



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



LEILANE ESTEVAM LEAL

**Estudos Genéticos e Agronômicos em espécies de
Jatropha da Caatinga.**

Feira de Santana, BA.
2015

LEILANE ESTEVAM LEAL

**Estudos Genéticos e Agronômicos em espécies de
Jatropha da Caatinga.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana para a obtenção do Título de Doutorado em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cássio van den Berg.

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro.

Feira de Santana, BA.
2015

À Karine Dantas (*in memorian*), pela amizade sincera,
pelos momentos vividos, pelo companheirismo e
alegria.

AGRADECIMENTOS

“Gratidão” é a palavra que define todo o misto de sentimentos que tomam conta de mim à medida em que reflito sobre a minha longa caminhada para chegar até aqui. Por isto, tenho muito a agradecer....

Em primeiro lugar à **Deus** pela minha vida, pela saúde, pela força, e por ter me permitido completar esta jornada com perseverança e muita determinação.

A toda a minha **família**, em especial à minha vovó querida **Neide Monteiro** por todas as orações e amor devotado.

Aos meus pais **Nádia Maria e David Leal**, e ao meu irmão **Marcus Leal** por estarem por perto, me acolhendo com um abraço de alegria ou de consolo para superar os tropeços no caminho, e me encorajando a ser sempre e a cada dia um pouco melhor.

Ao meu esposo **Mauricio Valverde** que me deu colo, aconchego, compreensão e amor quando os dias e as noites no Laboratório ficaram longos demais, quando a saudade de casa apertava, e quando os dedos já calejados, não tinham mais forças para continuar e eu não podia parar.

Ao Prof. **Dr. Cassio van den Berg**, o qual tenho a honra de ser orientada, pela competência, compreensão e paciência. Este trabalho só foi possível porque tive um verdadeiro orientador e parceiro junto comigo, um exemplo de profissional que eu com certeza sempre irei me espelhar.

A todos os meus **Amigos da UNEB**, pelos lindos momentos vividos e pela amizade sincera e eterna, que se propaga até hoje de forma tão intensa e indescritível, em especial à **Claudia Gonçalves, Gérson Limoeiro, Jéssica Vasconcelos, Lilian Mascarenhas, Mateus Nascimento (in memoriam), Mônica Ramos, Rosângela Bispo e Yuka Fujiki**.

A todos os meus **Amigos de Doutorado**, pois coletivamente reunimos forças encorajando-nos uns aos outros, em especial à **Aline Bispo e Nilton César**, que me fizeram rir quando o desespero tomava conta e o tempo parecia não colaborar.

Aos bons e velhos amigos que acumulei ao longo de todos os anos da minha existência, em especial à Patricia Tanajura, Emanuelle Medeiros, Mirna Campos, Cinthia Simara, André Souza, Thaiane Oliveira, Valdiclea, e à minha cunhada Tarina Oliveira.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioproductos (**LBBB**), representados nas pessoas de **Cristiane Brito, Cimille Antunes, Marta Bruno, Daniele Takahashi**, da Coordenadora **Luzimar Gonzaga** e do meu Co-orientador, o Prof Dr. **Renato Delmondez**, os quais participaram decisivamente na minha formação enquanto pesquisadora e aonde fiz bons e velhos amigos, que sempre me acolheram e jamais esqueceram-se de mim.

Aos meus professores que me ensinaram sobre a vida para além dos livros, mostrando o sentido real do “educar”, do “cuidar” e da importância da afetividade nesse processo, em nome das queridas Maristela e Marilake Oliveira, Claudia Regina e Sandra Ribeiro.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (**UEFS**), pelos excelentes profissionais e pesquisadores, que representam uma grande família à qual tenho a honra de fazer parte desde o meu Mestrado.

À Universidade do Estado da Bahia (**UNEB**) que me proporcionou uma excelente Licenciatura, e para onde tenho o maior orgulho de hoje ser Professora. Agradeço também a todos os meus **alunos** que contribuíram direta ou indiretamente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, especialmente à **Olga Lara**, pela amizade, carinho e dedicação.

Ao Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (**LAMOL**) pela disponibilização de toda a estrutura e suporte necessários pelo desenvolvimento das minhas pesquisas; aos funcionários e amigos, em especial à **Ariane Barbosa, Maria Cristina e Uiara Catharina** que não mediram esforços para me auxiliar nos momentos mais difíceis, compartilhando suas experiências e “acendendo luzes” quando tudo parecia escuridão.

Aos Laboratórios de Pesquisa em Microbiologia (**LAPEM**), de Biologia Molecular (**BIOMOL**), e de Entomologia (**LENT**), nas pessoas dos queridos professores **Aristóteles Neto e Eddy Francisco**, e dos amigos **Matheus Batista e Marcelo Tomé**.

Aos **moradores** da região semiárida no Nordeste brasileiro, que cederam os seus quintais e jardins, sorrisos e boas conversas, para as coletas de material biológico.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram, torceram, vibraram e me acompanharam na batalha pela conquista deste grande sonho: enfim, este dia chegou.

Muito Obrigada.

“O futuro pertence aqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt.

RESUMO

A Caatinga na porção semiárida do Nordeste brasileiro é o único bioma exclusivamente brasileiro, e contém uma comunidade de espécies bem adaptadas às condições extremas, incluindo espécies endêmicas. O gênero *Jatropha* (Euphorbiaceae) possui ampla distribuição nesta região, porém é muito pouco estudado em relação à diversidade e possíveis relações entre a geografia e padrões de genética populacional. Dessa maneira, os objetivos centrais deste trabalho estão no âmbito da criação, caracterização e manutenção de um Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de espécies de *Jatropha* da Caatinga, identificação de marcadores moleculares plastidiais e nucleares para estudos em *J. mollissima*, além da caracterização da diversidade e filogeografia da mesma espécie. Para tanto, foram utilizadas análises biométricas no BAG, estudos de diversidade genética e de polimorfismos em diferentes classes de marcadores (Single-Sequence Repeats-SSRs, sequências do ITS-Internal Transcribed Spacer) e DNA plastidial), análise da estrutura populacional, e estudos incluindo datação molecular e inferências demográficas. O presente trabalho representa um avanço nas pesquisas com populações naturais por ser primeiro estudo de filogeografia utilizando uma espécie endêmica das zonas baixas do bioma Caatinga. Por isto espera-se que os resultados aqui apresentados possam servir de base para uma melhor compreensão dos padrões de colonização, dispersão e diversificação de *J. mollissima*, além de servir como exemplo de como ferramentas moleculares podem auxiliar na busca pela história demográfica de espécies amplamente distribuídas do bioma. Também inclui uma iniciativa concreta de conservação *ex situ* da riqueza genética do gênero.

Palavras-chave: pinhão bravo, Caatinga, semiárido, banco de germoplasma, diversidade genética, cpDNA, nDNA, filogeografia.

ABSTRACT

The Caatingas in the semiarid portions of Northeast Brazil are the only exclusively Brazilian biome, and it contains a species community adapted to extreme conditions, including several endemic species. The genus *Jatropha* (Euphorbiaceae) presents a wide distribution in this region, but lacks studies regarding the genetic diversity and relationships between geography and population genetic patterns. For this reason, the main objectives of the present work are the creation, characterization and maintenance of Active Germplasm Bank (AGB) of *Jatropha* species from the Caatinga, identification of plastid and nuclear molecular markers for studies in *J. mollissima*, as well as the characterization of the genetic diversity and phylogeography of the latter species. For this purpose, biometric analyses were carried out in the AGB, genetic diversity studies and polymorphisms were studied with different classes of markers (Single-Sequence Repeats-SSRs and DNA sequences of the Internal Transcribed Spacer-ITS and plastid DNA), analysis of population structure, molecular dating and demographic inferences. The present work represents an advance in the research on plant natural populations because it is the first study of a lowland widespread plant species in the Caatingas. For this reason, we expected that its results can serve as a basis for a better understanding of the patterns of colonization, dispersal and diversification of *J. mollissima*, as well as a first example of how molecular tools can assist in the search for demographic history of the widespread species in this biome. It also includes a concrete action to build an *ex situ* conservation of this important genus.

Keywords: Caatinga, semiarid, germplasm bank, genetic diversity, cpDNA, nrDNA, phylogeography.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

Introdução Geral	01
Banco de Germoplasma de <i>Jatropha</i> L.: implantação e caracterização morfoagronômica com vistas ao melhoramento genético.....	03
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAIS E MÉTODOS	07
3. RESULTADOS	09
4. DISCUSSÃO	14
5. REFERÊNCIAS	17
Identificação e Caracterização de Marcadores Moleculares Informativos para Estudos Populacionais e Evolutivos em <i>Jatropha mollissima</i> (Pohl) Baill	22
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3. RESULTADOS	30
4. DISCUSSÃO	33
5. REFERÊNCIAS	39
Diversidade e Filogeografia de uma espécie endêmica da Caatinga (<i>Jatropha mollissima</i> Pohl Baill), região semiárida no Nordeste do Brasil	42
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3. RESULTADOS	55
4. DISCUSSÃO	73
5. REFERÊNCIAS	88
Conclusão Geral	98

Introdução Geral

Diversas espécies de *Jatropha* são reconhecidas pelo seu uso medicinal, ornamental e como cercas vivas (LEAL e AGRA, 2005; HELLER, 2006), e nas ultimas décadas, espécies como *Jatropha curcas* L. e *Jatropha mollissima* Pohl Baill vêm despertando o interesse do setor bioenergético (SILVA e TARGINO, 2013) pelas características físicoquímicas do óleo de suas sementes (TEIXEIRA, 1987), ideais para a fabricação de biocombustíveis (LIMA et al., 2012).

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são uma excelente alternativa para a conservação dos recursos genéticos vegetais, pois mantém a variabilidade genética parcial de acordo com o interesse dos programas de pesquisa, tendo por finalidade o enriquecimento da variabilidade, conservação, caracterização e avaliação; a conservação *ex situ* das coleções de germoplasma é a mais utilizada para manter a variabilidade genética da espécie fora de seu habitat natural (FAIAD et al., 2001).

Nos organismos eucariotos, o material genético encontra-se localizado no núcleo e em espécies vegetais, podem estar distribuídos em organelas como mitocôndrias e plastídios (CALSA JR et al., 2004). Os cloroplastos possuem genoma próprio, em forma circular, independente do genoma nuclear, e contém regiões bem conservadas, e muitos estudos de variabilidade genética utilizam cpDNA(DNA cloroplastidial) para avaliar as relações filogenéticas entre plantas estreitamente relacionadas, sobretudo, espécies dentro de um mesmo gênero

(COMES e ABBOTT, 2001; CHEN et al., 2014; MENG e ZHANG, 2013; MIGLIORE et al., 2015).

A filogeografia, enquanto estudo dos princípios e variáveis que edificam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, tem como principal objetivo compreender os processos que modulam as variações genéticas intra e interespecífica (AVISE et al., 1987; MARTINS e DOMINGUES, 2011).

Estudos filogeográficos podem nos dar algumas respostas de como as influências ambientais, os fatores geográficos e os eventos geológicos podem determinar a evolução de dada espécie (KNOWLES, 2009), o que pode auxiliar na reconstrução da história demográfica em uma região, sendo a Caatinga, um bioma que de uma forma geral, carece de estudos biogeográficos (MARTINS e DOMINGUES, 2011) com ênfase principalmente em espécies vegetais que habitam o bioma.

Nesse sentido, os principais objetivos do presente trabalho são produzir e caracterizar um Banco Ativo de Germoplasma de *Jatropha*; avaliar a possibilidade de geração de híbridos interespecíficos no gênero; selecionar marcadores de DNA informativos para estudos de diversidade em *J. mollissima* e discutir os padrões filogeográficos desta espécie a partir de informações sobre a variabilidade plastidial e nuclear.

Capítulo 1: Banco de Germoplasma de *Jatropha* L.: Implantação e Caracterização Morfoagronômica Visando o Melhoramento Genético.

LEAL, Leilane E.

DE CASTRO, Renato D.

VAN DEN BERG, C.

1 INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae comprehende espécies vegetais distribuídas por todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (WEBSTER, 1994a), possuindo representantes em diferentes tipos de vegetação no território brasileiro. O gênero *Jatropha* possui ampla distribuição, com espécies ocupando condições edafoclimáticas bem diferenciadas. Sátiro e Roque (2008), estudando a ocorrência de espécies de *Jatropha* no semiárido brasileiro, identificaram a abundante frequência de três espécies nativas: *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill, *Jatropha mutabilis* (Pohl) Baill e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill.

A espécie *Jatropha curcas* L. destaca-se pelo teor de óleo de suas sementes, pela aparente rusticidade e tolerância a condições de estresses abióticos (CARVALHO et al., 2009a), com grande potencial na produção de óleo biocombustível e desenvolvimento da agricultura familiar (TOMINAGA et al., 2007), porém ainda não está claro se ela atende aos quesitos essenciais para que seu óleo substitua os combustíveis fósseis como a produção de material

bruto renovável e se a sua utilização terá um menor impacto negativo sobre o meio ambiente (ACHTEN et al., 2008).

Jatropha mollissima, popularmente conhecida como pinhão bravo, é reconhecido pelo seu uso medicinal secular, difundido através de tradição cultural empírica (VASCONCELOS et al., 2014). É uma espécie nativa do nordeste Brasileiro, mais especificamente da Caatinga e outras regiões secas do nordeste do Brasil e Minas Gerais, sendo adaptada a alta evaporatividade e baixo potencial hídrico (SÁTIRO e ROQUE, 2008), mas apesar da sua ampla utilização na medicina popular local, os dados sobre a espécie se restringem a registros em estudos florísticos e fitossociológicos (MARACAJÁ et al., 2003; SANTANA e SOUTO, 2006; SÁTIRO e ROQUE, 2008; NEVES et al., 2010).

A espécie *J. ribifolia* ou pinhãozinho como é conhecida na região semiárida, é largamente empregada na medicina popular no Nordeste do Brasil, possuindo indicações terapêuticas e anti-inflamatórias, sendo o látex utilizado como antiofídico, enquanto suas sementes são comercializadas para extração de óleos fixos (LEAL e AGRA, 2005).

Devido à fácil propagação de suas sementes, espécies como *Jatropha gossypiifolia* L. (pinhão roxo) têm sido cultivadas em várias partes do mundo, principalmente na África, com fins ornamentais e/ou como cercas vivas (BATISTA et al., 2014). *Jatropha gossypiifolia* é uma planta cosmopolita bastante utilizada no tratamento de várias doenças como planta medicinal, em decorrência da sua capacidade antiinflamatória e em algumas regiões do Brasil, é ainda usada de forma ritualística por ser considerada venenosa (SERVIN et al., 2006).

Jatropha mutabilis, *J. ribifolia*, e *J. mollissima* são endêmicas da região semiárida do Nordeste brasileiro (OLIVEIRA, 2011), sobretudo nos estados da Bahia e Alagoas, morfologicamente diferenciada pela sua lâmina foliar orbicular inteira e arredondada (WEBSTER, 1994b).

Com o crescente aumento da erosão dos recursos genéticos vegetais, uma grande preocupação é o estreitamento da base genética do gênero *Jatropha*, em decorrência da redução ou até mesmo com a perda da variabilidade genética de espécies cultivadas e seus parentes silvestres, bem como de variedades locais (CARVALHO et al., 2009b). A conservação de germoplasma de espécies-alvo em coleções necessita ser estimulada, a fim de se ter o potencial genético explorado e para isto, a implantação e manutenção de coleções em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) têm sido amplamente utilizadas (GIMENES e BARBIERI, 2010).

Um BAG amplo e abrangente é de extrema importância para pesquisas genéticas, estudos filogenéticos e para o conhecimento e avaliação da variabilidade genética disponível no gênero *Jatropha* e seu potencial de melhoramento. Contudo, atualmente no Brasil, a realidade é que se encontram estabelecidos diversos BAGs de *J. curcas*, a exemplo da Embrapa Meio-Norte, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas (CBQA) da UNICAMP, Banco da Universidade Federal de Sergipe (UFS), BAG do Instituto Agronômico (IAC) em São Paulo, Embrapa Agroenergia e Embrapa Cerrados em Planaltina, Universidade Federal do Recôncavo Baiano- UFRB, EPAMIG- Nova Porteirinha, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Universidade Federal de Lavras (UFLA) e Universidade Federal de São Carlos (UFSC), contudo outras espécies do gênero adaptadas à região semiárida não estão representadas,

sendo pouco investigadas e onde não se têm relatos de cultivo, conservação e manutenção em bancos de germoplasma específicos.

Diante da necessidade de exploração e enriquecimento da base genética do gênero *Jatropha*, o objetivo do presente trabalho é implantar um BAG *ex situ* contendo diferentes espécies do gênero com vistas ao incentivo e/ou fortalecimento de programas de melhoramento, além de avaliar a possibilidade de geração de híbridos interespecíficos utilizando espécies correlatas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas expedições nas localidades de Alagoinhas, Feira de Santana, Lençóis, Milagres e Rafael Jambeiro no estado da Bahia, onde foram realizadas as coletas de estacas (Figura 1a e 1b). As estacas foram coletadas de ramos secundários, preferencialmente localizadas próximos aos ramos primários, medindo aproximadamente 1cm de diâmetro e 30cm de comprimento em plantas adultas (LIMA et al., 2010; ANDRADE et al., 2003).

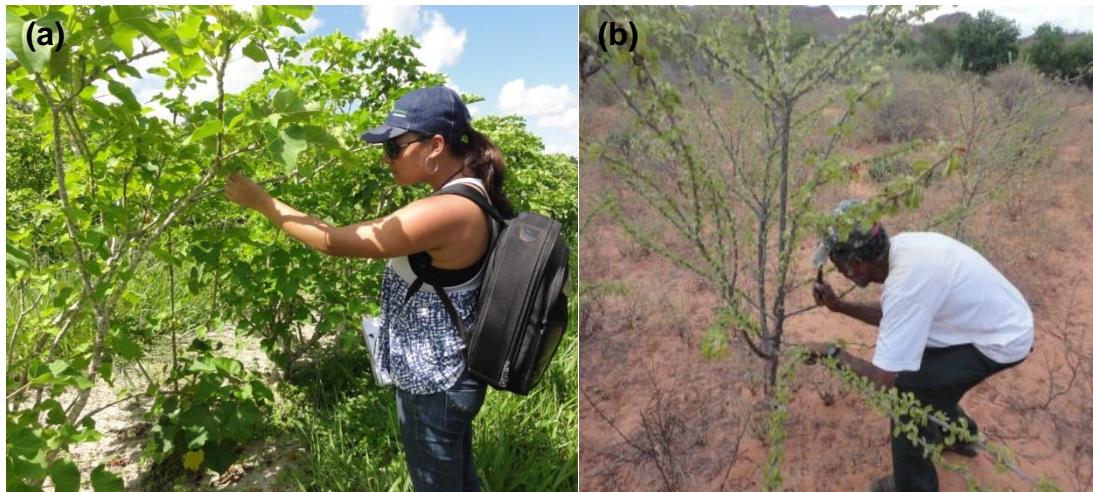


Figura 1: Coleta de estacas de (a) *Jatropha curcas* em Alagoinhas-BA e de (b) *Jatropha mutabilis* em Canudos- BA.

Os cortes foram feitos na base das estacas, em forma de bisel, em um ângulo de aproximadamente 45° com o auxílio de uma tesoura de poda, conforme sugerem Lima et al. (2010). Após a segmentação dos ramos e obtenção das estacas, a zona de excisão foi recoberta com algodão umedecido em água e estas foram embaladas em papel tipo jornal (PIO et al., 2007) para manter os tecidos hidratados até a chegada ao local de plantio (Figura 2).



Figura 2: Estacas de *Jatropha mollissima* recém-coletadas e recobertas com algodão antes do plantio.

As estacas foram plantadas na casa de vegetação da Unidade Experimental Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana- UEFS (Lat 12°14'21"/ Long 38°58'46") na cidade de Feira de Santana-BA localizada no semiárido baiano (Tabela 1), em sacos plásticos medindo 15x25 cm contendo uma mistura de 2/3 de compostagem, 1/3 de terra de formigueiro e 1L de adubo supersimples. As estacas foram colocadas a 5 cm de profundidade no sentido base ápice (LIMA et al., 2010), sendo irrigadas a cada 3 dias durante seis meses, e após esse período, as mudas foram transplantadas para covas de 20x20 cm contendo esterco bovino e espaçamento 2x2m em uma área no Horto da UEFS, destinada à criação do banco de germoplasmas de *Jatropha* (Figura 3); ao todo foi realizado o plantio de 136 mudas, entre as quais 20 de *J. mutabilis*, 21 de *J. ribifolia*, 23 de *J. mollissima*, 10 de *J. gossipyifolia* e 62 de *J. curcas*.



Figura 3: Plantio de mudas de *Jatropha* no BAG.

Tabela 1: Locais de coleta e quantidade de indivíduos coletados das espécies *Jatropha mutabilis*, *Jatropha mollissima*, *Jatropha ribifolia*, *Jatropha gossypiifolia* e *Jatropha curcas* para compor o BAG de *Jatropha*.

Espécie	Local da Coleta	Coordenadas	Qtd de indivíduos
<i>J. mutabilis</i>	Canudos-BA	- 09° 53' 48" - 39° 01' 35"	20
<i>J. mollissima</i>	Rafael Jambeiro-BA	-12° 24' 29" -39° 08' 02"	15
	Milagres-BA	-12° 49' 17" -39° 53' 16"	08
<i>J. ribifolia</i>	Milagres-BA	-12° 49' 17" -39° 53' 16"	10
	Rafael Jambeiro-BA	-12° 24' 29" -39° 08' 02"	11
<i>J. gossypiifolia</i>	Lençóis-BA	-12° 33' 47" -41° 23' 24"	10
<i>J. curcas</i>	Alagoinhas-BA	-12° 10' 46" -39° 24' 56"	32
	Feira de Santana-BA	-12° 16' 14" -38° 56' 15"	30
TOTAL			136

Para a caracterização do banco de germoplasma, foram feitas avaliações dos indivíduos de todas as espécies-alvo em dois períodos distintos: a primeira com 1 ano, e a segunda, com 3 anos após o plantio. As variáveis biométricas analisadas foram altura e largura da copa, diâmetro do tronco e número de ramos primários e secundários e a Análise de Variância (ANAVA) estimada com o Sisvar 5.3 (FERREIRA, 1999).

Para a avaliação da possibilidade de geração de híbridos, as anteras das flores masculinas foram levemente encostadas nos estigmas de flores femininas receptoras(Figura 4), para que os grãos de pólen se soltassem e aderissem à superfície; as flores femininas foram selecionadas com base na integridade física da estrutura no estágio inicial de abertura da corola (PEREIRA et al., 2003; JUHÁSZ et al., 2009).



Figura 4: Processo de polinização manual de flores masculinas de *Jatropha mollissima* e flores femininas de *Jatropha curcas*.

Para garantir a exclusividade da polinização manual, as flores femininas selecionadas para o experimento foram recobertas por sacos de tecido durante todo o processo (SANTOS et al., 2010), e após 15 dias, a possível formação inicial de frutos foi avaliada. Ao todo, foram realizadas 378 polinizações manuais utilizando flores de *J. curcas* como doadoras e receptoras de pólen de *J. mollissima*, *J. ribifolia* e *J. gossypiifolia*, dos exemplares do BAG de *Jatropha*.

3 RESULTADOS

Os indivíduos das espécies *J. curcas*, *J. mollissima*, *J. gossypiifolia* e *J. ribifolia* coletados compõem o Banco de Germoplasma de *Jatropha* da Universidade Estadual de Feira de Santana, que conta com um total de 105 mudas em campo, oriundas de propagação vegetativa por estacaia, o que revela a perda de 31 indivíduos (Figura 5).



Figura 5: Espécies que compõem o BAG de *Jatropha*.

A espécie *J. mutabilis*, endêmica do semiárido nordestino e que apresenta características fenotípicas bem divergentes das demais, teve um índice de pegamento das estacas de 0% (Figura 6), ou seja, foram perdidas todas as 20 mudas transplantadas, mesmo após efetuadas 4 tentativas de replantio das mudas. Dessa forma, esta espécie é a única que não compõe o BAG de *Jatropha*, já que todas as demais foram plantadas utilizando-se técnicas de estacaia.



Figura 6: Estacas de *Jatropha mutabilis* sem emissão de brotos 12 dias após plantio.

Nas demais espécies, após o plantio das estacas no campo, as plantas desenvolveram-se bem no campo sem infestação de pragas e sem a necessidade do uso de qualquer tipo de defensivo agrícola, nem de práticas de manejo das culturas como poda e irrigação. Periodicamente, foi realizada a limpeza da área com capina superficial nas zonas de intersecção entre as fileiras das mudas e nas áreas de acesso ao BAG.

A partir da coleta de dados biométricos obtidos 1 e 3 anos após o plantio das mudas(Tabela 2 e Tabela 3 respectivamente), foi possível verificar que os indivíduos das espécies-alvo apresentam crescimento e desenvolvimento em ascensão, mesmo após os regimes de seca e déficit hídrico que acometem a região.

Tabela 2: Caracterização biométrica dos indivíduos de diferentes espécies que compõem o BAG *Jatropha* 1 ano após o plantio, onde N é o tamanho amostral de cada espécie. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade segundo teste Scott-Knott.

Biometria do BAG <i>Jatropha</i>				
	<i>J. curcas</i>	<i>J. mollissima</i>	<i>J. gossypiifolia</i>	<i>J. ribifolia</i>
N	62	23	10	21
Altura (m)	0,72 a	0,82 a	0,75 a	0,87 a
Largura (m)	0,55 a	1,24 b	0,51 a	0,61 a
Diâmetro do tronco (cm)	0,09 a	0,09 a	0,08 a	0,04 a
Ramos primários	1,00 a	1,55 b	1,13 a	1,24 a
Ramos secundários	1,30 a	4,36 b	3,80 a	2,76 a

Tabela 3: Caracterização biométrica dos indivíduos de diferentes espécies que compõem o BAG *Jatropha* 3 anos após o plantio, onde N é o tamanho amostral de cada espécie. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade segundo teste Scott-Knott.

Biometria do BAG <i>Jatropha</i>				
	<i>J. curcas</i>	<i>J. mollissima</i>	<i>J. gossypiifolia</i>	<i>J. ribifolia</i>
N	60	19	11	15
Altura (m)	1,81 a	2,83 a	2,24 a	1,63 a
Largura (m)	1,22 a	2,14 b	1,24 b	1,26 b
Diâmetro do tronco(cm)	7,67 a	12,14 b	10,91 b	6,50 a
Ramos primários	2,55 a	2,36 a	2,91 a	2,00 a
Ramos secundários	4,64 c	5,57 c	4,36 b	2,63 a

Os dados obtidos a partir da caracterização biométrica das mudas nos permitem observar que levando em consideração a altura, *J. ribifolia* foi a que mais cresceu no primeiro ano, o mesmo não ocorrendo no terceiro ano, onde a espécie apresenta a menor taxa de crescimento; vale ressaltar que a variável Altura em todas as espécies e em ambos os períodos de análise (1 e 3 anos) não diferiu estatisticamente segundo a ANAVA. Em contrapartida, no terceiro

ano, em *J. mollissima* verifica-se os maiores valores de crescimento em altura e largura, associada à maior quantidade de ramos secundários, sendo superada apenas por *J. gossypiifolia* no quantitativo de ramos primários.

Com base nas condições às quais foram conduzidos os experimentos de avaliação da possibilidade de geração de híbridos no gênero *Jatropha*, 15 dias após as polinizações manuais, não foi possível verificar a formação de frutos em nenhuma das espécies utilizadas nos cruzamentos interespecíficos.

Cumprindo um dos diversos objetivos centrais no qual a criação e manutenção dos Bancos de Germoplasma se propõe, o BAG de *Jatropha* vem servindo como fonte de material para pesquisas de estudantes e pesquisadores, inclusive de outras instituições de ensino superior, com enfoque nas áreas de Biotecnologia, Fisiologia e Ecologia, o que por si só já representa um grande avanço no conhecimento das particularidades do gênero.

A partir da formação do Banco, foram aglutinadas algumas parcerias à UEFS, como a Universidade do Estado da Bahia (UNEB)- Campus II e a Universidade Federal da Bahia (UFBA), que no ano de 2012, iniciaram um trabalho em conjunto no BAG avaliando a possibilidade de geração de híbridos interespecíficos de *Jatropha*.

4 DISCUSSÃO

A possibilidade de conservação de materiais biológicos através da implantação de bancos de germoplasma apresenta-se como uma proposta viável e concreta para a conservação de espécies vegetais, principalmente aquelas que detêm base genética pouco variável, como é o caso de *J. curcas* (ROSADO et al., 2009). A formação do BAG, nesse caso, mais do que agrupar materiais diversos da mesma espécie, teve como foco reunir a variabilidade disponível em espécies congêneres e correlatas, ideais para agregar características interessantes para programas de melhoramento genético.

Os principais métodos para a produção de mudas de pinhão-manso são por semeadura direta, plantio de mudas originadas de sementes ou por propagação assexuada (OPENSHAW, 2000). Mudas produzidas por sementes apresentam variações quanto às suas características devido ao desenvolvimento da espécie em uma vasta gama de condições climáticas, com diferenças marcantes na pressão de seleção (GINWAL et al., 2005).

Quanto ao desenvolvimento das espécies em campo, foi possível verificar que *J. curcas*, *J. gossypiifolia*, *J. mollissima* e *J. ribifolia* podem ser propagadas vegetativamente com bastante facilidade, mesmo em terrenos sem irrigação e com pouca disponibilidade hídrica, o que não ocorreu com *J. mutabilis*, demonstrando a dificuldade de enraizamento intrínseca da espécie, mesmo considerando que o plantio ocorreu em época desfavorável, antes do período chuvoso na região.

A partir da observação das mudas, é possível indicar que a principal razão para o insucesso da propagação vegetativa de *J. mutabilis* tenha sido a falta de

enraizamento, já que não foram observadas emissões primárias tão pouco secundárias. Contudo, não há relatos na literatura a respeito dos possíveis métodos de propagação de *J. mutabilis*, nem se fitormônios seriam indicados para impulsionar os mecanismos de enraizamento nesta espécie.

Em *J. curcas*, o efeito dos promotores de enraizamento em estacas já foi alvo de diversos estudos, sendo os promotores mais utilizados os ácidos indolacético, naftaleno acético e indolbutírico, além da vitamina B1- a tiamina (KOCHHAR et al. 2008; NOOR CAMELLIA et al., 2009; DHILLON et al., 2011). Silva et al. (2008) por exemplo, obtiveram índices satisfatórios de enraizamento utilizando-se estacas lenhosas sem a utilização de nenhum tratamento, ocorrendo inclusive uma queda no potencial de enraizamento das estacas com a aplicação de concentrações de auxina, o que reduziria os custos, facilitando a propagação vegetativa da espécie em grande escala.

À despeito dos cruzamentos interespecíficos no gênero *Jatropha*, não há registros de tentativas de obtenção de híbridos de *J. curcas* com as espécies *J. mollissima* e *J. ribifolia* testados nesse estudo. No entanto, cruzamentos promissores entre *J. curcas* e *Jatropha integerrima* Jacq., *Jatropha multifida* L. e *Jatropha podagraria* Hook foram relatados por Laosatit et al. (2014) enquanto foram exitoso os cruzamentos entre *J. curcas* e *J. integerrima* por Sujatha e Prabakaran (2003). *Jatropha tanjorensis* J.L.Ellis & Saroja é relatada como um híbrido natural de *J. curcas* e *J. gossypiifolia* (PRABAKARAN e SUJATHA, 1999), não tendo tido sucesso no presente trabalho.

A análise filogenética das espécies de *Jatropha* utilizadas são relatadas mais detalhadamente no Capítulo 3 e revelam o potencial de *J. mutabilis* em

cruzamentos com *J. curcas*, devido à proximidade genética entre elas, o que não foi possível verificar neste trabalho devido ao insucesso na propagação da espécie por estaquia, sendo necessários portanto estudos posteriores para avaliação.

O presente trabalho de implantação do BAG de *Jatropha* no Campus da Universidade Estadual de Feira de Santana representa uma ação concreta na conservação do germoplasma disponível de algumas das mais diversas espécies que compõem o gênero e que podem agregar características morfoagronômicas, perfil fitoquímico e molecular interessantes para futuros programas de melhoramento genético ou simplesmente, poderá servir como campo de investigação para alunos e pesquisadores na avaliação da plasticidade fenotípica, mecanismos adaptativos e potencial farmacobotânico das espécies-alvo, por exemplo.

Estudos de variabilidade e diversidade genética intrapopulacional, além de pesquisas na área de Filogeografia vêm sendo realizadas desde a criação do BAG de *Jatropha*, utilizando-se *J. mollissima*, com o objetivo de compreender os padrões de distribuição da espécie na Caatinga e a sua interação com as características geomorfológicas deste bioma, e são descritos detalhadamente nos Capítulos 2 e 3.

O aumento da variabilidade e riqueza genética deverão ser o ponto de partida para atrair novas pesquisas e estudos nas mais diversas áreas de concentração, sobretudo no ramo da Biotecnologia, que poderão servir de base para a produção maciça de conhecimentos acerca de um gênero tão rico, mas tão pouco investigado e explorado com o *Jatropha*. A manutenção e a

ampliação da coleção disponível no BAG deverá ser um processo continuo de introdução de novos materiais, de forma a ter o potencial genético do gênero explorado e bem representado.

5 REFERÊNCIAS

- ACHTEN, W.M.J. et al. *Jatropha bio-diesel production and use.* Biomass & Bioenergy 32, 1063–1084. 2008.
- ANDRADE, F.P de. et al. **Preparo e Acondicionamento de Estacas de Algodoeiro para Plantio.** Comunicado Técnico 178 ISSN 0102-0099 Novembro/2003 Campina Grande, PB. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003.
- BATISTA et al. **Terpenoides e cumarinas de Jatropha ribifolia(Pohl) Baill.** Quím. Nova. vol. 37, n. 6. São Paul, jul. 2014.
- CARVALHO, B.C.L; LEITE. V.M; DOURADO, V.V. **Informações técnicas para o cultivo do pinhão-manso no Estado da Bahia.** Salvador: EBDA, 2009a, 79 p.il.
- CARVALHO, J. M. F. C. et al. **Perda e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2009b.
- DHILLON RS. et al. (2011) *Effects of auxins and thiamine on the efficacy of techniques of clonal propagation in Jatropha curcas L.* Biomass and Bioenergy, 3(5):1502-1510. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.12.017
- FERREIRA, D.F. **SISVAR - Sistema de análises estatísticas.** Lavras: UFLA. 1999.
- GIMENES, M. A; BARBIERI, R. L. **Manual de Curadores de Germoplasma - Vegetal: Conservação em BAGs.** Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.
- GINWAL, H. S. et al. *Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of Jatropha curcas Linn.* In Central India. Genética. 2005.
- JUHÁSZ. et al. **Biologia floral e polinização artificial de pinhão manso no norte de Minas Gerais.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.44, n.9, p.1073-1077, set. 2009.
- KOCHHAR, S; SINGH, S.P; KOCHHAR, V.K. *Effect of auxins and associated biochemical changes during clonal propagation of the biofuel plant - Jatropha curcas.* Biomass and Bioenergy, Oxford, v.32, n.12, p.1136-1143, dez. 2008.
- LAOSATIT et al. *Development of interspecific and intergeneric hybrids among jatropha-related species and verification of the hybrids using EST-SSR markers.* Plant Genetic Resources, 12p. 2014.

LEAL, C.K.A; AGRA M.F. **Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de Jatropha molissima (Pohl) Baill e Jatropha ribifolia (Pohl) Baill.** (Euphorbiaceae). Acta Farm Bonaerense 24: 5-13. 2005.

LIMA et al. **Avaliação do potencial fitorremediador da mamona (*Ricinus communis* L.) utilizando efluente sintético contendo chumbo.** Holos, Ano 26, Vol. 1. 2010.

MARACAJÁ, P. B. et al. **Levantamento florístico e fitossociológico do estrato arbustivo-arbóreo de dois ambientes na vila Santa Catarina, Serra do Mel, RN.** Revista de Biologia e Ciência da Terra, v.3, n.2, p.25-32, 2003.

NEVES, E.L ;FUNCH, L.S; VIANA, B.F. **Comportamento fenológico de três espécies de Jatropha (Euphorbiaceae) da Caatinga, semi-árido do Brasil.** Revista Brasileira de Botânica 33:155-166. 2010.

NOOR CAMELLIA N.A. et al. **Improvement on rooting quality of *Jatropha curcas* using indole butyric acid (IBA).** Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 5(4):338-343. 2009.

OLIVEIRA O.F. **Caatinga of Northeastern Brazil: Vegetation and Floristic Aspects.** In: Riet- Correa, F., Pfister, J., Schild A.L., Wierenga, T. (ed.), Poisoning by Plants, Mycotoxins and Related Toxins. CABI International, Wallingford, pp. 2-24.

OPENSHAW, K. **A review of *Jatropha curcas* L.: an oil plant of unfulfilled promise.** Biomass and Bioenergy, v. 19, p. 1–15, 2000.

PEREIRA et al. **Revista Brasileira de Fruticultura.** Efeito de horários de polinização artificial no pegamento e qualidade de frutos de pinha (*Annona squamosa* L.), 2003.

PIO et al. **Enraizamento de estacas juvenis do marmeiro 'Japonês' estratificadas a frio e tratadas com AIB.** Ciência e Agrotecnologia. Ciênc. Agrotec. vol.31 no.1 Lavras Jan./Feb. 2007.

PRABHAKARAN A.J, SUJATAHA M. ***Jatropha tanjorensis* a neutral interspecific hybrid occurring in Tamil Nadu India. Genetic Resources.** Crop E vol. 46: 213-218. 1999.

ROSADO, T. B. et al. **Avaliação da diversidade genética do banco de germoplasma de pinhão manso por marcadores moleculares.** Brasília: Embrapa Agroenergia, 2009. 16p. (Embrapa Agroenergia, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 1).

SANTANA, J. A. da S; SOUTO, J. S. **Diversidade e estrutura fitossociológica da caatinga na estação ecológica do Seridó, RN.** Revista de Biologia e Ciência da Terra, v.6, n.2, p.232-242, 2006.

SANTOS, A. S. et al. 2010. **Reunião Regional da SBPC no Recôncavo da Bahia.** Desenvolvimento de híbridos interespecífico de espécie silvestre de Manihot e variedades elites de mandioca.

SÁTIRO, L. N ;ROQUE, N. e Acta bot. bras. 22(1): 99-118. 2008.

SERVIN, S.C. et al. **Ação do extrato de *Jatropha gossypiifolia* L. (pião roxo) na cicatrização de anastomose colônica:** estudo experimental em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, v.21, n.3, p.89-96, 2006.

SILVA, S. G. A. et al. **Caracterização da diversidade de acessos de pinhão manso.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3. , 2008, Salvador. Anais...Salvador: Energia e Ricinoquímica, 2008. 1 CD-ROM.

SUJATHA, M; PRABAKARAN, A.J. **New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization.** Genetic Resources and Crop Evolution February, 2003, v. 50, pp 75-82.

TOMINAGA, N. et al. "Cultivo de pinhão-manso para produção de biodiesel". Viçosa-MG, CPT, 2007.220p.

VASCONCELOS, G.C.L. et al. **Caracterização morfológica de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.** Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. Revista Verde (Pombal - PB - Brasil), v. 9. , n. 3 , p. 263 - 268, jul-set, 2014.

WEBSTER, G.L. **Systematics of the Euphorbiaceae.** Annals of the Missouri Botanical Garden 81:1 144. 1994a.

_____. **Classification of the Euphorbiaceae.** Annals of Missouri Botanical Garden 81: 3-32. 1994b.

Capítulo 2: Identificação e Caracterização de Marcadores Moleculares Informativos para Estudos Populacionais e Evolutivos em *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.

LEAL, Leilane E.

DE CASTRO, Renato D.

VAN DEN BERG, C.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as regiões áridas, o Semiárido do Nordeste do Brasil é considerado a mais habitada do mundo, tendo formações vegetais predominantemente bem características que compõe a Caatinga, um bioma exclusivamente brasileiro (DRUMOND et al., 2008). Segundo Giulietti et al. (2006), das 154 famílias de Angiospermas reconhecidas no Semiárido nordestino, as famílias Fabaceae, Poaceae e Euphorbiaceae são as mais diversificadas representando juntas 28% da riqueza de espécies frequentes na região.

Apesar da sua ampla distribuição nos mais variados ambientes e do uso histórico na medicina popular, o gênero *Jatropha* é marcado pela escassez de informações básicas disponíveis a respeito das espécies que o compõem, os quais são essenciais para que se possa compreender a plasticidade fenotípica do grupo, sua variabilidade genética e seu potencial adaptativo, dentre outros atributos.

A espécie *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill é comumente encontrada em diversas regiões do nordeste Brasileiro, sendo nativa da caatinga e bem adaptada aos frequentes regimes de escassez hídrica (SÁTIRO e ROQUE, 2008).

Atualmente, tem-se à disposição na literatura apenas informações básicas a respeito de *J. mollissima*, voltadas quase que exclusivamente às suas características morfofisiológicas (VASCONCELLOS et al., 2014; LYRA et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2014), e farmacobotânicas (RIBEIRO et al., 2014; SOUZA et al., 2011). Não existem estudos que indiquem as relações filogenéticas dessa espécie e nem estudos com qualquer tipo de marcador molecular envolvendo *J. mollissima*.

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em diferentes espécies de oleaginosas, inclusive para o gênero *Jatropha* (ALMEIDA et al., 2009; LIRANETO, 2011). O seu uso no melhoramento de plantas é bastante amplo, pois permite a quantificação da variabilidade genética, a caracterização de germoplasmas, estudos de diversidade e distância genética e construção de mapas genéticos entre outros (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Os microssatélites apresentam-se no genoma de organismos eucarióticos como sequências simples repetidas (SSRs) e acredita-se que podem estar associados com a regulação da maquinaria gênica (LI et al., 2002; ZANE et al., 2002).

O espaçador ITS (*Internal Transcribed Spacer*) é uma das regiões nucleares mais utilizadas para estudos de plantas em baixos níveis taxonômicos, dada a sua herança biparental e rápida evolução (BUSO, 2005; ENGLUND et al., 2009; KIM et al., 2010), quando comparada a outras classes de marcadores, a exemplo das regiões plastidiais que possuem herança materna, características bastante relevantes em estudos evolutivos e de fluxo de pólen e sementes (ENNOS, 1994; PONS e PETIT, 1996).

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho é identificar segmentos plastidiais e nucleares potencialmente informativos para estudos filogenéticos e populacionais em *J. mollissima*, contribuindo para a ampliação do conhecimento sobre a espécie, com informações relevantes para programas de melhoramento genético.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram coletadas e armazenadas em gel de CTAB (VAN DEN BERG, 2005) folhas expandidas de 12 indivíduos, amostrados de forma a abranger a distribuição geográfica de *J. mollissima* no Nordeste brasileiro. As populações foram oriundas de diferentes regiões da Caatinga, conforme exibido na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização dos locais de coleta das 12 populações de *Jatropha mollissima* no semiárido nordestino.

População (P)	Locais de Coleta	Estado	Latitude	Longitude	Altitude(m)
1	Cipó	BA	-11.318	-38.747	132
2	Rafael Jambeiro	BA	-12.408	-39.134	238
3	Macambira	SE	-10.688	-37.684	282
4	Ilha do Rodeadouro	PE	-9.471	-40.605	353
5	Iati	PE	-9.172	-36.963	487
6	Catolé do Rocha	PB	-6.732	-37.878	272
7	Campina Grande	PB	-7.469	-35.763	551
8	Delmiro Gouveia	AL	-9.451	-38.422	256
9	São Jose do Campestre	RN	-6.329	-35.865	149
10	Goianinha	RN	-6.478	-35.077	19
11	Missão Velha	CE	-7.362	-39.233	360
12	Milagres	CE	-7.254	-39.859	323

Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento.

O DNA genômico foi extraído utilizando protocolo modificado descrito por Doyle e Doyle (1990). As modificações incluíram uma lavagem inicial com STE (Sacarose Tris-EDTA) para reduzir a quantidade de polissacarídeos e retirada do NaCl.

Para as regiões de plastídeo foram testados 11 marcadores (DEMESURE et al., 1995; SHAW et al., 2005; 2007; 2014) que encontram-se detalhadamente descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências de primers plastidiais e ITS utilizados no sequenciamento de populações de *Jatropha mollissima* na Caatinga.

Primer	Sequência (5'-3')
<i>psbJ-petA</i>	psbJ: ATA GGT ACT GTA RCY GGT ATT petA: AAC ART TYG ARA AGG TTC AAT T
<i>3'trnV-ndhC</i>	trnV ^{(UAC)x2} : GTC TAC GGT TCG ART CCG TA ndhC: TAT TAT TAG AAA TGY CCA RAA AAT ATC ATA TTC
<i>psbD-trnT</i>	psbD: CTC CGT ARC CAG TCA TCC ATA trnT ^{(GGU)-R} : CCC TTT TAA CTC AGT GGT AG
<i>trnQ- 5' rps16</i>	trnQ ^(UUG) : GCG TGG CCA AGY GGT AAG GC rpS16x1: GTT GCT TTY TAC CAC ATC GTT T
<i>3'rps16- 5' trnK</i>	rpS16x2F2: AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC trnK ^{(UUU)x1} : TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC
<i>rpl32-trnL</i>	trnL ^(UAG) : CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT rpL32-F: CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C
<i>trnS-trnG</i>	trnG ^(UUC) : GAA TCG AAC CCG CAT CGT TAG trnS ^(GCU) : AAC TCG TAC AAC GGA TTA GCA ATC
<i>rpl16 intron</i>	rpL16F: GCT ATG CTT AGT GTG TGACTC GTT G rpL16R: CCC TTC ATT CTT CCT CTA TGT TG
<i>psbA- trnH</i>	psbA: GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT trnH: CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC
<i>trnD-trnT</i>	trnD ^(GUC) : ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC trnT ^(GGU) : CCC TTT TAA CTC AGT GGT AG
<i>trnIC-trnID</i>	trnC: CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG trnD: GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC

As reações foram realizadas em um volume total de 10uL, utilizando o Kit de amplificação TopTaq Master Mix (Qiagen), enquanto para o par de iniciadores ITS (17SE: ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTCG e 26SE: TAGAATTCCCCGGTT CGCTGCCGTTAC), o volume total das reações foi de 15ul, com concentração final de 1x do tampão de reação, 2,5 mM MgCl₂, 171 mM dNTPs, 0,5 µM primers a 15pmol/ul cada, 1,25 unidades de Taq polimerase (Phoenix) e os aditivos betaina 1M, 1 µg BSA e DMSO (2%) e aproximadamente 2 ng do DNA genômico.

Para os testes com microssatélites, foram amostradas duas populações no estado da Bahia (P2 e P3), onde foram avaliados 49 locos (Tabela 3) referenciados na literatura e validados para *Jatropha curcas* L. (BRESSAN et al., 2012; PHUMICHAI et al., 2011; MAURYA et al., 2013), a fim de que se pudesse avaliar o potencial destes em estudos envolvendo *J. mollissima*.

Tabela 3: Caracterização dos marcadores microssatélites de *Jatropha curcas* testados em populações de *Jatropha mollissima*.

Locos	Forward	Reverse	Repetição	Amplifica
mJCENA41	CTTTCTTACCCCTCATCCTT	AAAGCCAGGACATACTTGAA	(AC) ₁₈	SIM
mJCENA47	GCCCGAGTTCTCTATAAGGT	CCAAGAGAAATTAGGAATGC	(GT) ₇ (GA) ₁₂	NÃO
mJCENA63	GCGTGGACTATCTCAACTTC	CTGATTACGCAATGGAACTA	(GA) ₁₇	NÃO
mJCENA87	ATCTGGAGTGAAACCAAAGA	CACATGGTAAGCATTACAAGC	(GT) ₁₅ (GA) ₈	NÃO
mJCENA106	AAGGACGCAGAAAGAGAACGTTG	TTTCGGAGGAGATGAAGAACG	(AGA) ₈	SIM
mJCENA108	GTGTGGTGCTTACCCCTATTT	GCCTCCTTTCTTTCTGTGTT	(GAA) ₁₀	NÃO
mJCENA110	GCGTAGAACACAGGAACATCA	ACTCTCAATGGTTGTTATGGGC	(GT) ₁₄	SIM
mJCENA111	AAGCCCAGTTGCTCATATTCAG	CAAGGCTAAAGATAGAACGGGA	(AT) ₆ (GT) ₆	SIM
JCT27ab	GCCATTAGAACGGACGGCTA	TGCGTGAAGCTTGATTGA	(CT) ₁₇	SIM
JCT31ab	TGGAAAACGAATGAGGCTCT	GGACACTCTGGAAAGGAACG	(TC) ₁₈	SIM
JCT34ab	TGACTCAATAATGTGGACTGG	GGTGCATTCCCAGAAAAAGT	(GT) ₁₆ ...(TA) ₉	NÃO
JCT59abc	GGTGACTIONCTGAATGCTGG	TACCCTGAAACTCCCAGGAA	(CT) ₁₀ (CA) ₁₄	SIM
JCT81abc	CCATTTAGAACCAACCAT	GATGTCCAATAAGCCTGAAT	(CT) ₁₈	NÃO
JCT3c	ATCTGCCATCAACCGTA	AACGCGTCACTAAGAGA	(AG) ₁₂	NÃO

JCT23c	ACCAGACCCAGGAAAAGGAC	TGTTGCTGTTGCATTTCTC	(GA) ₁₇	SIM
JCT28c	CGCAGCCATCTGAAGGTTA	CAAAATTCAAGCCATGCTC	(GA) ₁₅	NÃO
JCT36c	TTCTGATTGCCCTTATGT	GAAAATCGCAGAAAAGAAGA	(CT) ₁₈	NÃO
JCT51c	CATGGAATGCATTTGTGTGA	CCTTGACCTTCCTCCAACA	(GA) ₁₄	SIM
JCT76	ATTTGTTGCTGTGACTG	TCTCAGCTCTCATTTCAGGT	(AG) ₁₂	NÃO
JCT80	TCTCCATCCTGGAGTTCTA	TGCTGATAAACACAGATAAAC	(GA) ₁₇	NÃO
JCT86bc	TATTTCCCTTCCTGCACAT	GTTTGGCTAAAAGGTGATG	(GA) ₁₇	SIM
JCT89bc	GCCGATAAACACACAGATAAA	GAAAAATAAGCCAGCAAGA	(CT) ₁₆	NÃO
JCT103bc	CAACGACTCTTGAAGAAAAAA	GCCGATAAACACACAGATAAA	(AG) ₁₇	NÃO
JCT136	ATGAACCTGTAGTAGTGAGGA	GCCGATAGACCATAGACAAA	(AG) ₈ (TG) ₁₄	NÃO
JCT141c	TGTTAGTCAATGCAAGAAGGT	TTTGAAACAAGTTCCCTGCT	(GA) ₁₂	SIM
JCT60c	TTGGACAGGCTTTGTTGTG	GACAGTCAATATTAGGTACTTCAG	(CT) ₁₂	SIM
JCT17abc	TCTCTCATTGTTGCGCTGTC	TAACAAGTCCTCCCCCTCCT	(GA) ₆ ...(GA) ₁₁ (GT) ₂₁	SIM
JCT7c	CGAAGTGAATGCACAACACA	TGCTATTCAAATGGAACAAGTGA	(AG) ₁₁	NÃO
JM427851	TGACGGAAAGATAGAATAGTTGGAC	TGACATCACTGGCTACAGCA	(TA) ₇	SIM
JM427889	TCTGGCTTTCGCTCCTACC	CCCGTCTTCATTTCTTTCC	(CA) ₇	SIM
JM427915	TTCTGGCATTCACACACCTT	CATGGGAGGAAATAGGAGTAGG	(TG) ₁₇	SIM
JM427987	AAGGGATGTGACCTGCAAAT	CTGCCACCCATTCCATAATC	(TA) ₈	SIM
JM428009	GGCCCATCATTCCACAC	GGCTAGGACCCCTGATATTG	(AT) ₇	SIM
JM428024	CTGGATGATGACCCCTTCGT	GAACTGCAACCAACAAGCAG	(TA) ₉	SIM
JM428066	GGAGAGGGACGATAGGGAAG	TTGCATCCTCACAGCAAAC	(TA) ₈	SIM
JM428069	CATGACAACAGCCAAGAGAGA	GGGCAACCCAAACTAAACCTC	(TA) ₇	SIM
JM428072	TGCTATGCTTGCTGTGCTT	TCCTGCAACCTTAATCTGGG	(AT) ₈	NÃO
JM428169	TGAGGATAACCATCGGCTT	GGCAATTTCATGCGTAGGT	(TG) ₇	SIM
JM428206	TGGAAAATGGAAGCAAAGTG	TTCAGCCAGTTGGATTGTT	(CT) ₇	SIM
JM428391	CATTTTCTGCATAAGCATAACC	GAATAGAACTTTATAATTCAAGCCAATC	(AC) ₇	SIM
JM428397	TCATTGATCCAAGCGATTA	ACTTTGCCCGAGTAAGGTG	(AC) ₇	SIM
JM428435	TGTGATGTCGAGCAATGGTT	GCCGGTCAACTCTCTCTC	(AG) ₂₂ , (GTG) ₅	SIM
JM428446	GATCTGCTCAAACATGGGG	AGAACATGCAAACGTGGATT	(AT) ₉	SIM
JM428591	TAACCTCAACAGCATGAGCC	GCGTTCCATTAGTTCTTGA	(AT) ₂₁	SIM
JM428614	TTGTTCATGTTAACCTCTGACAAC	TGCAAGGAAGGGTCATCTTC	(AG) ₁₁	SIM
JM428661	TTACAGGGCAAGAGAGAGAAAAG	GTCGGTGAGGTGGCTAAAA	(AG) ₉	SIM
JM428663	AAACCTTTCCCTCTCGC	TCATGTCTGTTCACTCGCC	(GA) ₁₅	SIM
JM428775	AAGCCATAGCAACACTCCATC	CCAACCTTAATCACCGCCTCT	(TC) ₁₂	SIM
JM429009	AGGTAAAGGGTCTCCTTGG	TCCACCTCCCTCTCTCTTCTC	(AG) ₁₃	SIM

As reações de amplificação dos microssatélites foram realizadas com Taq Phoneutria (Invitrogen) em um volume final de 10uL, contendo 1uL de DNA diluído 1:10, água, tampão 10X (Tris-HCl 100 mM), MgCl₂, dNTPs e primer a 15pmol/uL; para a genotipagem dos loci SSR, durante a amplificação, foi

incorporada uma cauda da sequência M13 (5' CACGACGTTGTAAAACGAC 3') marcada com um dos quatro fluoróforos do sistema DS-33 da Applied Biosystems (6-FAM, VIC, NED e PET), segundo método desenvolvido por Schuelke (2000).

As reações de PCR foram realizadas utilizando programa *touchdown* começando com 94 °C por 3 min, seguido de 10 ciclos de 40s a 94°C; 40s em temperatura decrescente de 1°C a cada ciclo (de 60°C a 55°C), com extensão final de 72°C (30 min).

Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 1% com tampão Sódio Borato (BRODY e KERN, 2004) em cuba horizontal por 60min à 100V, 80W, em fonte eletroforética e fazendo uso do marcador 100pb Ladder (Invitrogen). O gel foi corado com Sybr Green (ZIPPER, 2004) e as bandas visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta (UV).

Os fragmentos amplificados foram purificados com precipitação por polietilenoglicol (PEG 8000 20%) e requantificados em NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Life), para mensurar a concentração de DNA em ng/uL em cada reação; os fragmentos de ITS e cpDNA(DNA plastidial) foram sequenciados bidirecionalmente com o kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) enquanto os SSR genotipados no sequenciador automático ABI3130 XL.

Em sua totalidade, as reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Escohealthcare (Swift Max Pro) em condições de PCR diferenciadas para cada região conforme exibe a Tabela 4, que indica as

temperaturas de desnaturação, amplificação e extensão utilizadas para cada par de primers, além do número de ciclos imposto na etapa de amplificação.

Tabela 4. Condições de PCR utilizadas para as regiões de DNA nuclear e DNA plastidial em 12 populações de *Jatropha mollissima*.

LOCOS	DESNATURAÇÃO	AMPLIFICAÇÃO	CICLOS	EXTENSÃO
<i>ITS</i>	94°C (3 min)	94°C(45s) + 54° (1 min) + 72°C (1min 30s)	28	72°C (7 min)
<i>psbJ-petA</i>	80°C (5 min)	94°C (45s) + 54°C (30s) + 72°C (1 min)	30	72°C (5 min)
<i>trnV-ndhC</i>	80°C (2 min)	95°C (1 min) + 50°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>psbD-trnT</i>	80°C (2 min)	95°C (1 min) + 50°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>trnQ-rps16</i>	80°C (2 min)	95°C (1 min) + 50°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>rps16-trnK</i>	80°C (2 min)	95°C (1 min) + 50°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>rpl32-trnL</i>	80°C (5 min)	95°C (1 min) + 51°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>trnS-trnG</i>	80°C (2 min)	95°C (1 min) + 50°C (1 min) + 65°C (4 min)	30	65°C (5 min)
<i>rpl16 intron</i>	80°C (2 min)	95°C (1 min) + 53°C (1 min) + 65°C (2 min)	30	65°C (5 min)
<i>psbA-trnH</i>	80°C (2 min)	95°C (1 min) + 53°C (1 min) + 65°C (2 min)	30	65°C (5 min)
<i>trnD-trnT</i>	80°C (5 min)	94°C (45s) + 54°C (30s) + 72°C (1 min)	30	72°C (5 min)
<i>trnIC-trnID</i>	94°C (3 min)	94°C (1 min) + 56°C (1 min) + 72°C (2 min)	35	72°C (10 min)

Análise dos Dados

Os eletroferogramas obtidos a partir das sequências de cpDNA e ITS foram editados e conferidos manualmente com o programa Pre-Gap 4 e Gap4 do pacote Staden (STADEN et al., 2000). A partir das sequências consolidadas obtidas por este processo, as matrizes foram construídas e alinhadas através do software MEGA 6 (TAMURA et al., 2013), seguidos de correção manual.

Os índices de diversidade tais como quantidade de sítios polimórficos, número de polimorfismos e quantidade de haplótipos gerados, foram calculados no software DnaSP 5.10 (LIBRADO e ROZAS, 2009).

As sequências obtidas a partir da genotipagem dos microssatélites foram processadas com o software GeneMarker (SoftGenetics), e os dados alélicos subsidiaram estimativas de diversidade genética no GenAIEx 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2009), que foram usadas para comparar a heterozigosidade esperada (H_e) com a observada (H_o), identificação dos alelos privativos e análise de desequilíbrio de ligação, além de demais dados referentes às frequências alélicas em cada locos.

3 RESULTADOS

Das onze regiões de plastídeo testadas, sete (*trnV-ndhC*, *psbD-trnT*, *trnS-trnG*, *rpl32-trnL*, *rpl16 intron*, *psbA- trnH* e *trnL intron*) foram amplificadas com sucesso, segundo condições específicas descritas anteriormente na Tabela 3. Destas, as quatro últimas apresentaram melhor qualidade nos padrões de amplificação e por isto foram sequenciadas, juntamente com o espaçador intergênico ITS; os parâmetros de polimorfismo observados para cada região com as análises do DnaSp encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de polimorfismo de regiões de DNA plastidial e nuclear em doze populações de *J. mollissima* na Caatinga, onde N é o tamanho amostral utilizado, (H) a quantidade de haplótipos, (π) a Diversidade Nucleotídica, e (Hd) representa a Diversidade Haplótípica observada em cada região.

Regiões de DNA					
	<i>trnH-psbA</i>	<i>rpl16 intron</i>	<i>rpl32-trnL</i>	<i>trnL intron</i>	<i>ITS4-ITS92</i>
N	12	12	12	12	12
Quantidade de Sítios	599	640	963	630	535
Nº de Sítios Polimórficos	15	12	38	1	9
H	11	10	11	2	6
Hd	0,985	0,955	0,985	0,167	0,682
π	0,0097	0,1649	0,0145	0,0003	0,0057

A análise das sequências obtidas nos permite inferir que em *J. mollissima*, o loco *rpl32- trnL* possui aproximadamente 850 pares de base (pb), enquanto

trnH-psbA possui 700 pb, *rpl16* intron 900 pb, e ITS com 800 pb, sendo *trnL intron* o menor deles, com 600 pb; para as análises, foram utilizados entre 535 a 963 de sítios em cada região, sendo *rpl32-trnL* aquela com o maior número de sítios polimórficos, e igualmente a *trnH-psBA*, gerou um total de 11 haplótipos em um conjunto de 12 populações.

Dos 49 marcadores nucleares SSR de *J. curcas* testados, 33 amplificaram para *J. mollissima* e 8 foram genotipados, sendo que destes, apenas 4 (*mJCENA41*, *mJCENA111*, *JCT31ab* e *JCT51c*) exibiram padrões polimórficos, enquanto *mJCENA106*, *mJCENA106*, *JCT141c* e *JCT60c* foram identificados como 100% monomórficos segundo análise do software GenAlex. Na Tabela 6 são informados os parâmetros de diversidade genética encontrados para cada um dos locos polimórficos nas duas populações testadas.

Tabela 6: Parâmetros de diversidade e polimorfismo de locos SSR testados em duas populações de *Jatropha molíssima* da região semiárida no estado da Bahia, onde (Na) é o nº de diferentes alelos, Índice de Shannon (I), Heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He), o Índice de Fixação (Fis), (Hw) probabilidade de Equilíbrio Hardy-Weingber e (σ) o desvio padrão.

Parâmetros de Diversidade									
Locos	Id. População	N	Na	I	Ho	He	Fis	Hw	
mJCENA 41	Pop2	12	4	1,332	0,833	0,726	-0,148	0,708*	
	Pop3	12	3	0,898	0,600	0,540	-0,111	0,687*	
mJCENA 111	Pop2	12	2	0,693	0,460	0,500	-1,000	0,157*	
	Pop3	12	2	0,693	0,462	0,500	-1,000	0,008**	
JCT 31ab	Pop2	12	2	0,693	0,465	0,500	-1,000	0,080*	
	Pop3	12	2	0,679	0,833	0,486	-0,714	0,317*	
JCT 51c	Pop2	12	4	1,186	0,722	0,660	-0,514	0,134*	
	Pop3	12	4	1,282	0,875	0,695	-0,258	0,357*	
Média			2,875	0,932	0,656	0,576	-0,593	0,306	
σ			0,990	0,29	0,181	0,100	0,390	0,267	

*não significativo; ** P<0,01

A partir das análises dos dados apresentados, é possível inferir que os quatro loci polimórficos analisados possuem média aproximada de 3 alelos para cada população, e heterozigosidade esperada e observada divergentes, sendo a primeira variando entre 0,4 a 0,7 e a segunda em uma faixa de 0,8 a 1,0.

O Índice de Shannon exibiu valor médio de 0,932, enquanto o Índice de Fixação (Fis) que mede o grau de endocruzamento nas populações, apresentou valores negativos em todos os loci testados neste estudo; a diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice de Shannon.

4 DISCUSSÃO

É de grande relevância o uso de sequencias de DNA cloroplastidial em estudos voltados para a filogeografia e evolução em vegetais, pois se baseiam em regiões intergênicas, onde a variabilidade genética é maior. Contudo, estudos baseados no plastoma das espécies de *Jatropha* são bastante escassos, sendo identificados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), o cpDNA completo de *J. curcas*, e pequenos segmentos do plastoma das demais espécies, a exemplo do espaçador *psbA-trnH* de *Jatropha gossypiifolia* L. e *Jatropha podagraria* Hook, mas até o momento não foram identificados quaisquer outros segmentos plastidiais de *J. mollissima* depositados em bancos de dados públicos.

A região ITS é uma das mais utilizadas para elucidar relações filogenéticas e taxonômicas entre diversos grupos, sobretudo em nível de gêneros e espécies. Sudheer Pamadimarri et al. (2009) investigando o gênero *Jatropha*, concluíram que regiões gênicas ribossomais podem contribuir para estudos que envolvam filogeografia, o que configura uma grande evolução nas hipóteses evolutivas com foco na família Euphorbiaceae.

Em um trabalho desenvolvido com Solanaceae, Mader (2008) obteve valores de diversidade divergentes aos encontrados nesse estudo, com Hd de 0,770 e $\pi=0,00376$ na região *trnH-psbA*, enquanto Blanco et al. (2007) encontrou Hd variando de 0,83 a 0,87 em populações naturais de *Annona crassiflora* Mart. Contudo, para uma interpretação precisa dos parâmetros de polimorfismo encontrados são necessárias análises suplementares que possam sustentar e

correlacionar a estrutura genética das populações com os padrões biogeográficos de colonização e adaptação da espécie. O presente estudo indica as regiões *psbA-trnH* e *rpl32-trnL* como as mais polimórficas para *J. mollissima*, sendo *trnL intron* a de menor variabilidade genética para a espécie, baseada nas populações amostradas no semiárido nordestino.

A caracterização da variabilidade genética de uma espécie é essencial para o sucesso de um programa de melhoramento genético. Em *J. curcas* existem diversos os trabalhos relatando a reduzida variabilidade genética observada em exemplares de todo o mundo (BRESSAN et al., 2012; SUN et al., 2008; SHEN et al., 2010; ROSADO et al., 2010), enquanto Ram et al. (2008) encontram elevada diversidade genética (ca. 80%) entre genótipos envolvendo diferentes espécies do gênero *Jatropha*, o que indica a necessidade de uma maior investigação no sentido de ampliar a base genética em programas de melhoramento genético, principalmente com espécies selvagens e endêmicas, potencialmente mais adaptadas às condições edafoclimáticas da região semiárida, a exemplo de *J. mollissima*.

A probabilidade de sucesso de uma amplificação heteróloga para uma sequência de DNA via PCR está inversamente relacionada a distância evolutiva entre duas espécies (ZUCCHI, 2003). No presente estudo, em um total de 8 loci SSR de *J. curcas* que amplificaram, encontramos 4 locos polimórficos (50%) nas duas populações de *J. mollissima* testadas, enquanto apenas um dos 17 SSR testados por Sun et al. (2008) foram polimórficos em espécimes de *J. curcas*.

Por outro lado, Bressan et al. (2012) testando 9 primers mjCENA desenvolvidos para *J. curcas*, obtiveram uma média de 5 alelos, onde no locos *mJCENA41* foi identificada a maior quantidade (8 alelos), sendo *mJCENA106* o de menor quantidade, com apenas 2 alelos, sendo identificados como monomórficos nas populações testadas neste estudo em *J. mollissima*. Obtivemos resultados similares a esse, à medida que o loci *mJCENA41* também se destaca com a maior quantidade de alelos observada($N_a= 4$), juntamente com *JCT51* com o mesmo valor. Já nos trabalhos realizados por Phumichai et al. (2011) investigando 55 primers para *Jatropha* denominados JCT (também utilizados aqui), relataram uma média de 2 a 5 alelos nos 55 loci SSR testados.

A quantidade expressiva de marcadores SSR desenhados para *J. curcas* e que, testados nesse estudo amplificaram para *J. mollissima*, indicam a eficácia de marcadores moleculares nucleares e plastidiais na detecção de polimorfismos, que mostraram-se informativos o suficiente para serem utilizados em trabalhos futuros envolvendo diversidade e variabilidade genética, estruturação populacional e filogeografia no grupo.

No trabalho supracitado de Bressan, foram encontrados 45 alelos com valores médios de heterozigose divergentes ($H_e=0,25$ e $H_o=0,43$) enquanto para *J. mollissima*, observou-se $H_e= 0,57$ e $H_o= 0,89$ aproximadamente. Os valores de heterozigosidade médias observadas foram maiores que as esperadas na grande maioria dos casos, evidenciando uma tendência de excesso de heterozigotos em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, (EHW).

São de extrema relevância os dados sobre heterozigosidade encontrados, pois, elevados níveis de variabilidade genética possibilitam a ocorrência de um grande número de novas combinações genotípicas, aumentando o potencial evolutivo das espécies, pela maior capacidade de adaptação às possíveis mudanças ambientais (SEBBENN et al., 2000). Em se tratando de espécies naturais, como é o caso de *J. mollissima*, os dados aqui obtido são de grande relevância, já que a maior arte dos trabalhos com *J. curcas* tratam-se de acessos propagados vegetativamente, e por isto, refletidos na base genética estreita observadas em diversos estudos (RAM et al., 2008; TATIKONDA et al., 2008).

Valores negativos para os índices de fixação foram observados e indicam ausência de endogamia nas populações conforme esperado, devido à ampla distribuição da espécie, o que reduz as taxas de endocruzamento. Isto diverge dos dados encontrados por Bressan et al. (2012) e Alves et al. (2015) que relatam altas taxas de cruzamento entre indivíduos de *J. curcas*.

Segundo Neves et al. (2011), *J. mollissima* e *J. mutabilis* (Pohl) Baill são espécies autocompatíveis, mas dependem de vetores de pólen, e por isto a xenogamia é o único modo de reprodução. Entretanto, isto não exclui a possibilidade de endogamia, já que seus principais polinizadores são as abelhas *Apis mellifera*, que tendem a se deslocar por indivíduos próximos (NEVES e VIANA, 2011).

Testes com espécies congêneres vêm sendo feitos, a exemplo de Basha e Sujatha (2009), que utilizaram *J. gossypiifolia* L., *J. maheshwari* Subram e *J.*

integerrima Jacq. com retrocruzamentos envolvendo *J. curcas* e obtiveram ganhos no teor de lipídios totais e tamanho médio das sementes. Contudo, não foram identificados cruzamentos interespecíficos utilizando *J. mollissima* na literatura.

A carência de estudos voltados para o entendimento da variabilidade nos genótipos específicos de *J. mollissima* existentes pode ser um grande fator limitante para a sua inserção em programas de melhoramento do pinhão manso, a partir de hibridação interespecífica, dada a proximidade genética entre as espécies e suas importantes características de adaptabilidade e resiliência às condições severas típicas do Nordeste brasileiro.

Após a análise dos marcadores nucleares e plastidiais utilizados neste trabalho, é possível inferir que os loci microssatélites mjCENA 41, mjCENA 11, JCT 31 e JCT51, o espaçador ITS e os loci *rpL32-trnL*, *trnH-psbA*, *rpL16 intron* são regiões de considerável polimorfismo para a espécie *J. mollissima*, com grande potencial para caracterização genética de populações naturais e bancos de germoplasma. Os resultados aqui apresentados indicam pela primeira vez na literatura, regiões de DNA informativas para a utilização em estudos genéticos com a espécie, permitindo o enriquecimento das informações disponíveis acerca do gênero *Jatropha*.

5 REFERENCIAS

- ALMEIDA, H.J.S. et al. Avaliação e Caracterização de genótipos superiores por marcador molecular, para obtenção de cultivar de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. 2009. Brasília. Anais... 2009.
- ALVES, P.F. et al. 2015. Sistema de reprodução em uma população base de *Jatropha curcas* L .Sci. For., Piracicaba, v. 43, n. 106, p. 427-434, jun.
- BASHA, S.D ; SUJATHA, M. *Genetic analysis of Jatropha species and interspecific hybrids between Jatropha curcas using nuclear and organelle specific markers*. Euphytica, v.168, n.2, p.197-214, 2009.
- BLANCO, A.J.V. et al. (2007). Diversidade genética em populações de *Annona crassiflora* (Mart.) via análise de cpDNA. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Disponível em:<http://www.redalyc.org/articulo_obra?id=253021631007>. Acesso em 03 de nov.2015.
- BRESSAN EDA; Scotton DC; Ferreira RR; Jorge EC, Sebbenn AM; Gerald LTS, et al. *Development of microsatellite primers of Jatropha curcas (Euphorbiaceae) and transferability to congeners*. American Journal of Botany. 2012;99:237–9.
- BRODY, J.R; KERN, S.E. 2004. *Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis* . BioTechniques, v. 36, n. 2.
- BUSO, G.S.C.2005. **Marcadores Moleculares e Análise Filogenética**. EMBRAPA- Recursos genéticos e Biotecnologia, 1^a ed.
- DEMESURE, B; SODZI, N;PETIT, R. J. (1995). *A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants*. Molecular Ecology, 4, 129–131.
- DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. 1990.
- DRUMOND, M. A. et al. **Produção e distribuição de biomassa de espécies arbóreas no semi-árido brasileiro**.Revista Árvore, v.32, n.4, p.665-669, 2008.
- ENGLUND, M., et al. 2009: *Phylogenetic relationships and generic delimitation in Inuleae subtribe Inulinae (Asteraceae) based on ITS and cpDNA sequence data*. –Cladistics. 25: 319-352.
- ENNOS, R. A., 1994 Estimating the relative rates of pollen and seed 90: 462–470.
Migration among plant populations. Heredity 72: 250–259.GIULIETTI, A.M; CONCEIÇÃO, A; QUEIROZ, L.P. 2006. **Diversidade e caracterização das**

fanerógamas do semi-árido brasileiro. Associação Plantas do Nordeste, Recife, v.1.

KIM, JOO-HWAN. et al. **Molecular phylogenetics of Ruscaceae sensu lato and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences.** *Annals of Botany*, v. 106, n. 5, p. 775-790, 2010.

LI, Y. C. et al. 2002. **Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review.** *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.

LIBRADO, P; ROZAS, J. **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics*. 2009;25:1451–1452.

LIRA-NETO A.de C. **Caracterização genética de espécies de Croton (Euphorbiaceae) ocorrentes no Nordeste brasileiro.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife: 2011.

LYRA, D. H; et al. **Pollen viability and germination in Jatropha ribifolia and Jatropha mollissima (Euphorbiaceae): Species with potential for biofuel production.** *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 10, n. 3, p. 368-374, 2011.

MADER, G. **Filogenia e Variabilidade Genética de Calibrachoa heterophylla (Sendtn.) Wijsman (Solanaceae).** 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MAURYA R. et al. (2013) **Microsatellite polymorphism in Jatropha curcas L.—a biodiesel plant.** *Ind Crop Prod* 49:136–142.

NEVES, E.L. das; MACHADO, I.C; VIANA, B.F. **Sistemas de polinização e de reprodução de três espécies de Jatropha (Euphorbiaceae) na Caatinga, semi-árido do Brasil1.** Revista Brasil. Bot., V.34, n.4, p.553-563, out.-dez. 2011.

NEVES, E.L; VIANA, B.F. 2011. *Pollination efficiency of Apis mellifera Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) on the monoecious plants Jatropha mollissima (Pohl) Baill. and Jatropha mutabilis (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) in a semi-arid Caatinga area, northeastern Brazil.* *Brazilian Journal of Biology* 71: 107-113.

PEAKALL R; SMOUSE, P. 2006. **Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research.** *Molecular Ecology Notes*. 288-295.

PHUMICHAI, C. et al. (2011). **Isolation of 55 microsatellite markers for Jatropha curcas and its closely related species.** *Biol. Plant.* 55(2):387-390

PONS, O; PETIT, R. J. 1995. *Estimation, variance and optimal Chapman & Hall, New York. sampling of gene diversity I. Haploid locus.* Theor. Appl. Genet.

RAM, G. et al. (2008). *Genetic diversity among Jatropha species as revealed by RAPD markers.* Genetic Resources and Crop Evolution, 55(6), 803–809.

RIBEIRO, A.R.C. et al. **Estudo da atividade anti-helmíntica do extrato etanólico de Jatropha mollissima (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) sob Haemonchus contortus em ovinos no semiárido paraibano.** Pesq. Vet. Bras. 34(11):1051-1055, novembro, 2014.

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.

SÁTIRO LN; ROQUE N (2008). **A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil.** Acta Botanica Brasilica 22 (1): 99–118.

SCHUELKE, M. 2000. *An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments.* Nature Biotechnology 18: 233-234.

SEBBEN, A.M. et al. **Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (Tabebuia cassinoides).** Scientia forestalis, n. 58, p.127-143, dez 2000.

SHAW J., et al. (2014). **Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in angiosperms: The tortoise and the hare IV.** American Journal of Botany.

VAN DEN BERG, Cássio. **Nota técnica:** Bancos de DNA de Plantas. 2005. Disponível em: <<http://www.researchgate.net/publication/228400642>>. Acesso em 16 de out de 2015.

SHAW, J. et al. *Comparison Of Whole Chloroplast Genome Sequences To Choose Noncoding Regions For Phylogenetic Studies In Angiosperms: The Tortoise And The Hare.* American Journal of Botany 94: 275–288. 2007.

SHAW, J; R. L. SMALL. 2005. *Chloroplast DNA phylogeny and phylogeography of the North American plums (Prunus subgenus Prunus section Prunocerasus, Rosaceae).* American Journal of Botany 92: 2011–2030.

SHEN J, et al. (2010). *AFLP analysis of genetic diversity of Jatropha curcas grown in Hainan, China.* Trees, 24: 455-462.

STADEN R; BEAL, K.F; BONFIELD, J.K. 2000. *The Staden package, 1998.* Methods in Molecular Biology 132: 115–130.

SUDHEER PAMIDIMARRI D. et al. (2009) ***Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of Jatropha curcas L. using RAPD, AFLP and SSR markers.*** Mol Biol Rep 36(6): 1357-1364.

SUN, Qi-Bao, et al. ***SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant in China.*** Crop Science 48.5 (2008): 1865-1871.

TAMURA, K. et al. ***MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.*** Mol. Biol. Evol. 30(12):2725–2729. Out, 2013.

VASCONELOS, G. C. L. et al. ***Caracterização morfológica de Jatropha mollissima (Pohl) Baill. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável.*** Revista Verde (Pombal - PB - Brasil), v 9. , n. 3 , p. 263 - 268, jul-set, 2014.

ZANE, L; BARGELLONI, L; PATARNELLO, T. 2002. ***Strategies for microsatellites isolation: a review.*** Molecular Ecology, 11: 1-16.

ZIPPER, H. et al. ***Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications.*** Nucleic Acids Research, v. 32, n. 12, p. 294-299, 2004.

ZUCCHI, M.A. et al. 2003. ***Genetic Structure and gene flow in Eugenia dysenterica DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers Genetic and Molecular Biology.*** Ribeirão Preto, v.26, n.4, 2003.

Capítulo 3: Filogeografia de uma espécie endêmica da Caatinga (*Jatropha mollissima* Pohl Baill), região semiárida no Nordeste do Brasil.

LEAL, Leilane E.

DE CASTRO, Renato D.

VAN DEN BERG, C.

1 INTRODUÇÃO

A crescente utilização do petróleo como fonte de energia tem significativa contribuição para o aquecimento global, em função do aumento da concentração de gases poluentes e consequente potencialização do efeito estufa na atmosfera, e deste modo, é urgente a busca por alternativas em fontes renováveis de energia visando a sustentabilidade do planeta (KOGA et al., 2006). Nesse contexto, duas espécies da Caatinga são consideradas relevantes para a produção de óleo não comestível: *Jatropha curcas* L. e *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill (FRANCIS et al., 2005; SHAH et al., 2004) regionalmente conhecidas como pinhão manso e pinhão bravo, respectivamente.

Tem sido muito discutida a possibilidade de cultivo dessas culturas no Nordeste, pois além de serem amplamente adaptadas à região (FRANCIS et al., 2005), se revestem de elevada importância para o semiárido brasileiro, na ocupação de mão-de-obra e geração de renda, devido à possível utilização na produção de biodiesel (SILVA e TARGINO, 2013).

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e ocupa o equivalente a 11% do território nacional, abrangendo os estados do Nordeste (Alagoas, Bahia,

Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí e Sergipe), além do norte de Minas Gerais (HAUFF, 2010). Contudo, segundo Tabarelli et al.(2000), esta região tem sido pouco estudada diante do seu grande potencial, e por isto, a sua diversidade biológica pode estar sendo subestimada. *Jatropha mollissima* destaca-se neste contexto pela ampla distribuição e adaptabilidade a esse bioma marcado por diversas áreas de solos degradados, com restrições hídricas permanentes e condições morfoclimáticas severas (ARAUJO, 2011).

Alguns estudos discutem a baixa diversidade genética encontrada em ensaios com *J. curcas* a partir de marcadores moleculares (MONTES et al., 2004; ROSADO et al., 2010; SUN et al., 2008), indicando a necessidade de se iniciar investigações mais aprofundadas, visando a ampliação da base genética e a variabilidade no gênero *Jatropha* L., que pode ser possível por genes de interesse oriundos de espécies correlatas.

A utilização simultânea de marcadores de DNA plastidiais e nucleares, em um contexto filogeográfico, pode se tornar uma excelente ferramenta na reconstrução da história demográfica de um grupo, além de auxiliar a distinção dos efeitos do fluxo gênico via pólen versus fluxo gênico via sementes na formação da estrutura populacional atual (PALMA-SILVA et al., 2009; PINHEIRO et al., 2011).

Recentemente, foram divulgados estudos relevantes envolvendo a filogeografia de *J. curcas* (SUDHEER-PAMIDIMARRI e REDDY, 2014) e *Jatropha gossypiifolia* L. (PRENTIS et al., 2008), onde no primeiro foram utilizados

marcadores RAPD e AFLP, comparados com DNA nuclear, enquanto no segundo analisaram marcadores SSR plastidiais, porém, até o momento não existem estudos relatando a utilização de *J. mollissima* neste tipo de abordagem, nem sobre os seus padrões de diversidade genética inferidos por marcadores moleculares. Nesse sentido, o presente trabalho tem como principal objetivo investigar os padrões filogeográficos no Nordeste brasileiro de uma espécie endêmica da Caatinga, a *J. mollissima*, a partir de informações obtidas com o uso de marcadores plastidiais e nuclear.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas folhas expandidas de 96 indivíduos, acondicionadas em gel de CTAB 2% (VAN DEN BERG, 2005), que representam um total de 12 populações amostradas em uma zona de distribuição geográfica de *Jatropha mollissima* no Nordeste brasileiro, conforme descrito na Tabela 1 e no mapa da Figura 1.

Tabela 1: Caracterização geográfica dos locais de coleta das 12 populações de *Jatropha mollissima* no semiárido nordestino.

População (P)	Locais de Coleta	Estado	Latitude	Longitude	Altitude(m)
1	Cipó	BA	-11.318	-38.747	132
2	Rafael Jambeiro	BA	-12.408	-39.134	238
3	Macambira	SE	-10.688	-37.684	282
4	Ilha do Rodeadouro	PE	-9.471	-40.605	353
5	Iati	PE	-9.172	-36.963	487
6	Catolé do Rocha	PB	-6.732	-37.878	272
7	Campina Grande	PB	-7.469	-35.763	551
8	Delmiro Gouveia	AL	-9.451	-38.422	256
9	São Jose do Campestre	RN	-6.329	-35.865	149
10	Goiaininha	RN	-6.478	-35.077	19
11	Missão Velha	CE	-7.362	-39.233	360
12	Milagres	CE	-7.254	-39.859	323

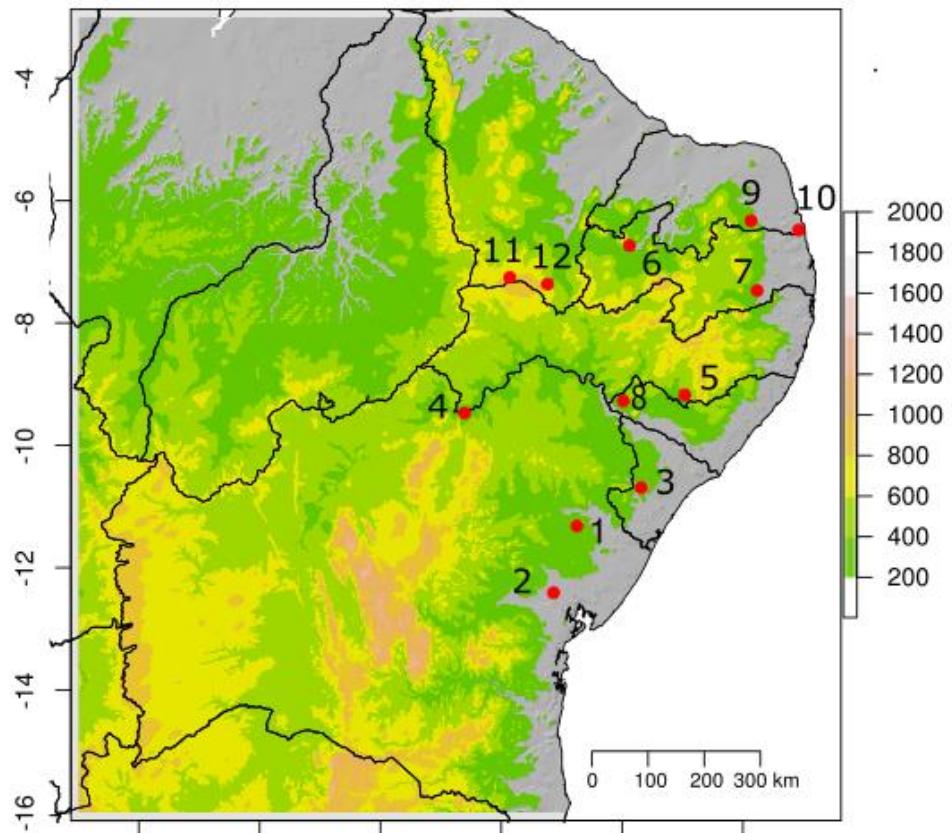


Figura 1: Mapa hipsométrico da região Nordeste do Brasil, exibindo populações de *Jatropha mollissima* amostradas na região de Caatinga, Semiárido nordestino. Os números correspondem aos locais de coleta de acordo com a Tabela 1.

Brasil (1972) indica que a vegetação que compõe o semiárido nordestino pode ser classificada segundo o seu grau de aridez em Floresta Subcaducifólia, Floresta Caducifólia, Caatinga Hipoxerófila e Caatinga Hiperxerófila. Já Chaves et al. (2008) sugerem uma classificação baseada no arranjo estrutural da população das plantas quanto à altura e ao grau de recobrimento do solo pela vegetação, e propõem diferentes classes de vegetação, identificadas como Arbórea, Subarbórea, Arbustiva e Subarbustiva, e que foram adotadas como modelo no presente trabalho.

Extração

O DNA genômico foi extraído utilizando-se uma modificação do protocolo CTAB 2X descrito por Doyle e Doyle (1990). As modificações incluíram lavagem inicial com STE (Sacarose Tris-EDTA) para reduzir a quantidade de polissacarídeos e retirada do NaCl; após a extração, as amostras foram diluídas 10X, e armazenadas em biofreezer a -80º C.

Amplificação via PCR

Foram utilizados os marcadores de DNA cloroplastidial (*rpL32-trnL* e *psbA-trnH*) e uma região de DNA nuclear (ITS). Para amplificação, foi utilizado o kit Top Taq Master Mix (Qiagen) e pares de primers para cada uma das regiões de interesse (SHAW et al., 2007; ALDRICH et al., 1988; DESFEAUX et al., 1996).

As reações foram realizadas em um volume total de 10uL, utilizando o Kit de amplificação TopTaq Master Mix (Qiagen), enquanto para o par de iniciadores ITS (17SE: ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG e 26SE: TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC), o volume total das reações foi de 15ul, com concentração final de 1x do tampão de reação, 2,5 mM MgCl₂, 171 mM dNTPs, 0,5 µM primers a 15pmol/ul cada, 1,25 unidades de Taq polimerase (Phoenix) e os aditivos betaína 1M, 1 µg BSA e DMSO (2%) e aproximadamente 2 ng do DNA genômico, conforme condições de PCR descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições de PCR utilizadas para regiões de DNA plastidial e nuclear nos experimentos com *Jatropha mollissima*.

REGIÃO	DESNATURAÇÃO	AMPLIFICAÇÃO	CICLOS NA AMPLIFICAÇÃO	EXTENSÃO
<i>rpL32-trnL</i>	80°C(5 min)	95°C(1 min) + 51°C(1 min) + 65°C(4 min)	30	65°C (5 min)
<i>psbA-trnH</i>	80°C(2 min)	95°C(1 min) + 53°C (1 min) + 65°C(2 min)	30	65°C (5 min)
ITS	94°C(3 min)	94°C(45s) + 54°C(1 min) + 72°C(1 min 30s)	28	72°C (7 min)

Os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 1% com tampão Sódio Borato (BRODY e KERN, 2004), por 60min à 100V, 80W, em fonte eletroforética e fazendo uso do marcador de peso molecular 100pb Ladder (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio (4uL/mL) e as bandas visualizadas em transluminador de luz ultravioleta (UV), e após esta etapa, os fragmentos foram purificados com precipitação por polietilenoglicol (20% Polietilenoglicol 8000 / NaCl 2,5 M) e requantificados em NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Life), para mensurar a concentração de DNA em ng/uL em cada reação; os fragmentos então foram sequenciados bidirecionalmente com o kit Big Dye 3.1 (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI3130 XL.

Seleção de Loci Polimórficos

Os eletroferogramas obtidos foram editados e conferidos manualmente com o programa Pre-Gap 4 e Gap4 do pacote STADEN (STADEN et al., 2000). A partir das sequências consolidadas, as matrizes foram construídas e alinhadas através do software MEGA 6 (TAMURA et al., 2014) com o algoritmo de alinhamento MUSCLE (EDGAR, 2004), seguidos de correção manual. A

detecção dos sítios polimórficos, número de polimorfismos e quantidade de haplótipos gerados foi realizada no DnaSP 5.10 (LIBRADO e ROZAS, 2009).

Dispersão de fluxo gênico

Para avaliar a magnitude do fluxo gênico em *J. mollissima*, foram realizadas estimativas indiretas com base nos índices de variância molecular (AMOVA) aplicados à formula de Ennos (1994), que calcula a proporção de dispersão preferencial pólen-semente para dada espécie a partir dos valores combinados de Fst (nesse caso, ITS e marcadores plastidiais).

Análise da filogeografia

As relações filogenéticas entre os diferentes padrões de bandas (haplótipos) encontrados em uma espécie podem ser inferidas com base na construção de redes de haplótipos ou networks (BANDELT et al., 1999). Para isso, o DNASP foi utilizado para a construção de um histograma (*Mismatch distribution*) que representa a distribuição das diferenças genéticas entre os haplótipos encontrados, enquanto o algoritmo *Median-Joining* (MJ) (Bandelt et al., 1999), disponível no programa NETWORK v.4.6.1.0 (Fluxus Technology Ltd.), foi utilizado para identificar os principais haplogrupos.

As diversas análises interpopulacionais foram feitas utilizando o software ARLEQUIN versão 3.5.1.2 (EXCOFFIER e LISCHER, 2010). Dentre elas está a análise de variância molecular (AMOVA), para avaliar a estruturação genética entre os grupos. Foram calculados os valores de diferenciação entre as

sequências utilizando-se o modelo de Distância Par a Par (parâmetros sem correção de gamma e com 10.000 permutações).

Para as análises de estruturação genética das populações, foi realizada uma análise Bayesiana utilizando o STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2012) para inferir o número de agrupamentos genéticos nas populações amostradas. Neste caso, cada sítio polimórfico nas sequências foi considerado um loco de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) com até 4 alelos (A, C, G ou T). O número de populações presumidas (K) foi testado de $K=1$ a $K=12$ e cinco corridas independentes foram feitas para cada K . Cada corrida conteve 100 mil cadeias de *burnin* inicial e 500 mil cadeias após o *burnin*, com Modelo *Admixture* e parâmetro alpha inferido durante as análises, além do modelo de frequências alélicas correlacionadas, com lambda inferido. Após a corrida, o número de grupos foi selecionado pelo método Delta K de Evanno (EVANNO et al., 2005), usando o software STRUCTURE HARVESTER (EARL e VONHOLDT, 2012).

Árvores filogenéticas foram construídas com algoritmo de agrupamento *Neighbor Joining*, a partir dos valores de distâncias genéticas Fst par-a-par para cada região, com enraizamento pelo método do ponto médio.

Para datação molecular dos haplótipos, foi utilizado o software BEAST 1.8.2 (DRUMOND et al., 2012), com uma matriz de 24 haplótipos obtidos com a região ITS, além de sequências de ITS de *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill, *J. mollissima*, *Jatropha mutabilis* (Pohl) Baill e *Jatropha podagraria* (Hook) geradas para esse trabalho, e mais amostras de *J. curcas*, *Jatropha tanjorensis*

(J.L.Ellis & Saroja), *Jatropha integerrima* (Jacq), *Jatropha glandulifera* (Roxb), *Jatropha multifida* L. e *Jatropha gossypifolia* L. obtidas no Genbank. As sequências de plastídeo não foram utilizadas devido à indisponibilidade no Genbank para várias das outras espécies de *Jatropha* e principalmente dos outgroups onde foi feita a calibração.

Para calibração de datas, foram selecionados três grupos externos, com base nos trabalhos de Berry et al. (2005), que indicam a posição de *Jatropha* próxima dos gêneros *Croton* L., *Brasilicroton* P.E. Berry & Cordeiro e *Sagotia* Baill. Com base nesse mesmo trabalho, foi escolhida uma distribuição anterior para o nó separando *Jatropha* dos *outgroups* de 75 milhões de anos, e desvio padrão de 2 milhões de anos. Na análise foi forçado o monofiletismo do gênero *Jatropha*, e dos haplótipos de *J. mollissima*.

O modelo utilizado foi HKY, frequências de base estimadas, Gamma e invariantes, e o modelo de especiação de coalescente, já que o nosso interesse é especificamente nas datas dos haplótipos dentro da espécie. Foram feitas 50 milhões de cadeias com uma árvore amostrada a cada 1000 e após a corrida, o *log* foi processado no TRACER 1.6(RAMBAUT et al., 2013), para verificar a convergência e ESS (*Estimated Sample Size*).

Foi escolhido um *burnin* de 5 milhões de cadeias (5000 árvores), sendo todos os parâmetros convergentes, e com ESS maior que 200. O consenso foi produzido com o mesmo *burnin* no software FIGTREE 1.4.2 (RAMBAUT, 2014), e editado no programa INKSCAPE 0.91.

O modelo IBD (isolamento por distância) foi investigado pelo teste Mantel (Fst versus distância geográfica) para analisar o efeito da genética sobre a distribuição geográfica. Uma regressão do eixo principal reduzida (RMA) foi usada para calcular o declive para o teste de IBD baseado no software *online* IBDWS 3.23 (disponível em <http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>).

A fim de investigar a história demográfica de *J. mollissima*, foi realizada uma análise *Bayesian Skyline plot* (DRUMMOND et al., 2005), onde foram utilizadas para coalescência os 24 haplótipos de ITS. Foram corridas 50 milhões de cadeias de Markov (MCMC), amostrando a cada 1.000 árvores, usando BEAST 1.8.2 (DRUMMOND e RAMBAUT, 2007; DRUMMOND et al., 2012), usando o modelo de evolução HKY+I+G. A todas as extremidades foi atribuída a data 0, e assumido um relógio molecular estrito, com a taxa de evolução do ITS fixada em 2.4788 x 10E-09, calculada a partir da análise de datação dos haplótipos, e subdivisão em 6 períodos de tempo. Os dados foram então testados para convergência, o que indicou um *burnin* de 5.000 árvores (referente a 5 milhões de estados da cadeia MCMC), e as árvores restantes foram utilizadas para calcular o *Skyline* com o software TRACER 1.6 (RAMBAUT et al., 2013).

A análise de tamanhos efetivos populacionais e taxas de migração foi feita no software MIGRATE-N 3.6.1(BEERLI, 2004). Foram utilizadas as 96 sequências de ITS para as 12 populações. O modelo utilizado foi o K84, único disponível no programa, com frequências de base e *Kappa* estimados dos dados. O modelo utilizado foi de isolamento por distância, com 12 parâmetros de tamanho efetivo populacional e taxas de migração assimétricas entre todos os pares possíveis de populações (portanto 132 taxas de migração), utilizando

uma matriz geográfica com as distâncias entre as populações como pesos. A corrida MCMC foi feita com 10.000 passos de *burnin* e 30.000 de amostragem. Como valores iniciais de diferenciação, foi tomado um valor similar ao Fst (BEERLI e FELSENSTEIN, 1999).

Foram corridas quatro cadeias com diferentes temperaturas (4.0; 1.5; 3.0; 1000000.0), conforme sugerido pelo manual do programa, e após as corridas, foram examinados valores de convergência e ESS, e estimados os parâmetros. Para o cálculo do tamanho efetivo populacional (N_e), foi usado o cálculo $N_e = \theta / 4\mu$ (para dados nucleares diplóides), onde θ é o parâmetro calculado pelo programa, e μ a taxa de mutação por geração. Para tanto foi assumida uma taxa de mutação/ano de 2.4788×10^{-9} , calculada na análise de datação, e um tempo de geração de 5 anos.

Para cálculo das taxas de migração (N_m) entre os pares de populações, utilizamos $N_m = \theta \times m$, onde o θ utilizado é aquele da população que recebe os migrantes; depois disso, foi estruturado um gráfico exibindo o tamanho efetivo populacional em escala logarítmica na base 10 em função do tempo, utilizando o pacote R incluindo intervalos de confiança de 95% do tamanho efetivo populacional ao longo do tempo.

3 RESULTADOS

As doze populações de *Jatropha mollissima* coletadas na região Nordeste encontram-se na zona de ocorrência da espécie, segundo o sistema de informações taxonômicas e geográficas, o Lacunas de Conhecimento da Flora e dos Fungos do Brasil (CANHOS et al., 2014), às quais possuem condições edafoclimáticas singulares.

A partir da subdivisão da Caatinga em Ecorregiões apresentada por Velloso et al. (2002), as populações de *J. mollissima* amostradas neste estudo poderiam ser enquadradas basicamente em três grandes subgrupos: a Depressão Sertaneja Meridional abrangeia as Populações P1, P2, P3, P4 e P5, com extensas planícies baixas, solos profundos com fertilidade baixa e vegetação arbustiva e arbórea, a mesma encontrada na Depressão Sertaneja Setentrional, mas que possui solos rasos, pedregosos e de fertilidade média-alta, onde foram amostradas P6, P7, P9, P10, P11 e P12, enquanto no Raso da Catarina estaria compreendida P8, numa zona com bacia de solos muito arenosos, profundos e pouco férteis, com relevo plano e vegetação predominantemente é arbustiva.

Análises Genéticas

Os parâmetros de polimorfismo observados nas regiões nuclear e plastidiais são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros de polimorfismo observados nas regiões ITS e plastidiais, analisadas nas populações amostradas de *Jatropha mollissima*.

	ITS	Plastidiais
N (tamanho amostral)	96	96
Quantidade de Sítios	547	1.607
Nº de Sítios Polimórficos	21	39
Nº de Haplótipos (Hp)	24	51
Div. Haplótípica (Hd)	0,7325	0,9581
Div. Nucleotídica (π)	0,00336	0,00496
Teste D de Tajima	-2,258	-1,254
Teste de Fu & Li	-1,447	-0,114

Nas doze populações amostradas, as regiões plastidiais combinadas possuem quantidade expressiva de haplótipos ($Hp= 51$) com Diversidade Haplótípica ($Hd=0,9581$), muito superior à região nuclear ($Hd= 0,7325$). Os valores absolutos de Hd e π para cada uma das populações estão expressos comparativamente na Tabela 4 e ambos os testes de neutralidade (Teste D de Tajima e Fu & Li) indicaram valores negativos para as populações de *J. mollissima* amostradas.

Tabela 4: Diversidade Haplótipica (Hd) e Nucleotídica (π) das doze populações para as regiões nuclear (ITS) e plastidiais, onde S é o desvio padrão amostral.

População	ITS		PLASTIDIAIS	
	Hd	π	Hd	π
P1	0,250	0,001	0,643	0,001
P2	0,857	0,011	0,929	0,002
P3	0,250	0,001	0,643	0,001
P4	0,000*	0,000*	0,964	0,002
P5	0,643	0,006	0,464	0,002
P6	0,250	0,001	0,857	0,002
P7	0,643	0,004	0,964	0,002
P8	0,000*	0,000*	0,893	0,004
P9	0,000*	0,000*	0,786	0,004
P10	0,250	0,001	0,964	0,009
P11	0,250	0,001	0,893	0,011
P12	0,853	0,010	0,964	0,004
Média	0,472	0,004	0,830	0,004
S	0,273	0,004	0,164	0,003

*não significativo para $P<0,001$

Os dados exibidos na Tabela 4 indicam que a Diversidade Haplótipica nas 12 populações amostradas variou de 0,25 a 0,857 na região nuclear, enquanto foi de 0,464 a 0,964 na região plastidial. Neste estudo, não foi possível detectar variações dentro de algumas destas populações (valores não significativos para $P<0,001$), mas de modo geral, a maior diversidade foi verificada nas populações P2, P7 e P12.

Os resultados da análise molecular de variância (AMOVA) são apresentados na Tabela 5.

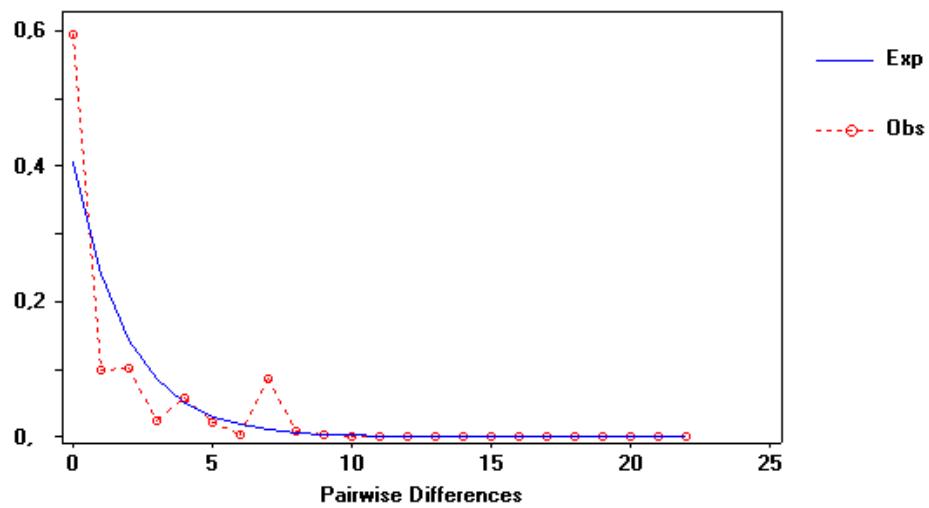
Tabela 5: AMOVA comparativa entre os marcadores plastidiais e nuclear em populações de *J. mollissima*, onde (Gst) é relação entre diversidade genética entre populações e a diversidade genética total.

	ITS	Plastidiais
Variação entre Populações (%)	12,9500	14,2400
Variação dentro das Populações (%)	87,0500	85,7500
Diversidade Genética (Gst)	0,3048	0,0936
Índice de Fixação (Fst)	0,1290	0,1420

Analizando as regiões plastidiais, e comparando par a par as doze populações, encontramos valores de Fst variando de ~0,005 a 0,446. A partir destes valores, foi possível avaliar indiretamente a estratégia de dispersão preferencial da espécie, e com o uso combinado dos marcadores de DNA, encontramos o valor de 0,54 (54%), indicando que o fluxo gênico via pólen tem praticamente a metade da eficiência do fluxo via semente em *J. mollissima*, em termos relativos.

Os histogramas apresentados na Figura 2 foram estruturados a partir de uma análise par a par, onde as curvas remetem às diferenças entre os pares de indivíduos (*mismatch distribution*), e podem indicar a ocorrência de expansão populacional recente, o mesmo podendo ser sugerido pela estrutura da rede de haplótipos vislumbrada no NETWORK da Figura 3.

(a)



(b)

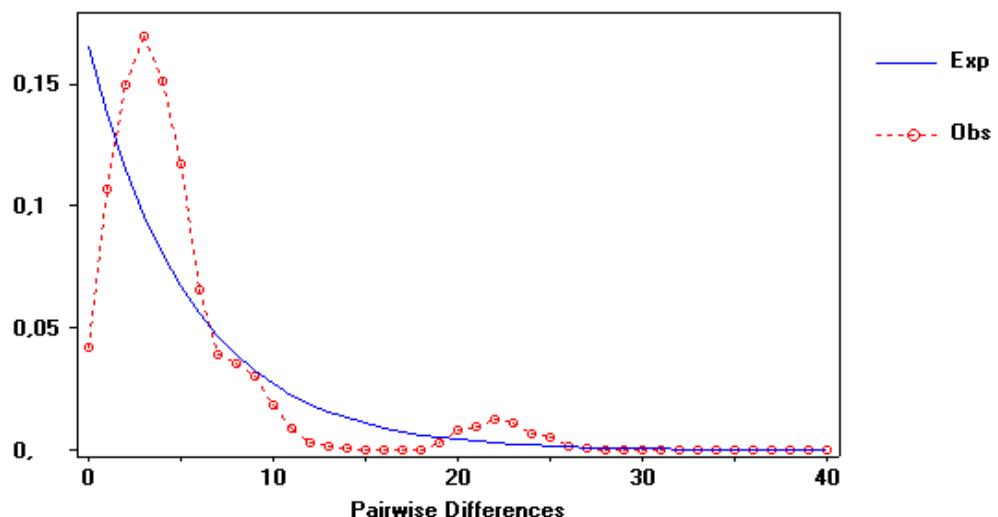
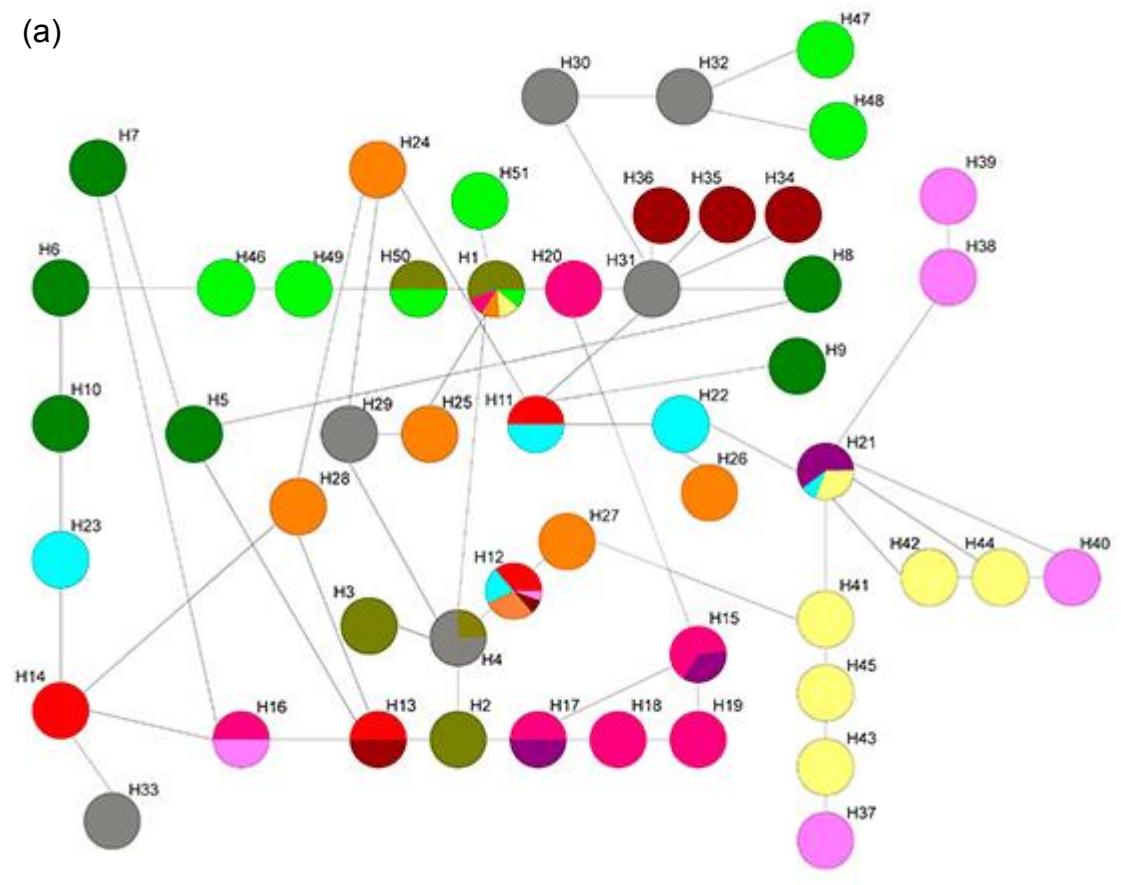


Figura 2: Histograma indicando as diferenças par-a-par observadas e esperadas entre as sequências de *Jatropha mollissima* encontradas nas regiões (a) ITS e (b) plastidiais.

(a)



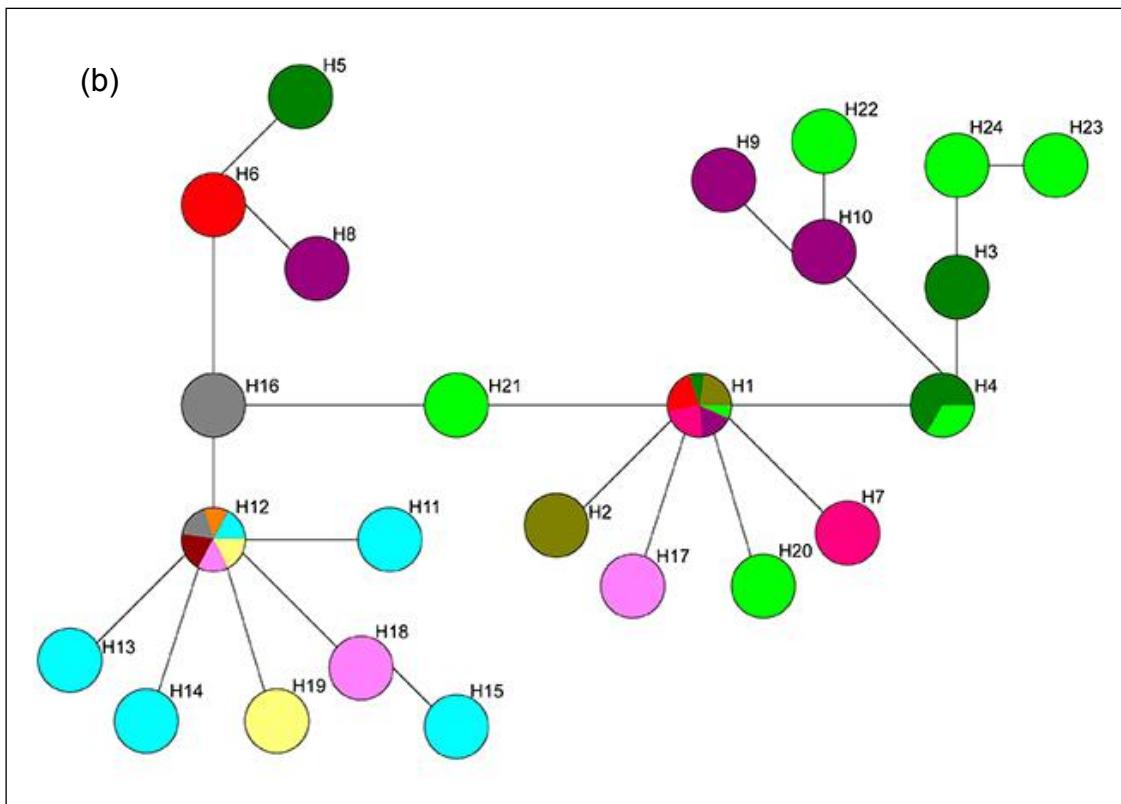


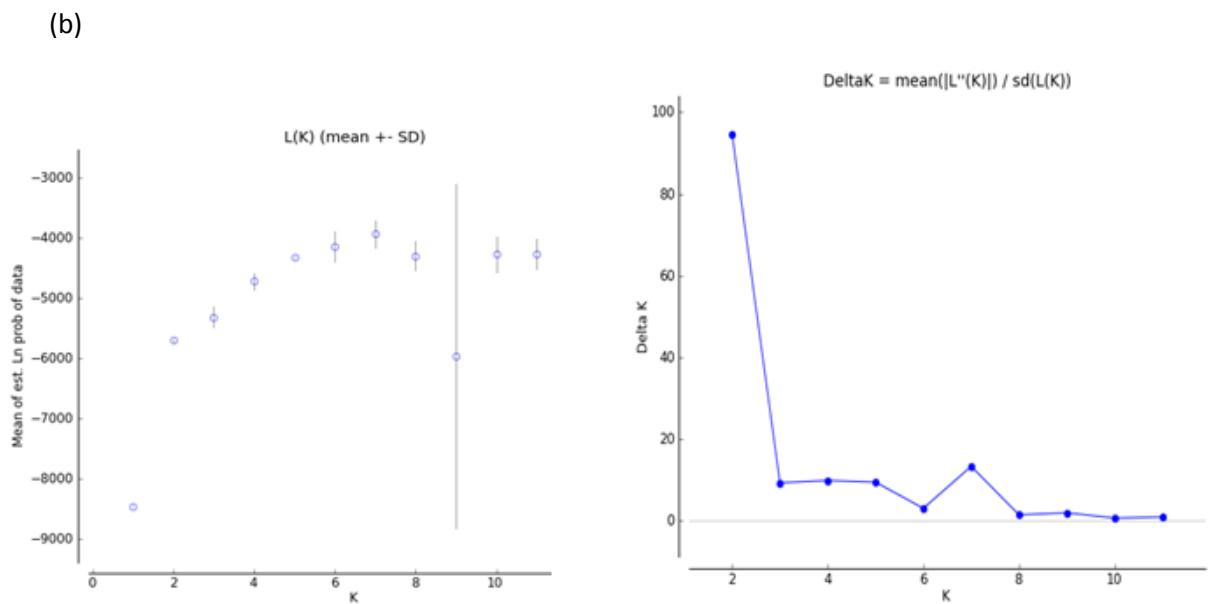
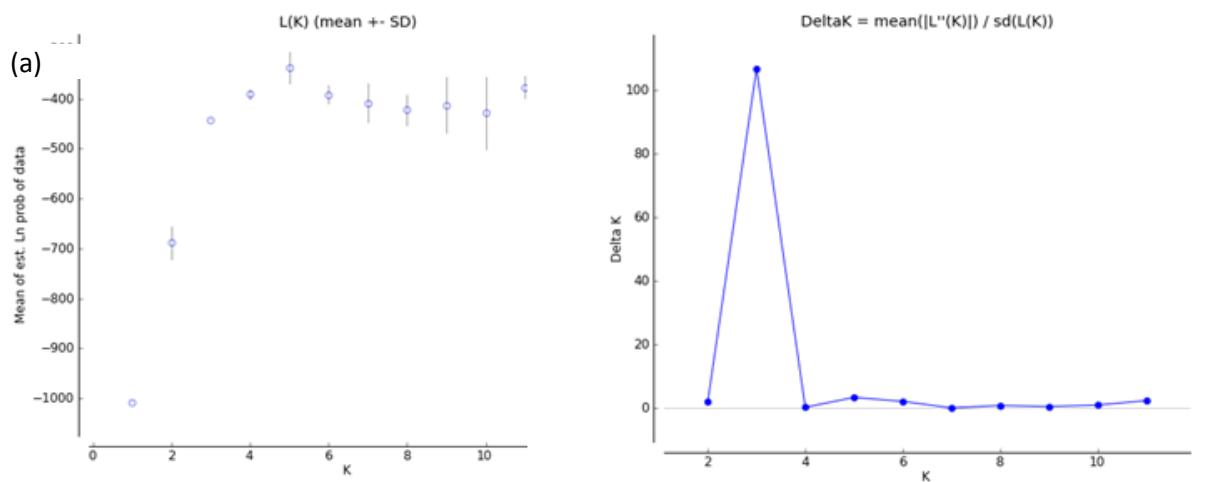
Figura 3: Median-joining network dos haplótipos de 12 populações de *J. mollissima* encontrados em regiões de DNA nuclear (a) e plastidial (b).

Legenda	
	P1
	P2
	P3
	P4
	P5
	P6
	P7
	P8
	P9
	P10
	P11
	P12

As redes de haplótipos nas regiões de DNA plastidiais evidenciaram estruturação genética moderada entre as populações amostradas, com a presença de diferentes haplótipos ancestrais nas regiões nucleares e plastidiais. De forma geral, as populações que compartilham a maior quantidade de haplótipos em ambas as regiões são P2, P7 e P12.

Analises de Estruturação Populacional

As estimativas *Delta-K* indicam o numero ótimo de populações, inferidas pelo STRUCTURE HARVESTER, e apontam que o numero ótimo de subpopulações variou de acordo com a região de DNA analisada. *Delta K* é inferido com base na média da primeira ordem de mudanças das estimativas “*likelihood*”, dividido pelo desvio padrão da segunda ordem de mudanças (Figura 4).



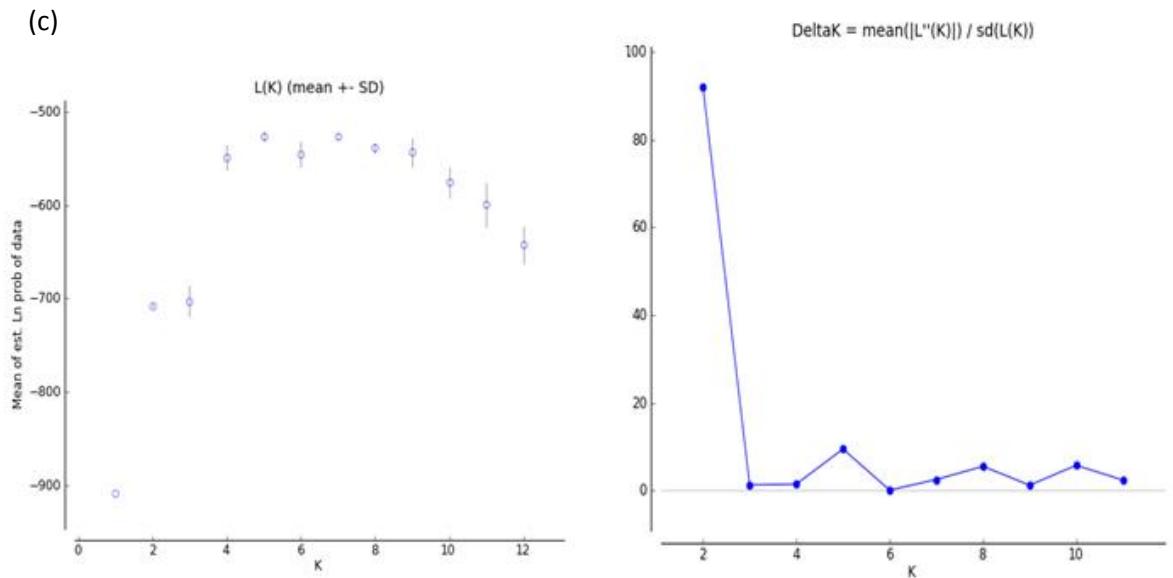


Figura 4: Estimativa Delta do numero ótimo de para dados de ITS e valores de Delta (K), segundo correção de Evanno et al (2005) assumidos para as regiões ITS(a), plastidiais (b) e combinados (c) em dados de sequência para 12 populações de *Jatropha mollissima*.

Essas estimativas foram utilizadas para a construção das representações *bar plot* que graficamente exibem um resumo de estimativas de Q (eixo Y) para dados de plastídio e dados combinados (nuclear e plastidiais), onde K é o numero ótimo de populações. O valor de Q corresponde à pureza dos indivíduos das localidades em relação aos grupos genéticos apresentados pelas diferentes cores, ou seja, fornece informações sobre a fração do genoma dos indivíduos que podem pertencer a cada uma das subpopulações K (eixo X), e isto pode ser melhor visualizado na Figura 5.

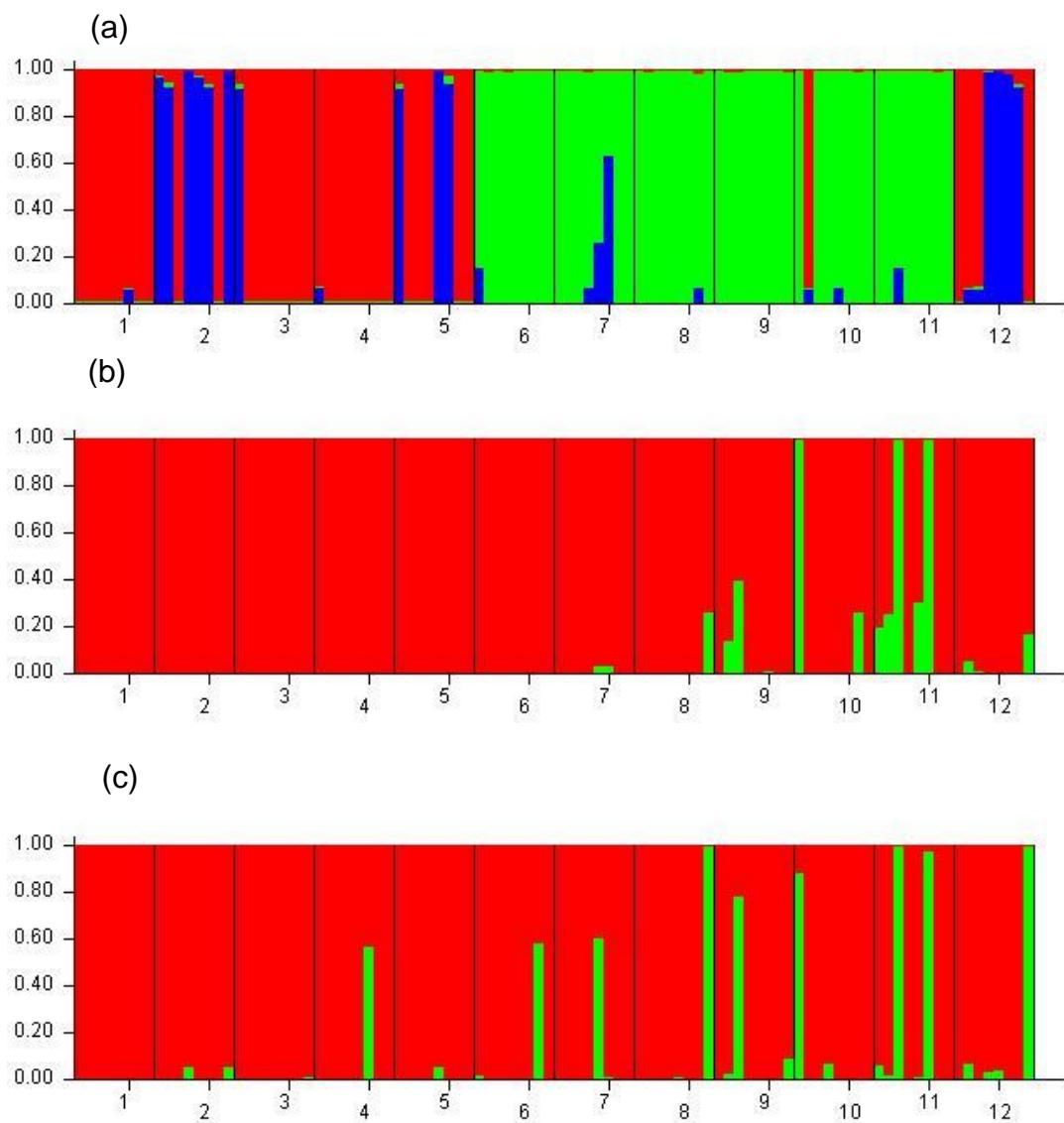


Figura 5: Representação *bar plot* populacional dos diferentes agrupamentos genéticos gerados pela análise Bayesiana no STRUCTURE, correspondentes a populações de *Jatropha mollissima*, baseados em informações de dados de ITS com $K=3$ (a), plastidiais com $K=2$ (b) e combinados com $K=2$ (c).

Os resultados apresentados pelo STRUCTURE nos permitem inferir a presença de 3 clusters($K=3$ na região ITS) e $K=2$ tanto para dados plastidiais quanto para combinados(plastidiais e ITS), de acordo com o maior valor de Delta K apresentado para cada região e/ou conjunto de regiões. A região ITS, com $K=3$ parece ter sido a que conseguiu o melhor esboço de estruturação

populacional, agrupando predominantemente populações P1, P3 e P4 em um primeiro grupo, as populações P6, P7, P8, P9, P10 e P11 no segundo grupo, e populações P2 e P12 em um terceiro grupo de identidade genética.

Esses dados são relativamente similares aos encontrados pelo agrupamento *Neighbor Joining*, nas árvores de dados combinados (nuclear e plastidial), ITS e plastidiais, exibidos na Figura 6 (a), (b) e (c) respectivamente.

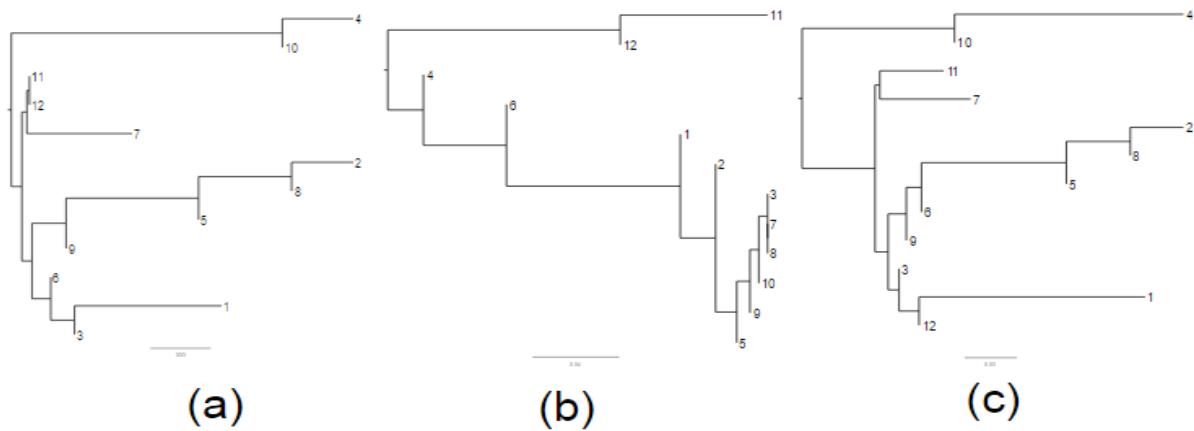


Figura 6: Árvores filogenéticas geradas a partir do algoritmo de agrupamento *Neighbor-Joining* sobre distâncias F_{ST} par-a-par, e enraizamento pelo método do ponto médio para as 12 populações de *Jatropha mollissima*, baseados em informações de dados de ITS (a), plastidiais (b) e combinados (c).

A análise do dendograma originado do agrupamento com base nas distâncias genéticas resultou na formação de grupos distintos, dependendo do marcador ou combinação utilizada. Em uma observação mais criteriosa, é possível verificar que as populações P11 e P12, encontram-se agrupadas na maioria dos casos, e que as populações P2, P5 e P8 estão mais proximamente relacionadas. Embora localizadas no mesmo estado da PB, as populações P6

e P7 parecem distantes geneticamente, o mesmo ocorrendo com as populações de estados próximos (BA e SE), como é o caso de P1 e P3.

Os dados apresentados na Figura 6 também indicam que a árvore que mais se assemelha à estrutura populacional ideal inferida no STRUCTURE, é a de dados das regiões plastidiais (Figura 6b), porém, é possível observar variações significativas nos agrupamentos formados com diferentes marcadores. Torna-se necessário, nesse contexto, ressaltar que estamos comparando resultados obtidos por métodos distintos, em que o STRUCTURE se baseia em critérios de verossimilhança, onde as diferenças entre as moléculas são consideradas como uma série de variáveis descontínuas, e *Neighbor-joining*, em que as diferenças entre duas sequências são reduzidas a uma só variável (número de diferenças) e suas relações evolutivas não são consideradas (MATIOLI, 2001).

Fluxo Gênico

Considerando uma geração de 5 anos, foi possível identificar o número de migrantes (N_m) em cada uma das doze populações de *J. mollissima* amostradas, e os valores mais significativos foram ilustrativamente representados na Figura 7.

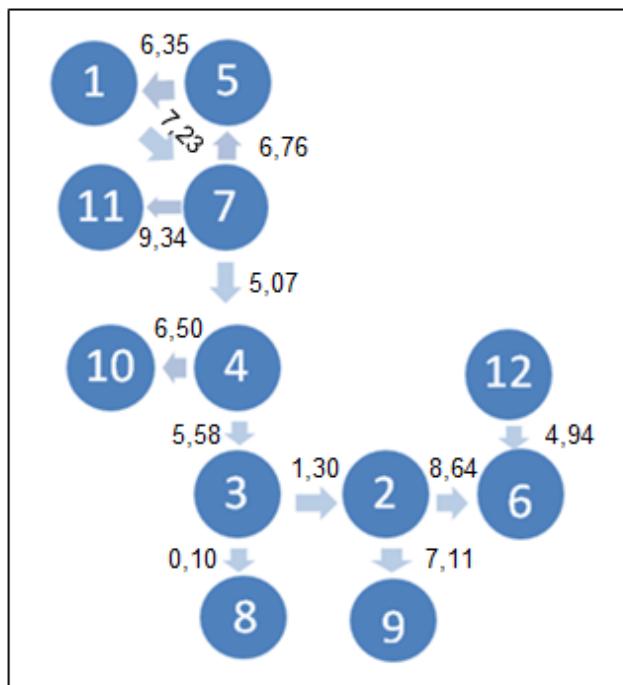


Figura 7: Representação ilustrativa das maiores taxas de fluxo de migrantes obtidas nas 12 populações de *J. mollissima* na Caatinga. O sentido das setas ilustra o sentido da migração entre as populações e os valores representam as taxas de migração, ou número de migrantes (Nm) em uma geração de 5 anos.

Foram encontradas diferenças bastante significativas no fluxo gênico entre as populações amostradas. O número de migrantes (Nm) partindo das populações P1 a P7 em direção a P4 a P10 foi na grande maioria dos casos alto, atingindo o valor máximo de P7 para P11, com Nm= 9,34, ao contrário das Populações P8, P9, P10, P11 e P12 que apresentam em geral poucos migrantes em direção às demais, com valores frequentemente menores que 1, indicando fluxo gênico reduzido entre estas populações, calculado pela abordagem bayesiana; nos chama a atenção também o fato do Nm para P8 ser menor do que 1 considerando todas as outras populações, sendo nulo (Nm=0) o fluxo de P5, P9, P10, P11 e P12 para P8, segundo inferências do MIGRATE.

Relação entre Distâncias Genéticas e Geográficas

Com base nos gráficos de regressão obtidos com o teste Mantel apresentados nas Figuras 8 e 9, observa-se que não foi possível estabelecer uma correlação positiva com significância estatística ($P<0,05$) entre as distâncias geográficas das populações de *J. mollissima* e suas respectivas distâncias genéticas representadas pelos valores de *Fst* nas regiões ITS e plastidiais.

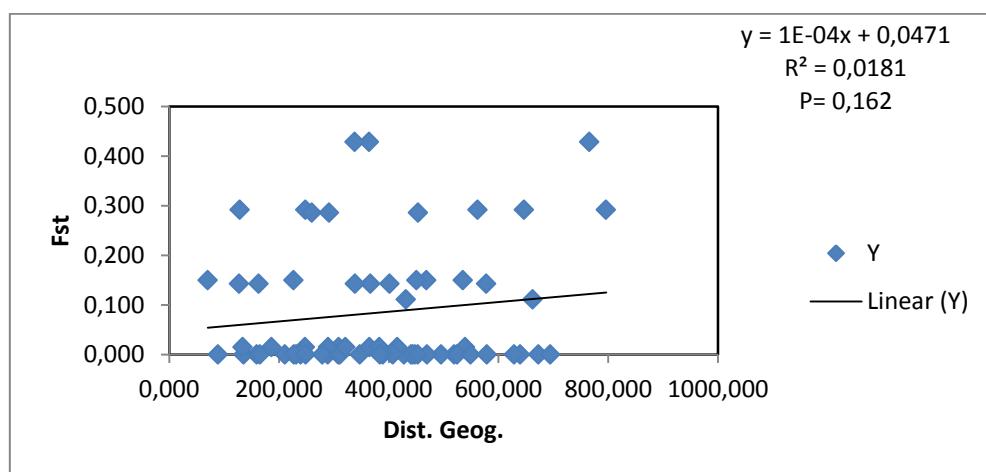


Figura 8: Regressão entre distância geográfica e distância genética (*Fst*) em populações de *Jatropha mollissima* observada na região ITS.

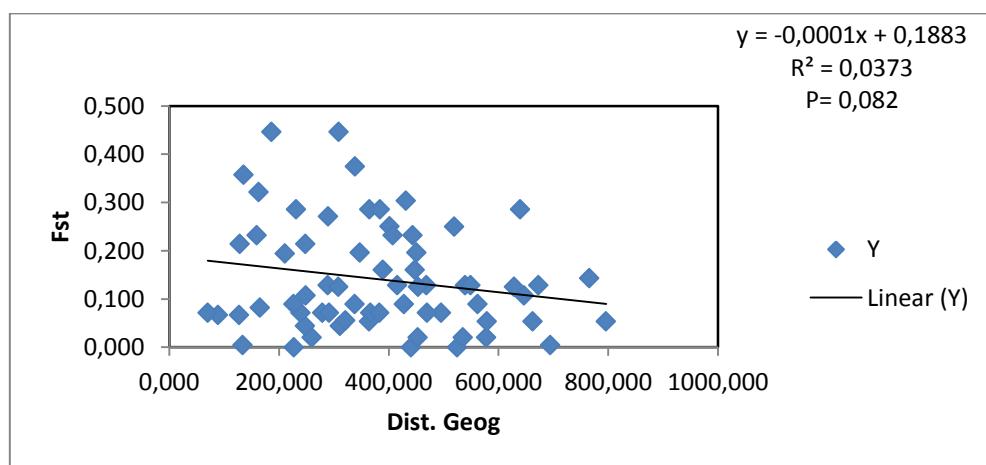


Figura 9: Regressão entre distância geográfica e distância genética (*Fst*) em populações de *Jatropha mollissima* observada nas regiões plastidiais.

Os dados aqui apresentados coincidem com os agrupamentos obtidos pela observação das árvores filogenéticas geradas a partir do algoritmo de agrupamento *Neighbor-Joining* citados na Figura 6.

Datação Molecular

De acordo com a datação gerada a partir das sequências de ITS exibida na Figura 10, a divergência entre o grupo mais basal, representado por *Jatropha mollissima* e *J. mutabilis*, parece ter ocorrido há 10 milhões de anos (Ma) no Mioceno, enquanto a diversificação dos haplótipos de *J. mollissima* datam do inicio do Plioceno, a 5 Ma.

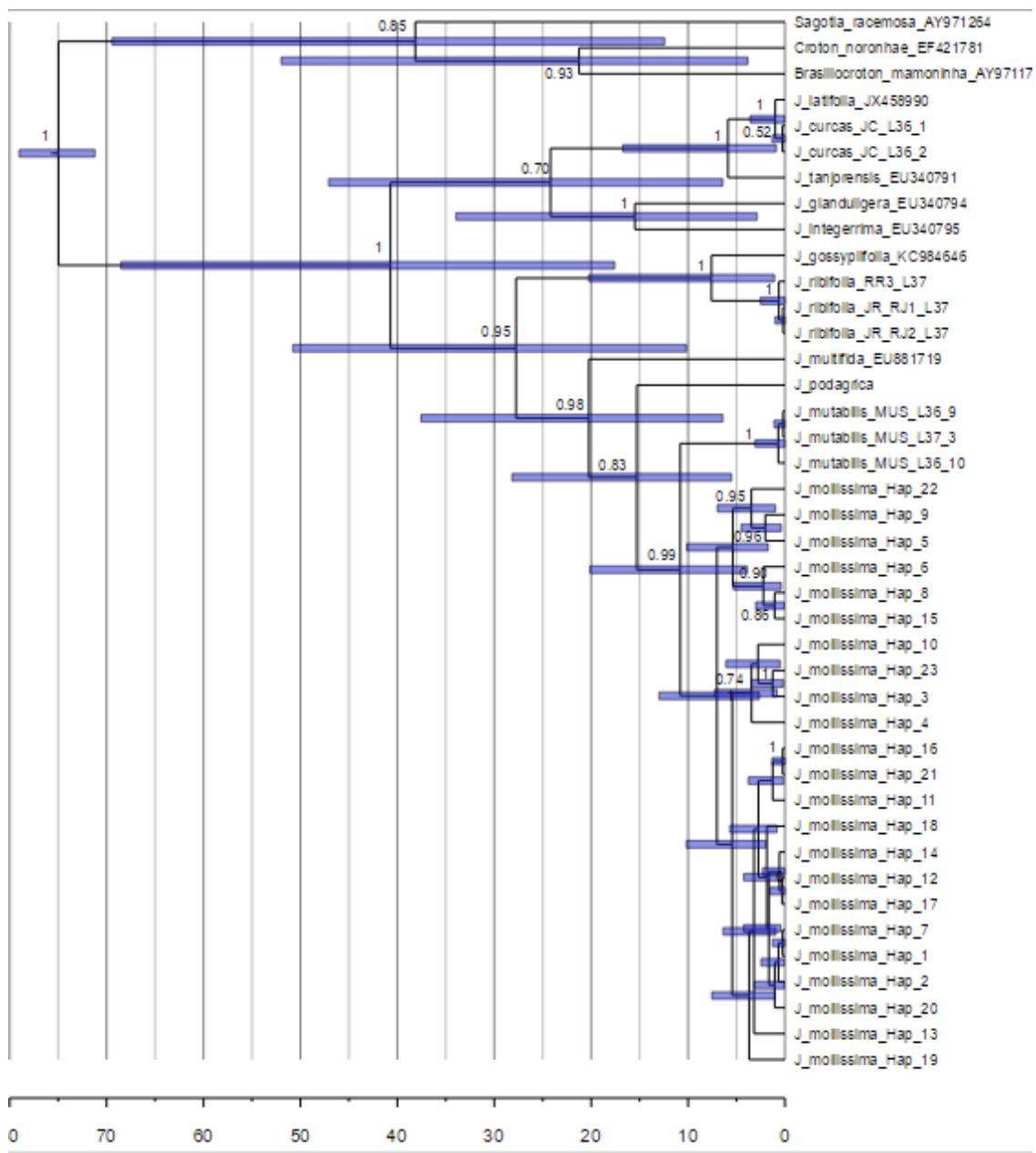


Figura 10: Árvore de máxima credibilidade do BEAST 1.8.2, mostrando a idade de 24 haplótipos de *Jatropha mollissima* e grupos externos. Os valores da probabilidade posterior são indicados nos nós, e a barra inferior indica a idade em milhões de anos atrás. As barras azuis indicam o intervalo de confiança de 95% das datas.

A espécie mais próxima à *J. mollissima* parece ser *J. mutabilis*, uma espécie também endêmica, e nativa do semiárido baiano, mas com características morfológicas bem distintas de todo o grupo, sendo o clado que inclui *J. curcas* um dos mais distantes geneticamente.

À despeito da distribuição temporal intraespecífica dos haplótipos entre as populações amostradas, é possível notar que P1, P2, P3, P4, P5 e P12, localizadas nos estados BA, SE e PE parecem ter se estabelecido mais primariamente, comparadas às demais populações dos estados de PB, AL e RN e CE por exemplo.

Reconstrução Demográfica

A partir dos 24 haplótipos obtidos com o marcador ITS, é possível observar que o tamanho efetivo das populações de *J. mollissima* na Caatinga em uma geração de 5 anos é elevado (Tabela 6) variando de aproximadamente 10 mil em P8, a pouco mais de 1 milhão de indivíduos na P 11.

Tabela 6: Tamanho efetivo populacional exibido por *J. mollissima* considerando uma geração (5 anos) na região da Caatinga, onde (σ) é o desvio padrão populacional.

População	Ne
P1	950.661,6
P2	187.187,3
P3	678.352,4
P4	677.343,9
P5	876.028,7
P6	1.154.389,2
P7	970.832,7
P8	10.690,7
P9	999.072,1
P10	901.242,5
P11	1.039.414,2
P12	753.993,9
Média	766.600,8
σ	344.776,0

A despeito da reconstrução demográfica dos últimos 5 Ma exibida no gráfico do Skyline bayesiano da Figura 11, demonstra que *J. mollissima* teve um episódio marcante de expansão populacional significativa por volta de 2 Ma, atingindo o pico máximo a 1 Ma, no Pleistoceno. Isso é similar à expansão inferida nos *mismatches* de haplótipos (Fig. 2).

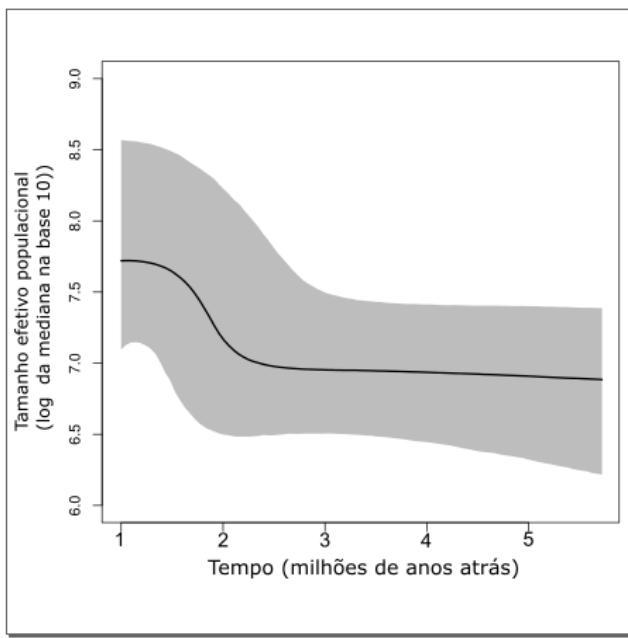


Figura 11: Reconstrução da história demográfica de *J. mollissima*. O gráfico representa a reconstrução bayesiana da história para todas as 12 populações da espécie. A linha sólida central representa o tamanho efetivo populacional médio (Ne) e as linhas acinzentadas representam o intervalo de 95% de probabilidade da densidade.

Os valores negativos e significativos para a região ITS nos testes de neutralidade apresentados nas análises de diversidade genética, aliados aos picos exibidos nos gráficos de *Mismatch Distribution* podem corroborar a possibilidade de expansão populacional recente no grupo, observada na reconstrução histórico- demográfica de *J. mollissima* na Caatinga.

4 DISCUSSÃO

Diversidade Genética

As diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica (π) encontradas neste estudo são relativamente elevadas quando comparadas a outras espécies de plantas, também de regiões áridas, a partir de marcadores de DNA plastidial, mesmo com ocorrência geográfica mais ampla do que *J. mollissima* (AMBROSI et al., 2010, WUYUN et al. 2015; NISTELBERGER et al. 2015). Estudos com *Camellia taliensis* (Theaceae), amplamente distribuída na China, indicam uma média de Hd= 0,841 e π =0,0047 na região *rpl32-trnL-* enquanto para *Lycium ruthenicum* (Solananeae), Chen et al. (2014) encontraram valores máximos de Hd=0,696 e π =0,0015 utilizando uma análise combinada de *psbA-trnH* e *rps16-trnQ*, além de Cosacov et al. (2010) que indicaram para *Calceolaria polyrhiza* (Calceolariaceae) Hd=0,74 e π =0,0499 na região *psbA-trnH*.

Observando comparativamente as populações, e baseado nos marcadores plastidiais e nucleares, é possível inferir que dentro das populações a variação genética é de 85% e 87% respectivamente. Su e Zhang (2013) encontraram maiores variações entre populações de *Nitraria sphaerocarpa* (Nitrariaceae), algo em torno de 95% utilizando *psbA-trnH*, enquanto Vieira et al. (2015) encontraram valores de diversidade entre as populações variando de 6 a 15% em *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae), em florestas tropicais da América do Sul.

A partir dos dados de diversidade genética, é possível inferir que a região ITS é a de menor diversidade genética e haplotípica, enquanto *rpL32-trnL* representa a de maior diversidade. Ram et al.(2008), em um trabalho relacionando *J. curcas* a sete outras espécies de *Jatropha* (*J. ramanadensis*, *J. gossypiifolia*, *J. podagraria*., *J. tanjorensis*, *J. villosa*, *J. integerrima* e *J. glandulifera*), encontraram resultados similares de diversidade genética, variando de 0,00 a 0,88, indicando alto nível de variação entre os genótipos analisados, enquanto Chen et al. (2014) sugerem $Hd= 0,733$ de *Lycium ruthenicum* em regiões desérticas.

Os dados obtidos neste estudo revelam o potencial das regiões plastidiais e nucleares como locos de variabilidade intraespecífica, sobretudo para populações de *J. mollissima* que exibem padrões claros de polimorfismo, principalmente na região *rpL32-trnL*. Espécies com ampla distribuição geográfica tendem a apresentar valores de diversidade mais elevados (NYBOM, 2004), pois geralmente refletem os efeitos de eventos evolutivos progressivos e a longo prazo, como por exemplo, o surgimento de mutações, extinção de populações intermediárias e restrição de fluxo gênico, durante processos de expansão e colonização das populações, sendo a diversidade genética, portanto, também dependente do grau de isolamento das populações.

Ainda sobre a diversidade genética das populações, os dados indicam que as populações de *J. mollissima* com valores mais elevados parecem ser P2, P7 e P11, e diversos fatores podem corroborar estes resultados. Em Rafael Jambeiro-BA, a população onde foram realizadas as coletas é bastante densa,

com uma quantidade de indivíduos bastante representativa, enquanto em Campina Grande-PB (P7) representa a população receptora do maior numero de migrantes (Nm) oriundas de outras populações; e por último, Milagres-CE se destaca pela sua localização estratégica próximo às dunas do São Francisco, verdadeiros corredores para a biodiversidade da Caatinga.

Quanto aos índices de fixação (Fst), estes refletem as distâncias genéticas entre populações, e no presente estudo, encontramos para as populações amostradas um Fst= 0,1420, portanto uma estruturação moderada, na região plastidial. Liu et al.(2015) relataram valores de Fst em populações de *Ficus pumila*, praticamente idênticos ao encontrado para o marcador ITS neste estudo em *J. mollissima* (Fst=0,129), enquanto indicaram (LIU et al., 2012) altas taxas de diferenciação entre populações de *Camellia taliensis* baseadas na região *rpL32-trnL*. Em *J. mollissima*, a partir da análise dos marcadores nucleares e dos espaçadores plastidiais, nota-se que a distância genética entre as populações amostradas na Caatinga são baixas quando comparadas a estes e outros estudos, sobretudo aos resultados encontrados por Silva (2007) que indica Fst=0,198 para *Chamaecrista semafora*, uma espécie endêmica da Serra do Espinhaço.

*Ecorregiões da Caatinga e Estrutura Genética de *J. mollissima**

Estudos filogeográficos na Caatinga são raros, tendo sido encontrados até o momento apenas para espécies animais a partir de genes codificantes para citocromo-oxidase (PELLEGRINO et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2014; CARNAVAL, 2002), não sendo observadas inferências diretas quanto ao

numero ótimo de populações neste bioma. Em contrapartida, se avolumam os estudos em zonas áridas ao redor do mundo, correlacionando inclusive a estrutura genética interpopulacional a partir de marcadores moleculares plastidiais e ITS (NISTELBERGER et al., 2015, GARRICK et al., 2009)

A partir dos dados obtidos com o STRUCTURE, assumindo K=3 como o numero ótimo de populações segundo o marcador ITS, uma possível correlação genética e ecogeográfica pode ser inferida, à medida em que verifica-se P1, P3 e P4, agrupadas em um mesmo cluster, e partilhando da mesma ecorregião de Depressão Meridional, enquanto as populações predominantemente localizadas na Depressão Sertaneja Setentrional, aglomeraram-se em um segundo grupo distinto. Contudo, é impossível estabelecer com clareza uma relação de influência dos padrões de distribuição ecológicos às quais as populações amostradas estão submetidas, com a estruturação genética exibida por elas, levando em consideração uma quantidade reduzida de marcadores de DNA, sem falar da grande heterogeneidade geomorfológica e vegetacional marcantes desse bioma.

A Caatinga é caracterizada por uma ampla variedade de sistemas ecológicos, dada pela sua diversidade vegetal, fruto da congruência de fatores geológicos e climáticos (RODAL et al., 2008), mas também diretamente modificada pelas relações de interação dos sistemas bióticos, com fortes influências na estruturação espacial das espécies. Observado a estrutura populacional proposta para as regiões plastidiais e combinado, assumindo em ambos os casos K=2, percebe-se uma tendência à homogeneização da espécie na região amostrada, que pode ser melhor compreendida pela Analise Molecular de

Variância, que indicam uma variação muito maior dentro das populações, do que entre elas, indicando moderada estruturação genética em *J. mollissima*.

Nesse sentido, é possível que marcadores cpDNA, especialmente as regiões *rpL32-trnL* e *psbA-trnH*, sejam mais sensíveis e melhor utilizados na detecção de polimorfismos no genoma de *J. mollissima*, não sendo tão eficazes em estudos de filogeografia na espécie, o que pode ser justificado pela diferença nas taxas de evolução e na herdabilidade dos marcadores testados.

Distâncias geográficas somadas às características singulares das formações geomorfológicas podem representar barreiras físicas ao fluxo gênico entre determinadas populações. Há de se considerar que *J. mollissima* possui ampla distribuição no bioma, porém ocupa preferencialmente áreas de menor altitude, como pode ser visualizado no mapa da Figura 12.

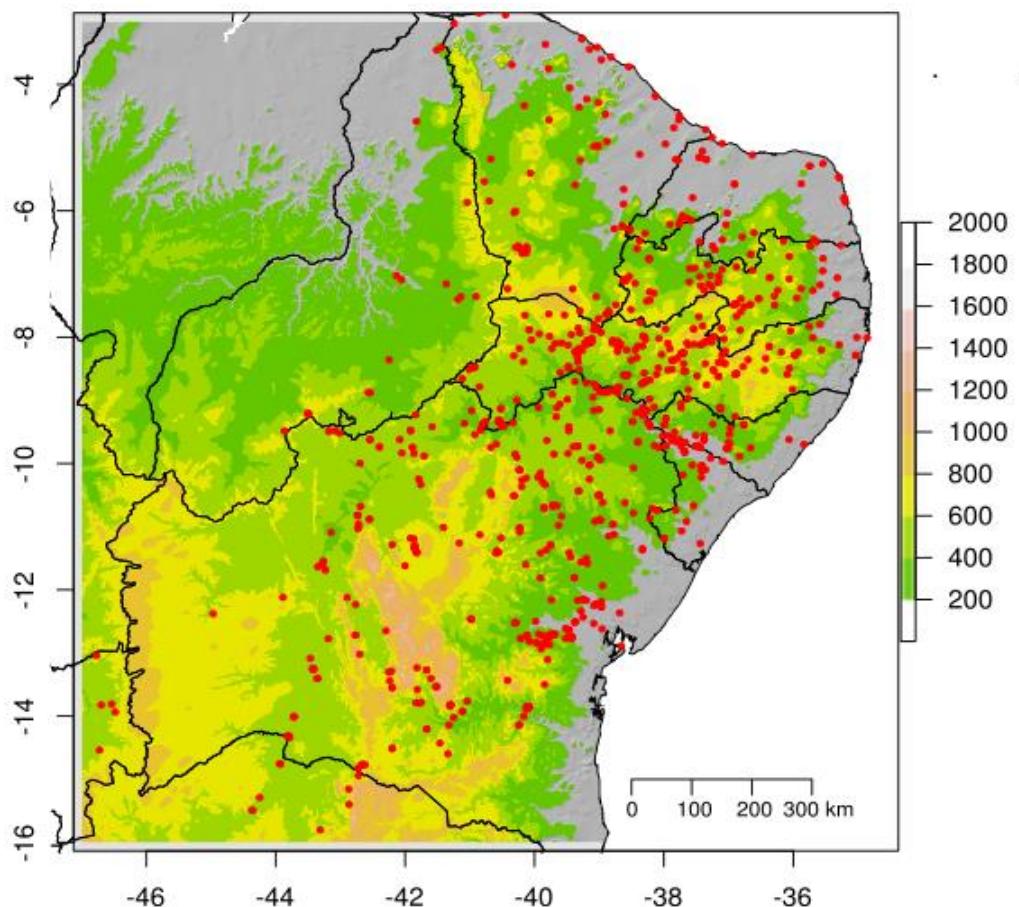


Figura 12: Mapa de relevo destacando ocorrência de *Jatropha mollissima* na região Nordeste do Brasil.

Nas áreas de estudo, a Cadeia do Espinhaço e o Rio São Francisco podem representar significativas barreiras para a comunicação gênica entre as populações, ao mesmo tempo em que as Dunas do São Francisco, caracterizada por baixas altitudes, podem servir como verdadeiros corredores para a migração genética interpopulacional.

Fluxo Gênico

Na grande maioria das populações amostradas, temos $Nm > 1$, indicando que o fluxo gênico foi elevado o suficiente para prevenir diferenciação populacional devido à deriva genética. Hernández (2014) encontraram valores de $Nm = 0,5$ em populações de *J. curcas* oriundas de diferentes regiões do Brasil, enquanto Martins et al. (2007), analisando populações naturais de *Anthonomus grandis* Boheman (Curculionidae) encontram $Nm = 3,84$ na região da Caatinga. A análise do Número de Migrantes feita neste estudo com base apenas no ITS, é congruente com o padrão inferido pelo STRUCTURE na mesma região, que assume $K=3$ agrupando indivíduos de populações com Nm significativos, pressupondo relativa homogeneidade genética nestes grupos. Além disso, a quantidade de haplótipos compartilhados entre populações parece estar diretamente relacionada ao Nm , de forma que quanto menor o número de migrantes, menor o fluxo gênico e menos haplótipos relacionados serão observados nas populações-alvo, o que pode ser muito bem exemplificado pela P8, enquanto receptora, que tem $Nm < 1$ e compartilha apenas um único haplótipo com a P1 (Hap4), sendo todos os outros haplótipos exclusivos.

No que tange às espécies alógamas, espera-se que o fluxo gênico seja basicamente mantido pelo fluxo de pólen (DUMINIL et al., 2007), contudo, os mecanismos de dispersão de espécies naturais ainda não foram completamente elucidados, sobretudo, em regiões de condições extremas como a Caatinga, onde fatores abióticos e bióticos podem interagir de forma decisiva nos padrões de dispersão de espécies.

Em *J. mollissima* este fato é ainda mais marcante, já que a espécie possui sementes grandes e pesadas, quando comparada a *J. ribifolia*, por exemplo, limitando o seu raio de dispersão. Portanto, espera-se que a maior fonte de variação genética e de fluxo gênico entre as populações de *J. mollissima* seja via pólen, o que pode ser observado no cálculo de dispersão preferencial baseados em Fst apresentado neste estudo. Contudo, quando o movimento de fluxo de pólen é limitado, como parece ser o caso nas populações amostradas (representando apenas 54%), espera-se que indivíduos mais próximos geograficamente, sejam também os mais parentados geneticamente, o que só foi possível observar utilizando uma análise concatenada de marcadores plastidiais, de origem unicamente materna, indicando correlação positiva entre as distâncias geográficas e genéticas nas populações de *J. mollissima*, não sendo observada em outras regiões do genoma testadas. Moraes et al. (2005) analisando *Praecereus euchlorus* e *Pilosocereus machrisii* encontram valores de fluxo gênico aproximado de 0,78 enquanto GARRICK et al. (2009) encontram um valor de 0,21 em populações de *Euphorbia lomelii*.

Barreiras geográficas interferem naturalmente no fluxo gênico de uma espécie, criando muitas das vezes, manchas de vegetação, decorrentes da descontinuidade de populações em dada região. Ao contrário disto, regiões de baixa altitude como as bacias e dunas do São Francisco, podem funcionar como pontes, favorecendo a ocupação de novos ambientes, e o aumento da diversidade intraespecífica via migração, o mesmo não tendo sido observado no Raso da Catarina, no qual está inserida a P8, que apresenta o menor Nm tanto como população receptora ou doadora de migrantes, no sentido do fluxo gênico.

Ademais, estudos realizados por Leal et al (2003) apresentaram informações relevantes sobre os mecanismos de dispersão de sementes de *Jatropha* por formigas (mirmecocoria), constatando que, na Caatinga, sementes de *J. mollissima*, *J. ribifolia*, *J. mutabilis* e *J. gossypiifolia* são dispersas primeiro balisticamente, através de uma capsula explosiva e, posteriormente, pelas formigas, o que garantiria uma maior distância da matriz, trazendo implicações diretas no sucesso da germinação das sementes, e no incremento do fluxo gênico via seminal. Estes dados se somam aos apresentados por Neves (2011), que detectaram *Apis mellifera* como principais dispersores primários de pólen no gênero, enquanto em outro trabalho realizado por Neves e Viana (2011), também em uma região de Caatinga, constataram dispersão secundária de *Jatropha mollissima* por hidrocoria, a partir da formação de riachos temporários em períodos chuvosos, que facilitam o arraste das sementes pelos solos lisos característicos da região, para longe das plantas-mãe.

Datação molecular, relações filogenéticas e demografia histórica de J. mollissima.

A partir dos dados de datação molecular, foi possível inferir parte da filogenia associada ao gênero *Jatropha*, onde verifica-se que a espécie mais próxima à *J. mollissima* parece ser *J. mutabilis*, também endêmica e nativa do semiárido baiano, mas com características morfológicas bem distintas de todo o grupo, a exemplo da lâmina foliar 5-lobada, sendo *J. curcas* uma das mais distantes geneticamente. Isto corrobora a relação proposta por Dehgan e Schutzman (1994), ao mesmo tempo em que contradiz diversos outros autores ao citarem

J. mollissima com destaque justamente pela sua proximidade genética com *J. curcas* (BRESSAN, 2012; FELIX, 2013; ARRUDA et al., 2004), além da plasticidade fenotípica entre ambas ser comparativamente similares.

A despeito da disposição filogenética aparente entre as outras espécies de *Jatropha* utilizadas neste trabalho (*J. integerrima*, *J. tanjorensis*, *J. latifolia*, *J. podagraria* e *J. glandulifera*), os dados obtidos se assemelham aos citados por Pamidimarri et al. (2008), Basha et al. (2009) e Kumar (2009). Estes resultados nos dão importantes pistas sobre as relações genéticas entre os grupos, facilitando a estruturação de projetos de conservação, ferramentas indispensáveis à manutenção do germoplasma em suas zonas de endemismo.

O bioma Caatinga possui padrões biogeográficos, domínios de vegetação e de distribuição de espécies bem específicos, e o seu histórico de diversificação foi citado por Werneck (2011) que sugere que a origem dos padrões de biodiversidade impostos nesta zona não podem ser atribuídos a apenas um ou a poucos eventos durante dado intervalo de tempo, mas que resultou de tendências ecológicas e evolutivas complexas, desencadeadas por eventos tectônicos e reorganizações paleogeográficas mantidos por mudanças climáticas do período Quaternário (NASCIMENTO et al., 2013).

Estudos filogeográficos na Caatinga são escassos (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013), sendo mais comumente relatos em espécies animais (CARNAVAL, 2002; MAGALHÃES et al., 2014). No que se refere às espécies vegetais selvagens e endêmicas deste bioma, este representa o primeiro trabalho catalogado, se destacando pelo caráter inédito e significativo, na tentativa de

compreender os mecanismos de evolução, dispersão e adaptação de *J. mollissima* na região do semiárido Nordestino.

São diversos, no entanto, os trabalhos analisando a filogeografia de diferentes espécies em zonas de temperatura mais elevada e índices pluviométricos mais escassos ao redor do mundo (BYRNE et al., 2002; SU et al., 2011; OSSA et al., 2013; MENG e ZHANG, 2013; XU e ZHANG, 2014). Pouget et al (2013) indicam a persistência de *Arenaria provincialis* (Caryophyllaceae), endêmica do Sudeste da França, ao longo do Pleistoceno, enquanto Garrick et al. (2009) relatam diversificação proeminente de *Euphorbia lomelii*, uma espécie adaptada a zonas áridas, por volta de 1Ma, o que coincide com um evento de expansão populacional efetiva relativamente recente de *J. mollissima*, com data de diversificação a cerca de 7 Ma, se comparada à origem de *J. curcas*, por exemplo, datada em 65 Ma (FERRÃO, 1982); este é um aspecto que pode ter influência direta na estruturação genético-populacional observada, já que representa um período reconhecidamente de grandes flutuações climáticas .

A Caatinga parece ter sido estabelecida no final do Terciário (AB'SÁBER, 1974), enquanto a origem da Família Euphorbiaceae foi estimada por Davis et al. (2005) e Wikstrom et al. (2001), com o aparecimento do gênero *Croton* nos últimos 65 Ma. Já a diversificação em *Desmodium* na Bahia, parece ter ocorrido no Final do Terciário (Plioceno e Pleistoceno), nos últimos 3 Ma (SANTOS et al., 2012), não tendo sido registradas com clareza, inferências para o surgimento do gênero *Jatropha* em outros trabalhos.

Estes dados se somam àqueles obtidos no presente estudo, onde a diversificação de *J. mollissima* na região da Caatinga foi relacionada ao inicio do Plioceno, enquanto os eventos de expansão no tamanho efetivo populacional foram vinculadas ao Pleistoceno, período marcado por grandes flutuações climáticas, alternando períodos secos e frios, com a consequente retração das florestas, e expansão destas nos períodos mais quentes e úmidos (BEHLING 1995, 2002; NEGRELLE, 2001; PRANCE , 1982; GENTRY , 1995; PRADO e GIBBS 1993; PENNINGTON, et al., 2000), o que originaria os padrões do mosaico geobotânico brasileiro atuais (CONTI e FURLAN, 2003).

Segundo Leal et al. (2003), se a Caatinga encontra-se datada no Terciário, espera-se que sejam encontradas nesse ambiente diversas espécies endêmicas e relativamente mais antigas também, o que pode ser suportado por exemplo, pelos numerosos gêneros endêmicos verificados em Cactaceae (TAYLOR, 2000), que é praticamente restrita à América do Sul, onde a datação do ancestral comum mais recente de *Cereus hildmannianus*, é de 2,56 milhões de anos (SILVA, 2013), remetendo a especiação deste ao período pré-Glacial.

A Teoria dos Refúgios, segundo Ab'Sáber (2006) pode ser encarada como uma das mais relevantes hipóteses para explicar os mecanismos de distribuição fitogeográfica atuais na América Tropical, considerando que houve uma grande faixa de transição, representada por possíveis corredores que viabilizariam a colonização de espécies nos locais em que atualmente podem ser encontradas. Andrade-Lima (1964) e Rizzini (1963) *apud* Oliveira- Filho e Ratter (1995) referem-se a uma possível rota migratória através de corredores formados na Caatinga no Terciário, o que de fato viabiliza populações

geograficamente mais distantes, manterem o fluxo gênico entre elas, a exemplo das populações amostradas nesse estudo.

Queiroz e Lavin (2011) referem-se à Caatinga como um palco da evolução de diversas espécies plantas, por apresentar vegetação muito distinta da observada em outros biomas da América do Sul, como o Cerrado e Floresta Amazônica, contudo, segundo Rizzini (1979), parte significativa do estoque florístico das Caatingas pode ter sido herdado das florestas tropicais da Mata Atlântica, o que justificaria a existência das zonas de transição naturalmente encontradas entre os biomas brasileiros.

Segundo Silva (2011), uma parcela significativa dos Cerrados, atualmente são refúgios, enquanto as Caatingas apresentam-se como redutos, ou seja, vestígios de ambientes passados. O sertão nordestino, em especial, nas fases glaciais, parece ter sido predominantemente árido, uma condição climática ainda mais extrema em termos de disponibilidade hídrica do que o atual semiárido. Alguns destes refúgios abrigam espécies endêmicas que mostram relações possíveis com a Amazônia ou com a Mata Atlântica (RODRIGUES e BORGES, 1997), e isto nos leva a crer que apenas as espécies mais resilientes e mais adaptadas a este regime de condições diversificadas conseguiram se estabelecer e se irradiar geograficamente.

No entanto, a história demográfica neste bioma ainda não está bem esclarecida. Werneck et al. (2011) não encontraram evidências significativas de expansão da Caatinga no Pleistoceno, enquanto outros autores indicam o

período Pré-Pleistoceno como cenário para a diversificação nas florestas tropicais sazonalmente secas (MAGALHÃES et al., 2014).

A distribuição temporal dos haplótipos de ITS observados nas análises de datação podem nos dar suporte às possíveis inferências quanto à origem e diversificação de *J. mollissima* nesse bioma. As populações dos estados da BA, SE e PE parecem ter se fixado primeiro, em relação às demais, sendo a região sudeste do Semiárido nordestino uma possível área ancestral.

Dados demográficos são difíceis de serem obtidos em populações naturais, especialmente pela variação de fatores evolutivos ao longo do tempo, como eventos de mutação aleatórios, deriva genética, fluxo gênico, adaptabilidade à mudanças nos padrões morfogeoecológicos e efetividade dos mecanismos de dispersão, e que dependem do tamanho populacional real.

O tamanho efetivo populacional projetado na reconstrução histórico-demográfica de *J. mollissima* demonstra a grande representatividade da espécie na região da Caatinga em condições extremas previstas nos últimos 7 Ma, o que pode ser corroborado pela ampla distribuição atual da espécie nessa região, visualizada no mapa da Figura 13, que predominantemente habita zonas de latitudes mais moderadas (inferiores a 800m), e que deve ter sido favorecida pelas condições edafoclimáticas atuais e passadas, reforçando a tendência de espécies xeromórficas se expandirem em relação às hidrófilas, e da mesotérmica se deslocar em busca de menores latitudes no Pleistoceno, como observado por Ab'Sáber (1977).

Contudo, o elevado tamanho efetivo verificado para a espécie nos leva a crer que as populações utilizadas nesse estudo podem ter sido subdimensionadas, de forma que a possibilidade de que uma mesma população tenha sido amostrada em dois pontos geograficamente distintos não deve ser descartada. Isto pode ser reforçado inclusive pelos baixos valores de Fst diagnosticados entre a grande maioria das populações, principalmente na região ITS, indicando baixa diferenciação genética, e contribuindo para a maior homogeneidade na estruturação populacional observada nas populações de *J. mollissima* da Caatinga desse estudo.

Implicações para a Conservação

A respeito dos mecanismos de conservação sugeridos para espécies arbóreas, Duque-Brasil et al. (2011) discutem a relevância dos agricultores familiares na conservação da biodiversidade, além de outras iniciativas que possam conciliar a manutenção e conservação da biodiversidade, uso sustentável dos recursos e qualidade de vida aos habitantes do Semiárido brasileiro. Contudo, os resultados aqui apresentados nos dão fortes indícios de que a partir da história demográfica e da ampla distribuição de *J. mollissima*, esta não se encontre ameaçada de extinção em sua zona de endemismo, não sendo necessários, portanto, a constituição de programas específicos para a conservação da espécie no bioma Caatinga.

5 REFERÊNCIAS

AB'SÁBER, A. N. (2006). **Brasil: Paisagens de Exceção:** o litoral e o Pantanal Mato – grossense: patrimônios básicos. Cotia – SP: Ateliê Editorial.

AB'SÁBER. A. N; **Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários.** Paleoclimas (3). São Paulo. 1977.

AB'SABER, A.N. (1974). **O domínio morfoclimático das caatingas brasileiras.** São Paulo, Instituto de Geografia, USP, Geomorfologia, n. 43.

ALDRICH, J. et al. (1988). *The role of insertions/deletions in the evolution of the intergenic region between psbA and trnH in the chloroplast genome.* Curr. Genet. 14: 137-146.

AMBROSI, D. G. et al. (2010). **DNA markers and FCSS analyses shed light on the genetic diversity and reproductive strategy of Jatropha curcas. L.** Diversity, 2(5), 810–836.

ANDRADE-LIMA, D. 1964. **Contribuição à dinâmica da flora do Brasil.** Arquivos do ICT 2:14-19.

ARAUJO, S.M.S. **A região semiárida do nordeste do Brasil:** Questões Ambientais e Possibilidades de uso Sustentável dos Recursos. Rios Eletrônica-Revista Científica da FASETE ano 5, n. 5 dezembro de 2011.

ARRUDA, F. P. et al. **Cultivo de pinhão-manso (Jatropha curcas L.) como alternativa para o semi-árido nordestino.** Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas. Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 789-799, 2004.

BANDELT H-J. et al., 1999. *Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies.* Mol Biol Evol 16:37-48 .

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

BEERLI, P. (2004). **Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations.** Molecular Ecology, 13, 827–836.

BEERLI, P; FELSENSTEIN, J.(1999). **Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach.** *Genetics* 152: 763–773.

BEHLING, H. **A high resolution Holocene pollen record from Lago do Pires, SE, Brazil: vegetation, climate and fire history.** *J. Paleolimnology*, v. 14, p. 253-268, 1995.

_____. **South and Southern Brazilian grassland during Late Quaternary times: a synthesis.** *Paleogeography, Palaeoclimatology, Palaecology*, v. 177, p. 19-27, 2002.

BERRY, P.E. et al. (2005). **Molecular phylogenetics of the giant genus Croton and tribe Crotoneae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data.** *American Journal of Botany* 92: 1520-1534.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Escritório de Pesquisas e Experimento.** Equipe de Pedologia e Fertilidade do Solo. Boletim Técnico. 15, SUDENE. Série Pedologia, Rio de Janeiro, 1972. 683p.

BRESSAN, E. A. et al. (2012). **Development of microsatellite primers for Jatropha curcas (Euphorbiaceae) and transferability to congeners.** *American Journal of Botany*, 99(6), 237–239.

BRODY, J.E ; KERN, S.E. (2004). **Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis** v. 36, n. 2. *BioTechniques* 36:214-216.fev. 2004.

BYRNE, M; MACDONALD, B; COATES, D. (2002). **Phylogeographical patterns in chloroplast DNA variation within the Acacia acuminata (Leguminosae Mimosoideae) complex in Western Australia.** *Journal of Evolutionary Biology*, 15, 576–587.

CANHOS D. A. L. et al. (2014). **Lacunas: a web interface to identify plant knowledge gaps to support informed decisionmaking.** *Biodiversity and conservation*, 23(1), 109-131.

CARNAVAL, A. C. O. Q. (2002). **Phylogeography of four frog species in forest fragments of Northeastern Brazil - A preliminary study.** *Integrative and Comparative Biology*, 42(5), 913–921.

CHAVES, I. de B. et al. (2008). **Uma classificação morfo-estrutural para descrição e avaliação da biomassa da vegetação da caatinga.** Revista Caatinga, v.21, n.2, p.204-213.

CONTI, J. B; FURLAN, S. A. (2003). **Geoecologia: O Clima, os Solos e a Biota.** In: ROSS, J. S. (Org.). Geografia do Brasil. 4. ed. 1 reimp. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo.

COSACOV, A. et al. (2010). **Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: The phylogeography of Calceolaria polyrhiza.** Journal of Biogeography, 37(8), 1463–1477.

DAVIS, C. C. C. O. et al. (2005). **Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-Cretaceous origin of tropical rain forests.** American Naturalist.

DEHGIAN, B; SCHUTZMAN, B. **Contributions toward a monograph of neotropical Jatropha: phenetic and phylogenetic analyses.** Ann. Missouri Bot. Garden 81: 349-367. 1994.

DESFEAUX, C.; et al. (1996). **Evolution of reproductive system in the genus Silene.** Proceedings of the Royal Society of London 263: 409-414.

DOYLE JJ; DOYLE JL. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus. 1990;12:13–15.

DRUMMOND A.J; RAMBAUT, A. (2007). **Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.** BMC Evol Biol 7: 214. doi: 10.1186/1471-2148-7-214.

DRUMMOND, A.J. et al. (2012). **Bayesian phylogenetics with BEAUTI and the BEAST 1.7.** Mol Biol Evol. 29:1969–1973.

DRUMMOND, A.J. et al. "Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences." Molecular biology and evolution 22.5 (2005): 1185-1192.

DUMINIL, J. et al.(2007). **Can population genetic structure be predicted from life-history traits?** The American Naturalist, 169:662–672.

DUQUE-BRASIL, R. **Composição, uso e conservação de espécies arbóreas em quintais de agricultores familiares na região da mata seca norte-mineira, Brasil.** Sitientibus série Ciências Biológicas, v. 2, p. 287–297, 2011.

EARL, B vonHoldt (2012) **STRUCTURE HARVESTER**: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Con Gen Resources* 4(2), 359-361.

EDGAR, Robert C. "**MUSCLE**: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput." *Nucleic acids research* 32.5 (2004): 1792-1797.

ENNOS, R. A., 1994 **Estimating the relative rates of pollen and seed** 90: 462–470. Migration among plant populations. *Heredity* 72: 250–259.

EVANNO et al. 2005. **Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study.** *Molecular Ecology* 14 , 2611 - 2620.

EXCOFFIER, L; LISCHER, H.E. L. (2010) **Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows.** *Mol. Eco. Res.* 10: 564-567.

FELIX, A. M. S. Dissertação de Mestrado. "Avaliação de marcadores aplicáveis à diversidade genética de *Jatropha curcas* e espécies relacionadas (Euphorbiaceae)." (2013).

FERRAO, J.E.M; A.M.B.C. **Purgeira da Ilha do Fogo. Composição da semente, algumas características da gordura.** Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Secção de Agronomia Tropical. Estudos No. 14. 1982

FRANCIS, G; EDINGER, R; BECKER, K. **A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: need, potential and perspective of Jatropha plantations.** *Nature and Resources*, Paris, Fórum 29, p.12-24, 2005.

GARRICK, R. C. et al. (2009). **Not just vicariance: phylogeography of a Sonoran Desert euphorb indicates a major role of range expansion along the Baja península.** *Molecular Ecology* 18, 1916–1931.

HAUFF, Shirley N. **PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO PROJETO BRA/00/021:** Sustentabilidade e Repartição dos Benefícios da Biodiversidade. Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga. Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/203/_arquivos/representativconservcaat_shauff_f_revisojoo_03___produto_final_203.pdf>. Acesso em 24 de out de 2015.

HERNÁNDEZ, B.G.D. **Diversidade Genética e desenvolvimento de protocolo de regeneração in vitro em *Jatropha curcas*.** Instituto Agronômico Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical. 2014.

KOGA, E. K. et al. (2006). **Biodiesel**: uma relação viável entre ciência, tecnologia, meio ambiente, sociedade e economia. Centro Educacional UNINOVE. São Paulo, 2006. Disponível em:
http://www.aedb.br/seget/artigos06/965_ArtigoBiodiesel.pdf. Acesso em: 20 jan. 2015

KUMAR , R.S; PARTHIBAN, K.T. **GOVINDA Rao, M. Molecular characterization of Jatropha genetic resources through inter-simple sequence repeat (ISSR) markers.** *Molecular Biology Reports*. set, v.36, 2009.

LEAL, I. R; TABARELLI, M; SILVA, J. M. C. Da. (2003). **Ecologia e Conservação da Caatinga:** Ecologia E Conservação Da Caatinga Recife. Ed. Universitária Da UFPE, 1, 822.

LIBRADO, P; ROZAS, J. (2009). **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* 25: 1541-1542.

LIU, M. et al. (2015). **Movements of genes between populations:** are pollinators more effective at transferring their own or plant genetic markers?.*Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 282, n. 1808.

LIU, Y. et al. (2012). **"Phylogeography of *Camellia taliensis* (Theaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA: insights into evolutionary history and conservation."** *BMC evolutionary biology* 12.1 (2012): 92.

MAGALHAES, I. L. F. et al. (2014). **Strong spatial structure, Pliocene diversification and cryptic diversity in the Neotropical dry forest spider *Sicarius cariri*.** *Molecular Ecology*, 23(21), 5323–5336.

MARTINS, W. F. S; AYRES ,C. F. J; LUCENA, W. A. "Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera, Curculionidae), the major cotton pest in the New World." *Genet Mol Res* 6.1 (2007): 23-32.

MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução.** Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MENG, H. H; Zhang, M. L. (2013). **Diversification of plant species in arid Northwest China:** Species-level phylogeographical history of *Lagochilus Bunge ex Bentham* (Lamiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(3), 398–409.
<http://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.04.012>

MONTES, J. M. et al. (2014). **Genetic Diversity in *Jatropha curcas* L. Assessed with SSR and SNP.** *Markers.Diversity*, 6(3), 551-566.

MORAES, E. M. et al. (2005). **Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil.** *Genetica*, 125(2-3), 311–323.
<http://doi.org/10.1007/s10709-005-0716-0>

NASCIMENTO, F. F. et al. (2013). ***The Role of Historical Barriers in the Diversification:*** Processes in Open Vegetation Formations during the Miocene/Pliocene Using an Ancient Rodent Lineage as a Model. PLoS ONE, 8(4).

NEGRELLE, R.R.B. 2001. **Espécies raras na Floresta Pluvial Atlântica.** Biotemas 14(2):7-21.

NEVES, E.L. das; MACHADO, I.C; VIANA, B.F. **Sistemas de polinização e de reprodução de três espécies de Jatropha (Euphorbiaceae) na Caatinga, semi-árido do Brasil**1. Revista Brasil. Bot., V.34, n.4, p.553-563, out.-dez. 2011.

NEVES, E.L. e VIANA, B.F. 2011. **Pollination efficiency of *Apis mellifera Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae)* on the monoecious plants *Jatropha mollissima (Pohl) Baill.* and *Jatropha mutabilis (Pohl) Baill.* (Euphorbiaceae)** in a semi-arid Caatinga area, northeastern Brazil. Brazilian Journal of Biology 71: 107-113.

NISTELBERGER, H. M. et al. (2015). **Genetic drift drives evolution in the bird-pollinated , terrestrial island endemic.** Grevillea georgeana (Proteaceae), 155–168.

NYBOM H. **Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants.** Molecular Ecology, 13:1143-1155. 2004.

OLIVEIRA-FILHO, A. T;RATTER, J. A. **A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns.** Edinburg Journal of Botany 52(2): 141-194. 1995.

PALMA-SILVA, C. et al. (2009) **Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species.** Heredity 103: 503-512.

PAMIDIAMARRI, D.V.N.S; PANDYA, N; REDDY MP (2008). **Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP.** Molecular Biology Reports 36: 901-907.

PAMIDIAMARRI, D.V.N.S; REDDY, M.P. (2014) **Phylogeography and molecular diversity analysis of *Jatropha curcas L.* and the dispersal route revealed by RAPD, AFLP and nrDNA-ITS analysis.** Molecular Biology Reports 41:3225–3234.

PELLEGRINO, K. C. M. et al. (2005). **Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): Genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest.** Biological Journal of the Linnean Society, 85(1), 13–26.

PENNINGTON, R.T; PRADO, D.E; PENDRY, C.A. (2000). **Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes.** J. Biog., vol. 27, no. 2, p. 261-273.

PINHEIRO, F. et al (2011). ***Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid Epidendrum fulgens***: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*.

POUGET, M. et al. (2013). ***Phylogeography sheds light on the central-marginal hypothesis in a Mediterranean narrow endemic plant***. *Annals of Botany*, 112(7), 1409–1420.

PRADO, D.E; GIBBS, P.E. ***Patterns of species distributions in the dry seasonal forest South America***. *Annals of the Missouri Botanic Garden* 80:902-927. 1993.

PRANCE, G.T. ***Forest refuges***: evidence from woody na giosperms. In: PRANCE,G.T. *Biological diversification in the tropics*. New York, Columbia University Press, 1982. p.137-58.

PRENTIS, P. J. et al. ***Worldwide phylogeography of the globally invasive plant: Jatropha gossypiifolia***. In: *Proceedings of the 16th Australian Weeds Conference*, Cairns Convention Centre, North Queensland, Australia, 18-22 May, 2008. Queensland Weed Society, 2008. p. 150-152.

PRITCHARD, J.K; WEN, X; FALUSH, D. 2010. ***Documentation for STRUCTURE software***. [Documentation file]. Available with the program at <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>.

QUEIROZ, L. P. de; LAVIN, M. ***Coursetia (Leguminosae) from Eastern Brazil***: Nuclear ribosomal and chloroplast DNA sequence analysis reveal the monophyly of three Caatinga-inhabiting species. *Systematic Botany* 36:69–79. 2011.

RAM, G. et al. (2008). ***Genetic diversity among Jatropha species as revealed by RAPD markers***. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(6), 803–809.

RAMBAUT, A., et al. (2013). Tracer v1.6.

RIZZINI, C. T. ***Tratado de fitogeografia do Brasil***. v.2. Aspectos ecológicos. Hucitec / Edusp, São Paulo. 1979.

_____. A flora do cerrado. ***Análise florística das savannas centrais***. In Simpósio sobre o cerrado (M.G. Ferri, org.). Edusp, São Paulo, p.126-177. 1963

RODAL, M. J. N. et al. (2008). ***Levantamento quantitativo das plantas lenhosas em trechos de vegetação de caatinga em Pernambuco***. Caatinga, v.21, n.3, p.192-205.

RODRIGUES, M. T; D. M. BORGES. ***A new species of Leposoma (Squamata Gymnophthalmidae) from a relictual forest in semiarid northeastern Brazil***. *Herpetologica* 53:1-6. 1997.

ROSADO, T. B. et al. (2010). **Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil.** Crop Science, v. 50, n. 6, p. 2372-2382.

SANTOS, J.S. et al. (2012). **Genetic diversity assessment of *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L.P.** Queiroz accessions using RAPD markers. Sci. Plena 8: 1-8.

SHAH, S; SHARMA, S; GUPTA, M. N. **Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil.** Energy & Fuels. v. 18, p. 154-159, 2004.

SHAW, L. et al. (2007). **Comparision of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperm: The tortoise and the Hair III.** American Journal of Botany, 94(3), 275–288.

SILVA, F. B. Da. (2007). **Filogeografia Comparada e História Evolutiva da Planície Costeira Sul e Sudeste do Brasil, 102.** Disponível em: <http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp055337.pdf>. Acesso em 12 de out de 2015.

SILVA, M.L.da. **A Dinâmica de Expansão e Retração de Cerrados e Caatingas no Período Quaternário:** Uma Análise Segundo a Perspectiva da Teoria dos Refúgios e Redutos Florestais. Revista Brasileira de Geografia Física 01: 057-073.2011.

STADEN R., BEAL, K.F, BONFIELD, J.K. **The Staden package,** 1998. Methods in Molecular Biology 132: 115–130. 2000.

SU, Z; Zhang, M. (2013). **Evolutionary response to Quaternary climate aridification and oscillations in north-western China revealed by chloroplast phylogeography of the desert shrub *Nitraria sphaerocarpa* (Nitrariaceae).** Biological Journal of the Linnean Society, 109(4), 757–770.

SUN, Q-B. et al (2008) **SSR and AFLP Markers Reveal Low Genetic Diversity in the Biofuel Plant *Jatropha curcas* in China.** Crop Science, v. 48, set. 2008.

TAMURA, K. et al. (2014). **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.** Mol. Biol. Evol. 30(12):2725–2729. out.

TAYLOR, N.P. **Cactaceae of Eastern Brazil.** PhD thesis, Royal Botanic Gardens, Kew. 2000.

TURCHETTO-ZOLET, A. C. et al. (2013). **Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America.** Mol. Ecol. 22, 1193–1213.

VAN DEN BERG, C. **Nota técnica:** Bancos de DNA de Plantas. 2005. Disponível em: <<http://www.researchgate.net/publication/228400642>>. Acesso em 16 de out de 2015.

VELLOSO, A.L; SAMPAIO, E.V.S.B; PAREYN, F.G.C. (eds.). **Ecorregiões: Propostas para o bioma Caatinga.** PNE Associação Plantas do Nordeste; Instituto de Conservação Ambiental, The Nature Conservancy do Brasil, 2002, 76p.

VIEIRA, F. de A. et al. (2015). "**Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America:** phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae)." *Botanical Journal of the Linnean Society* 177.2 (2015): 189-201.

WERNECK, M.D.S; Sobral, M.E.G; Rocha, C.T.V; Landau, E.C. & Stehmann, J.R. 2011. **Distribution and Endemism of Angiosperms in the Atlantic Forest.** *Natureza & Conservação* 9: 188-193.

WUYUN, T. et al. (2015). **Population Structure of and Conservation Strategies for Wild Pyrus ussuriensis Maxim.** *In China. Plos One*, 10(8), e0133686.

XU, Z; ZHANG, M-L. **Phylogeography of the Arid Shrub *Atrapaxis frutescens* (Polygonaceae) in Northwestern China:** Evidence From cpDNA Sequences. *Journal of Heredity Advance Access published December 16, 2014.*

Conclusão Geral

Diante dos resultados apresentados neste trabalho, é possível concluir que a implantação de um Banco Ativo de Germoplasma de *Jatropha* é um grande passo para o melhor conhecimento acerca das características do gênero, pois possibilita o desenvolvimento de estudos agronômicos, botânicos e genéticos-moleculares, dentre outros.

Marcadores moleculares microssatélites, nuclear (ITS) e plastidiais foram eficazes na detecção de polimorfismos em *J. mollissima*, que indicaram diversidade genética moderada nas populações amostradas no semiárido nordestino. Pelo caráter informativo desses marcadores, eles podem ser utilizados em outros estudos de variabilidade e diversidade genética.

A espécie *J. mollissima* está amplamente distribuída e adaptada à região semiárida do Nordeste brasileiro, ocupando grande parte da Caatinga, que historicamente sofre com a ação antrópica exploratória. Contudo, as populações amostradas parecem ter sofrido processos recentes de expansão. Espera-se que os resultados obtidos a partir do presente estudo representem um avanço no melhor entendimento dos padrões genéticos de uma espécie endêmica, associados às variáveis geográficas na Caatinga.

REFERÊNCIAS GERAIS

- CALSA JR, T. et al. **Structural features and transcript-editing analysis of sugarcane (*Saccharum officinarum L.*) chloroplast genome.** Current Genetic, v.46, p.366–373. 2004.
- COMES HP; ABBOTT, R.J. **Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean Senecio sect. Senecio (Asteraceae).** Evolution 55: 1943–1962. 2001.
- FAIAD, M. G. R.; EIRA, M. T. S. ; WETZEL, M. M. V. S. ; REIS,R.B., . **Monitoring Phaseolus vulgaris Seed Germplasm Long Term Stored.** In: Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe, 2001, Londrina, PR. III Simpósio de Recursos Genéticos Para a América Latina e Caribe. v. 1. p. 522-524.
- HELLER, J. Physic nut. *Jatropha curcas* L. In: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), **Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops.** (Prom Underused Crops) 1:1–66. 1996.
- LEAL C.K.A; AGRA M.F.. **Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill e *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae).** Acta Farm Bonaerense 24: 5-13. 2005.
- LIMA, M.L.B; LIMA, V.S.F; SILVA, T.M.; ALMEIDA, J.P.N. **Pinhão manso como alternativa para produção de biodiesel.** Revista ACSA: AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO – v. 8, n. 4, p. 01-07, out – dez , 2012.
- MARTINS, F de M.; DOMINGUES, M.V. **Filogeografia.** Revista da Biologia (2011) Vol. Esp. Biogeografia: 26-30.
- SILVA, F.F.M; TARGINO, K.C.F. **Rendimento e análise físico-química do óleo extraído das sementes do pinhão bravo (*Jatropha mollissima* Muell. Arg.).** IX CONCIG: inovação e tecnologia para o semiárido.2013.
- TEIXEIRA, J. P. F. **Teor e composição do óleo de sementes de *Jatropha* spp.** Bragantia Campinas n. 46, vol. 1, p. 151-157. 1987.