



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MELHORAMENTO GENÉTICO DE
PLANTAS

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS DE *Jatropha curcas*
L. E ESPÉCIES RELACIONADAS**

Orientadora: Ana Christina Brasileiro Vidal

Coorientadora: Daniela de Argollo Marques

Recife

2014

ROSILDA CINTRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGÉNÉTICA DE HÍBRIDOS DE *Jatropha curcas*
L. E ESPÉCIES RELACIONADAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, na área de concentração em Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela mestrandia **Rosilda Cintra de Souza**, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Recife

2014

ROSILDA CINTRA DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS DE *Jatropha curcas*
L. E ESPÉCIES RELACIONADAS**

Data de Aprovação: _____

Banca Examinadora:

Profa. Dra.

(Prof^a. Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal, UFPE – Orientadora)

Profa. Dra.

(Prof^a. Dra. Ana Maria Benko Iseppon, UFPE – Membro Externo)

Prof. Dr.

(Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho, UFRPE – Membro Interno)

Profa. Dra.

(Prof^a. Dra. Andréa Pedrosa Harand, UFPE - Membro suplente)

Profa. Dra.

(Prof^a. Dra. Kyria Cilene de Andrade Bortoleti, UNIVASF – Membro suplente)

Ao meu super-herói e pai João Wellington.

Ofereço.

A Deus,

Aos meus queridos pais João Wellington e Rosilda Valéria

e ao meu amado esposo Gilmar Paes.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai Celeste, que de sobremaneira me ama, me perdoa e me enche de bênçãos. Ele me capacitou e esteve ao meu lado em todos os momentos e me deu a alegria de concluir este trabalho.

Aos meus pais João Wellington e Rosilda Valéria, por nunca desistirem de mim, por me amarem e ensinarem os maiores valores da vida.

Ao meu esposo Gilmar Paes, que em todos os momentos esteve incentivando e acreditando em mim.

Aos meus irmãos Rebeca Lima, Myranna Viviane, Lucas Souza, Ana Cristina e Williene Melo, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida e a minha sobrinha Letícia Cintra de Souza Melo, pelos grandes momentos de alegria.

A minha orientadora Ana Christina Brasileiro Vidal, pela paciência, incentivo e motivação dada a mim. Obrigada por me aceitar, por me ensinar e por acreditar que eu seria capaz.

A minha coorientadora do IAC Daniella de Argolo Marques, pelo apoio e contribuição dada a mim e ao projeto.

Ao professor Dr. Reginaldo Carvalho, por me ensinar técnicas de citogenética com tanto afinco.

A Ana Benko-Iseppon, que mais do que avaliar, me ajudou a conseguir trilhar este caminho.

Ao coordenador do curso, professor Dr. José Luiz e a secretária da pós-graduação Bernadete, pelas inúmeras soluções e por ter me auxiliado em toda trajetória.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e a Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de aprendizado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Petrobrás, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

A secretária do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV) Vanessa e Técnicos: Lucas Vasconcelos e Ivanberto, pela atenção, amizade e solicitude em todos os momentos.

A minha amiga e companheira de laboratório Marília Gabriela, um especial agradecimento, pois nunca duvidastes de mim e por sempre acreditar que eu iria conseguir. Você é uma amiga pra toda vida, obrigada por tantos momentos inesquecíveis.

À minha amiga e confidente Ana Rafaela, por tantos momentos de conforto, auxílio e alegria. Obrigada por me ensinar e por ser minha amiga.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Anne Marinho, Arthur, Bruna, Emanuelle Vasconcelos, Erlânia, Flávia, Hévila, João Pacífico, Mitalle, Pedro Almeida, Pollyana, Santelmo Vasconcelos, Sheila e Silvany Araújo, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários Romildo e Zizi, pelos inúmeros cafezinhos que tomei.

SUMÁRIO

I. LISTA DE FIGURAS	X
II. LISTA DE TABELAS	XII
III. LISTA DE ABREVIÇÕES	XIII
IV. RESUMO	XV
V. ABSTRACT	XVII
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1 Origem e distribuição.....	23
3.2 Aspectos botânicos.....	24
3.3 Importância econômica.....	24
3.4 Bancos de germoplasma e coleções	25
3.5 Melhoramento genético de plantas	26
3.6 Resgate de embriões	27
3.6 Citogenética em plantas	29
3.6.1 Bandeamento cromossômico.....	29
3.6.2 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	30
3.6.3 Hibridização genômica <i>in situ</i> (GISH)	31
3.6.4 Caracterização citogenética em <i>Jatropha</i> L.....	32
3.6.5 Análise meiótica	34

3.6.6 Viabilidade polínica	36
CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO	38
Caracterização citogenética de híbridos de <i>Jatropha curcas</i> L. e espécies relacionadas	39
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1 Material Vegetal	42
2.2 Coleta, armazenamento do material e preparo de lâminas	43
2.3 Preparo de sondas e bloqueios	44
2.4 Hibridização Genômica <i>In Situ</i> (GISH)	45
2.5 Avaliação da viabilidade polínica	46
3. RESULTADOS	47
3.1 GISH em cromossomos mitóticos	47
3.2 Estudos meióticos	49
3.3 Análise da viabilidade polínica	51
4. DISCUSSÃO	54
5. CONCLUSÕES	61
6. AGRADECIMENTOS	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Hibridização Genômica *In Situ* (GISH) em metáfases mitóticas de híbridos de *J. curcas* x *J. integerrima* (**a, c**) e de *J. curcas* x *J. multifida* (**b, d**) em gerações F₁ (**a, b**) e RC₁F₁ (**c, d**). Cromossomos contracolorados com DAPI (pseudocoloridos em cinza) e sondas (em verde) de DNA genômico de *J. integerrima* (**a, c**) e de *J. multifida* (**b, d**). (**a, b**) Híbridos F₁, mostrando 11 cromossomos de cada parental, sendo os não marcados de *J. curcas*. (**c**) RC₁F₁ de *J. curcas* x *J. integerrima*, evidenciando os três cromossomos em verde de *J. integerrima*. (**d**) RC₁F₁ de *J. curcas* x *J. multifida*, mostrando os dois cromossomos em verde de *J. multifida*. Barra em **d** representa 5 μm. 49
- FIGURA 2.** Alterações no comportamento meiótico do híbrido L13V6 entre *J. curcas* x *J. multifida* em geração F₁. Células coradas com DAPI, pseudocoloridas em cinza. (**a**) Diplóteno final mostrando cromossomos precoces. (**b**) Metáfase I mostrando a formação de univalentes, bivalentes e multivalentes. (**c, d, e, f**) Anáfases I multipolares. Seta indica a formação de multivalentes e ponta de seta indica a formação de univalentes. Barra em **f** representa 5 μm 51
- FIGURA 3.** Análise da viabilidade polínica e da fase pós-meiótica (tétrades) em híbridos de *Jatropha* e espécies relacionadas na geração F₁, acessos L13V6 (**a, b, d**), L4V1, L8V2 e L13V6 (**c**) e L4V1 e L8V2 (**e**). (**a, b, c**) Fases pós-meióticas coradas com Carmim acético 2% com formação de (**a**) díade (**b**), tríades e (**c**) tétrades com núcleos de tamanhos diferenciados. (**d, e**) Pólens corados com reativo de Alexander (1980), em rosa os pólenes viáveis e em azul pólenes inviáveis. Barra em **e** representa 5 μm 52

- FIGURA 4.** Variação no tamanho / porte, pigmentação de folhas (antocianina), coloração das flores (rosa claro á púrpura) de híbridos F₁ entre *J. curcas* x *J. integerrima*. Fonte: Instituto Agronômico de Campinas (IAC) 56
- FIGURA 5.** Características morfológicas intermediárias de híbridos F₁ entre *J. curcas* e *J. multifida*. Da esquerda para direita: *J. multifida* (parental masculino); híbrido F₁; *J. curcas* (parental feminino) 56
- FIGURA 6.** Características morfológicas entre plantas da geração RC₁F₁. Número de flores femininas e número de cachos por planta (**a, b**). Morfologia do fruto (**c, d**) 59

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Acessos avaliados, cruzamento interespecífico e material coletado oriundo do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) 41
- TABELA 2.** Análise do comportamento meiótico e da fase pós-meiótica (tétrades) de três acessos da geração F₁ do banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) 51
- TABELA 3.** Acessos do banco de germoplasma analisados quanto à viabilidade polínica (%) mediante coloração com reativo de Alexander (1980) 51

ABREVIACOES

BAG	Banco de Germoplasma
BSA	Albumina de soro bovino
CARNOY	Fixador 3:1 (Etanol : cido acético)
C	Conteúdo de DNA
CG	Citosina-Guanina
DAPI	4 ', 6'-diamidino-2-phenylindole
DNA	cido Desoxirribonucleico
DNAr	DNA Ribossomal
dUTP	2'-deoxyuridine 5'-triphosphate
F₁	Primeira geração Filial
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G	Grama
GISH	Hibridização Genômica <i>in situ</i>
HCl	cido Clorídrico
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
Kg	Quilograma
Mb	Mega pares de base
Mm	Milimolar
Pg	Picograma

RC₁F₁	F ₁ retrocruzado com um dos parentais
RNA	Ácido Ribonucleico
RON	Região Organizadora de Nucléolo
° C	Grau Celsius
SSC	Solução de Citrato de Sódio
2n	Número diploide
8HQ	8-Hidroxiquinoleína
µL	Microlitro
µg	Micrograma
%	Porcentagem

RESUMO

Jatropha curcas L., denominada popularmente pinhão-manso, é uma oleaginosa cujo interesse tem aumentado devido à sua promissora utilização como matéria-prima na produção do biodiesel e fabricação de fármacos. Apesar de promissora, não há, até o momento, cultivares estáveis que possam viabilizar o seu cultivo em larga escala. Nesse sentido, se faz necessário o estabelecimento, caracterização e avaliação de acessos e híbridos interespecíficos, visando obter cultivares de *J. curcas* com características agronômicas melhoradas. A composição genômica dos híbridos interespecíficos de *Jatropha* resultantes dos cruzamentos *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida* em geração F₁ e RC₁F₁ foi analisada mediante hibridização genômica *in situ* (GISH, *Genomic In Situ Hybridization*). Adicionalmente, foram investigados o comportamento meiótico e a viabilidade polínica de três acessos dos referidos híbridos em geração F₁. Em células dos híbridos F₁ de ambos os cruzamentos observou-se como esperado a presença de 11 cromossomos de cada parental mediante GISH. Já na geração RC₁F₁, a GISH permitiu a identificação de três cromossomos de *J. integerrima* no híbrido *J. curcas* x *J. integerrima* (L4P49 // L4P49 x I2), e de dois cromossomos de *J. multifida* no híbrido *J. curcas* x *J. multifida* (L3P28 // R181). Com relação às análises de viabilidade polínica, os acessos F₁ de *J. curcas* x *J. integerrima* apresentaram os maiores percentuais, 82-83%. Estes dados indicam que os acessos oriundos do cruzamento entre estas duas espécies podem ser efetivamente usados em cruzamentos assistidos. No entanto, o acesso F₁ de *J. curcas* x *J. multifida* mostrou uma menor taxa de viabilidade (68%), que indica possíveis problemas de esterilidade e/ou de incompatibilidade para o referido cruzamento interespecífico. Os estudos meióticos corroboraram com os dados acima, demonstrando que a meiose dos acessos F₁ de *J. curcas* x *J. integerrima* foi predominantemente regular, e que o acesso F₁ de *J. curcas* x *J. multifida* apresentou elevado número de alterações meióticas e pós-meióticas, incluindo cromossomos retardatários em anáfase I e formação de díades, tríades, políades e micronúcleos. Os resultados apresentados mostram que a caracterização citogenética de

híbridos interespecíficos e suas progênes de retrocruzamentos podem contribuir para a caracterização e escolha dos melhores genótipos na seleção assistida do melhoramento genético de *J. curcas*.

Palavras-chave: *Jatropha*, GISH, viabilidade polínica, cruzamento interespecífico, estudos das tétrades.

ABSTRACT

Jatropha curcas L., popularly known as *Jatropha*, is an oilseed crop whose interest has increased due to their promising use as feedstock in biodiesel production and manufacturing of pharmaceuticals. However, stable cultivars are not available yet for its large scale cultivation. Thus, the establishment, characterization and evaluation of accessions and interspecific hybrids, in *J. curcas* improvement are necessary. The genomic composition of interspecific hybrids of *J. curcas* (*J. curcas* x *J. integerrima* and *J. curcas* x *J. multifida*) in F₁ and RC₁F₁ generations was analyzed by Genomic *In Situ* Hybridization (GISH). Additionally, meiotic behavior and pollen viability of hybrids of these three accessions in the F₁ generation were investigated. In F₁ cells from both hybrids, as expected it was observed the presence of 11 chromosomes of each parental by GISH. In the RC₁F₁ generation the GISH allowed identification of three *J. integerrima* chromosomes in *J. curcas* x *J. integerrima* hybrid (L4P49 // L4P49 x I2) and two *J. multifida* chromosomes in *J. curcas* x *J. multifida* hybrid (L3P28 // R181). Regarding the analysis of pollen viability, *J. curcas* x *J. integerrima* F₁ had the highest percentage, 82-83%. These data indicate that accessions arising from crosses between these two species can be effectively used in assisted breeding. However, the *J. curcas* x *J. multifida* F₁ accession showed a lower rate of viability (68%), indicating potential problems with sterility and / or incompatible to referred interspecific cross. The meiotic studies corroborate the above data showing that meiosis of *J. curcas* x *J. integerrima* F₁ accessions was predominantly regular, and that the F₁ access of *J. curcas* x *J. multifida* showed a high number of meiotic and post-meiotic changes, including laggard chromosomes in anaphase I and the formation of dyads, triads, polyads and micronuclei. The results showed that the cytogenetic characterization of interspecific hybrids and their backcross progeny can contributing to the characterization and selection of the best genotypes in assisted breeding of *J. curcas*.

Keywords: *Jatropha*, GISH, pollen viability, interspecific cross, studies of tetrads.

1. INTRODUÇÃO

Euphorbiaceae está representada no Brasil com 72 gêneros. Dentre eles, destaca-se o gênero *Jatropha* L. com 191 espécies aceitas (<http://www.theplantlist.org/tpl/search?q=Jatropha>). Muitas delas são utilizadas para fins de ornamentação, fabricação de sabões, detergentes e fármacos e como fonte para produção de biocombustível (DEVAPPA *et al.*, 2011).

Jatropha curcas L., denominada popularmente pinhão-mansão, destaca-se por ser promissora como fonte energética renovável e por sua produção não competir com culturas alimentares. Além disso, é compatível com o perfil da agricultura familiar, pois apresenta alta produtividade de óleo/ kg de sementes, baixo custo de produção (por ser uma espécie perene), tolerância ao estresse hídrico e solos pouco férteis (ARRUDA *et al.*, 2004; CARELS, 2009; GOMES *et al.*, 2010).

Por isso, centros de pesquisa nacionais têm criado bancos de germoplasma contendo acessos de *Jatropha*, provenientes em sua maioria de diversas regiões do Brasil, a fim de armazenar sua diversidade genética. Esses bancos permitem ao melhorista selecionar genes/alelos de interesse em espécies do gênero e em gêneros próximos a serem incorporados em programas de melhoramento genético (MARQUES *et al.*, 2013; BUENO *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de novas cultivares de *J. curcas* objetiva combinar vários caracteres de interesses agrônômicos. Contudo, devido às barreiras interespecíficas, faz-se necessário em alguns casos o uso de técnicas biotecnológicas, como por exemplo, resgate de embriões *in vitro* (MARQUES e FERRARI, 2008; MARQUES *et al.*, 2013). Além disso, estudos meióticos e de hibridização genômica *in situ* (GISH, *Genomic In Situ Hybridization*) em híbridos interespecíficos podem fornecer informações importantes, permitindo identificar irregularidades meióticas, viabilidade polínica e o percentual de

cada genoma parental nas células híbridas. Tais ferramentas facilitam a escolha de híbridos promissores e o planejamento de cruzamentos, visando maximizar a segregação e recuperação de genótipos superiores (PAGLIARINI, 2000; ALI *et al.*, 2004).

A presença de irregularidades meióticas em cruzamentos interespecíficos é, em geral, responsável pela formação de plantas com pouco/nenhum interesse agrônomico, com baixa fertilidade ou estéreis. As referidas anomalias reduzem, por consequência, a produção de pólenes viáveis e a produção de sementes (PAGLIARINI, 2000; BIONE *et al.*, 2000). Em híbridos interespecíficos de *Jatropha*, existem poucos estudos sobre fertilidade polínica, apesar de seu potencial uso nos cruzamentos para o melhoramento de *J. curcas* (SOUZA *et al.*, 2004).

Dessa forma, o presente trabalho visou analisar a meiose e a composição genômica, mediante uso da GISH de híbridos interespecíficos de *Jatropha* provenientes do programa de melhoramento de genético de *J. curcas* do Instituto Agrônomico de Campinas (IAC). Constitui o primeiro estudo realizado a respeito da composição genômica de híbridos interespecíficos resultantes dos cruzamentos *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida*, em gerações F₁ e RC₁F₁.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- ✓ Caracterizar e avaliar a meiose e a composição genômica de híbridos entre *J. curcas* e espécies relacionadas, como também de seu respectivo retrocruzamento RC₁F₁, mediante hibridização genômica *in situ* (GISH) em metáfases mitóticas.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a composição genômica de híbridos F₁ e RC₁F₁ entre *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida* em células mitóticas mediante GISH.
- ✓ Analisar a existência de irregularidades na segregação meiótica dos híbridos F₁ *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida*.
- ✓ Avaliar a viabilidade polínica de três acessos híbridos F₁ (*J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida*).
- ✓ Comparar os resultados da GISH com os dados morfológicos obtidos pelo grupo de pesquisa do IAC, a fim de colaborar para a diferenciação e seleção dos referidos genótipos.

Capítulo I

Revisão de Literatura

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Jatropha*

A família Euphorbiaceae compreende pouco mais de 8.000 espécies, distribuídas em cerca de 300 gêneros, dentre os quais se destacam *Ricinus* L., *Manihot* Mill, *Hevea* Willd. e *Jatropha* L., pela grande importância econômica de seus representantes, tais como a mamona (*Ricinus communis* L.), a mandioca (*Manihot esculenta* L.), a seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Muell.- Arg.) e o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.).

O gênero *Jatropha* possui 191 espécies de plantas atualmente aceitas (<http://www.theplantlist.org/tpl/search?q=Jatropha>), algumas são tradicionalmente cultivadas como fonte de matéria-prima para a produção de fármacos, combustível e cultivo ornamental (MABBERLEY, 1987; SOUZA e LORENZI, 2006; DEVAPPA *et al.*, 2011). A origem do gênero não está claramente definida. É provável que seja proveniente da América Central e de partes da América do Sul (HELLER, 1996; HENNING, 2009). A distribuição para outras regiões tropicais ocorreu através de navegadores e exploradores, a partir do século XVI em diante. Atualmente, desenvolve-se em áreas tropicais do mundo (Américas, Países Africanos, Sudeste Asiático, Índia, México), muito encontrada de forma espontânea ocorrendo em maior escala nas regiões tropicais e em número bastante reduzido nas regiões temperadas (ARRUDA *et al.*, 2004; SATURNINO *et al.*, 2006, VERMA & GAUR, 2009).

No Brasil, sua distribuição é bastante vasta, devido à sua rusticidade, resistência a longos períodos de estiagens e adaptação a variações climáticas existentes nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, onde inclui uma parte do Paraná (DRUMMOND *et al.*, 2007; ARRUDA *et al.*, 2004; SATURNINO *et al.*, 2005).

3.2 ASPECTOS BOTÂNICOS

Em geral, as espécies do gênero *Jatropha* se apresentam em forma de árvores, arbustos, subarbustos e herbáceas, com ramificações desde a base, de crescimento rápido, podendo atingir seis a oito metros em condições especiais. O sistema de raízes da *Jatropha* é bem desenvolvido, com raízes crescendo tanto lateral como verticalmente em camadas mais profundas do solo (CORTESÃO, 1956; ALVES *et al.*, 2008; BRITTAINE & LUTALADIO, 2010). São plantas alógamas e monoicas, que possuem inflorescência terminal cimosa. Seu tronco possui cicatrizes resultantes da queda das folhas em época de estiagem, as quais surgem novamente após as primeiras chuvas e seu látex possui cor geralmente avermelhada ou transparente (DEHGAN e WEBSTER, 1979; MISRA, 2010).

As folhas das espécies de *Jatropha* em geral são simples, brilhantes, largas e alternas, em forma de palma, podendo ou não apresentar pelos glandulares, com três a cinco lóbulos, pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior, com coloração verde ou vermelho-vinho. Suas flores podem variar de cor entre as espécies, que destoam entre vermelho-carmim, roxas e verdes e com tamanho de até 20 cm (ARRUDA *et al.*, 2004; SATURNINO *et al.*, 2005; MISRA, 2010; BRITTAINE & LUTALADIO, 2010).

O fruto é geralmente capsular com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos, conhecido como cápsula tricoca (SÁTIRO e ROQUE, 2008). As sementes de *Jatropha* são relativamente grandes com massa que varia de 0,5 a 0,8 g, comprimento de até 2 cm, com 20 a 40% de teor de óleo para a produção do biodiesel, destacando a *J. curcas*, com até 38% de óleo extraído de suas sementes (SATURNINO *et al.*, 2005; DIAS *et al.*, 2007; KUMAR e SHARMA, 2008; DEVAPPA *et al.*, 2011).

3.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO GÊNERO

Espécies do gênero *Jatropha* foram muito utilizadas na América Central, e talvez na América do Sul, para fins fitoterápicos (KUMAR E

SHARMA, 2008). O óleo de *J. curcas*, por exemplo, é um forte purgante, amplamente utilizado como um antisséptico para a tosse, doenças de pele e como um analgésico para reumatismo (RAJA, 2011). *Jatropha integerrima* também é usada como purgante (MONGKOLVISUT *et al.*, 2006) e *J. multifida* utilizada como antisséptica e antifúngica e anti-inflamatória (MARTINS *et al.*, 2005). Adicionalmente, as folhas e frutos de *J. multifida* também podem ser utilizados como cicatrizantes, anti-hemorrágico, laxante, antirreumática e anti-hipertensiva (LORENZI & MATOS, 2008).

Devido à toxicidade de suas folhas e ao seu rápido crescimento, espécies do gênero são frequentemente usadas como cerca viva, uma vez que o gado não se alimenta delas (OSONIYI e ONAJOBI, 2003). As espécies de *Jatropha* também são utilizadas para produção de fertilizantes, sabão, cosméticos, medicamentos populares, iluminação em lâmparinas, ornamentação, inseticida e biodiesel (DEVAPPA *et al.*, 2010; MISRA, 2010; RAJA, 2011). Além disso, são consideradas plantas que auxiliam no reflorestamento e na redução do efeito estufa (OPENSHAW 2000; KUMAR E SHARMA, 2008).

No Brasil, as expectativas de plantio em larga escala e o aumento do interesse pela produção de biodiesel de *J. curcas* têm criado demanda para o desenvolvimento de cultivares melhoradas, porém os programas de melhoramento genético da espécie ainda são iniciantes se comparados aos programas de outras espécies oleaginosas como a soja, amendoim e mamona (FREITAS, 2010).

3.4 BANCOS DE GERMOPLASMA

Bancos de germoplasma (BAG) são unidades conservadoras de material genético para uso imediato ou com potencial de uso futuro (BORÉM, 1999; VILELA-MORALES, VALOIS, 2000). Servem como um reservatório de genes, aos quais os melhoristas podem acessar para resolver problemas

específicos, como a suscetibilidade a fatores bióticos e abióticos (BORÉM, 1999; FRITSCHÉ-NETO & BORÉM, 2013).

O sucesso de um programa de melhoramento depende em grande parte do conhecimento e da conservação da variabilidade genética disponível das culturas (BASHA & SUJATHA, 2007). A introdução de um germoplasma vegetal, quando realizada corretamente, é uma opção e constitui uma vantajosa fonte de diversidade, que pode ser aproveitada para o melhoramento genético e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da agricultura (FRITSCHÉ-NETO & BORÉM, 2013).

A caracterização de germoplasma e da diversidade genética entre diferentes tipos podem auxiliar na identificação de genótipos promissores muito utilizados em programas de melhoramento genético. Dentre os centros de pesquisa brasileiros que possuem bancos de germoplasma de *Jatropha*, destacam-se o Embrapa Meio-Norte (Piauí), Embrapa Algodão (Paraíba) e o IAC (Instituto Agrônômico de Campinas, São Paulo). Este último possui diferentes espécies de *Jatropha*, incluindo cerca de 1200 acessos de *J. curcas* de diferentes regiões geográficas de nove estados brasileiros (Alagoas, Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Norte, São Paulo e Tocantins) e outros quatro países (China, Costa Rica, Índia e México) (MARQUES *et al.*, 2013).

3.5 MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS

O melhoramento das plantas teve início há mais de dez mil anos, quando o homem passou de consumidor do que a natureza provia espontaneamente, para organizador da produção, mediante o cultivo e a domesticação de plantas e animais (RIBEIRO, 1983).

Alguns passos são primordiais para que haja um melhoramento eficaz, dentre eles estão à coleta, introdução, caracterização, avaliação e conservação de germoplasma. Entre os métodos de melhoramento, a

introdução e a avaliação do germoplasma constituem uma opção de um processo rápido de seleção e inclusão de novas variedades ao sistema produtivo permitindo a ampliação da variabilidade genética. Esse método permitiu ao Brasil apropriar espécies e variedades com genótipos promissores, fornecendo assim, subsídios para os programas de melhoramentos (BORÉM E MIRANDA, 2013).

Para a implantação de um programa de melhoramento é fundamental o entendimento da base genética dos genótipos existentes e o melhoramento destes, através de hibridação ou por seleção a partir da identificação de genótipos promissores (BRASILEIRO, 2010). Embora, *J. curcas* já tenha seu genoma sequenciado, pouco se sabe sobre sua variabilidade genética e poucos são os estudos voltados à seleção de genótipos superiores de pinhão-manso e de espécies relacionadas (SATO *et al.*, 2011; HIRAKAWA *et al.*, 2012).

Programas de melhoramento de *J. curcas* têm sido desenvolvidos pela equipe do IAC, com intuito de explorar a variabilidade genética pré-existente e realizar a introgressão de genes de espécies afins mediante cruzamentos interespecíficos entre *J. curcas* x *J. integerrima*, *J. curcas* x *J. multifida* e *J. curcas* x *J. podagrica* (IAC, 2010; MARQUES, *et al.*, 2013). Dentre os objetivos do melhoramento de *J. curcas*, destacam-se aumento da produtividade; do teor e qualidade do óleo; porte mais compacto; uniformidade de maturação dos frutos; baixo teor ou ausência de substâncias tóxicas no óleo e no resíduo de extração; resistência a estresses abióticos (seca e acidez do solo) e bióticos (pragas e doenças) (MARQUES *et al.*, 2013).

3.6 RESGATE DE EMBRIÕES

Algumas sementes podem apresentar baixa porcentagem de germinação devido às deficiências nutricionais e/ou barreiras fisiológicas. Em espécies que apresentam desuniformidade no processo de maturação, como no caso de *Jatropha ssp.*, a germinação das sementes pode ser baixa. Este fato é atribuído a um pobre desenvolvimento do embrião (SHARMA *et al.*, 1996). Além do mais, híbridos interespecíficos podem apresentar barreiras genéticas pré ou pós zigóticas. Quando a barreira é pré zigótica (ou anterior à fertilização) não ocorre germinação do pólen no estigma ou há uma interrupção do crescimento normal do tubo polínico resultando, em ambos os casos, na não formação de embriões e sementes. Já nas barreiras pós zigóticas, os embriões híbridos obtidos após a fertilização degeneram durante o crescimento devido à inadequada nutrição e desenvolvimento do endosperma, seguido do aborto do embrião (SEGEREN *et al.*, 1993, MOREIRA *et al.*, 2013). Quando há perigo de abortamento do embrião, este pode ser "resgatado" e cultivado em condições apropriadas (SHARMA *et al.*, 1996). Esta técnica de resgate de embriões *in vitro*, consiste em remover os frutos imaturos da planta mãe antes que ocorram os problemas resultantes da incompatibilidade causem o aborto (MOREIRA *et al.*, 2013).

O resgate de embriões *in vitro* tem sido realizado em diversos gêneros, inclusive em Euphorbiaceae (CARVALHO e ARAÚJO, 2007). Esta técnica associada a uma série de retrocruzamentos planejados permite que muitos genes indisponíveis devido às barreiras interespecíficas possam ser introduzidos em uma cultura. Dessa forma, seu uso tem auxiliado na obtenção de híbridos interespecíficos raros, com introgressão de genes de resistência encontrados em parentais congêneres e incompatíveis com *J. curcas*. Tais híbridos integram hoje o programa de melhoramento genético de *J. curcas* do IAC (MARQUES e FERRARI, 2008, De Argollo, *et al.* 2013).

3.7 CITOGENÉTICA VEGETAL

A citogenética permite uma melhor compreensão da organização e da estrutura cromossômica, tanto no que diz respeito à sua função, quanto à sua variação e evolução. Além disso, é considerada uma ferramenta de suporte importante para caracterização do germoplasma e para as etapas de planejamento, coleta e seleção de genótipos em programas de melhoramento genético (GUERRA, 2000).

A análise de células mitóticas fornece os parâmetros cariotípicos mais básicos como número diploide, tamanho, morfologia e padrão de condensação cromossômica, localização das constrições primária e secundária e tipo de núcleo interfásico cromossômico. Com base nessas informações, os primeiros estudos citogenéticos possibilitaram comparar cariótipos de diferentes espécies (GUERRA, 2008).

Adicionalmente, a identificação e/ou qualificação da heterocromatina, mediante técnicas de bandeamento (C, com fluorocromos base-específicos e impregnação com nitrato de prata), vem sendo a principal forma para a diferenciação de cromossomos morfologicamente semelhantes na maioria das espécies de plantas (SUMNER, 2003). O uso de técnicas de bandeamento, por exemplo, permitiu distinguir cromossomos em espécies de *Manihot* e cultivares de *Manihot esculenta*, de cariótipos simétricos ($2n = 36$), mediante técnicas de bandeamento C, RON e com corantes fluorescentes CMA e DAPI, e de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para a localização de sequências de DNAr 5S e 45S (CARVALHO e GUERRA, 2002).

A análise citogenética também tem permitido o estudo do comportamento cromossômico durante o ciclo meiótico e a visualização de possíveis irregularidades celulares (WALKER e RAPLEY, 1999). Estudos meióticos têm possibilitado a detecção de alterações cromossômicas associadas à instabilidade meiótica, como também a identificação de genótipos com baixa fertilidade ou estéreis (TECHIO e DAVIDE, 2007).

Com advento da Hibridização *In Situ* Fluorescente (FISH), houve um aperfeiçoamento dos estudos da citogenética comparativa, fornecendo melhorias para a análise cromossômica e contribuindo para novos

conhecimentos sobre a natureza de rearranjos cromossômicos e composição genômica. Além disso, esta técnica tem permitido analisar os efeitos decorrentes do comportamento dos cromossomos durante a divisão e polimorfismos cromossômicos causados por diferenças entre sequências de DNA repetitivo em diferentes espécies e híbridos (HESLOP-HARRISON e SCHWARZACHER, 2011).

3.7.1 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

A FISH, primeiramente descrita por Pardue e Gall (1969), é um método histoquímico que tem possibilitado a visualização, identificação e localização de sequências de DNA ou RNA mediante seu pareamento com uma sequência específica de nucleotídeos complementares (GUERRA, 2004). É um método que tem como princípio básico o anelamento da sonda com a sequência alvo, para a visualização direta em microscópio epifluorescente. Entende-se por sonda, uma sequência de DNA complementar e específica marcada com uma molécula fluorescente (HESLOP-HARRINSON *et al.*, 1998; GUERRA, 2004).

A FISH tem uma grande variedade de aplicações dentro de diferentes campos de investigação, incluindo análise de alterações cromossômicas, mapeamento genético, genômica comparativa, biologia evolutiva, construção de mapas físicos de cromossomos, análise e investigação da estrutura, evolução dos cromossomos, e detecção de genomas (HESLOP-HARRINSON *et al.*, 1998; PINTO-MAGLIO, 2007).

As sondas mais utilizadas por FISH em plantas são aquelas constituídas por DNA repetitivo com comportamento em tandem, por sua facilidade de visualização nos cromossomos. Dentre elas, destacam-se, por exemplo, os genes de RNA ribossomal (RNAr), o DNAr 45S (RNAr 18S, 5.8S e 25S) e o DNAr 5S. Os sítios ativos de DNAr 45S, também denominados regiões organizadoras de nucléolo (RONs), são geralmente observados como constrições secundárias em células com coloração convencional. Análises

com FISH têm permitido a localização de sítios de DNAr 45S em cromossomos de centenas de espécies de plantas (RAO e GUERRA, 2012).

Em estudos realizados em espécies da família Euphorbiaceae, tais como *Manihot esculenta* Crantz, *M. dichotoma* Ule e *Ricinus communis*, foram observadas uma quantidade variável de sítios de DNAr 45S (um par para espécies de *Manihot* e sete pares, dois mais fortes e cinco nem sempre perceptíveis para as espécies de mamona) e a conservação de apenas um par de DNAr 5S para as espécies analisadas (LEITCH *et al.*, 1998; CARVALHO, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2010).

3.7.2 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA *IN SITU* (GISH)

A hibridização genômica *in situ* (GISH, *Genomic In Situ Hybridization*) é decorrente de modificações feitas por Schwarzacher *et al.* (1989) na hibridização *in situ* fluorescente (FISH), por utilizar como sonda o DNA genômico total de uma espécie, permitindo a marcação de cromossomos ou de braços cromossômicos uniformemente (BRASILEIRO-VIDAL *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005). Contudo, em alguns casos, quando as duas espécies parentais apresentam genomas similares, é preciso usar o DNA do segundo parental como bloqueio em conjunto com DNA genômico do primeiro parental usado como sonda. O uso do DNA bloqueio evita hibridizações de marcações inespecíficas decorrentes da presença de sequências comuns aos dois genomas (MUKAY, 2005).

Em espécies com origem híbrida, seja por cruzamento natural ou artificial, esta técnica permite a identificação da origem parental de cada cromossomo das células híbridas. Foi usada pela primeira vez em um estudo da organização genômica em parentais de um híbrido intergenérico *Triticum x Secale* (LEITCH *et al.*, 1989; SCHWARZACHER *et al.*, 1989), e tem sido largamente utilizada em plantas com origem aloploiploides ou provenientes de cruzamentos interespecíficos (BRASILEIRO-VIDAL *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005). Nesse sentido, a GISH tem sido amplamente utilizada com sucesso

em diversos gêneros de plantas, permitindo a distinção de cromossomos de diferentes parentais em híbridos interespecíficos e suas progênes de retrocruzamentos ou em espécies aloploides, bem como em estudos de similaridade genômica (HAN *et al.*, 2004; BRASILEIRO-VIDAL *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006). Além disso, pode ser aplicada para a análise do comportamento da meiose de híbridos e poliploides, fornecendo informação relativa sobre a relação entre as espécies (BRASILEIRO-VIDAL; GUERRA, 2002; MARKOVA & VYSKOT, 2009).

No entanto, em plantas com genomas muito pequenos, a GISH muitas vezes não teve êxito na identificação de cromossomos inteiros, como observado para híbridos dos gêneros *Brassica* L. (FAHLESON *et al.* 1997; SNOWDON *et al.* 1997), *Coffea* L. (BENNETT 1995; BARRE *et al.* 1998; RAINA *et al.* 1998), *Rubus* L. (LIM *et al.* 1998), *Musa* L. (D'HONT *et al.* 2000), e *Hypericum* L. (BRUTOVSKÁ *et al.* 2000). Nestes casos, os sinais detectáveis da GISH foram restritos principalmente às regiões pericentroméricas com blocos de heterocromatina e às vezes às regiões organizadoras do nucléolo (RONs), onde as sequências de DNA repetitivo estão agrupadas em tandem. Raina e Rani (2001) sugerem um tamanho crítico do genoma com cerca de 0,6 pg/ 1 C, no qual a marcação da GISH se torna difícil de alcançar. Entretanto, estudos realizados em *Arabidopsis thaliana* L. e *A. suecica* L. mostraram que a GISH é adequada para marcar cromossomos inteiros, mesmo de genomas muito pequenos, aumentando-se as concentrações de DNA genômico usado como sonda (ALI *et al.*, 2004).

A detecção dessas sequências *in situ* tem se tornado uma ferramenta cada vez mais importante permitindo o acompanhamento da quantidade de cromatina introduzida em cruzamentos interespecíficos e a análise de pareamentos intergenômicos em plantas híbridas. Desta forma, contribui de forma eficaz para a análise da evolução cariotípica dos materiais estudados (MARKOVA & VYSKOT, 2009), bem como para a caracterização e escolha dos melhores genótipos, atuando na seleção assistida do melhoramento

genético (BRASILEIRO-VIDAL *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005; JAHIER *et al.*, 2009).

3.7.3 CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA EM *Jatropha*

Do ponto de vista citogenético, o gênero *Jatropha* tem mostrado uma grande estabilidade no número cromossômico ($2n = 2x = 22$), como observado em *J. curcas*, *J. gossypifolia* e *J. molissima* (Pohl) Baill. Algumas espécies do gênero, como *J. cuneata*, *J. dioica* e em muitas populações de *J. heterophylla*, são tetraploides ($2n = 4x = 44$), e apenas a espécie *J. tirucalli* L. apresenta número cromossômico $2n = 20$. Observam-se ainda alguns híbridos artificiais triploides ($2n = 3x = 33$), resultantes dos cruzamentos *J. curcas* x *J. cathartica* e *J. curcas* x *J. podagrica* (DEHGAN, 1984; SUJHATA E PRABAKARAN, 2003; CARVALHO *et al.*, 2008; DAHMER *et al.*, 2009).

O gênero *Jatropha* apresenta espécies com cromossomos relativamente pequenos, distribuídos morfologicamente em meta e submetacêntricos. *Jatropha curcas*, por exemplo, apresenta um cariótipo com tamanho variando entre 1,71 e 1,24 μm e conteúdo de bases em torno de 38,7% GC e conteúdo de DNA $2C = 0,85$ pg (CARVALHO *et al.*, 2008). Apresenta dois pares terminais de DNAr 45S, um par terminal de DNAr 5S e uma variedade de elementos repetitivos em seu genoma (WITKOWSKA *et al.*, 2009; SATO *et al.*, 2010; MARGONAR *et al.*, 2012; MARINHO *et al.*, 2014). Este resultado também foi observado em cromossomos metafásicos mitóticos de outras cinco espécies do gênero *Jatropha* (*J. gossypifolia*, *J. integerrima*, *J. multifida*, *J. pandurifolia* e *J. podagrica*), o qual sugere um número e uma distribuição desses sítios muito conservados dentro do gênero *Jatropha* (MARINHO *et al.*, 2014).

Jatropha curcas, com tamanho de genoma de 410 Mb estimado por citometria de fluxo (CARVALHO *et al.*, 2008), teve cerca de 70% seu genoma sequenciado (285 Mb), com aproximadamente 36% de sequências repetitivas (SATO *et al.*, 2011). Dentre essas sequências, os elementos transponíveis classe I são os mais abundantes, sendo os retrotransposons do tipo *copia* e

gypsy os principais componentes, com 8,0% e 19,6% do DNA repetitivo, respectivamente (SATO *et al.*, 2011). Observou-se, por FISH em cromossomos metafásicos, uma distribuição dispersa com predominância distal para elementos tipo *copia* e localização pericentromérica para elementos tipo *gypsy* (ALIPOUR *et al.*, 2013; 2014).

3.7.4 ANÁLISES MEIÓTICAS

A meiose é considerada um evento essencial na etapa de diferenciação dos organismos, e constitui-se no principal responsável pelo sucesso evolutivo da reprodução sexuada em eucariotos. O processo meiótico envolve duas divisões, sendo a primeira caracterizada por ser reducional, originando células com metade do número cromossômico, e a segunda divisão, muito parecida com a divisão mitótica, resultando em células haploides com 1C de DNA (ALBERTS *et al.*, 2010).

Na meiose, são produzidas células haploides chamadas de gametas e após a sua fecundação, o número de cromossomos torna-se igual ao dos parentais. É durante a meiose que ocorre também a recombinação genética, evento de máxima importância na adaptação das populações e evolução dos seres vivos (GUERRA, 1988; PAGLIARINI, 2000). No entanto, problemas no comportamento meiótico podem estar associados a anormalidades genéticas e/ou alterações cromossômicas, resultando na formação de plantas com pouco/nenhum interesse agrônomo, com baixa fertilidade ou estéreis. Tais anomalias reduzem, por consequência, a produção de pólenes viáveis e a produção de sementes (PAGLIARINI, 2000; BIONE *et al.*, 2000).

A análise do processo meiótico permite observar e identificar eventos que podem ser utilizados em estudos evolutivos e na construção de mapas citogenéticos. Rearranjos cromossômicos podem ser detectados a partir de diferenças resultantes do pareamento dos cromossomos homólogos e são importantes para verificar a viabilidade das células e detectar a origem

poliploide ou híbrida do material (FUKUI & NAKAYAMA, 1996; PAGLIARINI, 2000).

Na maioria dos estudos de viabilidade em espécies do gênero *Manihot*, observou-se irregularidades meióticas, as quais levaram à esterilidade total dos grãos de pólen (SILVA *et al.*, 2008). Contudo, pesquisas realizadas em clones de *Manihot* que apresentaram irregularidades na meiose não comprometeram a viabilidade polínica e mostraram valores acima de 90% (GODOY, 2005). Isto mostra que as irregularidades cromossômicas refletem diretamente nos processos reprodutivos das espécies com a formação de grãos de pólen viáveis e inviáveis (CORRÊA *et al.*, 2005).

No processo natural da segunda divisão meiótica das angiospermas, a célula se divide e formam tétrades (PAGLIARINI *et al.*, 2011). Uma falha na etapa da citocinese pode levar a formação de uma díade, onde a célula não se divide e seus núcleos vão apresentar material genético duplicado. Caso a falha ocorra nas duas divisões pode haver a formação de díades ou tríades. As tríades são formadas na fase final da meiose II, quando a citocinese ocorre em somente uma das díades (RISSO-PASCOTTO *et al.*, 2003).

A presença de irregularidades está frequentemente associada com a redução do vigor e fertilidade em plantas híbridas (REIS *et al.*, 2008). Muitas delas decorrentes do mau pareamento meiótico. Em híbridos, pode indicar o grau de afinidade entre as espécies parentais, o que permite estabelecer a relação filogenética entre diferentes espécies e obter o conhecimento necessário para promover uma melhor combinação, auxiliando no planejamento e definição dos cruzamentos (TECHIO, 2002; PAGLIARINI *et al.*, 2011). O entendimento acerca do pareamento cromossômico e das alterações genômicas decorrentes em híbridos entre *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida* possibilita uma melhor seleção de genótipos estáveis e conseqüentemente uma melhor manipulação das populações e exploração da variabilidade genética, para fins de melhoramento genético e obtenção de cultivares de melhor rendimento, resistência e adaptabilidade.

3.7.5 VIABILIDADE POLÍNICA

A viabilidade do pólen é um entre os fatores que têm influência direta no sucesso da fertilização e da produção de sementes. A necessidade de avaliar a viabilidade do pólen usado na polinização artificial e em experimentos de melhoramento genético é muito importante para a compreensão dos problemas de esterilidade, incompatibilidade e receptividade do estigma (SOUZA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007).

A viabilidade pode ser medida através de testes colorimétricos considerados seguro para avaliar a integridade e produção de pólen. Uma grande variedade de corantes tem sido usada para fazer inferências importantes sobre a viabilidade dessas estruturas, sendo os mais comumente utilizados o reativo de Alexander (verde malaquita + fucsina ácida) e o carmim acético 2% (TECHIO *et al.*, 2006).

No reativo de Alexander, o corante verde de malaquita reage com a celulose da parede do pólen corando em verde os grãos de pólen abortados, enquanto que a fucsina ácida reage com o protoplasma revelando uma coloração rosa nos pólenes não abortados (ALEXANDER, 1980). O carmim acético cora os grãos de pólen viáveis de vermelho e os inviáveis permanecem não corados (MUNHOZ *et al.*, 2008).

Diversos estudos sugerem o corante reativo de Alexander como o mais indicado para estimar a viabilidade dos grãos de pólen frescos ou armazenados (AULER *et al.*, 2006; TECHIO *et al.*, 2006; DAMASCENO JÚNIOR, 2008; PRAKASH *et al.*, 2010). A viabilidade, produção e morfologia dos grãos de pólen em diferentes espécies do gênero *Manihot* (Euphorbiaceae), por exemplo, foram avaliados com a utilização do reativo de Alexander, mostrando valores altos de viabilidade em grãos de pólen de mandioca (GODOY, 2005). Contudo, não há informação sobre viabilidade e fertilidade do grão de pólen com corantes para espécies selvagens de *Jatropha*, apesar de seu potencial de uso em cruzamentos para produção de híbridos.

Capítulo II

Manuscrito

Caracterização citogenética de híbridos de *Jatropha curcas* L. e espécies relacionadas

Souza, RC^{1,2}; Marques DA³; Carvalho Filho MM³; Siqueira, WJ³; Benko-Iseppon, AM¹; Brasileiro-Vidal AC^{1,2}.

1 Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal - Universidade Federal de Pernambuco - Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife-PE, Brasil;

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco – Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 – Recife-PE, Brasil;

3 Instituto Agrônomo de Campinas, 13075-630, Campinas-SP, Brasil.

rosildacindra@hotmail.com; brasileirovidal.ac@gmail.com

RESUMO

Visando auxiliar na obtenção de cultivares de *Jatropha curcas* L. com características agronômicas melhoradas, o presente trabalho teve por objetivo analisar a composição genômica de híbridos interespecíficos de *Jatropha* resultantes dos cruzamentos *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida* em geração F₁ e RC₁F₁, mediante GISH (hibridização genômica *in situ*), bem como analisar a existência de irregularidades na segregação meiótica e avaliar a viabilidade polínica de três acessos de dois híbridos interespecíficos de *Jatropha* em geração F₁, mediante teste colorimétrico com reativo de Alexander. Em células dos híbridos F₁ de ambos os cruzamentos observou-se como esperado a presença de 11 cromossomos de cada parental mediante GISH. Já na geração RC₁F₁, a GISH permitiu a identificação de três cromossomos de *J. integerrima* no híbrido *J. curcas* x *J. integerrima* (L4P49 // L4P49 x I2), e de dois cromossomos de *J. multifida* no híbrido *J. curcas* x *J. multifida* (L3P28 // R181). Com relação às análises de viabilidade polínica, os acessos F₁ de *J. curcas* x *J. integerrima* apresentaram os maiores percentuais, 82-83%, sugerindo o uso efetivo em cruzamentos assistidos. No entanto, o acesso F₁ de *J. curcas* x *J. multifida* mostrou uma menor taxa de viabilidade (68%), que indica possíveis problemas de esterilidade e/ou de incompatibilidade para o referido cruzamento interespecífico. Os estudos meióticos corroboraram com os dados acima, demonstrando que a meiose dos acessos F₁ de *J. curcas* x *J. integerrima* foi predominantemente regular, e que o acesso F₁ de *J. curcas* x *J. multifida* apresentou elevado número de alterações meióticas e pós-meióticas, incluindo cromossomos retardatários em anáfase I e formação de díades, tríades, políades e micronúcleos. Os resultados apresentados mostram que a caracterização citogenética de híbridos interespecíficos e suas progênes de retrocruzamentos podem contribuir para a caracterização e escolha dos melhores genótipos, atuando na seleção assistida do melhoramento genético de *J. curcas*.

Palavras-chave: *Jatropha curcas*, híbridos interespecíficos, GISH, viabilidade polínica, seleção assistida.

ABSTRACT

Aiming the development of *Jatropha curcas* L. improved cultivars, the present study aimed: (1) to analyze the genomic composition of interspecific hybrids of *Jatropha* (*J. curcas* x *J. integerrima* and *J. curcas* x *J. multifida*) in F₁ and RC₁F₁ generation by GISH (genomic *in situ* hybridization) and, (2) to analyze the existence of meiotic irregularities and pollen viability in three accessions of both interspecific hybrids of *Jatropha* in F₁ generation by reactive Alexander colorimetric test. In F₁ cells from both hybrids, it is observed as expected the presence of 11 chromosomes of each parental by GISH. In the RC₁F₁ generation, the GISH allowed the identification of three *J. integerrima* chromosomes in the hybrid *J. curcas* x *J. integerrima* (L4P49 // L4P49 x I2), and two *J. multifida* chromosomes in the hybrid of *J. curcas* x *J. multifida* (L3P28 // R181). Regarding the analysis of pollen viability, the *J. curcas* x *J. integerrima* F₁ had the highest percentage, 82-83%, suggesting an effective use in assisted breeding. However, the accession F₁ *J. curcas* x *J. multifida* showed a lower rate of viability (68%), indicating potential problems of sterility and / or incompatible to referred interspecific cross. The meiotic studies corroborate the above data showing that meiosis of F₁ accessions of *J. curcas* x *J. integerrima* was predominantly regular, and that the F₁ accession of *J. curcas* x *J. multifida* showed a high number of meiotic and post-meiotic changes, including laggard chromosomes in anaphase I and the formation of dyads, triads, polyads and micronuclei. The results presented here show that cytogenetic characterization of interspecific hybrids and their backcross progeny can contribute to the characterization and selection of the best genotypes on assisted breeding of *J. curcas*.

Keywords: *Jatropha curcas*, interspecific hybrids, GISH, pollen viability, marker assisted selection.

1. INTRODUÇÃO

O interesse pela oleaginosa *Jatropha curcas* L., denominada popularmente pinhão-mansão, tem aumentado devido à sua promissora utilização como matéria-prima na produção do biodiesel e na fabricação de fármacos (KUMAR e SHARMA, 2008). Destaca-se por ser considerada como opção agrícola para áreas áridas e semiáridas, auxiliar na recuperação de áreas degradadas e contribuir para a agricultura familiar e como uma fonte de renda adicional para a população rural. Além disso, sua produção não compete com a de outras culturas alimentares (GOMES *et al.*, 2010).

Apesar de promissora, não há, até o momento, cultivares estáveis que possam viabilizar o seu cultivo em larga escala. Nesse sentido, se faz necessário o estabelecimento e caracterização de bancos de germoplasma contendo acessos de diferentes procedências, bem como avaliação e caracterização de cruzamentos e híbridos interespecíficos, visando obter cultivares de *J. curcas* com características agronômicas melhoradas (MARQUES *et al.*, 2013).

Dificuldades para o sucesso dos cruzamentos interespecíficos podem estar relacionadas a problemas no comportamento meiótico destes híbridos, que podem gerar de plantas com pouco/nenhum interesse agrônômico, com baixa fertilidade ou estéreis devido à redução na produção de pólenes viáveis e na produção de sementes. Dessa forma, a avaliação do comportamento meiótico e da viabilidade polínica é de grande importância para o sucesso dos cruzamentos interespecíficos (PAGLIARINI, 2000; SOUZA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007).

Adicionalmente, estudos de hibridização genômica *in situ* (GISH) dos híbridos interespecíficos podem fornecer informações importantes, permitindo identificar o percentual de presença de cada genoma parental nas células híbridas em estudo, além de aperfeiçoar os esforços de melhoramento na escolha de híbridos promissores e no planejamento de cruzamentos, visando maximizar a segregação e recuperação de genótipos superiores (JAHIER *et al.*, 2009; MARKOVA & VYSKOT, 2009).

Considerando a falta de conhecimento sobre a fertilidade de espécies mantidas em coleções de germoplasma para posterior uso em programas de

melhoramento, via hibridação interespecífica, o presente estudo foi realizado com os objetivos de avaliar o comportamento meiótico e estimar a viabilidade polínica bem como a composição genômica de híbridos F_1 entre *J. curcas* e espécies relacionadas e de seus respectivos retrocruzamentos RC_1F_1 .

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas raízes de híbridos entre *J. curcas* x *J. integerrima* e entre *J. curcas* x *J. multifida* em F_1 e em retrocruzamento RC_1F_1 , provenientes do Programa de Melhoramento Genético de *Jatropha* do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), localizado em Campinas/SP. Adicionalmente, botões florais dos referidos híbridos F_1 também foram coletados para análises meióticas e de viabilidade polínica (Tabela 1).

Tabela 1. Acessos avaliados, cruzamento interespecífico e material coletado.

Acessos*	Geração	Cruzamento interespecífico	Material
L4V5	F_1	<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i>	Botão floral
L8V2		<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i>	Botão floral
L13V6		<i>J. curcas</i> x <i>J. multifida</i>	Botão floral
L4P49 x I2		<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i>	Raiz
L2P48 X I4		<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i>	Raiz
L4P37 x I		<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i>	Raiz
L13P23 x M7		<i>J. curcas</i> x <i>J. multifida</i>	Raiz
L12P35 x M7		<i>J. curcas</i> x <i>J. multifida</i>	Raiz
L4P49 // L4P49 x I2	RC_1F_1	<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i>	Raiz
L3P28 // R181		<i>J. curcas</i> x <i>J. multifida</i>	Raiz

*Acessos oriundos do Instituto Agronômico de Campinas (IAC)

2.2 COLETA, ARMAZENAMENTO DO MATERIAL E PREPARO DE LÂMINAS

Pontas de raízes recém-geminadas de plantas envasadas foram coletadas, pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 2 mM por 4 h e 30 min, a 18 °C, fixadas em metanol: ácido acético (3:1) e estocadas a - 20 °C.

As raízes armazenadas em fixador foram inicialmente lavadas duas vezes em água destilada por 5 min e digeridas com solução enzimática celulase 2% (Onozuka) e pectinase 20% (Sigma) em câmara úmida a 37 °C por 4 h e 30 min. Após o tempo de digestão, os materiais foram lavados com água destilada.

Para a confecção das lâminas mitóticas, foi utilizado o protocolo descrito por Carvalho e Saraiva (1993), com algumas modificações. As lâminas foram gotejadas com fixador (metanol: ácido acético, 3:1) gelado (-20 °C) recém-preparado. Pontas de raízes foram colocadas em lâminas inclinadas, lavadas com fixador e maceradas. Posteriormente, as lâminas foram secas com bomba de ar, mergulhadas em ácido acético 45 % por 23 s e secas novamente à temperatura de 37 °C. As melhores lâminas foram selecionadas mediante coloração com o fluorocromo 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Logo após, foram descoradas em fixador Carnoy (etanol e ácido acético, 3:1) por 30 min e imersas em álcool etílico absoluto por 1 h à temperatura ambiente, secas ao ar e estocadas a -20 °C até o momento de sua utilização.

Para preparação das lâminas meióticas, foi utilizado o procedimento descrito por Guerra (1983), com algumas modificações, onde botões florais coletados foram diretamente fixados em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1) e estocados a - 20 °C. As anteras foram inicialmente lavadas em água destilada, tratadas com solução de citohelicase 4%, celulase 2,5% e pectinase 2,5% a 37 °C por 5 h, lavadas em água destilada por 5 min, hidrolisadas em HCl 5 N por 10 min e novamente lavadas em água destilada por 5 min. Em seguida, as anteras foram levemente pressionadas em solução de ácido acético 45% para liberação dos meiócitos, os restos das anteras eliminados e o material coberto com lamínula. O conjunto lâmina-lamínula foi congelado em nitrogênio líquido e as lâminas secas ao ar.

As 10 melhores lâminas de cada acesso (L4V1, L8V2 e L13V6) foram selecionadas e coradas com o fluorocromo DAPI. Foram analisadas as fases de metáfase I, (anáfase I + telófase I) e (anáfase II + telófase II). Em média 20 células por fase(s) / acesso foram analisadas.

Para visualização de tétrades, as lâminas foram preparadas e coradas com Carmim acético 2%. Foram analisadas cinco lâminas por acesso. O índice meiótico foi calculado dividindo-se o número de tétrades normais pelo total de tétrades observadas e multiplicado por 100. Considerou-se como normais as tétrades com quatro células iguais e como anormais as formações do tipo tríades e díades.

2.3 PREPARO DAS SONDAS E BLOQUEIOS

Para a hibridização genômica *in situ* (GISH), foram utilizados os DNAs genômicos de um dos parentais como sonda e o DNA genômico do segundo parental como DNA bloqueio. Para o preparo das sondas e do DNA bloqueio, os DNAs foram extraídos conforme protocolo de Weising *et al.* (2005), onde 5 a 8 g de folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido e, após liofilizadas, foram colocadas em tubos contendo 12 mL de tampão de extração pré-aquecido a 65 °C. Os tubos com as amostras foram levados ao banho-maria (65 °C) em agitação por 60 min. Após este período, com as amostras à temperatura ambiente, foi adicionado 12 mL de clorofórmio: álcool iso-amílico (24:1). Os tubos foram agitados por inversão por 100 vezes para posterior centrifugação em 4.000 rpm durante 20 min à 24 °C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos, onde foi adicionado isopropanol (60% do volume do sobrenadante). As amostras foram então misturadas cuidadosamente por inversão (uma ou duas vezes) e novamente centrifugadas em 4.000 rpm durante 20 min a 24 °C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado, deixando apenas o pellet. Foi adicionado 10 mL de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, e novamente centrifugados por

20 min a 4.000 rpm, o etanol descartado e o *pellet* deixado para secar ao ar. O *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de H₂O milliQ.

Em seguida, as amostras de DNA passaram por um tratamento com RNase e foram quantificadas em gel de agarose 1%. Para a preparação de sondas, amostras de DNA genômico de *J. integerrima* e de *J. multifida* foram marcadas por *nick translation* (Roche Diagnostics, Life Technologies), com digoxigenina-11-dUTP (Roche). Para a preparação do DNA bloqueio de *J. curcas*, o DNA extraído foi fragmentado em autoclave em 200 a 500 pb e posteriormente ressuspensionado em água MiliQ.

2.4 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA *in situ* (GISH)

A desnaturação dos cromossomos e das sondas, os banhos pós-hibridização e a detecção foram efetuados de acordo com Heslop-Harrison *et al.* (1991), exceto pela lavagem de estringência que foi realizada em 0,1 x SSC a 42 °C. As misturas de hibridização consistiram de: formamida 50% (v/v), dextran sulfato 10% (p/v), 2x SSC e 5 ng/µL de sonda. Adicionalmente, foi acrescentada à mistura de hibridização DNA bloqueio em uma proporção de sonda: bloqueio de 1:40 (*J. integerrima*: *J. curcas*) ou de 1:60 (*J. multifida*: *J. curcas*), para os híbridos *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida*, respectivamente. As lâminas foram desnaturadas por 7 min a 85 °C e hibridizadas por 48 h a 37 °C. As sondas marcadas com digoxigenina foram detectadas com anti-digoxigenina crescida em ovelha conjugado com fluoresceína isotiocianato (FITC; Roche) diluída em BSA 1% (p/v) e amplificadas com anti-IgG de ovelha conjugado com FITC (Sigma) também em BSA 1% (p/v). Ao final do processo, as preparações foram montadas com 2 µg/mL de DAPI em Vectashield (Vector), na proporção de 1:1.

Diversos testes foram realizados para determinar o DNA de qual espécie (*J. curcas*, *J. integerrima* ou *J. multifida*) seria usado como sonda e bloqueio, bem como as proporções sonda:bloqueio nas misturas de hibridização dos respectivos cruzamentos F1 interespecíficos (*J. curcas* x *J.*

integerrima e *J. curcas* x *J. multifida*). Para cada híbrido foram testados o DNA dos respectivos parentais como sonda ou bloqueio. Os testes foram feitos com lâminas das espécies parentais com diferentes proporções de sonda:bloqueio, a fim de observar a proporção que evitaria a hibridização de sequências comuns aos dois genomas: (1) lâminas de *J. curcas*, com sonda de *J. integerrima* e bloqueio de *J. curcas* nas proporções 1:0 (controle sem bloqueio), 1:10, 1:20 e 1:40; (2) lâminas de *J. curcas*, com sonda de *J. multifida* e bloqueio de *J. curcas* nas proporções 1:0 (controle sem bloqueio), 1:10, 1:20, 1:30, 1:50 e 1:60.

As células foram analisadas em microscópio de epifluorescência Leica DMLB e imagens das melhores células foram capturadas com uma câmera Leica DFC 340FX, usando o programa Leica CW 4000. As imagens foram otimizadas para melhor brilho e contraste com o Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated).

2.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE POLÍNICA

Anteras obtidas de botões-florais pré-fixadas em Carnoy foram seccionadas transversalmente e os grãos de pólen foram cuidadosamente extraídos. Para coloração foi testado o corante de Alexander (Alexander, 1980), adicionando-se uma gota em cada lâmina. Foram considerados viáveis os pólenes que apresentaram coloração rosa e/ou vermelho e inviáveis aqueles corados de verde e/ou azul. Foram preparadas 10 lâminas de cada acesso (*J. curcas* x *J. integerrima* (acessos L4V2, L8V5) e *J. curcas* x *J. multifida* (L13V6) em geração F₁, e analisados 250 grãos de pólen/ lâmina/ acesso, totalizando 2500 grãos de pólen por acesso analisados.

3. RESULTADOS

3.1 GISH em cromossomos mitóticos

Os híbridos F₁ *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida* não apresentaram perda cromossômica em mitose e mostraram um número cromossômico diploide de $2n = 22$. A realização da GISH nos híbridos interespecíficos de *Jatropha* foi possível em metáfases mitóticas, apesar de suas células apresentarem cromossomos pequenos e morfologicamente similares. Contudo, em alguns casos, especialmente em cromossomos prometafásicos (menos condensados), não foi possível a hibridização das regiões subterminais de condensação tardia. Nesses casos, os sinais foram restritos para dots terminais e para a região pericentromérica heterocromática.

Os testes realizados para a definição das proporções sonda: bloqueio demonstraram que as melhores proporções foram de 1:40 (*J. integerrima*: *J. curcas*) para os híbridos de *J. curcas* x *J. integerrima* e de 1:60 (*J. multifida*: *J. curcas*) para os híbridos entre *J. curcas* x *J. multifida*.

A GISH nos três híbridos de *J. curcas* x *J. integerrima* da geração F₁ (L4P49 x I2, L2P48 X I4 e L4P37 x I) evidenciou a metade do conjunto cromossômico (11 cromossomos) oriundos de *J. integerrima* e os outros 11 cromossomos não marcados de *J. curcas*, como esperado para a geração F₁ (Figura 1a). Igualmente, as células dos dois híbridos de *J. curcas* x *J. multifida* da geração F₁ (L13P23 x M7 e L12P35 x M7) apresentaram 11 cromossomos hibridizados com sonda de *J. multifida*, e 11 cromossomos de *J. curcas* não marcados (Figura 1b).

Nas células do híbrido *J. curcas* x *J. integerrima* geração RC₁F₁ (L4P49 // L4P49 x I2), a sonda de *J. integerrima* hibridizou em apenas três dos 22 cromossomos (Figura 1c), demonstrando que a maioria dos cromossomos são provenientes de *J. curcas*. De modo semelhante, nas células do híbrido *J. curcas* x *J. multifida* geração RC₁F₁ (L3P28 // R181), a sonda de *J. multifida* hibridizou em apenas dois do conjunto de 22 cromossomos, e evidenciou que os outros 20 cromossomos são oriundos de *J. curcas* (Figura 1d).

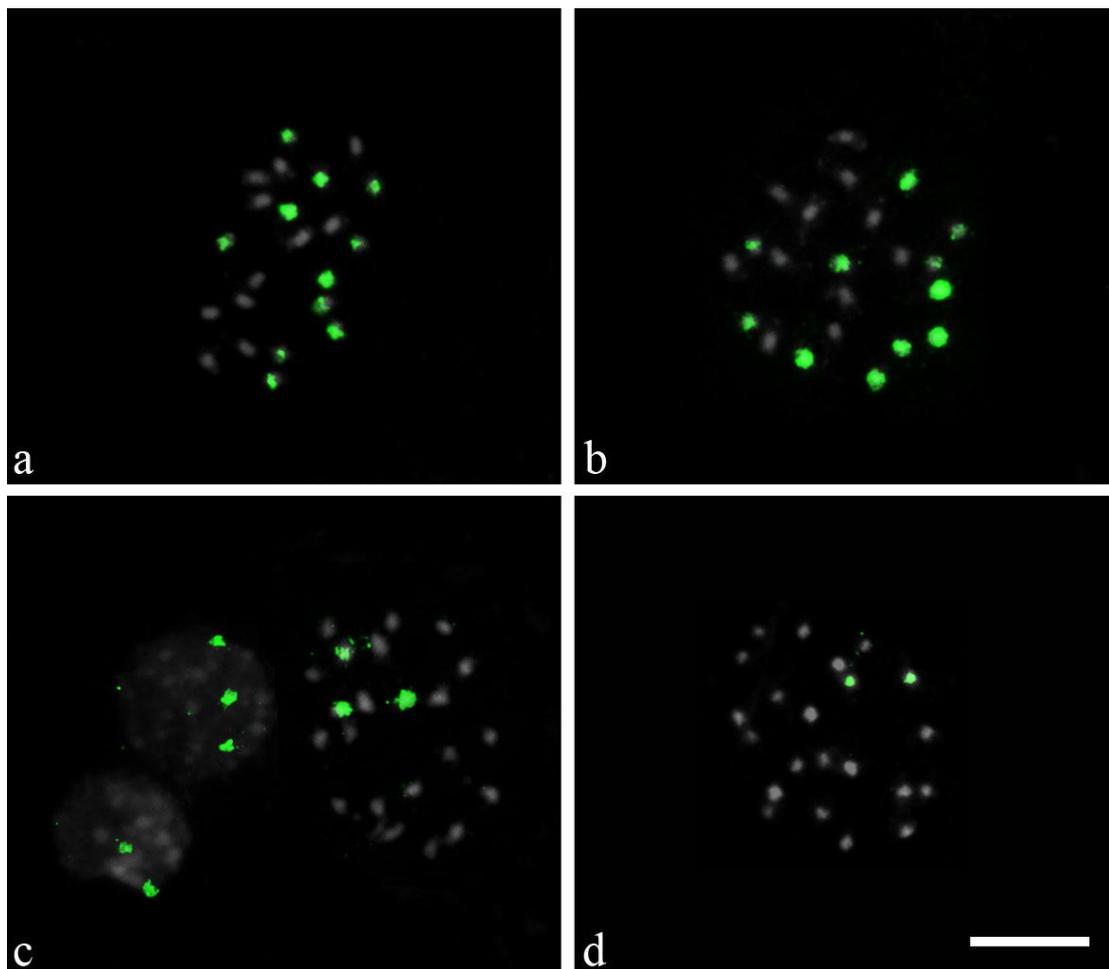


Figura 1. Hibridização Genômica *In Situ* (GISH) em metáfases mitóticas de híbridos de *J. curcas* x *J. integerrima* (a, c) e de *J. curcas* x *J. multifida* (b, d) em gerações F₁ (a, b) e RC₁F₁ (c, d). Cromossomos contracolorados com DAPI (pseudocoloridos em cinza) e sondas (em verde) de DNA genômico de *J. integerrima* (a, c) e de *J. multifida* (b, d). (a, b) Híbridos F₁, mostrando 11 cromossomos de cada parental, sendo os não marcados de *J. curcas*. (c) RC₁F₁ de *J. curcas* x *J. integerrima*, evidenciando os três cromossomos em verde de *J. integerrima*. (d) RC₁F₁ de *J. curcas* x *J. multifida*, mostrando os dois cromossomos em verde de *J. multifida*. Barra em d representa 5 µm.

3.2 Estudos meióticos

A meiose dos acessos L4V1 e L8V2 (*J. curcas* x *J. integerrima*) foi predominantemente regular, embora tenham sido observados em baixa frequência cromossomos não alinhados corretamente na placa metafásica durante a metáfase I, indicando a formação de univalentes (5 %) (Tabela 2). Isto pode indicar uma diferença no ciclo celular de cada espécie, em que cada

conjunto cromossômico migraria em um determinado tempo para a placa metafásica ou apenas a pressão feita pela lamínula sobre a lâmina. As demais fases, (anáfase I + telófase I), (metáfase II e telófase II), apresentaram células com segregação normal, onde não se observou irregularidade. Para esses acessos, com relação aos produtos pós-meióticos do tipo tétrades, também houve predominância de tétrades normais, embora tenham sido visualizadas algumas tétrades com micronúcleos (12,5 %) (Tabela 2; Figura 3).

No acesso L13V6 (*J. curcas* x *J. multifida*), as células em metáfase I apresentaram univalentes, bivalentes e multivalentes (85 %), gerando em sua maioria o não alinhamento adequado na placa equatorial (Tabela 2; Figura 2a, b). Isto pode estar associado à falta de homologia entre os cromossomos de ambos genomas, uma vez que apenas as regiões semelhantes se pareiam na meiose. Ainda para este acesso, a maioria das células analisadas em (anáfase I + telófase I) apresentou irregularidades (70 %), como cromossomos tardios e multipolaridade (Figura 2c-f). Estas irregularidades frequentes resultaram em produtos pós-meióticos do tipo díade, tríade, políades e tétrade com micronúcleos (Figura 3a-c).

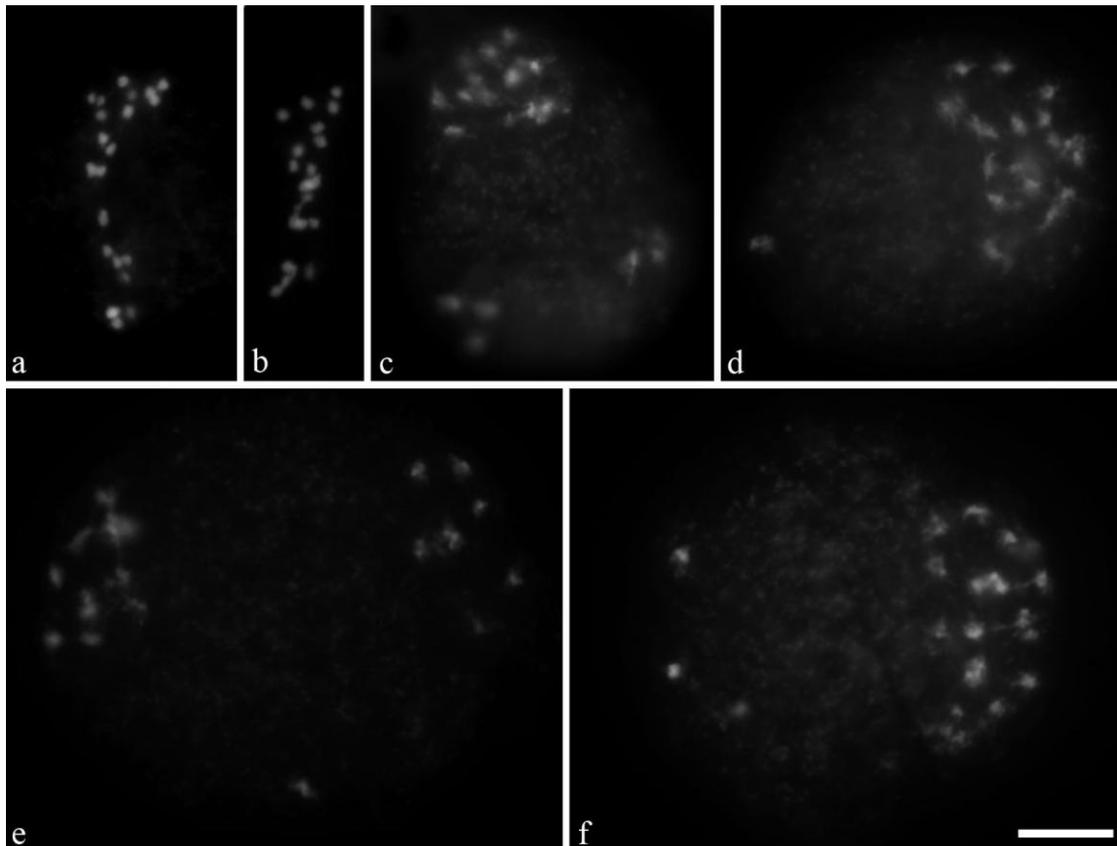


Figura 2. Alterações no comportamento meiótico do híbrido L13V6 entre *J. curcas* x *J. multifida* em geração F₁. Células coradas com DAPI, pseudocoloridas em cinza. **(a)** Diplóteno final mostrando cromossomos precoces. **(b)** Metáfase I mostrando a formação de univalentes, bivalentes e multivalentes. **(c, d, e, f)** Anáfases I multipolares. Seta indica a formação de multivalentes e ponta de seta indica a formação de univalentes. Barra em **f** representa 5 μ m.

3.3 Análise da viabilidade polínica

A viabilidade polínica dos acessos L4V1 e L8V2 (*J. curcas* x *J. integerrima*) variou de 82 a 83% (Tabela 3, Figura 3d-e). Por outro lado, essa viabilidade caiu para 68% para o acesso L13V6 (*J. curcas* x *J. multifida*). Uma baixa viabilidade pode estar diretamente associada às irregularidades observadas na meiose deste acesso, indicando possíveis problemas de esterilidade e/ou de incompatibilidade para o referido cruzamento interespecífico.

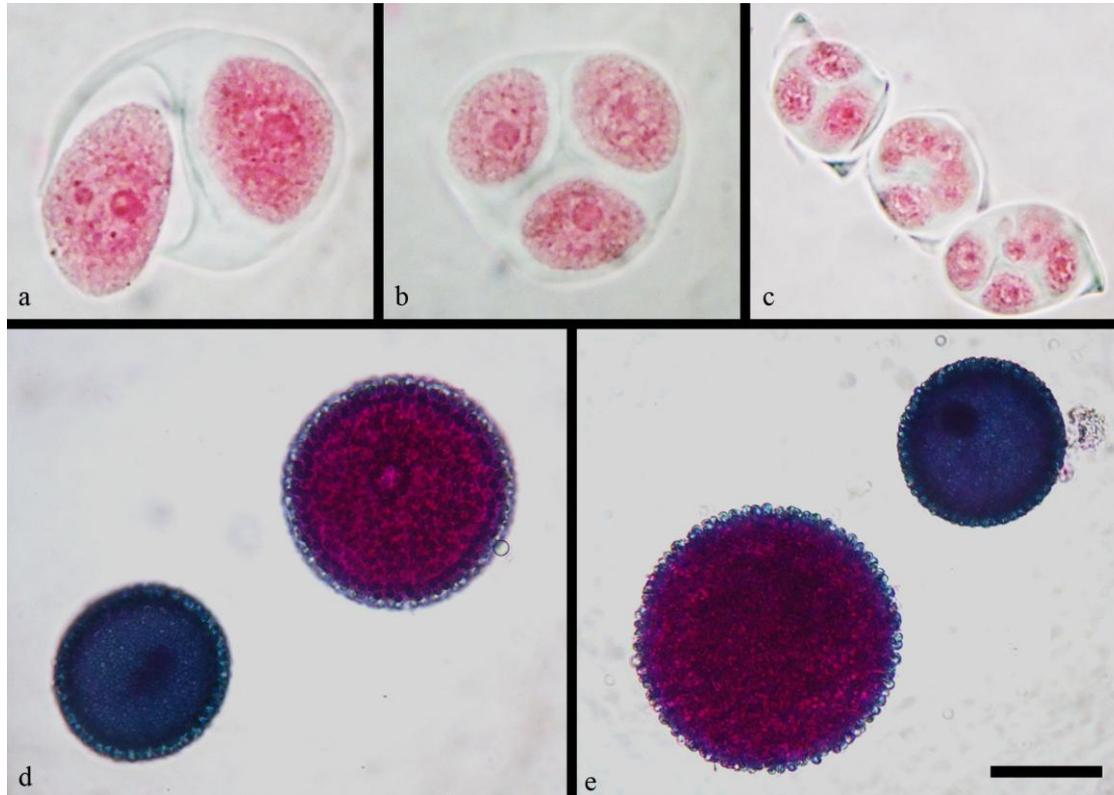


Figura 3. Análise da viabilidade polínica e da fase pós-meiótica (tétrades) em híbridos de *Jatropha* e espécies relacionadas na geração F₁, acessos L13V6 (**a**, **b**, **d**), L4V1, L8V2 e L13V6 (**c**) e L4V1 e L8V2 (**e**). (**a**, **b**, **c**) Fases pós-meióticas coradas com Carmim acético 2% com formação de (**a**) díade (**b**), tríades e (**c**) tétrades com núcleos de tamanhos diferenciados. (**d**, **e**) Pólenes corados com reativo de Alexander (1980), em rosa os pólenes viáveis e em azul pólenes inviáveis. Barra em **e** representa 5 μm.

Tabela 2. Análise do comportamento meiótico e da fase pós-meiótica (tétrades) de três acessos da geração F₁ do banco de germoplasma do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC).

Cruzamento	Acesso	Alterações observadas (N. alterações/ N. total)		
		Metáfase I	Anáfase I + Telófase I	Fases pós-meiótica
<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i>	L4V5	Alinhamento incorreto (1/20)	-	Tétrades com micronúcleos (2/20)
	L8V2	Alinhamento incorreto (1/20)	-	Tétrades com micronúcleos (3/20)
<i>J. curcas</i> x <i>J. multifida</i>	L13V6	Univalentes, multivalentes (17/20)	Cromossomos retardatários, anáfases multipolares (14/20)	Tríades, díades, políades, tétrades com micronúcleos (18/20)

Tabela 3. Acessos do banco de germoplasma analisados quanto à viabilidade polínica (%) mediante coloração com reativo de Alexander (1980).

Cruzamento	Acesso (F1)**	Número de pólenes analisados	Número de pólenes viáveis	Viabilidade polínica (%)
<i>J. curcas</i> x <i>J. integerrima</i>	L4V2	2500 *	2074	83%
	L8V5	2500 *	2049	82%
<i>J. curcas</i> x <i>J. multifida</i>	L13V6	2500 *	1700	68%

**Acessos provenientes do Banco de germoplasma do Instituto Agrônômico de Campinas (IAC).

* 250 pólenes analisados por lâmina, com 10 lâminas para cada acesso.

4. DISCUSSÃO

Apesar de diversos estudos sobre a composição genética de híbridos interespecíficos terem sido descritos na literatura (SEPSI *et al.*, 2009; FRADKIN *et al.*, 2009; NKONGOLO *et al.*, 2009), este é o primeiro trabalho citogenético realizado em híbridos interespecíficos de *Jatropha*, analisando composição genômica, comportamento meiótico e viabilidade polínica. As metodologias ajustadas para *Jatropha* possibilitam o aumento da eficiência na obtenção de cultivares melhoradas mediante cruzamentos interespecíficos e seleção assistida.

Embora portadores de cromossomos pequenos, a técnica de GISH possibilitou distinguir cromossomos de ambos os genomas parentais nos híbridos interespecíficos de *Jatropha*. Trabalhos anteriores utilizando a GISH em espécies de cromossomos pequenos mostram sinais detectáveis de forma restrita a regiões ricas em DNA repetitivo, como regiões pericentroméricas heterocromáticas e Regiões Organizadoras de Nucléolo (RONs), do modo observado para híbridos de espécies dos gêneros *Brassica* (FAHLESON *et al.* 1997; SNOWDON *et al.* 1997), *Coffea* (BENNETT 1995; BARRE *et al.* 1998; RAINA *et al.* 1998) e *Hypericum* (BRUTOVSKÁ *et al.* 2000) (ALI *et al.*, 2004). No presente trabalho, hibridização apenas pericentromérica e das RONs foi observada apenas para cromossomos prometafásicos (menos condensados) de *Jatropha*.

Os referidos cruzamentos apresentam alto grau de barreiras pós-zigóticas, sendo às vezes necessário o uso da técnica de resgate de embriões *in vitro* para seu desenvolvimento. Adicionalmente, observa-se aumento da taxa de abortos. Segundo Rulfini *et al.* (2013), cruzamentos entre *J. curcas* e *J. integerrima* revelaram uma taxa de 21,1% de produção de frutos, indicando uma alta taxa de aborto, embora a taxa de germinação obtida para o presente híbrido tenha sido alta (83,5%). Já no caso de *J. multifida*, a incompatibilidade observada foi maior. Dos 582 cruzamentos realizados, apenas 45 frutos foram produzidos (7,6% de êxito), sendo que somente quatro sementes germinaram (baixa taxa de germinação) (dados do

programa de melhoramento do IAC). O baixo índice de frutos parece estar relacionado a barreiras pré-zigóticas ou a barreiras pós-zigóticas fisiológicas, tendo em vista que os híbridos F₁ (*J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida*) mostraram o número cromossômico esperado para essa geração em metáfases mitóticas, 11 cromossomos oriundos de cada parental, resultando em um número diploide normal ($2n = 22$) em todas as células analisadas, demonstrando uma estabilidade para as divisões mitóticas.

Diferentemente do que ocorreu no cruzamento com estas espécies congêneres de *Jatropha*, alguns híbridos interespecíficos descritos na literatura apresentam eliminação cromossômica de um genoma parental após fertilização de gametas de duas espécies diferentes é um fenômeno bastante comum e pode resultar na formação de embriões haploides, o qual tem sido explorado, por exemplo, para cevada e trigo (KASHA e KAO, 1970; DEVAUX *et al.*, 2005). Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar a eliminação uniparental, tais como (1) diferenças de tempo das duas espécies de processos durante a mitose, o que conduz a uma assincronia celular; (2) formação de fusos multipolares; (3) separação espacial dos genomas durante a interfase; (4) não disjunção de cromossomos em anáfase; (5) inatividade centroméricas uniparental, entre outros (GUPTA, 1969; SUBRAHMANYAM e KASHA, 1973; LINDE-LAURSEN e VOM BOTHMER, 1999; SANEI *et al.*, 2011). No presente trabalho, as mitoses pós-zigóticas em ambos os híbridos foram normais, o que indica uma sincronização celular compatível, ausência de eliminação cromossômica e de outras alterações no ciclo mitótico dos híbridos F₁.

Características morfológicas observadas em ambos os tipos de híbridos foram intermediárias entre as espécies parentais corroborando os resultados relacionados à distribuição cromossômica igualitária entre os parentais: 11 cromossomos para cada parental (dados do programa de melhoramento do IAC). A variabilidade morfológica observada na população híbrida F₁ foi alta para ambos os tipos de híbridos aqui estudados. *J. curcas* x *J. integerrima*, por exemplo, apresentaram plantas com variação no tamanho/porte, pigmentação de folhas (antocianina), coloração das flores (rosa claro á

púrpura) (Figura 4), tamanho e número de flores femininas e masculinas. Com relação às estruturas reprodutoras, todos os híbridos F₁ mostraram similaridade com o parental masculino. Os híbridos F₁ entre *J. curcas* e *J. multifida* também apresentaram características intermediárias como pode ser observado na Figura 5.



Figura 4. Variação no tamanho / porte, pigmentação de folhas (antocianina), coloração das flores (rosa claro á púrpura) de híbridos F₁ entre *J. curcas* x *J. integerrima*. Fonte: Instituto Agrônômico de Campinas (IAC).



Figura 5. Características morfológicas intermediárias de híbridos F₁ entre *J. curcas* e *J. multifida*. Da esquerda para direita: *J. multifida* (parental masculino); híbrido F₁; *J. curcas* (parental feminino). Fonte: Instituto Agrônômico de Campinas (IAC).

Por outro lado, apesar da meiose predominantemente normal dos híbridos F₁ estudados de *J. curcas* x *J. integerrima*, o híbrido F₁ *J. curcas* x *J. multifida* mostrou irregularidades meióticas especialmente na meiose I, como a formação de univalentes e multivalentes, além da presença de cromossomos retardatários e anáfases multipolares. Estas irregularidades

estão provavelmente relacionadas a uma baixa similaridade entre alguns cromossomos homeólogos (univalentes) e/ou homeologia de outros cromossomos (ou parte deles) com mais de um cromossomo da segunda espécie (multivalentes). Ambos os casos impossibilitam uma correta formação de bivalentes e por consequência uma segregação anormal dos homeólogos na anáfase I (TECHIO; DAVIDE, 2007; ADAMOWSKI, 2008). Outras possíveis causas para a presença de univalentes nestes acessos seria uma baixa frequência de quiasmas ou sua terminalização precoce (GOTTSCHALK e KAUL, 1980).

Além disso, existe a possibilidade de que *J. curcas* e *J. multifida* apresentem ciclos celulares diferentes, onde cada conjunto cromossômico migraria em um determinado tempo para a placa metafásica o que poderia resultar em cromossomos retardatários e perda cromossômica (ADAMOWSKI, 2008; PAIVA, 2006; TECHIO *et al.*, 2006; RISSO-PASCOTTO *et al.*, 2005). A presença de cromossomos retardatários tem sido descrita também em outras espécies como *Glycine max* L. (BIONE *et al.*, 2000); *Carica papaya* L. (BAJPAI e SINGH, 2006) e em híbridos interespecíficos entre *Brachiaria ruziziensis* x *B. brizantha* retrocruzados com *B. brizantha*. (ADAMOWSKI, 2008). Em paralelo, a segregação precoce dos cromossomos para os polos também tem sido visualizada em diferentes espécies de importância econômica. Os univalentes presentes na metáfase I, que não permanecem alinhados na placa equatorial, tendem a migrar precocemente para os polos ou apresentar uma segregação tardia que podem levar a formação de micronúcleos e eliminação de cromossomos, o que pode comprometer a viabilidade desses acessos (RISSO-PASCOTTO *et al.*, 2009; PAGLIARINI, 2000).

As irregularidades observadas na meiose do acesso F₁ do cruzamento *J. curcas* x *J. multifida* resultaram na formação de díades, tríades, políades e micronúcleos, comprometendo a viabilidade polínica do referido acesso (68%), o que indica uma possível redução do vigor e da fertilidade para o referido cruzamento interespecífico (SOUZA *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2008).

De fato, as flores masculinas dos híbridos F_1 , resultantes do cruzamento entre *J. curcas* e *J. multifida*, apresentaram pólen não visível a olho nu. Apesar disso, tais plantas foram utilizadas para polinizar flores femininas de *J. curcas*, a fim de produzir a geração RC_1F_1 . Das polinizações realizadas entre estas duas espécies, foram obtidos apenas dois frutos e a taxa de pegamento foi muito baixa (3,23%) (dados do programa de melhoramento do IAC). Os resultados de meiose encontrados no presente trabalho podem explicar o desempenho inferior deste cruzamento interespecífico.

Por outro lado, a viabilidade polínica para os acessos F_1 *J. curcas* x *J. integerrima* (82-83%) pode ser considerada alta, fornecendo resultados satisfatórios para os trabalhos de melhoramento utilizando o híbrido em questão.

Nos retrocruzamentos de *J. curcas* com os híbridos F_1 (*J. curcas* x *J. integerrima*) foi obtida alta taxa de êxito, sendo que de 1082 flores polinizadas se obtiveram 334 frutos (taxa de fixação de 31%). Conforme o esperado, a taxa de germinação também foi alta (85,9%) devido a maior compatibilidade genética entre *J. curcas* e plantas da geração F_1 . No entanto a taxa de sobrevivência após germinação foi bem menor (38,9%) (RUFINO *et al.*, 2013). Esta redução poderia ser atribuída à expressão de alelos prejudiciais nas plantas RC_1F_1 .

Análises morfológicas (com base nas características das folhas e pecíolos) de plantas desta geração permitiram ao grupo do IAC classificá-las em três grupos: “tipo curcas”, “tipo intermediário” e “tipo integerrima” (RUFINO *et al.*, 2013). Observou-se que as progênies resultantes do retrocruzamento entre *J. integerrima* e variados genótipos de *J. curcas* (incluindo aqueles estudados neste trabalho, L4P49) foram morfológicamente similares ao parental feminino *J. curcas*. A maioria dos híbridos RC_1F_1 mostrou a característica folha em forma pentagonal, comum de *J. curcas* (RUFINO *et al.*, 2013). Esta semelhança parece refletir a perda da grande maioria dos cromossomos de *J. integerrima* nesta geração.

Outras características como altura/porte de plantas, coloração de flores e sementes (Figura 6), formato do fruto, número de flores femininas, número de frutos por cacho, número de cachos por planta, resistência a pragas e doenças, teor e qualidade do óleo foram a priori bastante variáveis dentre as plantas da geração RC₁F₁. No entanto, tais características são ainda instáveis e dados coletados ano a ano poderão compor um resultado mais robusto ao programa de melhoramento genético.

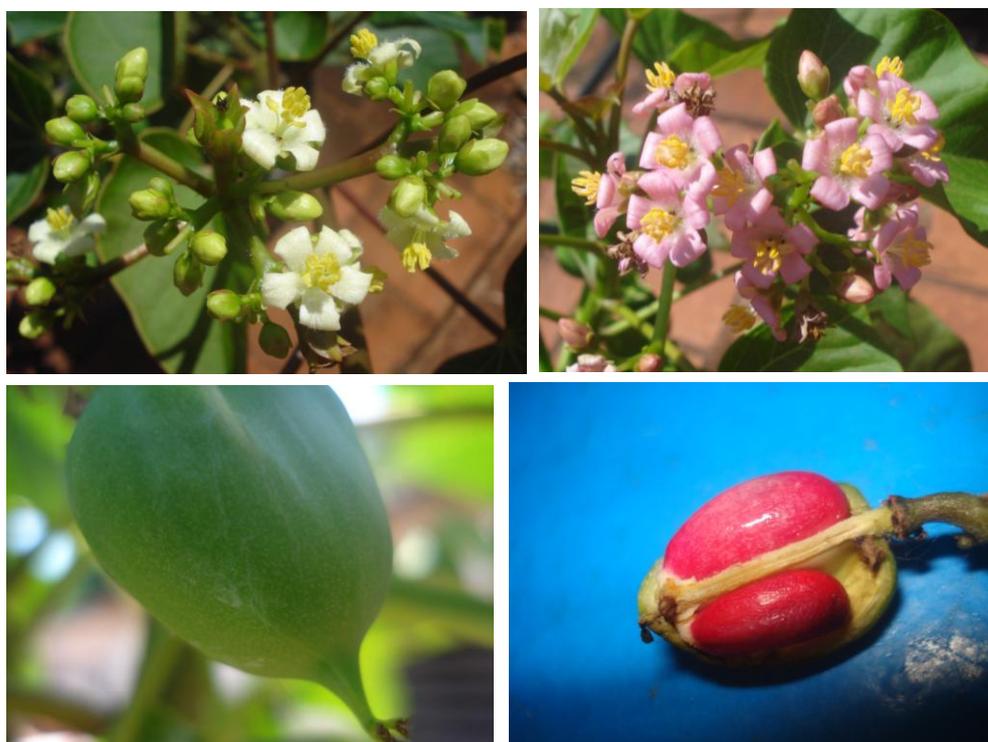


Figura 6. Características morfológicas entre plantas da geração RC₁F₁. Número de flores femininas e número de cachos por planta (a, b). Morfologia do fruto (c, d). Fonte: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC).

Apesar das anormalidades meióticas e redução da viabilidade polínica, principalmente para o cruzamento *J. curcas* x *J. multifida*, foi possível o avanço dos cruzamentos para a geração RC₁F₁, observando-se um número cromossômico estável de $2n = 22$ cromossomos (igual aos parentais) para todas as metáfases mitóticas dos indivíduos analisados. Isto indica que apenas gametas balanceados com $n = 11$ cromossomos foram viáveis para a formação da nova geração.

5. CONCLUSÕES

A caracterização de híbridos de *Jatropha curcas* L. e espécies relacionadas, mediante hibridização genômica *in situ* permitiu as seguintes principais conclusões:

- A GISH é uma ferramenta eficiente para a identificação de cromossomos dos diferentes parentais em híbridos interespecíficos de *J. curcas* x *J. integerrima* e *J. curcas* x *J. multifida* e suas progênes de retrocruzamentos, contribuindo na caracterização e escolha dos melhores genótipos, atuando na seleção assistida do melhoramento genético.
- As plantas da população F₁ de híbridos *J. curcas* x *J. integerrima* apresentam meiose predominantemente normal, enquanto *J. curcas* x *J. multifida* apresentam altos índices de irregularidades meióticas.
- O aumento do número de irregularidades na meiose está diretamente relacionada com a redução da viabilidade polínica nos acessos estudados.
- Os acessos oriundos do cruzamento *J. curcas* x *J. integerrima* possuem alta taxa de viabilidade polínica e podem ser efetivamente usados em cruzamentos assistidos. No entanto, o acesso L13V6 (*J. curcas* x *J. multifida*) mostrou baixa taxa de viabilidade, indicando possíveis problemas de esterilidade e/ou incompatibilidade para o referido cruzamento interespecífico.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de mestrado de Rosilda

Cintra, à Petrobrás pelo suporte financeiro às pesquisas realizadas junto ao Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) e a este Instituto de Pesquisa (IAC) pelo material vegetal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOWSKI, E.V.; PAGLIARINI, M.S.; VALLE, C.B. Meiotic behavior in three interspecific three-way hybrids between *Brachiaria ruziziensis* and *B. brizantha* (Poaceae:Paniceae). *Journal of Genetics*, Bangalore, v.87, n.1, p. 33-38, 2008.

ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* 55:13-18. 1980.

ALI BM, LYSAK MA, SCHUBERT I. Genomic *in situ* hybridization in plants with small genomes is feasible and elucidates the chromosomal parentage in interspecific *Arabidopsis* hybrids. *Genome* 47: 954–960. doi: 10.1139/g04-041. 2004.

ARRUDA FP, BELTRÃO NEM, ANDRADE AP, PEREIRA WE, SEVERINO LS. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semiárido nordestino. *Rev Bras Oleag Fib*, 8: 789-799. 2004.

AULER, N.M.F.; BATTISTIN, A.; REIS, M.S. Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 5563. 2006.

BARRE P., LAYSSAC M., D'HONT A., LOUARN J., CHARRIER A., HAMON S. and NOIROT J. - Relationship between parental chromosomal contribution and nuclear DNA content in the *coffee* interspecific hybrid *C. pseudozanguebariae* x *C. liberica* var. *dewerei*. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 301-305. 1998.

- BASHA S. D. E SUJATHA M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. *Euphytica*, 156:375–386. 2007.
- BIONE NCP; PAGLIARINI MS; TOLEDO JFF. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. *Genetics and Molecular Biology* 23: 623-631. 2000.
- BORÉM, A. Melhoramento das espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 1999.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Melhoramento de Plantas. 6. Ed. Viçosa: Editora UFV, 523 p. 2013.
- BAJPAI, A.; SINGH, A.K. Meiotic Behavior of *Carica papaya* L.: Spontaneous Chromosome Instability and Elimination in Important cvs. in North Indian Conditions. *Cytologia*, Tokyo, v.71, p. 131-136, 2006.
- BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.*, v. 76, p. 113-176, 1995.
- BRASILEIRO, B. P. Conservação e melhoramento genético do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) / Dissertação_Bruno Portela Brasileiro. Cruz das Almas-BA, 83f.; il. 2010.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. N.; GUERRA, M. Citogenética molecular em cereais. In: BRAMMER, S. P.; IORCZESKI, E. J. (Org.). Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p. 277-298. 2002.
- BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; CUADRADO, A.; BRAMMER, S. P.; BENKO-ISEPPON, A. M.; GUERRA, M. Molecular cytogenetic characterization of parental genomes in the partial amphidiploid *Triticum aestivum* × *Thinopyrum ponticum*. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 2, p. 308-313, 2005.

- BRITTAINE, R. e LUTALADIO, N. *Jatropha*: A Smallholder Bioenergy Crop. Integrated Crop Management, v. 8, 2010.
- BRUTOVSKÁ, R.; KUNIRIKOVÁ, P.; Bogyiová, E.; ellárová, E. Karyotype analysis of *Hypericum perforatum* L. *Biologia Plantarum*, Prague, v.43, n.1, p.133-136, 2000.
- CARELS N. *Jatropha curcas* : a review. In: Kader JC, Delseny M (eds) *Adv in Bot Res*, Elsevier, vol 50, pp 39–86. 2009.
- CARVALHO, R.; GUERRA, M. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas* 136: 159-168. 2002.
- CARVALHO CR, CLARINDO WR, PRAÇA MM, ARAÚJO FS, CARELS N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant, *Plant Sci*, 174:613-617. 2008.
- CARVALHO, J. M. F. C.; ARAÚJO, S. de S. Aplicação do cultivo de embrião zigótico ou imaturo no melhoramento vegetal. Campina Grande: Embrapa Algodão, 35 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 170). 2007.
- CHEN, Q. Detection of alien chromatin introgression from *Thinopyrum* into wheat using S genomic DNA as a probe – A landmark approach for *Thinopyrum* genome research. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 109, n. 1-3, p. 350-359, 2005.
- CORRÊA, M.G.S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J.B.; ÁVILA, P.F.V.; BUSATO, G.R.; LEMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família *Araceae*. *Acta Botânica Brasilica*, São Paulo, v.19, n.2, p.295-303, 2005.
- CORTESÃO, M. Culturas tropicais: plantas oleaginosas. Lisboa: Clássica, 231 p. 1956.
- DAHMER, N.; WITTMANN, M.T.S.; DIAS, L.A.S. Chromosome numbers of *Jatropha curcas* L.: an important agrofuel plant. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 9, p. 386-389, 2009.

- DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, F. F. Conservação de grão de pólen de mamoeiro. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 55, p. 433-438, 2008.
- DEHGAN B, WEBSTER GL. Morphology and infrageneric relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). University of California Press, Los Angeles. pp 139.1979.
- DEHGAN B. Phylogenetic significance of interspecific hybridization in *Jatropha* (Euphorbiaceae). *Systematic Botany* 94: 467-478. 1984.
- DEVAPPA, R. K., H. P. S. MAKKAR AND K. BECKER. "Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(12): 2090-2097. 2010.
- DEVAPPA, R., H. MAKKAR AND K. BECKER. "*Jatropha* Diterpenes: a Review." *Journal of the American Oil Chemists' Society* 88(3): 301-322. 2011.
- DIAS LAS, LEME LP, LAVIOLA BG, PALLINI A, PEREIRA OL, DIAS DCFS, CARVALHO M, MANFIO CE, SOUZA LCA, MARRA A AND PRETTI LA. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível. UFV, Viçosa, 40p. 2007.
- D'HONT, A., PAGET-GOY, A., ESCOUTE, J. & CARREEL, F. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa spp.* revealed by genomic DNA in situ hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 100, 177–183. 2000.
- DRUMMOND, M. A.; ANJOS, J. B.; RIBEIRO, M. Pinhão-manso: Pesquisa da Embrapa avalia planta para a produção de biodiesel no semiárido. 2007.
- FAHLESON, J., U. LAGERCRANTZ, A. MOURAS AND K. GLIMELIUS,; Characterisation of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Eruca*

- sativa* using species-specific repetitive sequences and genomic in situ hybridisation. *Plant Science* 123: 133-142. 1997.
- FRADKIN, M. *et al.* Cytological analysis of hybrids among triticales and trigopiros. *Genetic and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.32, n.4, p.797-801, ago. 2009.
- FREITAS R. G. Caracterização de Germoplasma de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) por descritores morfo-agronômicos. Dissertação (Mestrado em fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa. 2010.
- FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas. Visconde do Rio Branco: Suprema, 336 p. 2013.
- FUKUI K. e NAKAYAMA S. - *Plant Chromosomes: laboratory methods*. CRC Press. Boca Raton. 1996.
- GODOY, S. M.; PEREIRA, A. R. A.; RISSO-PASCOTTO, C.; TAKAHASHI, M. Análise do comportamento meiótico de clones de *Manihot esculenta* crantz de interesse econômico para a região Noroeste do Paraná. IAPAR, 2005.
- GOMES KA, ALMEIDA TC, GESTEIRA AS, LOBO IP, GUIMARAES ACR, MIRANDA AB *et al.* ESTs from seeds to assist the selective breeding of *Jatropha curcas* L. for oil and active compounds. *Genomics Insights* 3:29–56. 2010.
- GUERRA M. O Uso Giemsa na citogenética vegetal - Comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Ciência e Cultura*, São Paulo-Brasil. 35: 190-193. 1983.
- GUERRA M. Introdução à citogenética geral. Editora Guanabara Koogan, 154p.1988.

- GUERRA M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet. Mol. Biol.* 23: 1029-1041. 2000.
- GUERRA, M. SOUZAS, M. J. Como observar cromossomos : um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal, e humana - Ribeirão Preto, SP : Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 132 p. 2002.
- GUERRA, M. FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 176p. 2004.
- GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 120, p. 339-350, 2008.
- GUPTA SB. Duration of mitotic cycle and regulation of DNA replication in *Nicotiana plumbaginifolia* and a hybrid derivative of *N. tabacum* showing chromosome instability. *Can J Genet Cytol* 11:133–142. 1969.
- HAN J., LEE, Y., YEOM, K.H., KIM, Y.K., JIN, H., AND KIM, V.N. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Dev.* 18: 3016-3027. 2004.
- HELLER, J. Physic nut. *Jatropha curcas* L.: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1 ed. Roma: IPGRI, 66 p. 1996.
- HENNING RK. The *Jatropha* system. An integrated approach of rural development, Germany. Available from [http://www.jatropha.de/documents/The Jatropha Book-2009.pdf](http://www.jatropha.de/documents/The_Jatropha_Book-2009.pdf). 2009.
- HESLOP-HARRINSON P, OSUJI J, HULL R, HARPER G, D' HONT A and CARREEL F. Fluorescent in situ hybridization of plant chromosomes: illuminating the *Musa* genome. *INIBAP Annual Report* 1998:26-29. 1998.

- HESLOP-HARRISON, J. S. P., & SCHWARZACHER, T. Organisation of the plant genome in chromosomes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 66(1), 18–33. doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04544.x. 2011.
- HIRAKAWA H, TSUCHIMOTO S, SAKAI H, NAKAYAMA S, FUJISHIRO T, KISHIDA Y, KOHARA M, WATANABE A, YAMADA M, AIZU T, TOYODA A, FUJIYAMA A, TABATA S, FUKUI K, SATO T: Upgraded genomic information of *Jatropha curcas* L. *Plant Biotechnol*, 29:123–130. 2012.
- JAHIER, J., CHAIN, D., BARLOY, A., TANGUY, J., LEMOINE, G., RIAULT, E., MARGAL, C., TROTTET, M. & JACQUOT, E. Effect of combining two genes for partial resistance to Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) derived from *Thinopyrum intermedium* in wheat. *Plant Pathology*, 58: 807-814. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02084.x>>. 2009.
- KUMAR, A., & SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products*, 28(1), 1–10. doi:10.1016/j.indcrop.2008.01.001. 2008.
- LEITCH, ARMSTRONG KC, MIKI B. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total genomic DNA as a probe. *Plant Molecular Biology Reporter*. 7:150–158. 1989.
- LEITCH, A.R., LIM, K.Y., LEITCH, I.J., O'NEILL, M., CHEYE, M. & LOW, F. Molecular cytogenetic studies in rubber, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (Euphorbiaceae). *Genome* 41:464-467. 1998.
- LIM KY, LEITCH IJ, LEITCH AR. Genomic characterisation and the detection of raspberry chromatin in polyploid *Rubus*. *Theor Appl Genet* 97: 1027-1033. 1998.
- LINDE-LAURSEN I, VON BOTHMER R. Orderly arrangement of the chromosomes within barley genomes of chromosome-eliminating *Hordeum lechleri* x barley hybrids. *Genome* 42:225–236. 1999.

- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512 p. 2008.
- MABBERLEY DJ. The plant book. Cambridge University Press, Cambridge, 858p. 1997.
- MARQUES DA, FERRARI RA. O papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão-manso. *Biológico* 70(2):65–67. Portuguese. 2008.
- MARQUES, D. A., *et al.* Breeding and Biotechnology of *Jatropha curcas*. In: BAHADUR, B., *et al.* (eds). *Jatropha*, Challenges for a New Energy Crop: volume 2: Genetic Improvement and Biotechnology, DOI 10.1007/978-1-4614-4915-7_23, © Springer, 2013.
- MARGONAR, M.A.S.; KARSBURG, I.V.; BONA, D.A.O. Identificação da região organizadora nucleolar de *Jatropha curcas* L. estudos, Goiânia, v. 339, n. 2, p. 165-173, 2012.
- MARKOVA, M., VYSKOT, B. *New Horizons of Genomic in situ Hybridization*, Cytogenetic and Genome Research 126, 368-375 [AIS=0.672, IF=1.729 VH]. 2009.
- MISRA, M., & MISRA, A. N. *Jatropha*: The Biodiesel Plant Biology, Tissue Culture and Genetic Transformation – A Review, 1(1), 11–24. 2010.
- MONGKOLVISUT, W., SUTTHIVAIYAKIT, S., LEUTBECHER, H., MIKA, S., KLAIBER, I., MÖLLER, W., RÖSNER, H., BEIFUSS, U., JÜRGEN, C., Integerrimides A and B, cyclic heptapetides from the latex of *Jatropha integerrima*. *Journal of Natural Products* 69 (10), 1435–1441. 2006.
- MOREIRA *et al.* Resgate embrionario *in vitro* en el cruzamiento de *Jatropha curcas* con *J. integerrima*, *J. multifida* y *J. podagrica*. In: *Energia alterna y Biocombustibles: Innovación e investigación para un desarrollo sustentable. Germoplasma y mejoramiento genético*. P. 119-127. ISBN: 978-607-715-088-5. 2013.

- MUNHOZ, M. *et al.* Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. Revista Brasileira de Botânica, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 209-214, abr./jun. 2008.
- MUKAY Y. Perspectives in Molecular cytogenetics of wheat. (Ed.). Frontiers of Wheat Bioscience. Memorial issue. Wheat information Services 100: 17-30. 2005.
- NKONGOLO, K. K. Molecular cytogenetic and agronomic characterization of advance generations of *wheat x triticale* hybrids resistant to *Diuraphis noxia* (Mordvilko): application of GISH and microsatellite markers. Genome, Toronto, v. 52, n. 3, p. 353-360, mar. 2009.
- OPENSHAW K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. Biomass and Bioenergy, 19:1-15. 2000.
- OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. Journal of Ethnopharmacology, 89: 101-105. 2003.
- PAGLIARINI, M.S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. Genetics and Molecular Biology, v.23, p.997-1002, 2000.
- PAGLIARINI, M.S; SOUZA V.F., SILVA N., SCAPIM C.A., RODOVALHO M. e FARIA M.V. *ms17*: a meiotic mutation causing partial male sterility in a corn silage hybrid. Genet. Mol. Res. 10 (3): 1958-1962. 2011.
- PAIVA, E. A. A. Meiose em híbridos hexaplóides de capim-elefante e milho. 53p. Dissertação (Mestrado em agronomia) - Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras. 2006.
- PARDUE, M L., and J. G. GALL. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 64:600. 1969.

PINTO-MAGLIO CAF, CRUZ ND. Cytogenetic Studies in *Coffea* L. and *Psilanthus* Hook. f. Using CMA/DAPI and FISH. *Cytologia* 69 (1), 85-91. 2007.

PRAKASH, A.; CHAUHAN, S.; RANA, A.; CHAUDHARY, V. Study of In vitro Pollen Germination and Pollen Viability in *Punica granatum* L. (Punicaceae). *Research Journal of Agricultural Sciences, Awantipora*, v.1, n.3, p. 224-226, 2010.

RAINA S.N., MUKAI Y. and YAMAMOTO M. - In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 1204-1209. 1998.

RAINA SN, RANI V. GISH technology in plant genome research. *Methods Cell Sci.* 23: 83-104. 2001.

RAJA SA, ROBINSON SMART DS, LEE CLR. Biodiesel production from *Jatropha* oil and its characterization. *Res J Chem Sci* 1: 81–87. 2011.

REIS, C.A.O.; SCHIFINO-WITTMANN, M.T.; DALL´AGNOL, M. Chromosome numbers, meiotic behavior and pollen fertility in a collection of *Paspalum nicorae* Parodi accessions. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 8, p. 212-218, 2008.

RISSE-PASCOTTO C, PAGLIARINI MS, VALLE CB and MENDES-BONATO AB. Chromosome number and microsporogenesis in a pentaploid accession of *Brachiaria brizantha* (Gramineae). *Plant Breeding* 122: 136-140. 2003.

RISSE-PASCOTTO C, PAGLIARINI MS and VALLE CB. Multiples spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). *Plant Cell Report* 23: 522-527. 2005.

- RISSO-PASCOTTO, C PAGLIARINI, MS e VALLE, CB. Chromosome number and microsporogenesis of two accessions of *Brachiaria dura* Stapf (Poaceae). *Biota Neotropica*, 9(2), 257-261. 2009.
- ROA F, GUERRA M. Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology* 2012, 12:225 doi:10.1186/1471-2148-12-225. 2012.
- RULFINO *et al.*: Obtención de híbridos interespecíficos de *Jatropha curcas* L., In: Energia alterna y Biocombustibles:Innovación e investigación para un desarrollo sustentable. Germoplasma y mejoramiento genético. P. 107-117. ISBN: 978-607-715-088-5. 2013.
- SANEI M, PICKERING R, KUMKE K, NASUDA S, HOUBEN A. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 16;108(33):E498-505. doi: 10.1073/pnas.1103190108. Epub 2011 Jul 11. 2011.
- SÁTIRO, L.N. & ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 22:99-118. 2008.
- SATO, S, *et al.* Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. *DNA Research*, pp.1-12, doi:10.1093/dnares/dsq030. 2010.
- SATO S, *et al.*, Sequence analysis of the genome of an oil bearing tree, *Jatropha curcas* L. *DNA*, 18:65–76. 2011.
- SATURNINO, H. M. *et al.* Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.
- SATURNINO, H. M. *et al.* Implantação de unidades de validação de tecnologia pinhão-manso. Nova Porteirinha, 5 p. Projeto de Pesquisa, Centro Tecnológico do Norte de Minas Gerais, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Nova Porteirinha, 2006.

SCHWARZACHER T, LEITCH AR, BENNETT MD, HESLOP-HARRISON JS. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid. *Annals of Botany*. 64:315–324.1989.

SEGEREN ET AL. SEGEREN, M.I.; SÖNDAHL, M.R., SIQUEIRA, W.J.; MEDINA FILHO, H.P.;NAGAI, H.; LOURENÇÃO, A.L. *Tomato breeding: 1. Embryo rescue of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* (L.) MILL.* *Revista Brasileira de Genética*. 16: 367-380. 1993.

SEPSI, A.; MOLNÁR, I.; MOLNÁR-LÁNG, M. Physical mapping of a 7A.7D translocation in the wheat-*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1 using multicolour genomic *in situ* hybridization and microsatellite marker analysis. *Genome*, Toronto, v. 52, n. 9, p. 748-754, set. 2009.

SHARMA, D. R.; KAUR, R.; KUMAR, K. Embryo rescue in plants- a review. *Euphytica*, v. 89, n. 3, p. 325-337, 1996.

SILVA, K. V. P.; ALVES, A. A. C.; BENKO-ISEPPON, A.M.; CARVALHO, Reginaldo. Estudo do comportamento meiótico em acessos do gênero *manihot*. XIII Congresso Brasileiro de Mandioca, 2008.

SINGH, R. J. *Plant cytogenetics*. CRC Press, Boca Raton, USA, 391p, Disponível em <https://www.academia.edu/2004376/Singh_Plant_Cytogenetics?login=rosildapaes@gmail.com&email_was_taken=true>. 1993.

SNOWDON, R.J., W. KÖHLER, W. FRIEDT AND A. KÖHLER: Genomic *in situ* hybridisation in *Brassica* amphidiploids and hybrids. *TAG 95*, 1320-1324. 1997.

SOUZA, V.C. e LORENZI, H. *Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 2006.

- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). Ciênc. agrotec., Lavras. v.26, n.6, p.1209-1217, 2002.
- SOUZA MM, PEREIRA TNS, VIANA, AP, SILVA LC E SUDRÉ CP. Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). Beitrage zur Biologie der Pflanzen 73: 1-18. 2004.
- SUBRAHMANYAM NC, KASHA KJ. Selective chromosome elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization. Chromosoma 42:111–112. 1973.
- SUJATHA M AND PRABAKARAN AJ. New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization. Genetic Resources and Crop Evolution 50: 75-82. 2003.
- SUMNER, A. T. Chromosomes: Organization and Function. Oxford - United Kingdom. Blackwell Publishing Ltd., 287 p. 2003.
- TECHIO, V. H. Meiose e análise genômica em *Pennisetum spp.* 104p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras. 2002.
- TECHIO, V.H. *et al.* Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. Genetic and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 353-362, 2006.
- TECHIO, V.H; DAVIDE, L.C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. Biotemas, v. 20, n.4, p. 7-18, 2007.
- VASCONCELOS, S.S., SOUZA, A.A., GUSMÃO, C.L.S., MILANI, M., BENKO-ISEPPON, A.M. e BRASILEIRO-VIDAL, A.C. Heterochromatin and

rDNA 5S and 45S sites as reliable cytogenetic markers for castor bean (*Ricinus communis*, Euphorbiaceae). *Micron* 41:746-753. 2010.

VERMA, K.C. and GAUR, A.K. *Jatropha curcas* L.: Substitute for Conventional Energy. *World Journal of Agricultural Sciences* 5(5): 552-556. 2009.

VILELA-MORALES E. A; VALOIS A. C. C. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*. v.17, n.2, p.11-42, Brasília, 2000.

WALKER, M. R.; RAPLEY, R. *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Ed. Atheneu, 334p. 1999.

WITKOWSKA M, OHMIDO N, CARTAGENA J, SHIBAGAKI N, KAJIYAMA S, FUKUI K. Physical mapping of ribosomal DNA genes on *Jatropha curcas* chromosomes by multicolor FISH. *Cytologia*, 74: 133-139. 2009.

ZHANG HQ, YANG RW, DOU QW, TSUJIMOTO H, ZHOU YH: Genome constitutions of *Hystrix patula*, *H. duthiei* ssp. *duthiei* and *H. duthiei* ssp. *longearistata* (Poaceae: Triticeae) revealed by meiotic pairing behaviour and genomic in-situ hybridization. *Chromosome Res* 14:595-604. 2006.