



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO

**GENOTIPAGEM, TEOR DE ÓLEO, OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO
GRAVIMÉTRICO E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITE EM *Ricinus communis* L.**

EDNA LÔBO MACHADO

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

DEZEMBRO DE 2011

**GENOTIPAGEM, TEOR DE ÓLEO, OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO
GRAVIMÉTRICO E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITE EM *Ricinus communis* L.**

EDNA LÔBO MACHADO

Licenciada em Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Feira de Santana, 1998

Tese submetida ao Colegiado de Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Alves Silva

Co-Orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
EDNA LÔBO MACHADO**

Profa. Dra. Simone Alves Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Profa. Dra. Soraia Barreto Aguiar Fonteles
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Profa. Dra. Claudete Aparecida Mangolin
Universidade Estadual de Maringá- UEM

Dr. Alberto Duarte Vilarinhos
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Dr. Carlos Ivan Aguilar Vildoso
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical

Tese homologada pelo Colegiado do Curso de Doutorado em Ciências Agrárias
em

Conferindo o Grau de Doutor em Ciências Agrárias em.....

Ao meu filho, Lucas Machado Lima, pela sua existência e amor,
minha fonte de inspiração.

DEDICO

A Robson Batista de Lima pelo companheirismo, incentivo e paciência.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À toda a minha família, em especial à minha mãe Diva pela luta ao longo de sua vida; As minhas irmãs: Vilma, Joselma, Dayse e Dora pelo companheirismo e amizade; E aos meus sobrinhos queridos: Valéria, Davi, Guilherme e Beatriz;

Aos meus alunos que colaboraram significativamente para a conclusão deste trabalho: Agenildo, Luciel, Camila, Keyla e Leila;

A minha orientadora, Profa. Dra. Simone Alves Silva, pela oportunidade, orientação e amizade;

A minha co-orientadora Cláudia Fortes Ferreira pela co-orientação e amizade;

A banca examinadora pelas preciosas sugestões;

Aos técnicos da EMBRAPA, Epaminondas e Raimundo, que foram sempre muito atenciosos e solícitos. Meu muito obrigada;

Ao Dr. Éder e Dr. Ledo pelo apóio;

Aos colegas do NBIO, Helison, Diego, Magno, Elaine, Ronaldo, Bruno, Pedro, Adriana, Selma, Diana e Lívia por terem contribuído de forma direta ou indireta para a construção deste trabalho;

A todos os professores, da Pós-Graduação, e funcionários que de alguma forma foram importantes para a construção deste momento;

À Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA pela colaboração;

A todos que porventura não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram ou torceram para a conclusão de mais essa etapa;

À PETROBRÁS pelo apóio financeiro

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	
DISSIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES RAPD.....	22
CAPÍTULO 2	
OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO GRAVIMÉTRICO E TEOR DE ÓLEO EM UMA POPULAÇÃO F ₃ DE MAMONEIRA.....	46
CAPÍTULO 3	
GENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO F ₂ E SEU DESEMPENHO QUANTO AO TEOR DE ÓLEO NA SEMENTE DE MAMONEIRA (<i>Ricinus communis</i> L.).....	64
CAPÍTULO 4	
DESENHO E OTIMIZAÇÃO DE INICIADORES MICROSSATÉLITES PARA <i>Ricinus communis</i> L.....	91
CONSIDERAÇÕES FINAIS	111

GENOTIPAGEM, TEOR DE ÓLEO, OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO GRAVIMÉTRICO E DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITE EM *Ricinus communis* L.

Autor: Edna Lôbo Machado

Orientadora: Profa. Dra. Simone Alves Silva

Co-orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

RESUMO: A mamoneira é uma oleaginosa de relevante importância econômica e social, de cujas sementes se extrai um óleo de excelentes propriedades e de largo uso como insumo industrial. Outra importância no uso do óleo de mamona é na produção de biocombustível. Este trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de marcadores microssatélites (SSR), a genotipagem de população F_2 e cultivares introduzidas e a otimização do método de gravimetria para a quantificação do teor de óleo na semente. Para o desenvolvimento de marcadores SSR foram desenhados e otimizados 30 pares de iniciadores. Desses, 29 (96,7%) foram validados. A genotipagem da população F_2 foi realizada utilizando 27 pares de iniciadores SSR. Para o desempenho quanto ao teor de óleo na semente utilizou-se a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Um total de 11 locos foi polimórfico (49,7%) e o teor de óleo nas sementes variou entre 44,59% a 54,04%. A genotipagem de cultivares introduzidas de mamoneira foi realizada utilizando 58 iniciadores RAPD. Um total de 311 marcadores polimórficos (56,3%) foi identificado, com formação de cinco grupos. Para a otimização do método gravimétrico realizaram-se testes quanto ao número necessário de extrações com o solvente hexano e foi realizada a comparação entre os métodos *soxhlet* e gravimétrico. No método gravimétrico quatro extrações com o solvente hexano foram necessárias. Os resultados mostraram que não houve diferença entre os métodos comparados. Estes estudos servirão de base para a tomada de decisões dentro do programa de melhoramento da mamoneira da UFRB, que visa o desenvolvimento de cultivares com maior teor de óleo, mais produtivas, resistentes e bem adaptadas.

Palavras-chave: Melhoramento Genético, Teor de óleo, Biodiesel

GENOTYPING, OIL CONTENT, THE GRAVIMETRIC METHOD OPTIMIZATION AND DEVELOPMENT IN MICROSATELLITE MARKERS *Ricinus communis* L.

Author: Edna Lôbo Machado

Adviser: Prof. Dr. Simone Alves Silva

Co-adviser: Dr. Cláudia Fortes Ferreira

ABSTRACT: Castor bean is an economic and social relevant oil plant from which an oil with excellent properties is extracted from its seeds and is largely used as an industrial product. Another use of castor bean oil is in biofuels. The objective of this work was to develop microsatellite markers (SSRs), genotype an F_2 population and introduced cultivars and optimize the gravimetric methodology for the quantification of the oil content in seeds. For the development of SSR markers, primers were designed, 30 pairs of primers were optimized and 29 (96.7%) were validated. The genotyping of the F_2 population was carried out using 27 SSR primer pairs. As to the performance regarding oil content in seeds, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was used. A total of 11 loci were polymorphic (49.7%) and oil content in seeds varied from 44.59 to 54.04%. Genotyping of the introduced castor bean cultivars was carried out with 58 RAPD primers. A total of 311 polymorphic bands (56.3%) was identified with five groups formed. For the optimization of the gravimetric methodology, tests regarding the number of extractions necessary with the hexane solvent and comparisons between the Soxhlet and gravimetric methodologies, were carried out. Four extractions with the hexane solvent are necessary and there was no significant difference between the methodologies. These studies will set the basis for decision making processes in the castor bean genetic breeding program at UFRB which is aimed in developing cultivars with greater oil content, more productive, resistant and better adapted cultivars.

Key-words: Genetic breeding, Oil content, Biofuel.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L) pertencente à família Euforbiaceae. Seu centro de diversidade está localizado na Etiópia e no leste da África, com existência de centros secundários. No Brasil, sua introdução ocorreu durante a colonização portuguesa, por ocasião da vinda dos escravos africanos (MAZZANI, 1983).

A *R. communis* possui fácil propagação, adaptação e estabelecimento nas diferentes regiões. No Brasil a mamoneira é uma planta típica de região semi-árida (NÓBREGA, 2008). Segundo Nóbrega (2008), o Nordeste brasileiro representa 90% da área plantada e 79% da produção, cuja produtividade média é de 646 kg/ha⁻¹. Assim, a produção brasileira de mamona está concentrada na Região Nordeste, especialmente no Estado da Bahia.

A mamoneira possui elevado valor socioeconômico e seus produtos e subprodutos, são utilizados na indústria ou na agricultura, além de apresentar perspectivas de uso como fonte energética sob a forma de biodiesel (COSTA et al., 2006).

A cultura da mamona deve se consolidar como o principal componente do biodiesel a ser produzido no Brasil, podendo se tornar em curto prazo, no cenário do Nordeste, um dos principais componentes do programa nacional de biodiesel. Assim, torna-se imprescindível a implementação de estratégias que possibilitem o desenvolvimento de novos genótipos, com maiores teores de óleo e ajustados às condições do Recôncavo Baiano. Isto possibilitará também a consolidação da cultura da mamona nesta região de forma a garantir, no futuro, a expansão do agronegócio dessa oleaginosa no estado da Bahia.

Segundo Severino et al. (2006), no Brasil, o melhoramento genético tem permitido avanços em produção de genótipos que são importantes para a tecnologia de produtos. Uma das principais demandas, no melhoramento genético da mamoneira, é a adaptação de genótipos à baixas altitudes, o que permitirá a inclusão sustentável de muitos municípios onde o cultivo não é recomendado pelo risco de obtenção de baixas produtividades.

A espécie *Ricinus communis*

Taxonomia e classificação botânica

A espécie *Ricinus communis* pertence à família Euphorbiaceae e ao gênero *Ricinus*. O gênero *Ricinus* foi descrito por Linnaeus em 1753 que descreveu três espécies distintas, mas apenas a *Ricinus communis* é conhecida (POPOVA e MOSKIN, 1986). Apesar da descrição das três espécies, verificou-se que não existem barreiras reais de cruzamentos entre elas, motivo pelo qual se conserva somente a espécie *Ricinus communis* que inclui todos os tipos de mamoneira existentes (ZIMMERMAN, 1957; BANZATTO e ROCHA, 1969; SAVY FILHO, 1999a).

Popova e Moshkin (1986) propõem um esquema de classificação para a espécie *Ricinus communis*, que é representada por seis subespécies e 25 variedades botânicas. Por outro lado, Savy Filho (1999b) reconhece quatro subespécies: *R. sinensis*, *R. zanzibarensis*, *R. persicus* e *R. africanus*. Essas subespécies englobam as 25 variedades, que são todas compatíveis entre si, produzindo híbridos férteis diplóides, com $2n = 2x = 20$ cromossomos.

A mamoneira possui grande variação no hábito de crescimento, sendo, geralmente, arbustiva e capaz de atingir até dez metros de altura (POPOVA e MOSHKIN, 1986; MAZZANI, 1983). O seu sistema radicular é do tipo axial, com uma raiz principal pivotante e as demais raízes laterais. Em condições de baixa umidade do solo, a raiz principal atinge uma maior penetração e as raízes secundárias assumem caráter bem desenvolvido de particular importância para as variedades resistentes à seca. O caule pode apresentar grande variação, especialmente, na coloração e presença de cera. Observa-se o crescimento do ramo principal, verticalmente, sem ramificação, até o surgimento da primeira inflorescência, o que, em alguns genótipos, segundo Baldanzi et al. (2003), ocorre somente após a formação de seis nós. As folhas são simples, digitilobadas, denticuladas, apresentando pecíolos longos e profílexia alternada. As principais alterações nas folhas de mamoneira são cor, cerosidade, número de nervuras principais, comprimento do pecíolo, número de glândulas e na profundidade dos lóbulos (MAZZANI, 1983).

É uma planta monóica cujas flores femininas ocupam a porção superior e as masculinas a porção basal da inflorescência, proporcionando dois tipos de reprodução: autofecundação e fecundação cruzada, sendo sua polinização geralmente anemófila (SAVY-FILHO, 1999a; BELTRÃO et al., 2001). A quantidade de flores femininas e masculinas, bem como a produção da planta, está diretamente ligada às condições ambientais, tipos de solo e idade da planta. Quando as condições ambientais estão adequadas, proporcionam o desenvolvimento de flores femininas e, quando são desfavoráveis, ocorre o desenvolvimento de flores masculinas (WEISS, 1993). Em condições normais, a mamoneira desenvolve-se adequadamente em climas quentes e úmidos. A temperatura ideal para o desenvolvimento é de 20 a 30° C e a exigência hídrica no período vegetativo é de, no mínimo, 100 mm de chuva por mês (HERMELY, 1981; CARVALHO, 1988; SAVY-FILHO, 1999b).

Os frutos são produzidos isoladamente, em cachos, na extremidade dos ramos (BANZATTO e ROCHA, 1965) e podem ser deiscentes ou indeiscentes, tricocas, na sua maioria com acúleos, triloculares, com sementes que variam de tamanho, formato, cor e teores de óleo (SAVY-FILHO, 1999a; BELTRÃO et al., 2001). As sementes apresentam-se de diversas formas e tamanhos, encontrando-se variações na cor, peso, tamanho, presença ou ausência de carúncula e aderência do tegumento ao endosperma. De acordo com Ribeiro Filho (1996), o tegumento externo da semente é representado pela casca, que é dura e quebradiça, tendo uma película interna, fina, que envolve o albúmen, que é branco, compacto e rico em óleo.

Origem

Há relatos da existência de sementes e de óleo de mamona no Antigo Egito a mais de 4000 anos (MOSHKIN, 1986). Muitos autores acreditam em uma origem africana para a mamoneira, enquanto outros afirmam que sua origem seria asiática (HEMERLY, 1981). A mamoneira tem seu centro de diversidade localizado na Etiópia e no leste da África, com existência de centros secundários (POPOVA e MOSKIN, 1986). Atualmente, é cultivada em diversos países do mundo, sendo que 95% da produção mundial de mamona está concentrada na

Índia, na China e no Brasil, sendo esta a ordem os maiores produtores mundiais (SUJATHA, 2008).

No Brasil, acredita-se que a mamoneira foi introduzida durante a colonização portuguesa, por ocasião da vinda dos escravos africanos (BELTRÃO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002), com a finalidade de utilizar seu óleo na iluminação e para lubrificação de eixos de carroça (CHIERICE e CLARO NETO, 2001).

Importância Econômica e Produtividade

O interesse pelo cultivo da mamona deve-se às diversas possibilidades de uso do óleo extraído das sementes e à sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais (SILVA, 2008). Além disso, as folhas da mamona podem ser utilizadas como alimento na sericultura ou adicionadas à forragem, após a sua desintoxicação, visando o aumento da lactação em vacas (LOUREIRO, 1962). É possível, ainda, a extração de fibra e celulose a partir da haste da mamona. A fibra e a celulose são usadas na confecção de papel e tecidos grosseiros. Finalmente, sua semente esmagada compreende um dos componentes da torta de mamona, juntamente com os restos culturais da planta. Essa torta pode ser utilizada como fertilizante orgânico, com grande capacidade de restauração de solos desgastados, como nematicida, e, após tratamento para a retirada de produtos tóxicos (a proteína ricina), como alimentação animal (HERMELY, 1981; BATISTA et al., 1997; SAVY-FILHO, 1999b). A mamona possui em suas sementes uma alta concentração da proteína ricina. Esta é extremamente tóxica e é considerada um dos venenos mais mortíferos se administrada por via intravenosa ou oral. A ricina é um proteína inibidora da síntese protéica por interagir com os ribossomos (CHAN et al., 2010).

No que concerne aos avanços na área de medicina, hoje deriva-se do óleo um polímero utilizado na fabricação de cimento ósseo e de próteses de diversas partes do corpo humano (IGNÁCIO et al., 1996; ERENO, 2003)

Quanto à geração de energia, o óleo de mamona torna-se propício para fazer frente ao Programa Nacional de Biodiesel que, além da inclusão social, almeja reduzir tanto as importações brasileiras de petrodiesel quanto a queima de combustíveis fósseis. Nesse sentido, destaca-se que além das vantagens sócio-

econômicas que a cultura da mamona propicia essa oleaginosa apresenta teor de óleo acima das demais. A semente da mamona apresenta mais de 45% de óleo em suas sementes, e este óleo apresenta-se composto por 80 a 90% de um hidróxil ácido graxo não usual que é o ácido ricinoleico (JEONG e PARK, 2009). Segundo a EMBRAPA (2004), cada hectare cultivado com mamona absorve dez toneladas de gás carbônico, ou seja, o quádruplo da média das outras oleaginosas.

A mamoneira apresenta adaptação a quase todas as regiões do país, com destaque para as regiões nordeste, sudeste e sul – representadas, respectivamente, pelos estados da Bahia, São Paulo e Paraná -, que são os principais produtores dessa oleaginosa. A evolução da cultura da mamona, no Brasil, foi avaliada por Kouri et al. (2004), desde a safra de 1977-78 até o ano de 2004, por meio de dados fornecidos pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Conforme esses autores, as taxas de crescimento da área colhida, da produção e do rendimento médio da cultura, no país, foram negativas em diversas safras, e na década de 90, representaram um período de decadência. No entanto, o cenário que se estabeleceu com a criação do Probiodiesel, em 2002, é de crescimento da cultura. A mamona está incluída no Programa Nacional de Produção e uso de Biodiesel (PNPB), elaborado pelo Governo Federal, que autorizou a adição de 2% de combustíveis derivados de óleos vegetais ao diesel, obtido a partir do petróleo, já em 2008, e a elevação desse percentual para 5% até 2012 (RAMOS et al., 2006).

A produtividade média da mamona no Brasil está em torno de 646 kg ha⁻¹, considerada ainda muito baixa (SAVY FILHO et al., 2007). Essa baixa produtividade brasileira poderá comprometer a oferta de mamona para atender à crescente demanda por óleos vegetais para uso no PNPB.

A maior produção da mamona fica no Nordeste do Brasil, sendo a Bahia o seu principal produtor. No território baiano, essa monocultura chegou a ocupar, na safra de 2004/2005, uma área de aproximadamente 160.000 hectares, (CONAB, 2005). Porém, sua produtividade ainda é considerada extremamente baixa. Isso se deve à exploração insustentável dos recursos naturais, ao uso inapropriado das terras e, sobretudo, à falta de tecnologias modernas aplicadas à agricultura.

Para Freire et al. (2001), a baixa produtividade média observada no Brasil deve-se, em parte, ao uso de sementes de baixa qualidade genética. Essas

sementes são multiplicadas pelos próprios agricultores, levando-as a um alto grau de heterogeneidade e, não raro, a uma grande diversidade de tipos locais pouco produtivos.

Com o avanço das pesquisas sobre o biodiesel e sua importância e com a criação do Programa Nacional do Biodiesel, a mamona surgiu como uma das principais matérias-primas, embora existam outras opções de grande importância econômica como o babaçu, o óleo de palma, a soja, o dendê, pinhão-manso, dentre outras oleaginosas. Uma das vantagens do óleo de mamona sobre os demais utilizados para o Biodiesel é que esse óleo não entra na cadeia alimentícia, sendo um produto estritamente industrial. Além disso, o óleo da mamona é rico em ácido ricinoléico e este é o único ácido graxo solúvel em álcool, mesmo em baixas temperaturas (BELTRÃO et al., 2004) fato que favorece o Brasil que é um grande produtor mundial de etanol e este é produzido a partir de fontes renováveis. Assim, a mamona pode-se consolidar como a principal cultura no cenário do Nordeste para fins da utilização de seu óleo para produção de biodiesel.

O óleo da mamona

Indubitavelmente, o óleo é o principal produto da mamona, sendo matéria prima de diversos produtos das indústrias químicas, a exemplo de plásticos, fibras sintéticas, esmaltes, resinas e lubrificantes. É, ainda, matéria prima de produtos mais sofisticados produzidos pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e até pela aeronáutica (FREIRE et al., 2001). Além de sua vasta aplicabilidade, o óleo da mamoneira apresenta algumas características peculiares: (i) é o único glicerídico natural que é solúvel em álcool; (ii) é o mais denso e mais viscoso de todos os óleos vegetais e animais; (iii) é o que tem o maior percentual de oxigênio na molécula, cerca de 5% a mais do que os demais óleos. Ademais, ao ser transformado em biodiesel, esse óleo comporta-se como combustível e comburente, constituindo-se em um agente poluidor da atmosfera bem menos severo do que o diesel, mineral derivado diretamente do petróleo.

Em geral, o teor de óleo nas sementes da mamoneira varia de 35% a 55% (VIEIRA et al., 1997; JEONG e PARK, 2009). Contudo, a maior parte das

cultivares que são plantadas comercialmente no Brasil, possui teor variando entre 45% e 50% (FREIRE et al., 2006).

A cultura da mamona deve se consolidar como o principal componente do biodiesel a ser produzido no Brasil, podendo se tornar em curto prazo, no cenário do Nordeste, um dos principais componentes do programa nacional de biodiesel. A estimativa é de que cerca de 40% do biodiesel produzido no Brasil nos próximos anos, sejam obtidos a partir dessa oleaginosa. Assim, torna-se imprescindível à implementação de estratégias que possibilitem o desenvolvimento de novos genótipos, com maiores teores de óleo e ajustados às condições do Recôncavo Baiano. Bem como, o desenvolvimento de novas metodologias para a determinação do teor de óleo na semente de um grande número de amostras.

A consolidação da cultura da mamona no Recôncavo Baiano poderá garantir, no futuro, a expansão do agronegócio dessa oleaginosa no estado da Bahia.

Melhoramento genético da mamoneira

O melhoramento de plantas envolve diferentes métodos e supõe a obtenção de uma nova cultivar, cujas vantagens comparativas devem justificar sua distribuição comercial. Tais vantagens podem estar relacionadas com a questão da produtividade de bagas e óleo, resistência/tolerância ao mofo cinzento, tolerância à acidez do solo, adaptação à determinada condição edafoclimática, qualidade do produto, dentre outras (SAVY FILHO, 2005; BAHIA et al., 2008; PASSOS et al., 2010, SAMPAIO FILHO et al., 2011).

Embora a mamoneira seja uma planta com grande capacidade de adaptação às mais diferentes regiões do mundo, ela está sujeita a doenças causadas por diversos microrganismos, os quais causam grandes prejuízos econômicos, principalmente quando as condições climáticas lhes são favoráveis (FORNAZIERI JÚNIOR, 1986; SAVY FILHO, 1999). Entre essas doenças, pode-se destacar o mofo cinzento, causado pelo fungo *Amphobotrys ricini* (Buchw.) Hennebert, como uma das mais importantes, pois causa grandes prejuízos à produção, destruindo inflorescências e racemos, e assim reduzindo a produção de óleo pela diminuição dos frutos colhidos (LIMA et al., 2001). A principal forma de disseminação de A.

ricina é por esporos carreados pelo vento e por sementes (NEERGAARD, 1979), porém alguns insetos, atraídos pela grande exsudação de néctar nas flores, também desempenham papel na disseminação do fungo (KIMATI, 1980; MASSOLA JR. e BEDENDO, 2005).

No Brasil, o primeiro programa de melhoramento genético da mamoneira foi iniciado pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em 1936, (KRUG et al., 1943) com o objetivo de desenvolver cultivares de mamoneira mais produtivas, com maiores níveis de resistência/tolerância às doenças e pragas e com outras características desejáveis. No estado da Bahia, os trabalhos envolvendo melhoramento genético da mamoneira foram iniciados na década de 1960 pelo Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Leste (IPEAL), com sede em Cruz das Almas (BELTRÃO, 2006). A partir de 1974, esses trabalhos passaram a ser conduzidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia (EPABA), tendo desenvolvido e distribuído várias cultivares (CRISÓSTOMO e SILVA, 1975; GODOY et al., 1985), dentre as quais se destacaram: SIPEAL 1, SIPEAL 2, SIPEAL 3, SIPEAL 4, SIPEAL 5, SIPEAL 6, SIPEAL 7, SIPEAL 9, SIPEAL 13, SIPEAL 19, SIPEAL 25, SIPEAL 28 e EPABA 2.

Instituições de pesquisa como a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ, a Universidade Federal de Viçosa – UFV, a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará – EPACE e a Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, também, participam ativamente das redes de competição de cultivares de portes anão, médio e alto, que culminou com o lançamento das cultivares BRS 149 Nordestina e BRS 188 Paraguaçu, respectivamente em 1998 e 1999, para toda a área zoneada para a mamona no Nordeste e Norte de Minas Gerais (AZEVEDO, 1997; LIMA, 2001).

Com o objetivo de desenvolver genótipos superiores de mamoneira para o estado da Bahia, principalmente em regiões de baixa altitude, o Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia – NBIO, pertencente à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, com sede em Cruz das Almas, iniciou em 2005 seus trabalhos com a espécie, e desde então vem procurando compor seu programa de melhoramento por meio da hibridação e seleção de materiais de elevado potencial produtivo e adaptados a diferentes condições de ambientes.

O programa do NBIO teve início com a introdução de cinco cultivares, sendo elas: Sipeal 28, BRS Nordestina, BRS Paraguaçu, Mirante 10 e EBDA MPA 17. Bahia et al. (2008) estudaram a divergência genética entre essas cinco variedades no ambiente de Cruz das Almas e observaram a formação de três grupos distintos; o grupo I foi formado pelas cultivares “EBDA MPA 17 e Sipeal 28”, o II pela “BRS 149 Nordestina e BRS 188 Paraguaçu” e o III pela “Mirante 10”, considerando a divergência para os caracteres em conjunto. Os mesmos autores observaram que combinações promissoras são esperadas entre “Sipeal 28 x BRS 188 Paraguaçu” e “Sipeal 28 X EBDA MPA-17”, em virtude da maior dissimilaridade apresentada e do melhor desempenho médio destes híbridos na região do Recôncavo Baiano. Entretanto, os caracteres eleitos como índice de seleção para o programa expressaram ampla variabilidade genética, sendo eles: teor de óleo na semente, peso da semente, estatura de planta, florescimento e resistência ao mofo cinzento. Dessa forma, para o caráter de óleo na semente o cruzamento que se destacou foi entre as cultivares EBDA MPA-17 e BRS Nordestina.

Cerqueira (2008), estudando as mesmas variedades através da dissimilaridade por marcadores moleculares, confirmou a variabilidade genética constatada em campo entre os materiais. Sampaio Filho (2009), estudando as mesmas cultivares por dois anos seguidos em ambiente de baixas altitudes, notou que existe variabilidade para os principais caracteres agronômicos da cultura. Silva (2008), em seus estudos fisiológicos com avaliação do crescimento e produtividade dessas cinco cultivares no município de Cruz das Almas constatou que o desempenho das mesmas, indica serem adaptados à região do Recôncavo Baiano, pois apresentam maior plasticidade aos efeitos do ambiente. Passos et al. (2010), estudando as populações fixas e segregantes do dialélico parcial entre essas variedades, verificaram forte efeito do ambiente e reduzida herdabilidade, indicando métodos de melhoramento como genealógico e SSD na condução de populações segregantes. Oliveira (2011) conduziu pelo método SSD a população segregante F_3 e avaliou seu desempenho e dissimilaridade em condições de baixa altitude. O estudo mostrou que houve variabilidade genética na população segregante F_3 e fortes correlações genéticas entre os caracteres. Em relação à divergência genética, percebeu-se a formação de quatro grupos, sendo que os caracteres de maior contribuição foram o peso de fruto por planta, peso de

racemo por planta, produtividade e peso do racemo. Os resultados indicaram a existência de variabilidade genética na população F₃ e possibilidade de que a forte correlação entre os caracteres pode facilitar à seleção, gerando genótipos produtivos e adaptados ao estado da Bahia.

Caracterização molecular em *Ricinus communis*

A mamoneira (*R. communis*) é uma planta com grande variabilidade genética. Há variação quanto ao porte; à coloração e tamanho da folhagem e do caule; ao formato, tamanho, peso e coloração da semente; a cor e ao conteúdo de óleo; e a tolerância/resistência a pragas e doenças e a estresse ambiental (AZEVEDO et al., 1997). Apesar de ser um aspecto crucial para o melhoramento genético da mamoneira, existe, ainda, uma escassez de informações sobre a variabilidade genética, em nível de DNA, de coleções de germoplasma brasileiros de *R. communis*. Nesse contexto, a caracterização e a avaliação de variedades comerciais e de populações naturais, quanto ao seu potencial de uso, são consideradas essenciais nos programas de melhoramento da espécie (FIGUEIREDO NETO et al., 2004). Assim como em populações oriundas de hibridações controladas (PASSOS et al., 2010; OLIVEIRA 2011).

Os marcadores moleculares representam ferramentas importantes para estudo de diversidade genética, uma vez que permitem avaliar, em curto prazo, um número elevado de genótipos e apresentam um alto grau de polimorfismo, auxiliando em seleção e hibridação os marcadores morfológicos.

Não existem muitos trabalhos utilizando marcadores RAPD no estudo da diversidade genética da mamoneira não é muito. Há, até onde se tem conhecimento, os seguintes estudos: Menezes et al., (2004), Cunha (2006), Cerqueira et al. (2006), Anthonisen (2007), Cerqueira (2008), Milani (2008) e Gajera et al. (2010). Esses trabalhos relatam a eficiência dos marcadores RAPD na identificação de polimorfismo em mamoneira.

A técnica de RAPD pode ser utilizada, com sucesso, por exemplo, em estudos de diversidade genética, identificação de genes de interesse, análises filogenéticas e caracterização de germoplasma (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1998). O uso de oligonucleotídeos iniciadores de sequência arbitrária que não requer clonagem, sequenciamento ou outra caracterização genética prévia do

genoma em questão, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados constituem características peculiares da técnica de RAPD. Esses marcadores permitem um grande avanço tanto nos estudos que visam a análise da variabilidade genética entre e dentro de populações, quanto em estudos que objetivam acessar a variabilidade genética existente entre raças, espécies ou outros grupos taxonômicos (BLOTT et al., 1999; MOMMENS et al., 1999; NAGAMINE e HIGUCHI, 2001).

Os microssatélites apresentam, por sua vez, muitas vantagens comparadas a outros marcadores (RAPD, RFLP, AFLP, etc). Isso devido a vários motivos: (i) são informativos e altamente polimórficos; (ii) a herança é codominante, permitindo, assim, a discriminação entre homozigotos e heterozigotos; (iii) são multialélicos; (iv) são baseados em PCR, necessitando, portanto, de pouca quantidade de DNA; (v) são altamente reproduzíveis; (vi) estão bem dispersos no genoma, em regiões codificadoras, e não codificadoras, sendo que os locos são frequentemente conservados em espécies relacionadas (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1998).

O genoma dos eucariotos possui sequências repetitivas que podem ser usadas como marcadores de DNA. As sequências simples repetidas SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites são um dos marcadores mais polimórficos encontrados em animais e plantas. A principal característica do marcador SSR é sua seqüência que vai de um a seis nucleotídeos de comprimento e que podem estar repetidos em tandem (SONAH et al., 2011).

Até então, há apenas três estudos de diversidade genética com marcadores SSR genômico em mamoneira, a saber: Bajay et al. (2009), Bajay et al. (2011) e Seo et al., 2011. Além disso, existe mais um estudo envolvendo marcadores EST-SSR que foi realizado por Qiu et al. (2010).

Até o momento foram desenvolvidos um total de 51 marcadores SSR (BAJAY et al., 2009; BAJAY et al., 2011; SEO et al., 2011) e 118 EST-SSR (QIU et al., 2010) para mamoneira. Os marcadores EST-SSR são assim chamados por serem marcadores microssatélites (SSR) desenvolvidos a partir de seqüências EST (*Expressed Sequence Tags*).

No entanto, o número de marcadores SSR para mamoneira ainda é restrito. Sendo assim, são necessários o desenvolvimento e a otimização de mais marcadores SSR para a realização de estudo de diversidade genética, mapeamento de QTLs e auxílio a programas de melhoramento genético da

espécie. Além disso, estudos com marcadores microssatélites em populações segregantes de *Ricinus communis*, ainda são praticamente inéditos.

Assim, os objetivos desse estudo, foram: i - a análise da dissimilaridade genética entre 15 cultivares de mamoneira; ii - a otimização e validação do método gravimétrico e a quantificação do teor de óleo na semente da população F₃ oriunda da hibridação entre as cultivares BRS Nordestina e Sipeal 28; iii – a genotipagem da população F₂, de mamoneira, proveniente da hibridação entre as cultivares BRS Nordestina e EBDA MPA-17 e seu desempenho fisiológico quanto ao caráter teor de óleo na semente e IV – o desenvolvimento de marcadores microssatélites para *Ricinus communis* para subsidiar o programa de melhoramento da mamoneira no Recôncavo Baiano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHONISEN, D. G., **Caracterização de genótipos de mamona: marcadores RAPD, teor de óleo nas sementes por SOXHLET e RMN e rendimento da extração do óleo usando etanol**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. **Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Nordeste do Brasil**. Campina Grande, PB: MAARA/Embrapa-CNPA, (Circular técnico, 25), 52p.,1997.

BAHIA, H. F.; SILVA, S. A., FERNANDEZ, L. G., L. C. A. DA S.; M. R. F. C. **Divergência genética entre cinco cultivares de mamoneira**. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.3, p.357-362, 2008.

BAJAY, M. M.; ZUCCHI, M. I.; Kiihl, T. A . M.; BATISTA, C. E. A; MONTEIRO, M. PINHEIRO, J. B. **Development of a novel set of microsatellite markers for castor bean, *Ricinus communis* (euphorbiaceae)**. **American Journal of Botany**: e1–e3. 2011.

BAJAY, M. M.; PINHEIRO, J. B.; NOBREGA, M. B. M.; ZUCCHI, M. I. Development and characterization of microsatellite markers for castor (*Ricinus communis* L.), an important oleaginous species for biodiesel production. **Conservation Genetic Resource**, 2009.

BALDANZI, M.; FAMBRINI, M.; PUGLIESE, C. Redesign of castorbean plant body plan for optimal combine harvesting. **Ann. Appl. Biol.** Vol. 142, p. 296-306, 2003.

BANZATTO, N. V.; ROCHA, J. L. V. da. **Genética e melhoramento da mamoneira**. In: KERR, W. E. Melhoramento e genética. São Paulo: Melhoramentos, p. 102-113, 1969.

BANZATTO, N. V.; ROCHA, J. L. V. Florescimento e Maturação dos Cultivares de Mamoneira IAC-38 e Campinas. **Bragantia**. Campinas 24 (nota n.6): XXIXXXXII, 1965.

BATISTA, F. A. Z.; LIMA, E. F.; AZEVEDO, D. M. P. De, SANTOS, J. W., PIRES, V. A. **Avaliação do nível de resistência de genótipos de mamoneira às podridões causadas por *Macrophomina phaseolina* e *Botryodiplodia theobromae***. Embrapa-CNPA (Comunicado Técnico, 57), Campina Grande, 03 pp., 1997.

BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, C. L.; VASCONCELOS, O. L.; AZEVEDO, D. M. P. de.; VIEIRA, D. J. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa-Algodão, cap. 2, p. 37-61, 2001.

BELTRÃO, N. E. De M.; ARAÚJO, A. E. De; AMARAL, J. A. B. Do; SEVERINO, L. S.; CARDOSO, G. D.; PEREIRA, J. R. **Zoneamento e época de plantio da mamoneira para o Nordeste brasileiro**. Campina Grande. Embrapa Algodão. 2002.

BELTRÃO, N. E. de M.; ARAÚJO, A. E. de; GONÇALVES, N. P.; AMARAL, J. A. B. do; SEVERINO, L. S.; CARDOSO, G. D. **Ordenamento ambiental e época de**

plantio da mamoneira (*Ricinus Communis* L.) para a região Norte de Minas Gerais. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 6 p. (Embrapa Algodão, Comunicado Técnico, 207).

BELTRAO, N. E. M. **A cadeia da Mamona no Brasil, com Ênfase para o Segmento P&D: Estado da Arte,** Demandas de Pesquisa e Ações Necessárias para o Desenvolvimento. Campina Grande: Embrapa Algodao, (Documentos), 2006.

BLOTT, S. C.; WILLIAMS, J. L.; HALEY, C. S. DISCRIMINATING AMONG CATTLE BREEDS USING GENETIC MARKERS. *Heredity*, v. 82, n. 6, p. 613-619, 1999.

CARVALHO, L. O. **Cultura da mamoneira.** Campinas: CATI (Comunicado Técnico, 73), 3 pp., 1988.

CERQUEIRA, L. S. **variabilidade genética e teor de óleo em mamoneira visando ao melhoramento para região de baixa altitude.** 2008. 57 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias-CCAAB- UFRB), Cruz das Almas, Ba, 2008.

CERQUEIRA, L. S.; SILVA, S. A.; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E.; PALMEIRI, D. A.; MOREIRA, R. F. C.; PESTANA, K. N.; SILVA, A. N.; JÚNIOR, J. F. P. **Seleção de *primers* RAPD capazer de detectar polimorfismo em mamoneira,** III Congresso Brasileiro de Mamona Energia e Ricinoquímica, 2006.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (eds.). **O agronegócio da mamona no Brasil.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 89 a 118, 2001.

CONAB: COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Área total plantada de mamona no Brasil.** Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em 17/05/2005.

COSTA, M. N.; PEREIRA, W. E.; BRUNO, R. L. A.; FREIRE, E. C.; NÓBREGA, M. B. M.; MILANI, M.; OLIVEIRA, A. P. Divergência genética entre acessos e cultivares de mamoneira por meio de estatística multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, p.1617-1622, 2006.

CRISÓSTOMO, J. R.; SILVA, J. M. da. **Comportamento das Variedades SIPEAL de mamoneira nos Municípios de Iraquare e Itaeté, Bahia**. Salvador, EMBRAPA, 8p., (Comunicado Técnico, 14), 1975.

CUNHA, M. A. S.; SALES, J. S.; MORAIS, T. A.; RAMALHO NETO, C. E. Variabilidade genética de *Ricinus communis* L revelada por marcadores RAPD. In: congresso brasileiro de mamona, 2., 2006, Aracaju. **Anais**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 1 CD-ROM, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA/CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE ALGODÃO - CNPA. Pesquisa com mamona pode viabilizar biodiesel brasileiro. Disponível em: <www.cnpa.embrapa.brjornal/mamonaPDU.htm>. Acesso em: 17 ago. 2004.

ERENO, D. Próteses de mamona. **Pesquisa Fapesp**, n. 91, p. 66-71, 2003.

FERREIRA, M.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-CENARGEN. 3 ed. P 220. 1998.

FIGUEIREDO NETO, A.; ALMEIDA, F. De A. C.; GOUVEIA, J. P. G.; NÓBREGA, M. B. M.; CARNEIRO, R. M.; PEDROZA, J. P. Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus comunnis* L.) Baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

FREIRE, R. M. M.; SEVERINO, L. S.; MACHADO, O. L. T. **Ricinoquímica e co-produtos**. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRAO, N. E. M.. **O Agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informacao Tecnologica. Cap. 13, 2006.

FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D.M.P. de, LIMA, E.F. (Eds). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 295-335, 2001.

FORNAZIERI JUNIOR, A. **Mamona: uma rica fonte de óleo e de divisas**. São Paulo: Ícone, 1986. 72 p.

GAJERA, B. B.; KUMAR, N.; SINGH, A. S.; PUNVAR, B. S.; RAVIKIRAN, R.; SUBHASH, N.; JADEJA, G. C. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, 32:491-498, 2010.

GODOY, I. J. de.; SAVY FILHO, A.; TANGO, J. S.; UNGARO, M. R. G.; MARIOTTO, P. L. **Programa Integrado de Pesquisa. Oleaginosas**. São Paulo. Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária da Secretaria de Agricultura. 33p., 1985.

HERMELY, F. X. **Mamona: comportamento e tendências no Brasil**. Embrapa-DTC (Documento, 2), Brasília, 69 pp., 1981.

IGNÁCIO, H; MAZZER, N; BARBIERI, C. H. e CHIERICE, G. O. Estudo sobre a aplicabilidade médica da poliuretana derivada da mamona. **Resenha Ortopédica**, n. 6, 1996.

JEONG, G. T., PARK, D. H. Optimization of biodiesel production from castor oil using response surface methodology. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 156: 431-441, 2009.

KIMATI, H. Doenças da mamoneira – *Ricinus communis* L. In: GALLI, F. (coord.) **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agrônômica Ceres, 1980. v. 2, p. 347-351.

KOURI, J.; SANTOS, R. F. dos; SANTOS, J. W. dos. Evolução da cultura da mamona no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

KRUG, C. A.; MENDES, P. T.; SOUZA, G. F. de. Melhoramento de mamoneira (*Ricinus communis* L.) III. Primeira séria de ensaios de variedades (1937/38-1938/39). **Bragantia**, v. 3, n. 5, p. 85-122, 1943.

SEO, K.- I.; LEE, G. A.; KYUNG-HO, M. A.; HYUN D. Y.; PARK, Y. J.; JUNG, J. W.; LEE, S. Y.; GWAG, J. G.; KIM, C.; LEE, M. C. Isolation and characterization of 28 polymorphic SSR loci from castor bean (*Ricinus communis* L.). **Journal of Crop Science e Biotecnologia**, 14, 2, 97-103, 2011.

LIMA, E. F. (Org.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001.350p

LOUREIRO, M. C. **Torta da semente de mamona na alimentação animal**. Campinas, v.6, 290-294, 1962.

MASSOLA JUNIOR, N. S. & BEDENDO, I. P. **Doenças da mamoneira**. In: KIMATI, H. [et al.]. **Manual de Fitopatologia**. 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2: it. p. 445-447.

MAZZANI, B. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, p. 71, 1983.

MENEZES C. H. S. G.; BEZERRA, C. S.; TAVARES, A. C.; COUTINHO, T. C.; SILVA, S. C.; MILANI, M.; VIDAL, M. S. Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética de *Ricinus communis* L. I Congresso Brasileiro de Mamona: Energia e Sustentabilidade. **Anais**. Campina Grande – PB, 2004.

MILANI, M.; DANTAS, F. V.; MARTINS, W. F. S.; MARTINS, P. G. S. **Uso de marcadores RAPD para avaliar a Divergência Genética em Mamoneira**. Comunicado Técnico 360 – EMBRAPA, Campina Grande, PB, 2008, ISSN 0102.0099.

MOMMENS, G.; PEELMAN, L. J.; VANZEVEREN, A.; IETEREN, G. D.; WISSOCQ, N. Microsatellite variation between an african and five european taurine breeds results in a geographical phylogenetic tree with a bison outgroup. ***Journal of Animal Breeding and Genetics***, v. 116, n. 5, p. 325 - 330, 1999.

MOSHKIN, V. A. **Castor**. Amerind, New Delhi, pp 315, 1986.

NAGAMINE, H. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. ***Journal of Animal Breeding and Genetics***, v. 118, n. 2, p. 101-109, 2001.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. Londres: McMillan, 1979. 839 p.

NÓBREGA, M. B. de M. **Avaliação de genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) em cruzamentos dialélicos parciais**. 2008. 77f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, SP.

OLIVEIRA, R. S. de. Avaliação de população segregante (F₃) de mamoneira em condições do recôncavo baiano. 2010. 39 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias-CCAAB- UFRB), Cruz das Almas, Ba, 2010.

PASSOS, A. R.; SILVA, S. A.; SOUZA, C. DA S.; SOUZA, C. M. M.; FERNANDES, L. DOS S. Parâmetros genéticos de caracteres agronômicos em genótipos de mamoneira. **Pesq. agropec. bras.**, v.45, n.7, p.709-714, jul. 2010.

POPOVA, G. M.; MOSHKIN, V. A. **Botanical and biological properties of castor: botanical classification**. In: MOSHKIN, V. A. (Ed.). **Castor**. New Delhi: Amerind, p. 11-27, 1986.

QIU, L.; YANG, C.; TIAN, B. YANG, J.; LIU, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.). **BMC Plant Biology**, 10:278, 2010, <http://www.biomedcentral.com>.

RAMOS, N. P.; AMORIM, E .P.; SAVY FILHO, A. Potencial da cultura da mamona como fonte de matéria-prima para o programa nacional de produção e uso de biodiesel. In: CÂMARA, G.M. de S.; HEIFFIG, L.S. (Coord.). **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para biodiesel**. Piracicaba: Esalq, p.81-104, 2006.

RIBEIRO FILHO, J. **Cultura da mamoneira**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. P 75. 1996.

RODRIGUES, R. F. De O.; OLIVEIRA, F. De; FONSECA, A. M. As folhas de palma *Christi-Ricinus communis* L. *Euphorbiaceae* Jussie. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, V. 20, N 2, p. 183-194, 2002.

SAMPAIO FILHO, O. M.; SILVA, S. A.; BAHIA, H. F. SILVA, M. S. DA; CARVALHO, D. DOS S. Análise descritiva de cultivares de mamoneira em dois anos de cultivo no recôncavo baiano. **Revbea**, Rio Grande, 6: 28-34, 2011.

SAVY FILHO, A; AMORIM, P.; RAMOS, N. P.; MARTINS, A. L. M.; CAVICHIOLI, J. C. IAC-2028: nova cultivar de mamona. **Pesq. agropec. bras. vol. 42, no.3**, Brasília, 2007.

SAVY FILHO, A. **Mamona: tecnologia agrícola**. Campinas: Emopi. 105p., 2005.

SAVY FILHO, A. **Melhoramento da Mamona**. In BORÉM, A. (ed.): Melhoramento de Espécies Cultivadas. Viçosa: UFV, 817p.,1999a.

SAVY FILHO, A. **Melhoramento da mamona**. In: Bórem, A. Melhoramento de Espécies Cultivadas. Editora UFV. Viçosa-Minas Gerais. Pp 385 a 407. 1999b.

SEO, K. - I.; LEE, G. – A.; MA, K. –H.; HYUN, D. – Y.; PARK, Y. – J.; JUNG, J. – W.; LEE, S. – Y.; GWAG, J. – G.; KIM, C. – K.; LEE, M. – C. Isolation and characterization of 28 polymorphic SSR loci from castor bean (*Ricinus communis* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, Volume 14, Number 2, 97-103, 2011.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; MORAES, C. R. A.; GONDIM, T. M. S.; CARDOSO, G. D. Avaliação da produtividade e teor de óleo de dez genótipos demamoneira cultivados em altitude Inferior a 300 metros. *Revista Ciencia Agronomica*, v. 37, n.2, p.188-194, 2006.

SILVA, V. **Características fisiológicas de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Recôncavo Baiano**. Cruz das Almas, 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

SONAH, H.; DESHMUKH, R. K.; SHARMA, A.; SINGH, V. Y. P.; GUPTA, D. K., GACCHE; R. N., RANA; J. C., SINGH, N. K.; SHARMA, T. R. Genome-Wide Distribution and Organization of microsatellites in Plants: An Insight into Marker Development in *Brachypodium*. **PLoS ONE** | www.plosone.org. Vol.6, Issue 6, e21298: 2011.

SUJATHA, M.; REDDY, T. P.; MAHASI, M.J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor bean (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnol. Adv.**, 26: 424-435, 2008.

VIEIRA, R. De M. e LIMA, E. F. **Importância sócio-econômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil**. Disponível em: [HTTP://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/index.html](http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/index.html) Acesso em: 25 set., 2011.

WEISS. E. A. Oilseed crops. London: Longman, 1983. 660p.

ZIMMERMAN, L. H. Castor beans: a new crop for mechanized production. **Advances in Agronomy**. v. 10, p. 257-288, 1957.

CAPÍTULO 1

DISSIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES RAPD¹

1 Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Bioscience Journal.

DISSIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES RAPD

Autor: Edna Lôbo Machado

Orientadora: Profa. Dra. Simone Alves Silva

Co-orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo a identificação de cultivares geneticamente divergentes de *Ricinus communis* L. utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD visando o melhoramento genético da espécie. Para tanto, DNA total foi extraído e quantificado do tecido foliar de *Ricinus communis*. Um total de 58 iniciadores RAPD foi usado na genotipagem de 15 cultivares. Foram identificados 552 fragmentos, sendo 311 polimórficos (56,3%). A dissimilaridade genética entre as cultivares foi calculada a partir do índice de dissimilaridade de Jaccard, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA. Um dendrograma foi gerado. Um total de cinco grupos foi formado, mostrando que há divergência genética entre as cultivares. Combinações promissoras são esperadas entre as cultivares EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-35, EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-34, EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-36 e EBDA MPA-35 e EBDA MPA-42 com base na matriz de similaridade. Os marcadores moleculares do tipo RAPD mostraram-se eficientes na caracterização da variabilidade genética existente entre as cultivares. Este estudo preliminar servirá de base para delinear as estratégias de cruzamento dentro do programa de melhoramento de mamoneira da UFRB, que visa o desenvolvimento de variedades mais resistentes, bem adaptadas, com maior teor de óleo e mais produtivas.

Palavras-chave: *Ricinus communis* L., melhoramento, marcadores de DNA.

GENETIC DISSIMILARITY BETWEEN CASTOR BEAN CULTIVARS USING RAPD MARKERS

Author: Edna Lôbo Machado

Adviser: Dr. Simone Alves Silva

Co-adviser: Dr. Cláudia Fortes Ferreira

ABSTRACT: The objective of the present work was to identify divergent cultivars of *Ricinus communis*. using RAPD molecular markers aiming genetic breeding improvement of the species. Total DNA was extracted and quantified from *Ricinus communis*. leaf tissues. A total of 58 RAPD primers were used. Five-hundred and fifty-two fragments were identified, whereas 311 were polymorphic (56.3%). The genetic dissimilarity between the cultivars was calculated by Jaccard's dissimilarity index using the UPGMA cluster method. A dendrogram was constructed. A total of five groups were formed showing that there is genetic variability between the cultivars. From the distance matrix, promising combinations are expected between the EBDA MPA-11 and EBDA MPA-35, EBDA MPA-11 and EBDA MPA-34, EBDA MPA-11 and EBDA MPA-36 and the EBDA MPA-35 and EBDA MPA-42 cultivars. The RAPD markers were efficient in characterizing the genetic variability between the cultivars. This preliminary study will set the basis to direct crossing strategies within the castor bean genetic breeding program at UFRB, aiming the development of more resistant, well adapted, with greater oil content and high yielding varieties.

Key-words: *Ricinus communis* L., breeding, DNA markers.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis*) é uma planta que pertencente à família das Euforbiáceas. Essa oleaginosa possui fácil propagação, adaptação e estabelecimento nas diferentes regiões. É uma planta de hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas e racemos, podendo ou não possuir cera no caule e pecíolo. Os frutos, em geral, possuem espinhos e, em alguns casos, são inermes. As sementes apresentam-se com diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração (SBRT, 2005).

A mamona, no Brasil, é uma planta típica de região semi-árida. Segundo Nóbrega (2009), o nordeste brasileiro representa 90% da área plantada e 79% da produção, cuja produtividade média, nos últimos 30 anos, foi de 539 kg/há⁻¹. Todavia, Moreira et al. (1996) relatam que a maior dificuldade na exploração racional da mamona está na baixa disponibilidade de sementes de cultivares adaptadas, produtivas, com elevado teor de óleo e tolerantes a pragas e doenças.

A mamoneira possui elevado valor socioeconômico nas regiões onde seus produtos e subprodutos são utilizados na indústria ou na agricultura, além de apresentar perspectivas de uso como fonte energética sob a forma de biodiesel (COSTA et al., 2006). No sistema de produção adotado pelos agricultores, quase todas as atividades empregam mão-de-obra familiar, o que torna a cultura típica de propriedades pequenas (NÓBREGA, 2009).

Neste contexto, a cultura da mamona deve consolidar-se como o principal componente do biodiesel a ser produzido no Brasil, podendo se tornar em curto prazo, no cenário do Nordeste, um dos principais componentes do programa nacional de biodiesel. Assim, torna-se imprescindível a implementação de estratégias que possibilitem o desenvolvimento de novas cultivares com maiores teores de óleo e ajustadas às diferentes condições de ambiente. Isso possibilitará, também, a consolidação da cultura da mamona em diferentes regiões do Estado

da Bahia de forma a garantir, no futuro, a expansão do agronegócio dessa oleaginosa no Estado.

Para Severino et al. (2006), no Brasil, o melhoramento genético tem permitido avanços importantes na tecnologia de produto da mamoneira, tendo, como uma das principais demandas, a adaptação de genótipos a baixas altitudes, o que permitirá a inclusão sustentável de muitos municípios onde o cultivo não é recomendado pelo risco de obtenção de baixas produtividades.

De acordo com Cunha et al. (2006), a grande variabilidade apresentada pela mamona é observada em características botânicas e agronômicas, podendo ser avaliada por meio de polimorfismo de DNA, com o emprego de técnicas tais como RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*). Os marcadores moleculares representam ferramentas importantes em diversos estudos, permitindo avaliar, em curto prazo, um número elevado de genótipos, apresentam um alto grau de polimorfismo, além de não sofrerem influência ambiental, pleiotrópica ou epistática, como ocorre com marcadores morfológicos que apresentam relativa limitação, especialmente, em relação as cultivares muito próximas. No entanto, ainda existe uma enorme escassez de informações acerca da variabilidade genética relacionada ao DNA, de coleções de germoplasma, linhagens, cultivares e híbridos brasileiros de *Ricinus communis*. Nesse contexto, Figueiredo et al. (2004) acredita que a caracterização e avaliação das diferentes variedades disponíveis comercialmente e de populações naturais, quanto ao seu potencial de uso, são consideradas essenciais no estabelecimento de diferenças ou semelhanças, imprescindíveis para os programas de melhoramento da espécie. O presente estudo tem por finalidade a avaliação da dissimilaridade genética entre 15 cultivares de *Ricinus communis* L, utilizando-se marcadores RAPD para fins de seleção de parentais a serem utilizados em futuras hibridações.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O presente trabalho foi realizado no campo experimental e Laboratório do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO), situados na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, no Campus Universitário de Cruz

das Almas, localizado a 12° 40' 19" latitude sul, 39° 06' 23" de longitude oeste de Greenwich e com altitude média de 220 m. O clima é do tipo subúmido, com pluviosidade média anual de 1170 mm, com variações entre 900 e 1300 mm, sendo os meses de março a agosto os mais chuvosos e de setembro a fevereiro os mais secos. A temperatura média anual é de 24,1°C (ALMEIDA, 1999).

Foi utilizado um total de quinze cultivares de mamoneira, a citar: EBDA MPA-11, EBDA-MPA-17, EBDA MPA-18, EBDA MPA-26, EBDA MPA-31, EBDA MPA-34, EBDA MPA-35, EBDA MPA-36, EBDA MPA-37, EBDA MPA-38, EBDA MPA-39, EBDA MPA-40, EBDA MPA-41, EBDA MPA-42 e EBDA MPA-43, disponibilizadas pela EBDA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola, e já estabelecidas para estudos anteriores no campus da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Para fins de isolamento do DNA genômico, foram realizadas coletas de folhas jovens e saudáveis das 15 cultivares. De cada cultivar, utilizou-se amostra foliar de dez plantas totalizando 150 amostras. Esse material foi desinfestado em solução de hipoclorito de sódio a 20%, enxaguado com água destilada em abundância e armazenado em freezer a -80°C até o momento da extração de DNA.

Isolamento de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Para tanto, foram macerados aproximadamente 300 mg de tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, transferiu-se o macerado para microtubos de 2 mL e adicionaram-se 700 µL do tampão de extração a 65°C (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 0,1 M pH8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP 1,0% e água ultra-pura q.s.p.). As amostras foram homogeneizadas suavemente por inversão durante 5 minutos e incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Decorrido o tempo, as amostras foram retiradas do banho-maria, adicionando-se 700 µL da mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O material foi homogeneizado suavemente e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Logo após, coletou-se o sobrenadante. Para uma maior purificação do material, foram repetidas as etapas de extração

com clorofórmio:álcool/isoamílico. Foram adicionados ao sobrenadante 400 μL de álcool isopropílico gelado, o que equivale a aproximadamente 2/3 do volume coletado. As amostras foram homogeneizadas suavemente e incubadas a -20°C por 20 minutos. O precipitado foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. Ressuspendeu-se o DNA em 600 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), adicionando-lhe 200 μL de acetato de amônio a 7,5 M. Para homogeneizar a solução, as amostras foram misturadas suavemente por inversão e incubadas no gelo por 15 minutos. Decorrido esse tempo, o material foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm. Transferiu-se, então, o sobrenadante para tubos novos de 2 mL, adicionando-lhe 800 μL de etanol absoluto. Em seguida, as amostras foram incubadas por uma hora a -20°C . Logo após, centrifugou-se o material por 10 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% (v/v) e as amostras, centrifugadas. O precipitado foi seco, ressuspendido em 100 μL de tampão TE contendo 1 μL de RNase (10 mg/mL) e colocado em banho-maria a 37°C durante uma hora. Finalmente, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C .

Quantificação do DNA genômico

Para a avaliação da integridade e quantificação do DNA extraído, um total de 3 μL do DNA foi adicionado a 5 μL de solução corante (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo e submetido à eletroforese por aproximadamente uma hora e vinte minutos a 80 vts. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa, do DNA extraído, com um DNA de concentração conhecida (DNA lambda-Invitrogen). A fim de realizar as reações de amplificação, diluíram-se as amostras em tampão TE para ajuste de sua concentração ($5 \text{ ng}/\mu\text{L}^{-1}$) e foi feito um pool de DNA para cada cultivar. Cada pool de DNA constou de uma mistura de 10 amostras de DNA da mesma cultivar.

Seleção prévia de iniciadores arbitrários

Inicialmente foi efetuada uma triagem para a seleção de iniciadores com bom padrão de amplificação. Para esse teste foram utilizadas 3 cultivares

distintas (Tabela 1). Um total de 82 oligonucleotídeos da série *Operon Technologies* (Alameda-CA-USA) foi utilizado nessa triagem inicial (Tabela 1). Apenas os oligonucleotídeos que produziram padrões consistentes foram selecionados para a etapa de amplificação.

Tabela 1: Cultivares e iniciadores RAPD utilizados na triagem

Cultivares	Iniciadores RAPD
EBDA MPA-11, EBDA MPA-18 e EBDA MPA-42	OPJ2, OPJ3, OPJ6, OPJ7, OPJ8, OPJ17, OPB5, OPM8, OPQ9, OPM15, OPM17, OPQ19, OPI20, OPM10, OPQ1, OPM19, OPQ7, OPA06, OPP12, OPP16, OPP11, OPP14, OPI4, OPQ11, OPAA3, OPD2, OPF2, OPH19, OPQ2, OPQ13, OPA12, OPQ20, OPJ15, OPJ18, OPD05, OPJ11, OPJ19, OPF6, OPJ10, OPJ20, OPB10, OPA3, OPA4, OPA1, OPA2, OPE1, OPJ13, OPB1, OPB4, OPB7, OPD3, OPD8, OPE3, OPD8, OPE3, OPF13, OPM5, OPN5, OPN7, OPN8, OPQ1, OPJ1, OPJ4, OPJ5, OPJ16, OPJ15, OPI2, OPM3, OPI15, OPM13, OPQ18, OPQ17, OPM16, OPI10, OPM2, OPM1, OPQ10, OPM14, OPM4, OPQ4, OPQ14
Total	82

Condições de amplificação e eletroforese

Cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 μL , contendo: 2,5 μL de tampão 10 X (50 mM tris-HCL, 20 mM KCL), 1,0 μL de dNTPs mix (2,5 mM de cada), 2,5 μL de MgCl_2 (25 mM), 2,5 μL de iniciadores aleatórios (20 mM, *Operon Technologies*), 1 μL de Taq DNA polimerase (5U/ μL -Invitogen), 5 μL de DNA genômico (5 ng/ μL) e água ultra-pura q.s.p. As amplificações foram de acordo com o protocolo proposto por Williams et al. (1990). As amostras foram amplificadas em termociclador *Biocycler MJ96+/MJ96G* (*Biosystems*), empregando-se um programa com um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto e 40 ciclos de: 94°C por 30 segundos, 35°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL⁻¹) em tampão TBE 1 X (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA) por aproximadamente 3 horas. Como padrão de peso molecular utilizou-se

o *ladder* 1 Kb (Promega). Os fragmentos foram visualizado por meio de luz UV e fotodocumentado por meio do Sistema Digital *Kodak Science*.

Análise dos dados

Por se tratar de um marcador dominante, os dados foram computados como ausência (0) e presença (1) de bandas. A diversidade genética das cultivares foi determinada por meio da matriz de dissimilaridade genética usando o índice de Jaccard (1908) gerada pelo programa GENES (CRUZ, 2003). O índice de Jaccard é formulado da seguinte maneira:

$$I_{AB} = A / (A + B + C) \text{ onde:}$$

A = mesma banda para ambos os indivíduos;

B = presença da banda no indivíduo 1 e ausência no indivíduo 2;

C = ausência da banda no indivíduo 1 e presença no indivíduo 2.

O dendrograma foi construído utilizando-se o método de agrupamento, método da média aritmética não ponderada – UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method Averages*, (SNEATH e SOKAL, 1973) por meio do software do programa STATISTICA (STATISTICA, 2002). A correlação cofenética entre a matriz de distância e a matriz de agrupamento, foi calculada por meio do programa genes (CRUZ, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 82 iniciadores arbitrários testados quanto ao padrão de amplificação das amostras, 58 foram considerados bons. Assim, esses iniciadores foram selecionados para a genotipagem das 15 cultivares (Tabela 2).

Dos 58 iniciadores RAPD, utilizados na genotipagem das 15 cultivares, 49 foram polimórficos (84,48%) e 9 monomórficos (15,51%) (Tabela 2).

Tabela 2: Iniciadores RAPD utilizados na genotipagem das 15 cultivares de *R. communis* L.

Iniciadores RAPD	Classificação	Total
OPAA3, OPD2, OPF2, OPH19, OPQ2, OPQ13, OPA12, OPQ20, OPJ15	Monomórficos	9 (15,51%)
OPJ18, OPD5, OPJ11, OPJ19, OPF6, OPJ10, OPJ20, OPB10, OPA3, OPA4, OPA1, OPA2, OPE01, OPJ13, OPB1, OPB4, OPB7, OPD3, OPD8, OPE3, OPD8, OPE3, OPF13, OPM5, OPN5, OPN7, OPN8, OPQ1, OPJ1, OPJ4, OPJ5, OPJ16, OPJ15, OPI2, OPM3, OPI15, OPM13, OPQ18, OPQ17, OPM16, OPI10, OPM2, OPM1, OPQ10, OPM14, OPM4, OPQ4, OPQ14.	Polimórficos	49 (84,48,%)
Total		58

A figura 1 mostra o padrão de amplificação do iniciador OPA-4 e a detecção de alguns marcadores polimórficos utilizados nas análises.

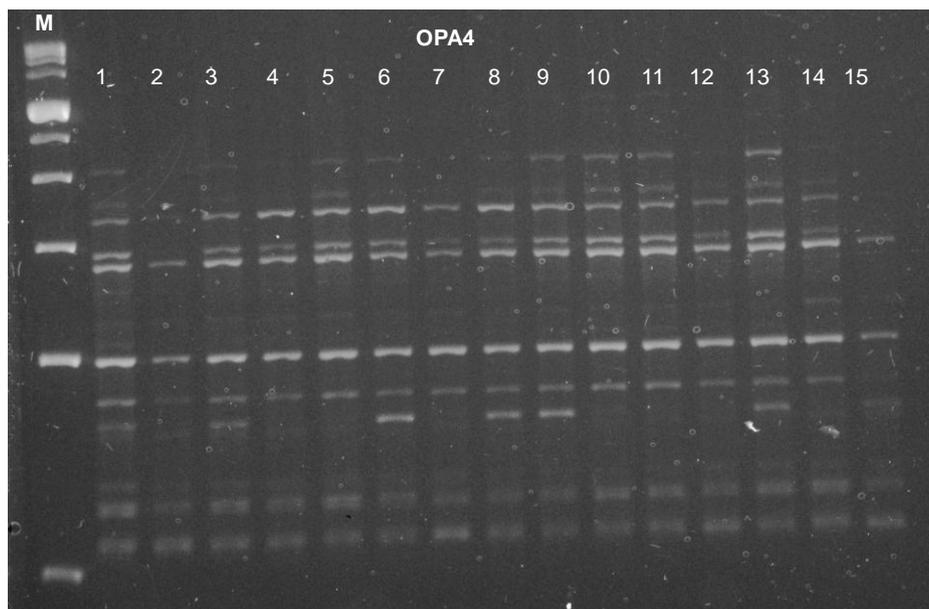


Figura 1: Padrão de amplificação do DNA genômico de *R. communis* L. obtido por meio do iniciador arbitrário OPA4. M: padrão de peso molecular 1 Kb; 1 a 15: as cultivares 1- EBDA MPA-11, 2- EBDA MPA-17, 3- EBDA MPA-18, 4- EBDA MPA-26, 5- EBDA MPA-31, 6- EBDA MPA-34, 7- EBDA MPA-35, 8- EBDA MPA-36, 9- EBDA MPA-37, 10- EBDA MPA-38, 11- EBDA MPA-39, 12- EBDA MPA-40, 13- EBDA MPA-41, 14 EBDA MPA-42 e 15- EBDA MPA-43.

Foram gerados 552 fragmentos sendo que 311 foram polimórficos (56,3%). Em média, cada iniciador produziu 11,3 fragmentos, dos quais 6,3 apresentaram polimorfismo (Tabela 3). O maior número de bandas polimórficas foi detectado pelos iniciadores OPN8 e OPI2, ambos com 15 fragmentos (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Gajera et al. (2010). Os autores objetivando diferenciar 22 genótipos de mamoneira utilizaram 30 iniciadores RAPD polimórficos. Os 30 iniciadores geraram 256 fragmentos, dos quais 205 foram polimórficos com uma média de 6,83 fragmentos polimórficos por iniciador. Já Anthonisen (2007) fez uso de 13 iniciadores RAPD visando diferenciar 15 cultivares de mamoneira e encontrou 41% de polimorfismo num total de 120 fragmentos. O autor identificou em média 9,2 fragmentos por iniciador sendo que em média, 3,8 foram polimórficos. Cunha et al. (2006), empregando marcadores do tipo RAPD para estudar 10 cultivares de mamona do município de Igaci, em

Alagoas, obtiveram 60 fragmentos polimórficos, utilizando 7 iniciadores, ou seja, cada iniciador produziu 8,6 bandas, em média.

Resultados diferentes foram obtidos por Milani (2008) ao genotipar 32 acessos de mamoneira pertencentes ao BAG da Embrapa Algodão por meio de 23 iniciadores RAPD. Os 23 iniciadores geraram um total de 57 fragmentos. A proporção de bandas polimórficas foi de 96,5% (55 fragmentos). Uma porcentagem menor de marcadores polimórficos foi detectada por Cerqueira et al., (2006) e Cerqueira (2008), ao estudar cinco cultivares de mamoneira por meio de 38 iniciadores de RAPD. Os autores observaram que o polimorfismo foi de 22,45% (33 fragmentos) de um total de 147 marcadores obtidos. Vidal et al. (2005) genotiparam cinco cultivares de mamoneira a partir da utilização de 47 iniciadores RAPD, e encontraram apenas 105 fragmentos polimórficos dos 454 gerados.

Tabela 3: Iniciadores polimórficos, total de marcadores detectados e número de marcadores polimórficos.

Iniciador	Nº de bandas		Polimorfismo (%)
	Total	Polimórfica	
OPA1	10	8	80
OPA2	7	4	57,1
OPA3	16	14	87,5
OPA4	12	5	41,7
OPB1	7	3	42,9
OPB4	5	2	40
OPB7	14	8	57,1
OPB10	13	9	69,2
OPD3	7	7	100
OPD5	16	4	25
OPD8	14	10	71,4
OPE1	11	2	18,8
OPE3	9	2	22,2
OPE14	14	5	35,7
OPF1	5	1	20
OPF3	5	1	20
OPF6	15	9	60
OPF13	6	1	16,7
OPI2	18	15	83

OPI10	15	12	80
OPI15	7	2	28,6
OPI16	4	3	75
OPJ1	13	11	84,6
OPJ4	2	1	50
OPJ5	13	9	69,2
OPJ10	13	6	46,2
OPJ11	8	2	25
OPJ13	7	4	57,1
OPJ16	12	7	58,3
OPJ18	16	8	50
OPJ19	10	3	30
OPJ20	12	2	16,7
OPM1	19	14	73,7
OPM2	10	7	70
OPM3	8	4	50
OPM4	21	12	57,1
OPM5	12	8	66,7
OPM13	11	3	27,3
OPM14	12	10	83
OPM16	12	6	50
OPN5	15	10	66,7
OPN7	13	9	69,2
OPN8	21	15	71,4
OPQ1	9	7	77,8
OPQ4	17	9	52,9
OPQ10	4	1	25
OPQ14	11	3	27,3
OPQ17	6	2	33,3
OPQ18	15	11	73,3
Totais	552	311	
Médias	11,3	6,3	52,9

A frequência dos marcadores RAPD por número de cultivar está representada na tabela 4. Observa-se que 10,9%, 9,32% e 6,75% dos marcadores polimórficos estavam presentes em apenas 1, 2 e 3 cultivares, respectivamente, das 15 cultivares analisadas. Por outro lado, 6,4%, 9% e 15,43% estavam presentes em 14, 13 e 12 cultivares. Esses resultados mostram

que 57,8% do polimorfismo detectado foi proveniente da presença ou ausência de marcadores em no máximo 3 cultivares.

Tabela 4: Frequência dos marcadores RAPD por número de cultivares

Nº de marcadores	Presente em
34 (10,9%)	1 cultivar
29 (9,32%)	2 cultivares
21 (6,75%)	3 cultivares
9 (2,89%)	4 cultivares
17 (5,47%)	5 cultivares
13 (4,18%)	6 cultivares
13 (4,18%)	7 cultivares
20 (6,4%)	8 cultivares
15 (4,82%)	9 cultivares
24 (7,72%)	10 cultivares
20 (6,4%)	11 cultivares
48 (15,43%)	12 cultivares
28 (9%)	13 cultivares
20 (6,4%)	14 cultivares
Total 311	

De acordo com Azevedo et al. (1997), existe uma grande variabilidade genética em mamona, especificamente quanto ao porte, à coloração e ao tamanho da folhagem e do caule, ao formato, tamanho, peso, coloração da semente, a cor e ao conteúdo de óleo, e a tolerância a pragas e doenças e a estresse ambiental. Porém, há uma escassez de informações sobre a variabilidade genética, em nível de DNA, de coleções de germoplasma brasileiros de *R. communis*. Nesse contexto, a caracterização e avaliação das diferentes variedades disponíveis comercialmente e de populações naturais, quanto ao seu potencial de uso, são consideradas essenciais no estabelecimento de diferenças ou semelhanças, imprescindíveis para os programas de melhoramento da espécie (FIGUEIREDO NETO et al., 2004).

Uma alternativa para a escolha dos genitores em programa de melhoramento baseia-se na análise do seu comportamento isolado e no resultado dos cruzamentos dialélicos. Nos cruzamentos dialélicos, pode-se estimar a capacidade geral e específica de combinação (GRIFFING, 1956) ou os componentes da heterose (GARDNER e EBERHART, 1966). No entanto, a

necessidade de realização de grande número de cruzamentos manuais e principalmente a condução de experimentos envolvendo um número excessivo de híbridos limitam a utilização dos cruzamentos dialélicos. Assim, medidas da divergência genética obtidas antes que qualquer cruzamento seja realizado, podem auxiliar os melhoristas a concentrar seus esforços somente nas combinações mais promissoras, pois a heterose manifestada nos cruzamentos, está diretamente relacionada à divergência genética entre seus pais (FALCONER, 1981).

O dendrograma obtido a partir da dissimilaridade dos fragmentos gerados nas reações de amplificação possibilitou a separação dos genótipos em 5 grupos mostrando que há dissimilaridade genética entre as cultivares analisadas. A detecção de variabilidade genética entre essas cultivares é importante para a tomada de decisão na escolha de genitores a serem hibridados dentro do programa de melhoramento genético da espécie (Figura 5). O ponto de fusão foi definido de acordo com os critérios propostos por Mingoti (2005).

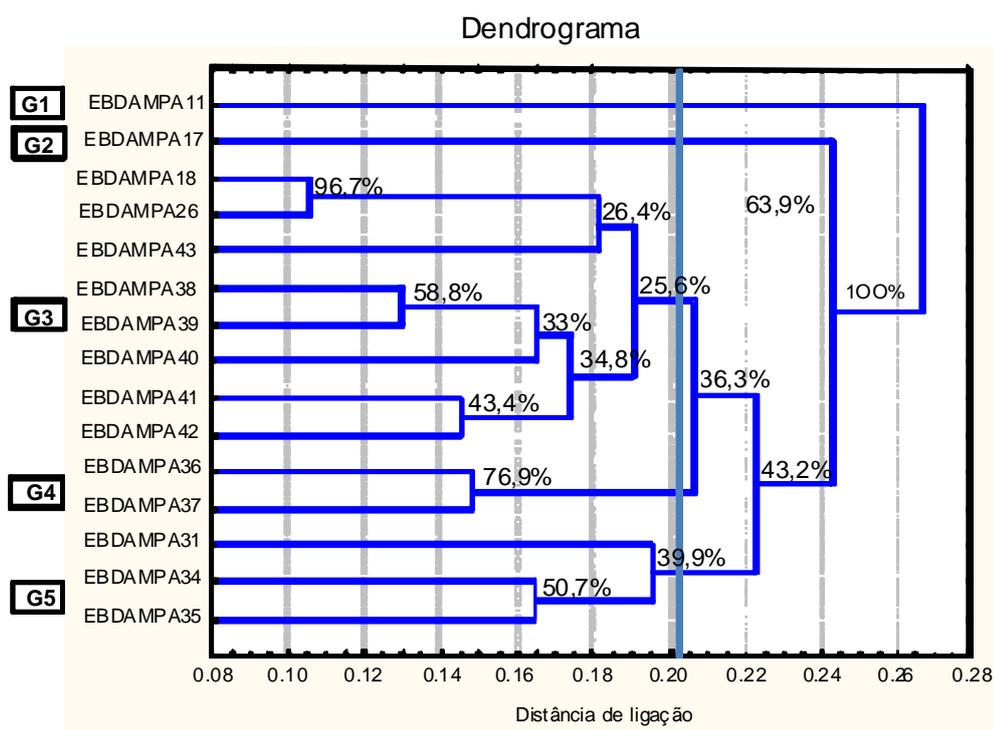


Figura 5: Dendrograma mostrando as relações genéticas entre as 15 cultivares de mamoneira baseadas em marcadores RAPD gerados pelo método de agrupamento UPGMA, a partir do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard. O *bootstrap* foi calculado pelo programa GENES (Cruz, 2003).

As cultivares foram agrupadas com a seguinte distribuição: G1: EBDA MPA-11, G2: EBDA MPA-17, G3: EBDA MPA-18, EBDA MPA-26, EBDA MPA-43, EBDA MPA-38, EBDA MPA-39, EBDA MPA-40, EBDA MPA-41 e EBDA MPA-42, G4: EBDA MPA-36 e EBDA MPA-37 e G5: EBDA MPA-31, EBDA MPA-34 e EBDA MPA-35. Um agrupamento diferenciado foi obtido por Diamantino et al. (2011), ao avaliarem a variável teor de óleo na semente para essas mesmas 15 cultivares. Essa avaliação possibilitou a formação de 4 grupos distintos: G1- EBDA MPA-39, EBDA MPA-38, EBDA MPA-37, EBDA MPA-26, EBDA MPA-41 e EBDA-MPA 11, G2- EBDA MPA-36, EBDA MPA-18, EBDA MPA-31, G3- EBDA MPA-31, EBDA MPA-42, EBDA MPA-34 e EBDA MPA-17 e G4- EBDA MPA-40, EBDA-MPA 43 e EBDA MPA-35.

Cerqueira et al. (2006) e Cerqueira (2008) conduziram estudos de divergência genética entre cinco cultivares de mamoneira por meio de estatística multivariada e obtiveram a formação de quatro grupos: O grupo 1 foi representado por duas cultivares e os grupos 2, 3 e 4, por apenas uma, cada grupo. Costa et al. (2006), também, estimaram a divergência genética entre nove cultivares de mamoneira, por meio de estatísticas multivariadas, e observaram a formação de apenas dois grupos: o grupo 1 formado por oito cultivares e o grupo 2 por apenas uma. Já Milani et al (2008), avaliando a divergência genética molecular (RAPD) em um conjunto de 32 acessos do BAG de mamona da Embrapa Algodão, obtiveram 9 grupos distintos, sendo 3% dos genótipos no grupo 1; 19% dos no grupo 2; 35% no grupo 3; 9% no grupo 4; 3% no grupo 5; 22% no grupo 6 e 3% nos grupos 7, 8 e 9. A correlação cofenética obtida foi de 0,74, considerada alta e adequada. Para Vaz Patto (2004), $r > 0,56$ é considerada ideal, refletindo uma boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

Tabela 5: Valores da dissimilaridade genética entre os pares de cultivares, gerados pelo índice de Jaccard.

	MPA11	MPA17	MPA18	MPA26	MPA31	MPA34	MPA35	MPA36	MPA37	MPA38	MPA39	MPA40	MPA41	MPA42	MPA43
MPA11	0														
MPA17	0.27333	0													
MPA18	0.19121	0.19205	0												
MPA26	0.23146	0.18907	0.10575	0											
MPA31	0.26959	0.23543	0.19406	0.18561	0										
MPA34	0.27637	0.26439	0.19831	0.14955	0.20582	0									
MPA35	0.28434	0.22276	0.21882	0.1798	0.18462	0.16462	0								
MPA36	0.27729	0.26444	0.19079	0.18161	0.21495	0.17817	0.19598	0							
MPA37	0.25495	0.27451	0.19264	0.18919	0.22831	0.20518	0.21027	0.14849	0						
MPA38	0.25322	0.25376	0.18471	0.18943	0.24222	0.21218	0.2201	0.16629	0.13739	0					
MPA39	0.21868	0.22172	0.1886	0.18807	0.25404	0.24034	0.23039	0.21412	0.20316	0.13043	0				
MPA40	0.23611	0.17349	0.21951	0.21247	0.26869	0.23282	0.24694	0.24027	0.23356	0.1758	0.15476	0			
MPA41	0.22422	0.25442	0.16484	0.17808	0.25968	0.25105	0.2524	0.20628	0.19196	0.15145	0.15632	0.15349	0		
MPA42	0.22506	0.25629	0.17568	0.20979	0.24	0.27214	0.27696	0.19213	0.20872	0.16782	0.19393	0.20863	0.14524	0	
MPA43	0.22538	0.23026	0.17484	0.18708	0.25223	0.24948	0.25352	0.23312	0.23011	0.20256	0.18486	0.20449	0.17982	0.18037	0

De acordo com os valores da matriz de dissimilaridade (Tabela 5), as cultivares mais próximas geneticamente foram EBDA MPA-18 e EBDA MPA-26 (0,10) e as mais distantes geneticamente foram as cultivares EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-35, EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-34, EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-36 e EBDA MPA-35 e EBDA MPA-42 (0,28). A princípio, esses cruzamentos seriam os mais promissores para futuras hibridações dentro de um programa de melhoramento genético da mamoneira. Outras combinações também promissoras seriam entre as cultivares EBDA MPA 31 e a EBDA MPA 40 juntamente com as EBDA MPA34 e a EBDA MPA42, EBDA MPA17 e a EBDA MPA37 e a EBDA MPA11 e a EBDA MPA17 que apresentaram um valor de dissimilaridade de 0,27. No entanto, estes resultados devem ser confirmados com avaliações fenotípicas das cultivares. Segundo CRUZ et al. 2004 e FALCONER, 1989 para a seleção de genitores para cruzamento, deve-se aliar o bom desempenho destes com a divergência genética entre eles.

É de grande importância o estudo acerca da variabilidade genética e caracterização molecular dos genótipos de mamoneira do bloco de cruzamentos, visando melhor utilização dos mesmos. Dentre as ferramentas úteis ao estudo da variabilidade genética em espécies vegetais, o uso de marcadores RAPD

(*Random Amplified Polymorphic DNA*) destaca-se pela praticidade e rapidez e pelo número de informações obtidas (ANTHONISEN, 2007). Marcadores RAPD tornaram-se populares porque a sua aplicação não necessita de qualquer informação prévia sobre a sequência alvo no genoma. Esses marcadores têm sido utilizados na identificação da diversidade e mapeamento genético em muitas espécies de plantas (WEISING et al., 1995).

Embora haja questionamentos sobre a repetibilidade de marcadores RAPD. Ramos et al., (2008) avaliaram a repetibilidade de marcadores RAPD em *Tibouchina papyrus*, utilizando uma técnica de otimização (*simulated annealing*). Eles conseguiram um índice de repetibilidade igual a 84% entre as matrizes, confirmando que, quando padronizadas as condições de PCR, pode-se obter uma boa taxa de repetibilidade dos marcadores RAPD, confirmando a possibilidade de uso dessa importante ferramenta em estudos genético-populacionais.

Estudos comparativos entre os tipos de marcadores RAPD e AFLP tem sido relatados: Pamidiarrri et al. (2009a), avaliando a variabilidade genética entre 6 espécies do gênero *Jatropha* (pertencente a família Euphorbiaceae) utilizando marcadores RAPD e AFLP concluíram que os dois marcadores mostraram-se eficientes na detecção de polimorfismo para o gênero estudado. Pamidiarrri et al (2009b) caracterizaram variedades tóxicas e não tóxicas de *Jatropha curcas* utilizando marcadores AFLP e RAPD. Os autores concluíram que os dois marcadores foram igualmente eficientes na identificação de polimorfismo.

Vários autores obtiveram sucesso com a técnica de RAPD, tais como o de Cunha et al. (2006) que identificaram polimorfismo em mamona e o de Cerqueira et al. (2008) que utilizaram este marcador para a identificação da similaridade entre cultivares de mamoneira o de Pimenta (2006) que avaliou a divergência genética entre 21 variedades de mamoneira por meio da utilização de 26 iniciadores aleatórios, com formação de seis grupos distintos entre as variedades estudadas.

Nossos resultados mostraram que é possível avaliar a diversidade genética em genótipos de mamona por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD. As informações geradas, neste trabalho, trazem grande contribuição para o programa de melhoramento da espécie pelo fato de existirem poucos grupos trabalhando com a espécie e a falta de publicações abordando este assunto.

CONCLUSÕES

- 1- Os marcadores moleculares baseados em RAPD são eficientes para revelar a variabilidade genética de cultivares de mamona (*Ricinus communis*);
- 2- Existe variabilidade genética entre as cultivares avaliadas;
- 3- Com base na avaliação da dissimilaridade genética, por meio dos marcadores RAPD, combinações promissoras poderão ser esperadas entre as cultivares EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-35, EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-34, EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-36 e EBDA MPA-35 e a EBDA MPA-42, EBDA MPA-31 e a EBDA MPA-40, EBDA MPA-34 e a EBDA MPA-42, EBDA MPA-17 e a EBDA MPA-37 e EBDA MPA-11 e a EBDA MPA-17.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, O. A. **Informações meteorológicas do CNP: Mandioca e Fruticultura tropical**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA – CNPMF. 1999. 35 p. (EMBRAPA – CNPMF. Documentos, 34).
- ANTHONISEN, D. G., **Caracterização de genótipos de mamona: marcadores RAPD, teor de óleo nas sementes por SOXHLET e RMN e rendimento da extração do óleo usando etanol**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.
- AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. **Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis*) no Nordeste do Brasil**. Campina Grande, PB: MAARA/Embrapa-CNPA, (Circular técnico, 25), 1997, 52p.
- CERQUEIRA, L. S.; SILVA, S. A; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E. P.; PALMIERI, D. A.; MOREIRA, R. F. C.; PESTANA, K. N.; SILVA, A. N. da. **Seleção**

de iniciadores RAPD capazes de detectar polimorfismo em mamoneira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3, Salvador. Energia e ricinoquímica: **Anais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 1 CD-ROM.

CERQUEIRA, L. S. **variabilidade genética e teor de óleo em mamoneira visando ao melhoramento para região de baixa altitude**. 2008. 57 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós Graduação em Ciências Agrárias-CCAAB- UFRB), Cruz das Almas, Ba, 2008.

COSTA, M. N.; PEREIRA, W. E.; BRUNO, R. L. A.; FREIRE, E. C.; NÓBREGA, M. B. M.; MILANI, M.; OLIVEIRA, A. P. **Divergência genética entre acessos cultivares de mamoneira por meio de estatística multivariada**, Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, n.11, p 1617-1622, 2006.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 585 p., 2003.

CRUZ, P. J.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C.; BENIN, G.; VIEIRA, E. A.; SILVA, J. A. G.; VALÉRIO, I. P.; HARTWIG, I.; BUSATO, C. C. Genetic dissimilarity among wheat genotypes for lodging-associated traits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. n.4, v.4, p.427-433, 2004.

CUNHA, M. A. S. SALES, J. S.; MORAIS, T. A.; RAMALHO NETO, C. E. Variabilidade genética de *Ricinus communis* L revelada por marcadores RAPD. In: congresso brasileiro de mamona, 2., 2006, Aracaju. **Anais**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 1 CD-ROM, 2006.

DIAMANTINO, M. S. A. S.; SILVA, S. A.; COSTA, M. A. P. de C. RICARDO, D. S.; SILVA, J. B. da; SOUZA, T. C. do N. de; MORAIS, D. V. de REIS, A. S. dos. Desempenho de genótipos de mamoneira quanto aos caracteres relacionados ao rendimento e teor de óleo da semente. In 6º Congresso Brasileiro de Plantas. **Anais**. 1 a 4 de agosto de 2011, Búzios, Rio de Janeiro. 1 CD-ROM, 2011.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L.. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus** 12:13-15, 1990.

FALCONER, D. S. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman, 438p. 1989.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. 2.ed. London: Longman, 1981. 340p.

FIGUEIREDO Neto, A.; ALMEIDA, F. De A. C.; GOUVEIA, J. P. G.; NÓBREGA, M. B. M.; CARNEIRO, R. M.; PEDROZA, J. P. Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus comunnis* L.) Baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

GAJERA, B. B.; KUMAR, N.; SINGH, A. S.; PUNVAR, B. S.; RAVIKIRAN, R.; SUBHASH, N.; JADEJA, G. C. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, 32:491-498, 2010.

GARDNER, C.O.; EBERHART, S.A. Analysis and interpretation of variety cross diallel and related populations. **Biometrics**, Raleigh, v.22, p.439-452, 1966.

GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.9, p.463-493, 1956.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bul. Soc. Vaudoise Sci. Nat.** 44:223–270, 1908.

MILANI, M.; DANTAS, F. V.; MARTINS, W. F. S.; MARTINS, P. G. S. **Uso de marcadores RAPD para avaliar a Divergência Genética em Mamoneira**. Comunicado Técnico 360 – EMBRAPA, Campina Grande, PB, 2008, ISSN 0102.0099.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**, Editora UFMG, Belo Horizonte, 295p, 2005.

MOREIRA, J. A. N.; LIMA, E. F.; FARIAS, F. J. C.; AZEVEDO, D. M. P. **Melhoramento de mamoneira (*Ricinus communis*)**. Embrapa-CNPQ (Documentos, 44). Campina Grande. p 30, 1996.

NÓBREGA, M. B. M. **Seminários em genética e melhoramento de plantas**. Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, Piracicaba, São Paulo, 2009.

PIMENTA, M. R. **Estudo molecular em *Ricinus communis* L., visando a divergência genética, a inibição causada pelo extrato protéico sobre tripsina de *Erinnyis ello* L. e a prospecção de genes do tipo inibidor de tripsina**. Larvas – UFLA, 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado).

RAMOS, J. R; SOARES, T. N; OLIVEIRA, G.; TELLES, M. P. C; RESENDE, L. V; DINIZ-FILHO, J. A. F. **Avaliação da repetibilidade de marcadores RAPD em *Tibouchina papyrus* utilizando técnica de otimização**. Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 16 a 19 de setembro de 2008, Bahia Othon Palace Hotel • Salvador • BA • Brasil www.sbg.org.br - ISBN 978-85-89109-06-2

SBRT – **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**, 2005.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; MORAES, C. R. de A.; GONDIM, T. M. de S.; CARDOSO, G. D. **Avaliação da produtividade e teor de óleo de dez genótipos de mamoneira cultivados em altitude inferior a 300 metros**. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza-CE, v. 37, n. 2, p. 188-194, 2006.

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

STATISTICA. **Statistica for Windows v. 6.0: Computer Program Manual**. Editora StatSoft Inc. Tulsa, UK (CD-Rom), 2002.

PAMIDIMARRI, S. D. V.; SINGH, S.; MASTAN S. G.; PEREIRA, J.; REDDY, M. P. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Mol Biol Rep.** 36 (6) :1357-1364, 2009a.

PAMIDIAMARRI, S. D. V.; PANDYA, N.; REDDY, M. P.; RADHAKRISHNAN, T. Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha*. **Mol Biol Rep.** 36 (5) :901-7, 2009b.

VAZ PATTO, M. C; SATOVIC, Z.; PÊGO S.; FEVEREIRO P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica** 137:63-67, 2004.

VIDAL, M. S.; MILANI, M.; MENEZES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. S.; **Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética de *Ricinus communis* L.**, Campinas Grande: Embrapa – CNPA, 5p., (Circular Técnica, 90), 2005.

WEISING, K.; ATKINSON R. G.; GARDNER, R. C. Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. **PCR Methods Appl.**, 4(5):249-255.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFASLKI, J. A.;TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-5, 1990.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO GRAVIMÉTRICO E TEOR DE ÓLEO EM UMA POPULAÇÃO F₃ DE MAMONEIRA DA UFRB¹

1 Artigo ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico científico: Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB).

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO GRAVIMÉTRICO E TEOR DE ÓLEO EM UMA POPULAÇÃO F₃ DE MAMONEIRA DA UFRB

Autor: Edna Lôbo Machado

Orientadora: Profa. Dra. Simone Alves Silva

Co-orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

RESUMO- O presente trabalho teve como objetivos otimizar e validar o método gravimétrico na determinação do teor de óleo de semente de mamona e avaliar o desempenho para teor de óleo nas sementes de uma População F₃, oriunda do cruzamento entre as cultivares BRS Nordestina e Sipeal 28. Para a otimização do método analítico gravimétrico e para a validação foi realizada comparações com o método oficial de *soxthlet*. Um total de seis extrações, com o solvente hexano a frio, foi testado para a verificação do número ótimo de extração. Observou-se que a presença de tegumento nas sementes interfere na solubilização do óleo pelo solvente. A partir de quatro extrações com o solvente hexano a frio, pelo método analítico de gravimetria, não há diferença estatística significativa com os números maiores de extrações. Não houve diferença significativa pelo teste F a 1% de probabilidade entre os métodos de *soxthlet* e o gravimétrico. Frente a estes resultados o método gravimétrico foi adotado para a quantificação do teor de óleo na população F₃. A quantificação do teor de óleo na semente foi submetida à análise de variância e comparação de médias pelo teste de *Scott Knot*. Houve diferença significativa entre os genótipos da População F₃ a 1% de probabilidade para o caráter teor de óleo na semente, variando de 27% a 46%. O genótipo 91 foi superior para o caráter avaliado com 46% de teor de óleo na semente. A similaridade entre os parentais (BRS Nordestina e Sipeal 28) para teor de óleo na semente não proporcionou ampliação da base genética da população F₃ resultante, com pequena variação para o caráter.

Palavras-chave: *Ricinus communis*, L. Biodiesel, Melhoramento genético

OPTIMIZATION AND VALIDATION OF THE GRAVIMETRIC ANALYTICAL METHOD AND OIL CONTENT OF AN F₃ POPULATION OF CASTOR BEANS

Author: Edna Lôbo Machado

Adviser: Prof. Dr. Simone Alves Silva

Co-adviser: Dr. Cláudia Fortes Ferreira

ABSTRACT- The objective of the present work was to optimize and validate the gravimetric method for the determination of the oil content in castor bean seeds and evaluate the performance of an F₃ population originated from the cross between the BRS Nordestina and the Sipeal 28 cultivars as to the oil content in seeds. Optimization tests of the gravimetric analytical method in the determination of oil content and the validation of the gravimetric method by comparison to the official soxhlet method, were carried out. A total of six extractions with the cold hexane solvent was tested in order to verify the optimal number of extractions. Comparison assays between the soxhlet and gravimetric methods were carried out. The presence of the tegument in the seeds interfered with the solubilization of the oil by the solvent. After four extractions with the cold hexane solvent using the analytic gravimetric method, there was no significant statistical difference. There was no significant difference by the F test at 1% probability between the soxhlet and the gravimetric methods. Therefore, this was the method adopted for quantifying the oil content in the F₃ population. The quantification of the oil content in seeds was submitted to the analysis of variance and comparison of averages by the *Scott Knot* test. There was significant difference between the genotypes of the F₃ population at 1% probability for oil seed content, varying from 27% to 46%. Genotype 91 was superior for the trait evaluated with 46% of oil content in the seeds. The similarity between the parental varieties (BRS Nordestina and Sipeal 28) for oil content in the seeds did not provide the broadening of the genetic base of the F₃ population contributing only to a small variation of the trait.

Key-words: *Ricinus communis*, L. Biofuel, Genetic breeding.

INTRODUÇÃO

A mamoneira, com centro de diversidade na Etiópia e na África, é uma planta tropical perene cultivada em muitas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (FOSTER et al., 2010). A espécie *Ricinus communis* pertence à família da Euforbiacea, de reprodução mista, ocorrendo tanto a autofecundação quanto fecundação cruzada natural. É monoica, permitindo a obtenção de plantas homozigotas por meio de autofecundação. Com o controle parental, podem-se conseguir populações de plantas geneticamente puras sendo mantida a variabilidade individual (BORÉM, 1999).

A *Ricinus communis* é uma oleaginosa que apresenta grande importância econômica sendo que cerca de 90% do seu óleo, extraído das sementes, é composto de um ácido graxo hidroxilado incomum: o ácido ricinoleico (SILVA et al., 1984). O ácido graxo ricinoleico apresenta propriedades químicas únicas, o que favorece a alta valorização do óleo da cultura da mamona.

O óleo da mamoneira é utilizado na fabricação de lubrificantes, cosméticos, aplicações médicas e de especialidades químicas. A mamona tem sido proposta, também, como uma potencial fonte de biodiesel (SILVA et al., 2006).

A cultura da mamona é um importante recurso nos países tropicais em desenvolvimento por conter alto teor de óleo em suas sementes e pela facilidade com que podem ser cultivadas em ambientes desfavoráveis.

Segundo Chan et al. (2010), a mamoneira possui 71 genes que apresentam similaridade com genes conhecidos envolvidos na biossíntese dos ácidos graxos e triacilgliceróis e que correspondem, principalmente, ao ácido ricinoleico. A mamona não só evoluiu a enzima ácido oleico hidroxilase, para sintetizar o ácido ricinoleico, como também desenvolve a capacidade eficiente de acumular altos níveis de ácido ricinoleico no óleo de sua semente (CHAN et al., 2010).

A semente da mamoneira apresenta um teor de óleo que pode variar entre 35% a 55%, com padrão comercial de 44% (VIEIRA et al., 1997). Para atender a demanda mundial na produção de óleo de mamoneira, faz-se mister o melhoramento genético desta cultura a fim de se obter cultivares mais produtivas com maior teor de óleo na semente, adaptadas às regiões de baixas altitudes com relação às cultivares atualmente comercializadas.

Uma avaliação importante num programa de melhoramento genético da mamoneira é a quantificação do teor de óleo da semente, sendo um dos critérios de seleção de genótipos superiores. Portanto, a metodologia empregada na quantificação do teor de óleo na semente deve atender às necessidades do melhorista. Isso porque, ao tratar-se de uma população segregante, com grande número de indivíduos, a metodologia a ser empregada deve ser eficiente, rápida, barata e não agressiva ao meio ambiente. A metodologia oficial utilizada na quantificação do teor de óleo em sementes, segundo a IUPAC, é a extração a quente através de extratores *Soxhlet* (SOXHLET, 1879). No entanto, quando se diz respeito a um grande número de amostras, como, por exemplo, uma população segregante, o custo individual de cada análise, através de extratores *Soxhlet*, é alto. Além de ser uma técnica demorada e de utilizar grande quantidade de solvente Hexano e este é liberado ao meio ambiente.

No método de gravimetria (BLIGH e DYER, 1959) adaptado para plantas por Marques (2009), as sementes são maceradas e submetidas à extração de óleo por meio de um volume menor do solvente hexano (5%) e a extração é a frio. Esse método constitui-se em uma alternativa ao método químico de extração a quente por meio de extrator *Soxhlet*. O hexano é usado no processo por ser o mais seletivo dentre os solventes, por possuir estreita faixa de ebulição e, além disso, por ser imiscível com a água, o que evita a formação de misturas azeotrópicas. Contudo, os riscos operacionais à saúde humana e ao meio ambiente, associados à origem não-renovável, justificam a pesquisa de alternativas para diminuir o uso desse solvente na quantificação do teor de óleo em sementes. Sendo assim, analisar uma mesma amostra usando diferentes técnicas pode servir para verificar a ordem de grandeza de um resultado ou para confirmar a existência de um analito, obtido pela técnica original.

Comparar resultados é uma prática comum à química analítica para verificar a precisão de técnicas distintas e determinar se conjuntos diferentes de

dados são coerentes e, portanto, confiáveis (LEITE, 1998). Além disso, Ellison et al. (2002) destacam que a atual preferência pelos métodos analíticos oficiais para a determinação dos mais variados analitos tem origem na necessidade de apresentar dados com rastreabilidade e precisão. Todavia, vale ressaltar que a exigência formal de confiabilidade consiste na rastreabilidade do resultado a uma referência que pode ser representada por método reconhecido ou empírico (ELLISON et al., 2002). O uso da Gravimetria pressupõe, portanto, a necessidade de estabelecer previamente uma referência para os resultados, como forma de validá-los.

Levando-se em consideração não apenas a necessidade de agilidade na geração de resultados, redução de riscos operacionais e custos e minimização do impacto ambiental, mas, sobretudo, a confiabilidade dos resultados gerados em análises laboratoriais, este trabalho objetivou a otimização e a validação da técnica de gravimétrica na determinação do teor de óleo de sementes de mamona, por comparação com o método químico de *Soxhlet*. No tocante ao caráter teor de óleo nas sementes, objetivou, também, a avaliação do desempenho fisiológico de uma população F_3 proveniente do cruzamento entre as cultivares BRS Nordestina e Sipeal 28. Vale salientar que - quanto ao caráter quantidade de óleo na semente, no Recôncavo Baiano - são ainda inéditas a quantificação do teor de óleo em sementes de mamoneira por meio do método gravimétrico e a avaliação do desempenho fisiológico de uma população F_3 originada de hibridações controladas.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido entre 2009 e 2010, na área experimental e no laboratório do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, no Município de Cruz das Almas, Bahia, nas coordenadas geográficas 40°39'S e 39°06'23"W, a 220 m de altitude. Foram instalados experimentos em condições de telado e campo para a obtenção da população segregante F_3 , obtida de cruzamentos controlados entre as cultivares Nordestina BRS e Sipeal 28. O espaçamento utilizado entre fileiras foi de 3 m e de 1 m entre

plantas, totalizando 31 plantas em delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições. A área experimental foi preparada por meio de aração, gradagem, marcação das parcelas e a adubação efetuada com base no resultado da análise de solo.

Otimização do método gravimétrico

A fim de otimizar o método de gravimetria para a quantificação do teor de óleo em sementes de mamoneira, um total de cinco sementes de mamona foi macerado com e sem tegumento (retirado manualmente com o auxílio de um estilete). O tegumento é um tecido externo e impermeável que reveste a semente, protegendo o endosperma e o embrião. Em tubos do tipo falcon, previamente pesados, foram adicionados cerca de 500 mg do macerado e 5,0 mL do solvente hexano. Em seguida, esses tubos foram fechados e mantidos sob agitação constante, com o auxílio de uma mesa agitadora (Mesa Agitadora Orbital 7,5-kg 110-V 500-rpm), com movimentos orbitais a 50 rpm. Decorrido 1 h, as amostras foram centrifugadas a $3.000 \times g$, por 5 min, à temperatura ambiente e o sobrenadante, no qual os lipídios da amostra apresentavam-se dissolvidos, foi descartado.

Para garantir a total solubilização e extração dos lipídios nas sementes, bem como a homogeneização entre as repetições, realizaram-se testes com diferentes números e duração de extrações com o hexano. Os testes foram os seguintes: uma a seis extrações com o solvente, sob agitação constante, sendo que a primeira extração teve duração de uma hora e as demais tiveram duração de 30 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Ao término do processo, os tubos contendo o precipitado final (sementes delipidadas) foram deixados à temperatura ambiente por 24 h, para que se processassem a completa volatilização da mistura extratora. Só então, foram pesados até a obtenção de massas constantes.

Os valores correspondentes aos teores de óleo nas sementes foram obtidos por meio da diferença entre as massas iniciais e finais dos tubos e foram expressos em percentagem. Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) a 1% de probabilidade. Após, realizou-se a comparação entre médias pelo teste turkey (para o teste com e sem tegumento na semente) e

análise de regressão (para o número adequado de extração com a utilização do solvente hexano) utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

Validação do método gravimétrico

Para a validação do método gravimétrico, realizou-se a quantificação do teor de óleo nas sementes das cultivares BRS Nordestina, Sipeal 28 e de um genótipo da população F_3 por meio do método gravimétrico e do método químico com o extrator *Soxhlet* de acordo com AOAC (2000), ambos com o solvente hexano. Os resultados foram submetidos a ANOVA a 1% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

O método de extração do tipo extrator *Soxhlet*, usando hexano como solvente, é o método oficial de determinação do teor de óleo, de acordo com a IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Para a quantificação com o método de extração do tipo extrator *Soxhlet*, utilizou-se 10 g de extrato de cada amostra. As amostras foram colocadas no extrator *Soxhlet*, por 6 h. O volume utilizado de hexano em cada extração foi de 500 mL, sendo realizadas três repetições para cada amostra. Decorrido o tempo de 6 horas no extrator, as amostras foram retiradas e secas à temperatura ambiente por aproximadamente 24 h e pesadas novamente. O teor de óleo foi determinado pela diferença de peso antes e depois da extração com hexano.

Quantificação do teor de óleo das sementes da população F_3

Para a análise de teor de óleo das sementes, foram utilizados os 31 genótipos da população F_3 (oriunda da hibridação controlada entre as cultivares BRS Nordestina e Sipeal 28). Esta população é considerada uma população em avanço dentro do programa de melhoramento genético da mamoneira na UFRB. Após o beneficiamento, as sementes da população F_3 foram usadas para a quantificação do teor de óleo no Laboratório do NBIO/UFRB.

A quantificação do teor de óleo nas sementes da população F_3 e parentais de *R. communis*. foi realizada por meio do método gravimétrico. Os parâmetros adotados foram: sementes sem tegumento (o tegumento foi manualmente retirado com o auxílio de um estilete), quatro extrações com o solvente hexano e três

repetições. Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e comparação entre médias pelo teste de *Scott Knott* (SCOTT e KNOTT, 1974) a 1% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os tratamentos de quantificação de teor de óleo nas sementes com e sem tegumento o teste F foi significativo a 1% de probabilidade. O coeficiente de variação foi de 0,51 indicando a boa precisão do experimento. Provavelmente, a presença de tegumento na semente interfere na solubilização eficiente dos lipídios por meio do solvente (Tabela 1). Sendo assim, faz-se necessária a retirada do tegumento da semente de mamoneira para uma maior eficiência na quantificação do teor de óleo.

Tabela 1: Teste de extração de óleo em sementes de *Ricinus communis* L. com e sem tegumento utilizando o método de gravimetria. Cruz das Almas, 2011.

Tratamentos	Médias
Sem tegmento	48,903 a
Com tegumento	45,343 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Turkey* a 1% de probabilidade

Na determinação do número adequado de extrações, com o solvente hexano, o teste F foi significativo a 1% de probabilidade. Esses resultados demonstram que pelo menos um dos tratamentos é superior aos demais. O coeficiente de variação de 4,59 mostra a boa precisão dos experimentos.

A linha de tendência referentes a figura 1 aponta que - entre quatro, cinco e seis extrações - não há diferença estatística significativa (Figura 1), sugerindo que quatro extrações são suficientes, economizando tempo e recurso e sendo menos

ofensivo ao meio ambiente, uma vez que utiliza menos solvente e não há desperdício de água como no método de *Soxhlet*.

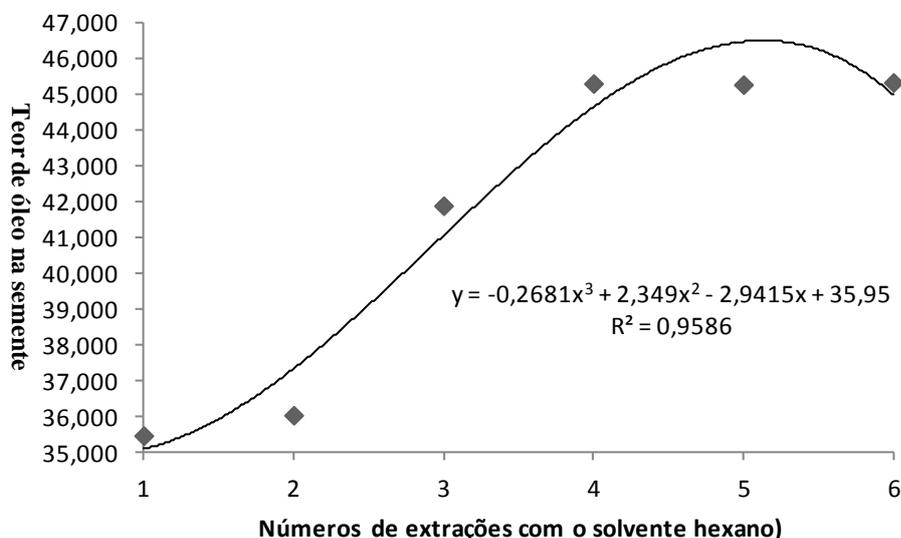


Figura 1: Número de extrações realizadas com hexano a frio por gravimetria para a quantificação do teor de óleo de mamona. Cruz das Almas, 2011.

A equação de regressão polinomial de quarto grau mostrou melhor ajuste para o teste, apresentando coeficientes de determinação R^2 de, aproximadamente, 0,96.

Os métodos analíticos de gravimetria e *soxhlet* não diferiram estatisticamente entre si pelo teste F a 1% de probabilidade. O coeficiente de variação foi de 2,75, indicando boa precisão dos experimentos, requisito intrínseco para a oficialização de um método analítico. Dessa forma, devido aos fatos de o método analítico de gravimetria ser mais rápido e aplicável a um grande número de amostras por vez, inclusive com redução de custo e tempo, e por utilizar um volume menor de solvente quando comparado ao método extrator de *soxhlet*, é o indicado para o uso na análise de várias amostras, como a situação em estudo. Mendham et al. (2002) afirmam que, para escolher a técnica analítica adequada à escala laboratorial, é necessário considerar as seguintes variáveis: o tempo de execução do ensaio, o volume de testes que serão realizados, a natureza da amostra, o tamanho da alíquota para o teste e a quantidades de solvente.

Apesar do extrator de *Soxhlet* ser o método oficial de determinação do teor de óleo, de acordo com a IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, em se tratando de uma população segregante composta por um número grande de indivíduos, o método se torna muito demorado, caro e prejudicial ao meio ambiente, uma vez que utiliza um grande volume de solvente. Assim sendo, o método analítico de gravimetria mostrou-se ser uma alternativa para a quantificação de teor de óleo em mamoneira. A análise gravimétrica ou gravimetria é um método analítico quantitativo cujo processo envolve a separação e a pesagem de um elemento, ou de um composto do elemento na forma mais pura possível. O peso do elemento ou composto pode ser calculado a partir das diferenças entre o peso inicial e o peso final das amostras.

Estudos de quantificação do teor de óleo na semente de populações segregantes de *R. communis* desenvolvidas por um programa de melhoramento específico para regiões de baixa altitude, ainda são inéditos. A altitude pode influenciar o desenvolvimento de uma cultura por diversos fatores, tais como: nebulosidade, umidade e pressão de oxigênio; mas principalmente pela temperatura a qual tende a crescer à medida que a altitude diminui. A temperatura tem grande impacto sobre a fotossíntese e respiração da planta, pois influencia diversas reações bioquímicas ligadas a esses dois processos fisiológicos (TAIZ e ZEIGER, 1998).

As sementes da população F_3 e seus parentais: BRS Nordestina e Sipeal 28 tiveram seus teores de óleo avaliados por meio do método analítico de gravimetria. Os resultados foram significativos pelo teste F a 1 % de probabilidade com coeficiente de variação (CV) igual a 5,28 mostrando que há variabilidade para o caráter avaliado.

Para identificação de genótipos superiores, quanto ao teor de óleo nas sementes, realizou-se a comparação de médias múltiplas por meio do teste de *Scott Knott*. O teste de *Scott Knott* é o mais indicado quando existe um grande número de tratamentos e quando há um interesse na separação de grupos de médias sem que haja ambiguidade dos resultados (BEZERRA Neto, 2002).

O teor de óleo nas sementes da população F_3 variou de 27,02 a 46,15% com formação de 6 grupos: Grupo I (a cultivar BRS Nordestina); Grupo II (a cultivar Sipeal 28); Grupo III (os genótipos NS23, NS21, NS22, NS26, NS27, NS24, NS28, NS31, NS29, NS3, NS25 e NS1); Grupo IV (NS4, NS7, NS2, NS6,

NS9, NS5, NS10 e NS8); Grupo V (NS32, NS14, NS13, NS20, NS11) e Grupo VI (NS 19, NS18, NS12, NS16, NS17 e NS 15) (Tabela 2). Os resultados têm indicativo de variabilidade genética para o caráter estudado dentro da referida população. Moreira et al. (2008) verificaram alta variabilidade, com variação entre 37,8 e 51,55%, ao analisarem 78 genótipos de mamona do banco ativo de germoplasma - BAG da Embrapa Clima Temperado em Pelotas, RS, para os caracteres peso de 100 sementes e teor de óleo.

Tabela 2: Teor de óleo avaliado nas sementes da população F₃ e nas cultivares BRS Nordestina e Sipeal 28 utilizando o método gravimétrico. Cruz das Almas, 2011.

Genótipos	Teor de óleo	Genótipos	Teor de óleo
BRS Nordestina	50,950 a	NS6	38,733 d
Sipeal 28	46,963 b	NS9	38,117 d
NS23	46,156 b	NS5	38,020 d
NS21	45,173 c	NS10	37,923 d
NS22	43,930 c	NS8	37,520 d
NS26	43,893 c	NS32	35,863 e
NS27	43,690 c	NS14	33,467 e
NS24	43,446 c	NS13	33,383 e
NS28	43,253 c	NS20	33,073 e
NS31	42,620 c	NS11	32,643 e
NS29	42,283 c	NS19	30,543 f
NS3	42,116 c	NS18	29,953 f
NS25	41,883 c	NS12	28,467 f
NS1	41,810 c	NS16	27,837 f

NS4	40,433 d	NS17	27,307 f
NS7	40,283d	NS15	27,023 f
NS2	39,253 d		

*Medias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott Knott* a 1% de probabilidade.

Os resultados de teor de óleo nas sementes, obtidos para as cultivares BRS Nordestina (50,95%) e Sipeal 28 (46,96%), são semelhantes à faixa de valores encontrada por Cerqueira (2008). Cerqueira (2008) avaliou o teor de óleo em cinco cultivares de mamoneira, EBDA MPA17, Sipeal 28, BRS 188 Paraguaçu, BRS Nordestina e Mirante 10, cultivadas no município de Cruz das Almas – BA via extrator de *Soxhlet*, com emprego do solvente hexano e obteve valores de teor de óleo de 47,33% e 50,33% para as cultivares Sipeal 28 e BRS Nordestina, respectivamente. Melo et al. (2006) avaliaram o teor de óleo de sementes das cultivares BRS Nordestina e CSRN-393. Esses autores revelaram, respectivamente, 50,92% e 43,75%; enquanto experimentos, conduzidos por Lucena et al. (2006), alcançaram, respectivamente, 48,9% e 47,98% para a BRS Nordestina e a BRS 188 Paraguaçu.

O teste de comparação de médias, apresentado na tabela 2, aponta o genótipo NS23 com teor de óleo de 46,154% como estatisticamente superior aos demais genótipos para o caráter teor de óleo nas sementes. No entanto, o teor de óleo encontrado na população F₃ do cruzamento entre as cultivares BRS Nordestina X Sipeal 28 foi inferior aos valores obtidos para os seus parentais (aproximadamente 51% e 47% para BRS Nordestina e Sipeal 28, respectivamente), embora o genótipo NS23 não tenha apresentado diferença estatística em relação ao seu parental Sipeal 28. Essa baixa amplitude de base genética nesta população confirma a necessidade de hibridações envolvendo parentais divergentes para o caráter de interesse, proporcionando recombinações e surgimento de indivíduos superiores na população.

Desta forma o baixo desempenho fisiológico para teor de óleo na semente desta população pode ser em função da capacidade específica de combinação (CEC) dos parentais e da ausência de divergência genética para o caráter. De acordo com Sprague e Tatum (1942), o termo capacidade específica de

combinação é utilizado para designar os casos em que certas combinações híbridas são superiores ou inferiores em relação ao esperado quanto ao desempenho médio dos dois parentais. Falconer (1981), no entanto, definiu CEC como sendo o desvio do desempenho médio de uma combinação particular em relação à média dos parentais envolvidos no cruzamento. Assim, baixas estimativas positivas ou negativas de $\hat{\sigma}_{ij}$ significam que o comportamento de determinado híbrido é função da capacidade geral de combinação (CGC) de seus parentais; enquanto valores absolutos altos de $\hat{\sigma}_{ij}$ indicam que algumas combinações são relativamente melhores e outras piores, com base na CGC dos parentais (SPRAGUE e TATUM, 1942; CRUZ et al., 2004). Entretanto, os efeitos da CEC enfatizam a importância de interações não-aditivas resultantes da complementação gênica entre os parentais (BASTOS et al., 2003). É válido ressaltar, porém, que dois parentais de elevada CGC nem sempre proporcionam a formação da melhor combinação do dialelo (CRUZ e VENCOVSKY, 1989). Os parentais podem não apresentar entre si um apreciável grau de complementação gênica em relação às frequências dos alelos nos locos que apresentam dominância (VENCOVSKY e BARRIGA, 1992).

CONCLUSÕES

1. O método gravimétrico é similar ao método de Soxhlet com a vantagem da reduzido gasto com o solvente hexano;
2. A utilização de métodos, como o método analítico de gravimetria, é de suma importância no auxílio à seleção de plantas em programas de melhoramento genético, em que grande número de análises é necessário;
3. Existe variabilidade no caráter teor de óleo na semente entre os genótipos da população F_3 de mamoneira mesmo com restrita base genética nos parentais;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Association of Official Analytical Chemists (AOAC); **Official methods of analysis**, 13th ed., Arlington, 2000.

BASTOS, I. T.; BARBOSA, M. H. P.; CRUZ, C. D.; BURNQUIST, W. L.; BRESSIANI, J. A.; SILVA, F. L. da. Análise dialéctica em clones de cana-de-açúcar. **Bragantia**, Campinas, v.62, n. 2, p. 199-206, 2003

BEZERRA Neto, F.; NUNES, G. H. S.; NEGREIROS, M. Z. Avaliação de procedimentos de comparações múltiplas em trabalhos publicados na revista Horticultura Brasileira de 1983 a 2000. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 05-09, março, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** v. 37, 911-917, 1959.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p. 385-485.

CERQUEIRA, S. L. **variabilidade genética e teor de óleo em mamoneira visando ao melhoramento para região de baixa altitude**. 2008. 57 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Ba.

CHAN, A. P.; CRABTREE, J.; ZHAO, Q. I.; LORENZI, H.; ORVIS, J.; PUIU, D.; MELAKE-BERHAN, A.; JONES, K. M.; REDMAN, J.; CHEN, G.; CAHOON, E. B.; GEDIL, M.; STANKE, M.; HAAS, B. J.; WORTMAN, J. R.; FRASER-LIGGETT, C. M.; RAVEL, J.; RABINOWICZ, P. D. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. **Nature biotechnology**, v. 28 n. 9, p. 951-959, 2010.

CRUZ, C. D., REGAZZI, A. J.; CARNEIRO P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. **Viçosa: UFV**, cap. 7, p.223-375. 2004.

CRUZ, C. D.; VENCOVSKY, R. Comparação de alguns métodos de análise dialélica.

Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto v. 12, n. 2, p. 425-438, 1989.

ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. **Determinando a incerteza na medição analítica**. Guia EURACHEM/CITAC. 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2002. 166 p.

FALCONER, D. S. Introdução à genética quantitativa. Trad. SILVA, M. A.; SILVA, J. C., Viçosa, MG: UFV, **Impr. Univ.** 1981, 279p

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium (Lavras)**, v. 6, p. 36-41, 2008

FOSTER, J. T.; ALLAN, G. J.; CHAN, A. P.; RABINOWICZ, P. D.; RAVEL, J.; JACKSON, P. J.; KEIM, P. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). **BMC Plant Biol.** 10, 13 (2010).

LEITE, F. **Validação em análise química**. 3 ed. Campinas: Átomo, 1998. 224 p.

LUCENA, A. M. A. de; SEVERINO, L. S.; FREIRE, M. A. de O.; BELTRÃO, N. E. de M.; BORTOLUZI, C. D. Caracterização física e teor de óleo de sementes das cultivares: BRS Nordestina e BRS Paraguaçu separadas em classes pela cor do tegumento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Anais**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 1 CDROM.

MARQUES, E. C. **Estresse salino e mobilização de reservas durante a germinação e estabelecimento da plântula de cajueiro anão-precoce**. 2009. 135 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Ceará.

MELO, C. L. R. de; GONDIM, T. M. de S.; SAMPAIO, D. D.; ARAÚJO, D. R. de; SOUSA, J. dos S. Análises físico-químicas de sementes de três genótipos de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Anais**.

MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, VOGEL, M. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.

MOREIRA, L. L.; ÁVILA, T. T. de; LEMÕES, J. S. CASAGRANDE, J. G. SILVA, S. D. dos A. Variabilidade de acessos de mamona para peso e teor de óleo das sementes. In: III Congresso Brasileiro de Mamona, **Anais**. Salvador, BA, 2008.

SILVA R.L. C da; SHOGIRO T. J.; SAVI, A.; LEAL, N. R. Variability for oil and fatty acid composition in castor bean varieties. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 61, 841–1843, 1984.

SILVA, N. D. E. L da; MACIEL, M. R.; BATISTELLA, C. B.; MACIEL FILHO, R. Optimization of biodiesel production from castor oil. **Appl. Biochem. Biotechnol.** **130**, 405–414, 2006.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A **Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance**. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507 - 512, Sept. 1974.

SOXHLET, F. (1879): Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Polytechnisches J. (Dingler's)**, v.232, p. 461–465, 1879.

SPRAGUE, G. F.; TATUM, L. A. General vs. specific combining ability in single crosses of corn. **Journal of the American Society of Agronomy**, v. 34, n. 10, p. 923-932, 1942.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 792 p.

VENCOSVSKY, R.; BARRIGA, P. Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto, **Revista Brasileira de Genética**, p. 486, 1992.

VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. Diagnóstico e perspectivas da mamoneira no Brasil. In: Reunião temática matérias-primas oleaginosas no Brasil, 1997, Campina Grande. **Anais**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA/MAA/ABIOVE, 1997. p.139-150.

CAPÍTULO 3

GENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO F₂ E SEU DESEMPENHO QUANTO AO TEOR DE ÓLEO NA SEMENTE DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.)

1 Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Plant Science

GENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO F₂ E SEU DESEMPENHO QUANTO AO TEOR DE ÓLEO NA SEMENTE DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.)

Autor: Edna Lôbo Machado

Orientadora: Profa. Dra. Simone Alves Silva

Co-orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

RESUMO: A mamoneira é uma oleaginosa de grande importância econômica, sendo que seu óleo grande aplicabilidade, tanto na indústria quanto na medicina e apresenta-se como fonte energética alternativa ao petróleo e a seus derivados. Assim, foram objetivadas a genotipagem da população F₂ de *Ricinus communis* L. por meio de marcadores microssatélites-SSR e a avaliação do seu desempenho quanto ao teor de óleo na semente. A determinação desse teor foi realizada através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Foram realizadas a análise de variância e a comparação entre médias múltiplas pelo teste de *Scott Knott* para as médias obtidas. A genotipagem da população F₂ foi realizada por meio de 27 pares de iniciadores microssatélite (SSRs). O teor de óleo nas sementes variou entre 44,59% a 54,04% para os genótipos avaliados. Esse resultado mostra que há variabilidade genética entre os genótipos da população F₂ e seus parentais para o caráter avaliado. De um total de 27 locos amplificados, 11 foram polimórficos (49,7%). O número de locos polimórficos identificados, nesse trabalho, é insuficiente para correlacioná-los a um caráter quantitativo, a exemplo do teor de óleo na semente, demonstrando que há necessidade de aumentar o número de marcadores para aumentar a chance de associação.

Palavras-chave: Marcadores microssatélites, melhoramento genético, variabilidade.

GENOTYPING OF AN F₂ POPULATION AND ITS PERFORMANCE AS TO OIL CONTENT IN CASTOR BEAN (*Ricinus communis* L.) SEEDS

Author: Edna Lôbo Machado

Adviser: Prof. Dr. Simone Alves Silva

Co-adviser: Dr. Cláudia Fortes Ferreira

ABSTRACT: Castor beans are very economically important oil plants. Castor bean oil has wide applicability in the industry as well as the medical field and is considered as an alternative energy source to petroleum and its derivatives. Therefore, the genotyping of an F₂ population of *Ricinus communis* L. using SSR markers and the evaluation of its performance as to seed oil content, were carried out. The determination of the seed oil content was carried out using the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) method. The analysis of variance and comparison between multiple averages by the *Scott Knott* test was carried out. The genotyping of the F₂ population was carried out using 27 pairs of microsatellite primers (SSRs). The content of oil in the seeds varied from 44.59% to 54.04%. These results shows that there is genetic variability between the genotypes of the F₂ populations and their parents. From a total of 27 amplified loci, 11 were polymorphic (49.7%). The number of polymorphic loci identified is not enough to correlate them to a quantitative trait, such as oil content in the seeds, showing that the number of markers need to increase in order to increase the chances of a satisfactory association.

Key-words: Microsatellite markers, genetic breeding, variability

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis*) é uma euforbiácea rústica, heliófila e disseminada por diversas regiões do mundo. É uma planta monoica com flores femininas ocupando a porção superior e a masculina a porção basal da inflorescência, fato que proporciona dois tipos de reprodução: autofecundação e fecundação cruzada. A sua polinização geralmente é anemófila (SAVY-FILHO, 1999; BELTRÃO et al., 2001).

A espécie *R. communis* produz um óleo cujo principal componente é o ácido ricinoleico. O ácido ricinoleico tem moléculas com propriedades bastante flexíveis e estrutura, de certa forma, incomum entre os ácidos graxos existentes nos óleos vegetais (VARGAS, 2006). Estas características conferem ao óleo da mamona condições especiais, permitindo a sua utilização em mais de 400 processos industriais, tais como na produção de anticongelantes de combustível de avião e espaçonaves, de revestimento de poltronas e paredes de avião (não queima com facilidade nem libera gases tóxicos), bem como na produção de lubrificantes, resinas, tintas, cosméticos, medicamentos e até componentes de automóveis (VIEIRA e LIMA, 1998). Outras aplicações de grande valor econômico do óleo de mamona se verificam na fabricação do nylon e da matéria plástica. Em ambos os casos, o emprego do óleo da mamona é considerado indispensável (SANTOS et al., 2001). Esse óleo apresenta-se, ainda, como fonte energética alternativa ao petróleo e a seus derivados.

Em geral, o teor de óleo nas sementes da mamoneira varia de 35 a 55% (VIEIRA et al., 1997). Contudo, a maior parte das cultivares que são plantadas comercialmente no Brasil possui teor com variação entre 45% e 50% (FREIRE et al., 2006).

Os principais problemas para a exploração racional de espécies vegetais para produção de biodiesel na região Nordeste estão relacionados ao potencial

produtivo de cultivares e a inadequada disponibilidade destas cultivares, principalmente quanto ao elevado teor de óleo e tolerantes a pragas e doenças. Ou seja, não há sementes que atendam às necessidades dos agricultores e dos processadores da matéria prima produzida (PALMIERI e MAIA, 2007; BAHIA et al., 2008).

O melhoramento de plantas visa a sua modificação genética com o objetivo de agregar em um único genótipo as características desejáveis, em nível comercial, de uma determinada espécie (BORÉM e MIRANDA, 2009). Contudo, os caracteres de interesse, que, na sua grande maioria, são controlados por muitos genes e apresentam baixa herdabilidade e alta influência ambiental (FERREIRA, 2003). Esses fatores atenuam o progresso esperado com os processos seletivos e, conseqüentemente, o êxito de Programas de Melhoramento (BORÉM e MIRANDA, 2009).

A seleção de genótipos auxiliada por marcadores moleculares tem sido bastante utilizada em várias culturas, baseando-se na associação de marcadores moleculares com caracteres herdáveis que tenham interesse agrônômico (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Assim, a seleção assistida constitui-se em um processo de seleção indireta, no qual o caráter em questão apresenta uma herdabilidade próxima a 100%, já que não possui influência ambiental. Este tipo de processo seletivo poderá incrementar a eficiência do melhoramento de plantas, reduzindo-se o número de progênies avaliadas e o número de gerações para a estabilização dos genótipos pela possibilidade de seleção em gerações precoces (BARBOSA-NETO, 1998; FEDERIZZI, 1998). Além disso, a duração de programas de melhoramento pode ser reduzida, resultando em liberação mais rápida de cultivares e retorno mais rápido do investimento aplicado (BORÉM e MIRANDA, 2009).

Os microssatélites ou sequências simples repetidas em tandem (SSRs) são marcadores co-dominantes, abundantes nos genomas dos eucariotos, multi-alélicos e com alta reprodutibilidade (POWELL et al., 1996). Essas características fazem desses marcadores ferramentas úteis no melhoramento de plantas.

A espécie *R communis* L. é diploide com conjunto cromossômico $2n=2x=20$. Seu genoma apresenta tamanho moderado (aproximadamente 350 Mb) organizado em 10 cromossomos (FOSTER et al., 2010). Mais de 50% do genoma da mamoneira é composto de DNA repetitivo. Essa porcentagem não

inclui as sequências repetidas de baixa complexidade. Um terço dos elementos repetitivos são retrotransposons e menos de 2% são transposons de DNA. Os elementos de repetição longa são os mais abundantes (CHAN et al., 2010).

A avaliação de populações segregantes, por meio de marcadores SSR, permite diferenciar os indivíduos homocigotos (para diferentes alelos) dos heterocigotos e relacionar esses marcadores com genes de interesse.

Assim, foram objetivadas a genotipagem da população F₂ de *Ricinus communis* por meio de marcadores miscrossatélites-SSR e a avaliação do seu desempenho quanto ao teor de óleo na semente.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O presente trabalho foi realizado no campo experimental e Laboratório do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO), situados na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, no Campus Universitário de Cruz das Almas, localizado a 12° 40' 19" latitude sul, 39° 06' 23" de longitude oeste de Greenwich e com altitude média de 220 m. O clima é do tipo subúmido, com pluviosidade média anual de 1170 mm, com variações entre 900 e 1300 mm, sendo os meses de março a agosto os mais chuvosos e de setembro a fevereiro os mais secos. A temperatura média anual é de 24,1°C (ALMEIDA, 1999).

O material vegetal trata-se da população segregante F₂, resultado da autofecundação da população F₁, oriunda da hibridação controlada entre as cultivares EBDA MPA-17 e BRS Nordestina. Essas cultivares foram selecionadas devido ao fato de serem as mais divergentes para o caráter teor de óleo na semente, de serem mais resistentes às condições adversas e de serem indicadas para região onde predomina baixos e médios agricultores.

A genotipagem com os pares de iniciadores SSR foi realizada em 72 genótipos da população F₂ e os parentais (as cultivares BRS Nordestina e EBDA MPA-17). No entanto, para a quantificação do teor de óleo na semente foram utilizados apenas 42 desses genótipos. Nesse último caso, o número de

genótipos foi inferior em decorrência da falta de sementes, pois, nem todos os indivíduos da população F_2 produziram sementes.

Desempenho da população F_2 e parentais quanto ao caráter teor de óleo nas sementes

A determinação do teor de óleo, na semente, realizou-se no Laboratório Avançado de Tecnologia em Química da Embrapa Algodão, Campina Grande, Paraíba. A técnica empregada foi a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os procedimentos adotados foram como descritos por Colnago (1996). Para tanto, utilizou-se 25 g de sementes de cada genótipo da população F_2 (42 genótipos) e seus parentais, totalizando 44 genótipos de mamoneira.

Em uma primeira etapa foi realizada a calibração do espectrômetro de onda contínua de 2,7 MHz. Nesse processo, foram usados a farinha e o óleo de mamona como os pontos zero e 100%, respectivamente, foram realizadas as quantificações para os 44 genótipos. Para cada amostra foram inseridas 25 g no sistema de leitura. O teor de óleo foi fornecido automaticamente. Foram feitas três repetições para cada genótipo.

Os resultados foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) e da comparação entre médias múltiplas pelo teste de *Scott Knott* (SCOTT e KNOTT, 1974), a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

Isolamento do DNA genômico

Para o isolamento do DNA genômico, realizaram-se coletas de folhas jovens e saudáveis de 74 genótipos de mamoneira (72 genótipos da população F_2 e os parentais BRS Nordestina e EBDA MPA-17). Essas folhas foram levadas para o laboratório de Marcadores Moleculares do NBIO/UFRB. As folhas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 20%, enxaguada com água destilada em abundância e armazenado em ultra-freezer a -80°C até o momento da extração de DNA.

O DNA genômico foi isolado segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações. Foram macerados, aproximadamente, 300 mg de tecido na presença de nitrogênio líquido. Transferiu-se o macerado para microtubos de 2 mL e foram adicionados 700 µL da solução tampão de extração a 65°C (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP 1,0% e água ultra-pura q.s.p.). As amostras foram homogeneizadas durante 5 minutos e depois foram incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos. As amostras foram homogeneizadas a cada 15 minutos. Decorrido o tempo, foram retiradas do banho-maria e foram adicionadas 700 µL da mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm (em centrífuga *micro high speed refrigerated centrifuge* VS-15000c. FNII). Coletou-se o sobrenadante. As etapas de extração com clorofórmio:álcool isoamílico foram repetidas para uma maior purificação do material. Ao sobrenadante adicionaram-se 400 µL de álcool isopropílico gelado, equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado. A mistura foi incubada a -20°C por 20 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. Ressuspendeu-se o precipitado em 600 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) e adicionaram-se 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M. As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas no gelo por 15 minutos. Decorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 rpm. e o sobrenadante recuperado. Ao sobrenadante adicionaram-se 800 µL de etanol absoluto. As amostras foram incubadas por uma hora a -20°C. Em seguida, centrifugou-se o material por 10 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) e centrifugados por 3 minutos. Depois foi seco e ressuspendido em tampão TE contendo 1 µL de RNase (10 mg/ml), colocado em banho-maria a 37°C durante uma hora. As amostras foram armazenadas em freezer a -28°C.

Quantificação do DNA genômico

Para verificar a integridade e quantidade do DNA extraído, foram adicionados 5 µL de tampão (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol) a 3 µL da amostra. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo. Para a condução da corrente elétrica,

utilizou-se o tampão TBE 1 X (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA). A corrida durou aproximadamente uma hora e vinte minutos a 80 vts. O DNA foi visualizado por meio de luz UV. O gel foi fotodocumentado por meio do sistema digital *Kodak Science*.

Otimização das condições da PCR

Diferentes temperaturas de anelamento (de 60°C a 66°C) foram testadas para otimização do padrão de amplificação de cada par de iniciador. Para tanto, utilizou-se 25 ng de DNA genômico dos parentais (as cultivares BRS Nordestina e EBDA MPA-17) e o genótipo NM3 da população F₂. Para cada par de iniciador, montou-se uma reação-controle contendo todos os componentes da reação de amplificação, exceto o DNA.

Seleção dos pares de iniciadores SSRs

Um total de 27 pares de iniciadores SSR foi utilizado para a genotipagem da população segregante F₂ e seus parentais. Desses 27 pares de iniciadores, 11 foram desenvolvidos por Bajay et al. (2009), 12 por Bajay et al. (2010) e 4 foram desenvolvidos a partir de sequências depositadas em banco de dados de domínio público (GenBank/NCBI). A tabela 1 mostra a caracterização desses pares de iniciadores.

As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 25 µL. Cada reação conteve 5 µL de DNA genômico (5 ng/µL), 2 µL de tampão da enzima 10 X (100 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl), 0,8 µL de dNTP mix (2,5 mM de cada), 0,6 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de cada iniciador (*forward e reverse*, 20 mM) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL - Invitrogen) e água ultra-pura q.s.p.

As reações foram submetidas a uma desnaturação inicial de 1 minuto a 94 °C + 35 ciclos (1 min a 94 °C + 1 min com a temperatura de anelamento específica para cada par de iniciador + 1min a 72 °C) + uma extensão final de 72° por 10 min em termociclador *Biocycler MJ96+/MJ96G (Biosystems)*.

Os pares de iniciadores que amplificaram os locos SSRs foram identificados por meio da eletroforese em gel de agarose a 3%, corado com

brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹). Para a condução de corrente, usou-se o tampão TBE 1 X. Para cada reação, foram adicionados 5 µL de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 60% de glicerol). A corrida durou aproximadamente 3 horas a 80 vts. O DNA foi visualizado por meio de luz UV. O gel foi fotodocumentado por meio do sistema digital *Kodak Science*.

Tabela 1: Pares de iniciadores microssatélites - SSR de *Ricinus communis* L.

Locos	Sequência 5'-3'	Motivo	Amplitude dos segmentos	Autor
Rco2	F: CTAGCTTTGGGGCACAGTC R: GGAAAATAGGTGCGTATGAAAC	(AC) ₁₂	130-152	Bajay et al (2009)
Rco3	F: GATGTGAGCCCATTATGCTG R: TCAGAAAATACCTCTAGGCGACA	(GA) ₂₂	230-240	Bajay et al (2009)
Rco8	F: CGTGTGTCTGTGTGCATGTC R: CCTCAACCCTTTGCTGTTTC	(TG) ₁₀	280-288	Bajay et al (2009)
Rco11	F: GCGTGGACTAACTTCAAGCAR: CCCCATTAGCATCGAGAAAG	(TC) ₁₀ (GT) ₆	240-250	Bajay et al (2009)
Rco12	F: AAGACTGCACCTCCTCCTA R: TGCTGGAACAAACCCTGATA	(TG) ₈ (GA) ₆	220-224	Bajay et al (2009)
Rco13	F: GGTGCTTCCAGAAATTCAGTT R: GGAGGGGAAAGACAGGATTC	(GA) ₂₃	226-254	Bajay et al (2009)
Rco5	F: AGCCCAGAAATTGGAAAAGA R: CAAACCCAAGCAAACCTCA	(TG) ₆ (GA) ₂ 2(GAA) ₄	264-280	Bajay et. al. (2010)
Rco6	F: GGGTGA AAAATGAAGAGATTGG R: ATAACCCGTGAAGCATGGAC	(TG) ₁₁	266-306	Bajay et. al. (2010)
Rco9	F: CCAACTCCCTTGTCTGCAA R: GTGAATGGCAAGCAGCAAT	(AC) ₁₁	170-194	Bajay et. al. (2010)
Rco18	F: AGGGGGATAAGCGTGATATG R: CCGTTATGAAAAGGAAAGCA	(CA) ₁₇	244-256	Bajay et. al. (2010)
Rco20	F: CAAAAGGAATGTGGGACTC R: TGTGGAGAGGATGAAGAGGAA	(TC) ₂₃	300-320	Bajay et. al. (2010)
Rco31	F: ACAATGCGTGTGTCTGTGTG R: CCTCAACCCTTTGCTGTTTC	(TC) ₁₂ (TCT A) ₄ (AC) ₁₀ (AG) ₁₈	250-260	Bajay et. al. (2010)
Rco15	F: CACGCACGTTAAAGCAA ACT R: GCGAAGAAACAAAATGGAG	(AAAC) ₃ (AC)) ₉ (TC) ₅	220-230	Bajay et al (2009)
Rco22	F: ATCCGCCGACAATAGCAGR: GCAACACTCTCTCCCTGAA	(GA) ₁₅ (AG) ₈	240-260	Bajay et al (2009)
Rco23	F: CATGGATGTAGAGGGTCGAT R: CAGCCAAGCCAAGATTTTC	(CT) ₁₉	260-274	Bajay et al (2009)
Rco26	F: TTGCTTGTCAAAGGGGAGTT R: TCATTTTGAGGGAGAAACCA	(GA) ₇	210-220	Bajay et al (2009)
Rco29	F: GGAGAAAAGAAAGGGAGAAGG R: GCCAAAAGCACACTTAATTTGA	(AG) ₁₉	220-240	Bajay et al (2009)
Rco30	F: TGAACCTTTGGAGCTTGGAGA R: GGTCCACACATTCATACACA	(TCT) ₁₁	236-240	Bajay et. al. (2010)
Rco33	F: ACATACATGCAGGGAGACCA R: TCTGCTTTAATGGCTGATCG			

Rco34	F: TCGGTTAAGGGTATGGGTTG R: CACACTTCATTTGCGAGACC	(GT)11	296-306	Bajay et. al. (2010)
Rco35	F: GGAAGAATTGGGTTGGAAGT R: AACAAACACAGGTGCATCAT	(AG)16	290-298	Bajay et. al. (2010)
Rco40	F: AACTGGATAAAGGGTATTTGG R: GCTTTTTGGTAGCAGGTTTGA	(TC)5(CT)7	200-280	Bajay et. al. (2010)
Rco41	F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC R: CGTTCACACTCATCAATCCA	(CT)17(CA)1 1	224-230	Bajay et. al. (2010)
RcoM5	F: AATGAGTCGCAATCTATGAACG R: ATGGTGGAAGAGAATGGCTG	(AAAAGA)3	204	NBIO
RcoM11	F: AACATCCCCTCCACTCACAG R: CCTGACCCTCCTGATTGTTT	(CAA)6	252	NBIO
RcoM17	F: GAAGATTCAACAACACCCCATAA R: CAGCAGAAGAAAAGAAAGGCA	(GAA)8(GA) 13	248	NBIO
RcoM4	F: TCATAACCAACTCCTCACCAGA R: TTGTGATCGTTGTGGCTTGT	(TCCTAC)2 e (GGTAGG)2	274	NBIO

Identificação de locos polimórficos

Trinta por cento do volume de formamida foram misturados aos produtos amplificados. A separação dos fragmentos se deu através de eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida (7%), contendo 5,6 M de ureia em tampão TBE 1 X (Litt et al., 1993). Conduziu-se a eletroforese em uma cuba vertical com capacidade para 80 amostras em gel de 0,4 mm de espessura. Antes da aplicação das amostras, submeteu-se o gel a uma pré-corrida a 60 watts de potência por 40 min. A eletroforese das amostras foi realizada a 70 watts de potência por 2 horas. O gel foi corado com nitrato de prata, seguindo-se quatro passos: 1- fixação do gel com uma solução de etanol 10% e ácido acético glacial 1% com duração de 10 minutos; 2- fixação do gel com uma solução de ácido nítrico a 1% por 5 minutos; 3- coloração do gel por uma solução de nitrato de prata (0,2%) acrescido de formaldeído 37 % por 30 minutos; 4- revelação do gel com uma solução de carbonato de sódio 2% até a visualização das bandas, aproximadamente 5 minutos (CRESTE et al., 2001).

Para confirmação do tamanho esperado dos fragmentos, utilizou-se o padrão de peso molecular de 50 pb (invitrogen). Após seco, o gel foi escaneado em equipamento *HP ScanJet N8460*.

Teste de segregação alélica e correlação de locos com o teor de óleo

A segregação individual de cada loco foi testada por meio do teste qui-quadrado.

Para o estudo da associação entre os locos marcadores e o teor de óleo, foram utilizadas as técnicas de análise de regressão linear múltipla e de correlação linear.

Na análise de regressão linear múltipla, cada loco marcador foi considerado como variável independente e o teor de óleo como variável dependente. Para avaliar o comportamento de todas as variáveis independentes em relação à dependente, foi utilizado o método *stepwise*. As análises foram realizadas pelo programa estatístico R (*R Development Core Team, 2006*).

Para a análise de correlação linear foi estimado o coeficiente de correlação de Spearman, considerando a associação entre os valores dos locos marcadores e o teor de óleo, utilizando o programa estatístico SAS (*SAS Institute Inc., 2003*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantificação do teor de óleo nas sementes da população F₂

Para as médias do teor de óleo nas sementes, o teste F foi significativo a 1% de probabilidade (Tabela 2). Esse resultado mostra que há variabilidade genética entre os genótipos da população F₂ e seus parentais, fato importante dentro de um programa de melhoramento genético da espécie. O coeficiente de variação de 1,00 mostra a boa precisão experimental.

O uso do método de RMN, na determinação quantitativa do óleo, tem-se mostrado adequado para sementes de outras espécies como o girassol (FICK, 1975; LAKSHMINARAYANA et al., 1980), milho (ALEXANDER et al., 1967, MILLER et al., 1981) e a soja (BRIM et al., 1967, COLLINS et al., 1967, BURTON e BRIM, 1981). Esse método também foi eficiente para a mamona como pode ser observado nesse trabalho.

Tabela 2: Análise de variância (ANOVA) para teor de óleo nas sementes dos parentais BRS Nordestina e EBDA MPA-17 e de 72 genótipos da população F_{2:3} de mamoneira. Cruz das Almas, 2011.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GEN	43	462.099618	10.746503	45.445	0.0000
Erro	88	20.809733	0.236474		
Total corrigido	131	482.909352			
CV(%)	1.00				
Média geral:	48.4206061	Número de observações:	132		

O teor de óleo nas sementes apresentou variação entre 44,59% (genótipo NM70) e 54,04% (genótipo NM32) para os genótipos da população F₂ avaliados (Tabela 3). Esses resultados estão de acordo com Vieira e Lima (1998). Segundo esses autores, o teor de óleo nas sementes de mamona pode variar entre 35 e 55%. Entretanto, a maior parte das cultivares plantadas comercialmente no Brasil possui um teor de óleo que oscila entre 45 e 50% (FREIRE et al., 2006). Dessa forma, as médias de teores de óleo de 53,6 e 54,04% obtidos nesse trabalho, são superiores as médias das cultivares comercializadas no Brasil.

Tabela 3: Teor de óleo nas sementes da população F_{2:3} e dos parentais BRS Nordestina e EBDA MPA-17 por meio do método de RMN. Cruz das Almas, 2011.

Genótipos	Teor de óleo%	Genótipos	Teor de óleo%	Genótipos	Teor de óleo%
NM32	54.04 a	NM4	48.89 c	NM27	48.07 d
NM26	53.63 a	NM66	48.85 c	NM13	48.04 d
BRS Nordestina	50.95 b	NM21	48.80 c	NM57	48.02 d
NM24	50.05 c	NM48	48.78 c	NM54	47.87 d
NM18	49.79 c	NM19	48.72 c	NM10	47.74 d
NM3	49.37 c	NM20	48.66 c	NM38	47.69 d
NM8	49.31 c	NM69	48.54 d	NM14	47.60 d
NM53	49.23 c	NM28	48.52 d	NM35	47.41 d
NM51	49.15 c	NM16	48.45 d	NM30	46.84 e
NM56	49.14 c	NM6	48.41 d	NM9	46.71 e
NM41	49.04 c	NM55	48.35 d	NM52	44.95 f
NM47	49.02 c	NM67	48.32 d	NM71	44.76 f
NM49	48.95 c	NM46	48.25 d	NM70	44.59 f

NM23	48.94 c	NM40	48.12 d	EBDAMPA-17	43.00 g
NM59	48.90 c	NM29	48.07 d		

*Medias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de *Scott Knott* a 1% de probabilidade. M1 a M71 genótipos da população F₂ e os parentais Nordeste e EBDA MPA-17.

Os genótipos NM26 e NM32 foram os que apresentaram um maior teor de óleo nas sementes: 53,63 e 54,04%, respectivamente. Esses genótipos superaram o teor de óleo do parental BRS Nordeste (50,95%). Já os genótipos NM70, NM71 e NM52 apresentaram os menores teores de óleo (44,59%, 44,76% e 44,95%, respectivamente). No entanto, o teor de óleo para esses genótipos foi superior ao parental EBDA MPA-17 (43%). A cultivar EBDA MPA-17 é o parental com a menor média de teor de óleo na semente.

Assim, os resultados mostram que o cruzamento entre as cultivares BRS Nordeste e EBDA MPA-17 (cultivares divergentes para o caráter teor de óleo na semente) proporcionou a obtenção de variabilidade para o caráter entre os genótipos da referida população. E também, os resultados apontam os genótipos NM26 e NM32 como promissores para o programa de melhoramento genético da mamoneira.

Resultados similares foram relatados por Porto et al. (2008). Esses autores avaliaram o teor de óleo na semente de mamona em 18 genótipos obtidos por autofecundação. Eles observaram que 11 desses genótipos apresentaram aumento relativo na média de teor de óleo, sendo que essas médias variaram de 46,09 a 56,46% (PORTO et al., 2008).

Um total de 78 genótipos de mamona do banco de germoplasma - BAG da Embrapa Clima Temperado em Pelotas, RS - apresentou uma alta variabilidade para o caráter teor de óleo na semente. Esse teor variou entre 37,84 e 51,55% para esses genótipos (MOREIRA et al., 2008).

Foi avaliado o teor de óleo na semente de dez genótipos de linhagens avançadas e de cultivares de *R. communis* L que foram plantados em altitude inferior a 300 m. O trabalho foi conduzido nos Municípios de Carnaubais, RN (60 m), Maranguape, CE (140 m) e Quixeramobim, CE (280 m). O teor de óleo nas sementes não variou significativamente entre os locais. Porém, houve variação no teor de óleo entre os genótipos analisados (entre 43 e 46,9%) (SEVERINO, et al., 2006).

A variação do teor de óleo avaliado nas sementes da população F_{2:3} no presente trabalho sugere que o cruzamento entre as cultivares BRS Nordestina e EBDA MPA-17 favoreceu a obtenção de genótipos superiores para o caráter teor de óleo nas sementes. Fato que pode ser explicado pela divergência genética entre os parentais para o caráter teor de óleo na semente, com média de 50,95% para BRS Nordestina e 43% para EBDA MPA-17, com surgimento de genes transgressivos com a hibridação superando o genótipo do maior pai.

De acordo com Lopes et al. (2002), o avanço de gerações por autofecundação tem a finalidade principal de desenvolver genótipos homozigóticos, que aumentam a eficiência dos testes de desempenho agrônômico, quando estão livres das combinações alélicas heterozigóticas e quando têm fixadas as combinações epistáticas favoráveis. Por outro lado, o avanço das gerações de autofecundação tem como desvantagem o aumento do número de anos de cada ciclo do programa de melhoramento e da demanda de recursos humanos e financeiros. Essas limitações poderiam ser contornadas pela eficaz escolha dos parentais, bem como pela avaliação e pela seleção dos genótipos promissores logo nas gerações iniciais e pela seleção assistida por marcadores moleculares. Isso permitiria que apenas os genótipos selecionados fossem avançados até obtenção de linhagens superiores (LOPES et al., 2002).

Genotipagem da população F₂ de *Ricinus communis*.

As temperaturas de anelamento oscilaram entre 62°C a 66° C, em função do par de iniciadores SSRs específicos utilizado (Tabela 4).

Tabela 4: Iniciadores SSR e temperatura de anelamento (Ta).

Iniciadores Ta	Rco2 62°C	Rco3 62°C	Rco8 62°C	Rco11 63°C	Rco12 63°C	Rco13 63°C	Rco5 64°C	Rco6 62°C	Rco9 66°C
Iniciadores Ta	Rco18 62°C	Rco20 64°C	Rco31 62°C	Rco15 62°C	Rco22 62°C	Rco23 63°C	Rco26 62°C	Rco29 62°C	Rco30 66°C
Iniciadores Ta	Rco33 62°C	Rco34 63°C	Rco35 63°C	Rco40 63°C	Rco41 63°C	RcoM5 62°C	RcoM11 62°C	RcoM17 63°C	RcoM4 62°C

Todos os 27 pares de iniciadores SSR testados geraram fragmentos com bom padrão de amplificação e tamanhos esperados. A figura 1 apresenta os locos SSR amplificados pelos pares de iniciadores Rco11, Rco12, Rco13, Rco15, Rco22, Rco23, Rco26, Rco29 e Rco30.

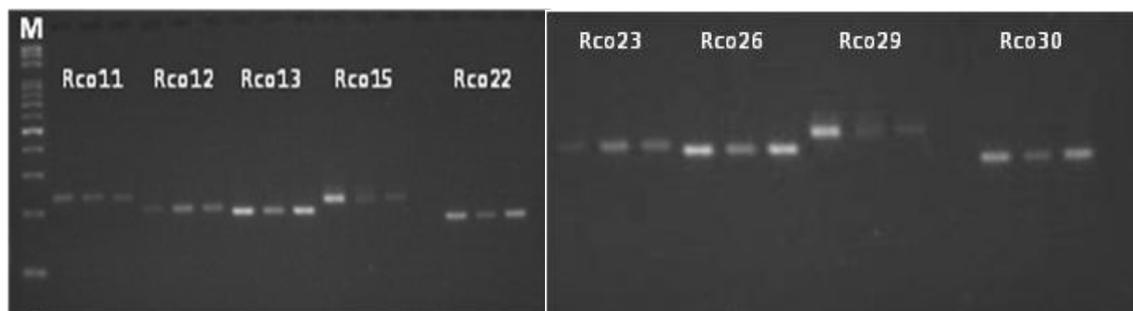


Figura 1: Perfil eletroforético, em gel de agarose 3%, obtido a partir da amplificação do DNA genômico de *Ricinus communis* L por meio de iniciadores SSR. Em M: marcador de peso molecular 100 pb. Para cada par de iniciador, utilizou-se DNA de dois parentais (cultivares BRS Nordeste e EBDA MPA-17) e o genótipo M3 da população F₂.

Onze locos foram polimórficos (49,7%) para os parentais e mais os 72 genótipos da população F₂ de um total de 27 locos amplificados. Os locos polimórficos foram Rco2, Rco5, Rco6, Rco8, Rco20, Rco23, Rco11, Rco29, RcoM5, RcoM11 e RcoM17. A figura 2 mostra três locos amplificados utilizando os pares de iniciadores RcoM17, Rco11 e Rco29.

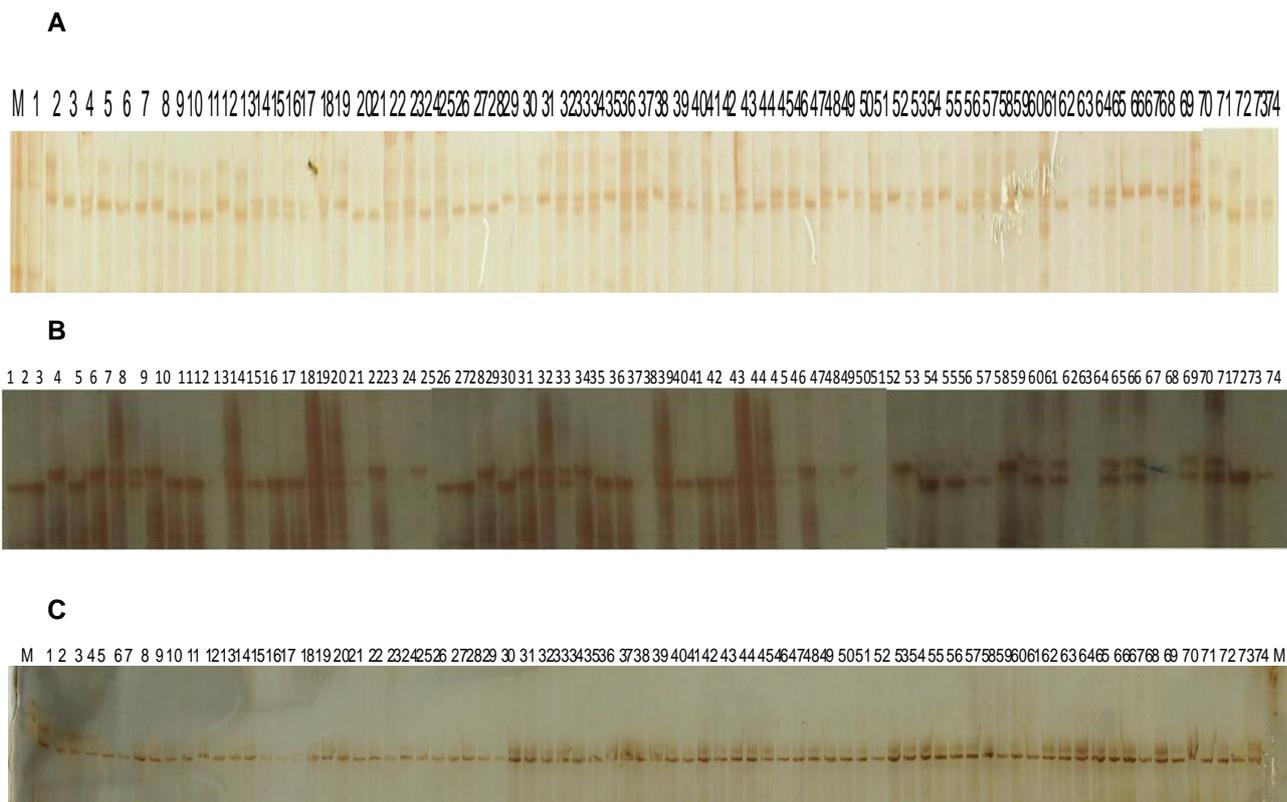


Figura 2: Locos SSR de mamoneira. Em A, B e C locos amplificados através dos pares de iniciadores RcoM17, Rco11 e Rco29, respectivamente; M=marcador de peso molecular de 50 pb; 1 e 2 = parentais BRS Nordestina e EBDA MPA-17, respectivamente; De 3 a 74 genótipos da população F₂.

Resultado similar foi encontrado por Qui et al. (2010). De 379 locos EST-SSRs analisados, em 24 amostras de mamona coletadas de diferentes países, somente 118 foram polimórficos (31,13%). Pranavi et al. (2011) genotipou, por sua vez, nove híbridos comerciais de mamona, utilizando 92 marcadores EST-SSR e apenas 9 foram polimórficos (9,72%).

Uma porcentagem maior de locos polimórficos para mamoneira foi encontrada por Bajay (2009). Esse autor genotipou 38 acessos de mamona pertencentes ao banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 76 ao Instituto Agrônomo de Campinas e 35 a UNESP de Botucatu. Foi identificado um total de 41 locos, destes 26 polimórficos (63,4%). Vinte e três desses pares de iniciadores foram utilizados neste trabalho. Entretanto, apenas 9 foram polimórficos para os genótipos aqui analisados. Esse resultado pode ser explicado por se tratar de uma população altamente aparentada oriunda da hibridação entre duas cultivares com baixa divergência genética para vários caracteres, entretanto divergentes para o teor de óleo. Para

Foster et al., (2010), em culturas economicamente importantes, é comum a perda da diversidade genética por causa do processo de domesticação de plantas. Esse processo envolve intensa seleção para um número limitado de fenótipos específicos.

Um total de 22 alelos foi identificado a partir dos 11 locos polimórficos. Cada loco apresentou somente 2 alelos. Esse resultado está de acordo com o esperado, pois, em uma população segregante oriunda do cruzamento entre dois parentais diploides, podem-se encontrar, no máximo, quatro alelos. Não obstante, para a identificação dos quatro alelos em uma população segregante, faz-se necessário que os dois parentais sejam heterozigotos para os locos detectados.

Na obtenção da população segregante, foram utilizadas cultivares como parentais. Em geral, cultivares comerciais apresentam alto grau de homozigose para a maioria dos locos. Esse alto grau de homozigose é decorrente do processo de seleção para o melhoramento.

Doze dos 27 pares de iniciadores SSR utilizados, nesta pesquisa, são os mesmos empregados na caracterização de 38 acessos de mamona pertencentes ao germoplasma da EMBRAPA. Nessa caracterização, os doze locos foram polimórficos. O número de alelos variou de 2 a 6 com uma média de 3,3 alelos por locos (BAJAY et al., 2009).

Qui et al. (2011) identificaram 350 alelos a partir de 118 locos (EST-SSR) polimórficos para mamona. Esses 118 locos variaram entre 2 a 6 alelos por locos com uma média de 2,97 alelos.

Os 11 locos polimórficos analisados não segregaram na proporção esperada de 1:2:1. Tal distorção pode estar relacionada ao fato de a população ser pequena.

Quando um dado marcador não segrega mendelianamente, deve ser desconsiderado da análise. Contudo, a título de informação, realizou-se a regressão múltipla para todos os locos. O valor de r^2 foi de 26% (Figura 3). O método *Stepwise* finalizou com apenas dois locos marcadores Rco2 ($p < 0,11681$) e Rco6 ($p < 0,01802$) com valor de r^2 de 23,5% (Figura 3). O coeficiente de correlação de *Spearman* não foi significativo a 5% de probabilidade pelo teste t.

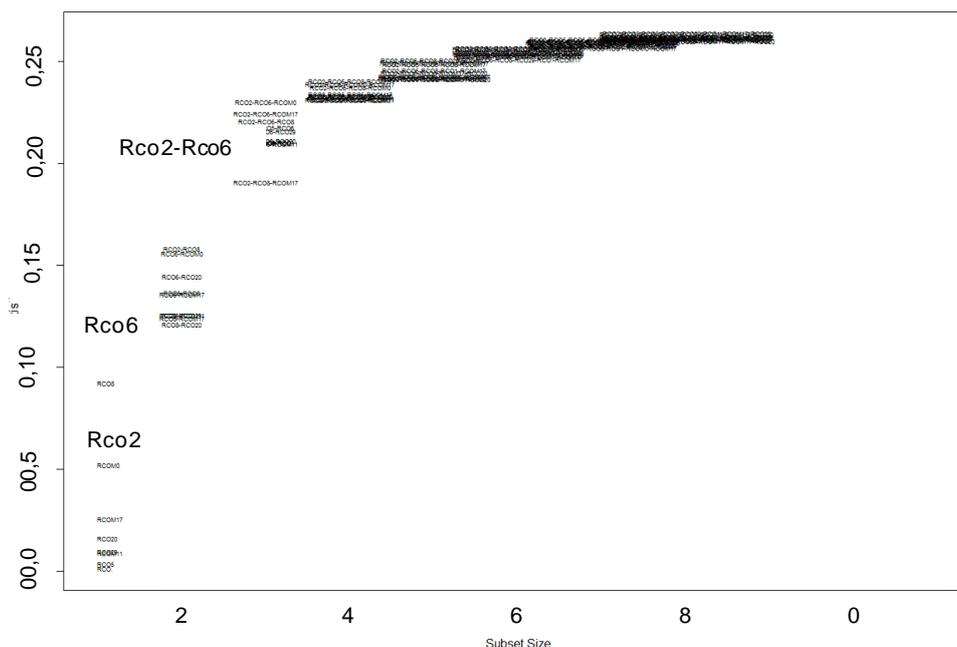


Figura 3: Associação conjunta dos locos Rco6 e Rco2 na variação fenotípica para teor de óleo na semente da população F₂ de mamoneira.

A análise de regressão múltipla e a correlação de *Spearman* foram aplicadas para verificar a magnitude do efeito fenotípico da ligação entre o loco/teor de óleo. No entanto, a baixa amplitude dos dados de teor de óleo, o pequeno número de marcas e a distorção da segregação mendeliana dificultam associações mais fortes.

Para haver uma melhor associação de marcadores com o caráter teor de óleo na semente, é necessária a obtenção de uma população maior e de um número maior de marcadores polimórficos.

A genotipagem de uma população grande, com análise de um número elevado de locos, pode ser facilitada por meio da montagem de um *bulk*, que deve conter genótipos contrastantes para o fenótipo em estudo.

Estudos recentes sobre a diversidade genética por meio de marcadores moleculares têm mostrado que a espécie *Ricinus communis* L apresenta limitada diversidade genética (PRANAVI et al., 2011; RIVAROLA et al., 2011; FOSTER et al., 2010; QUI et al. 2010).

Marcas moleculares associadas a caracteres de interesse são ferramentas essenciais para a aplicação da seleção assistida por marcadores. No entanto, espécies de plantas com baixa diversidade genética, como é o caso da *R. Communis* (FOSTER et al., 2010), demandam um esforço maior para que se

consiga alcançar um número suficiente de marcadores que permita correlacioná-los a um caráter quantitativo, a exemplo do teor de óleo na semente. Dessa forma, faz-se mister a identificação de um maior número de marcadores polimórficos na população segregante de mamoneira para que se tenha êxito na correlação entre marcadores e o caráter de interesse.

CONCLUSÕES:

Há variabilidade genética entre os genótipos da população F_2 e seus parentais para o caráter teor de óleo na semente.

Os pares de iniciadores Rco2, Rco5, Rco6, Rco8, Rco20, Rco23, Rco11, Rco29, RcoM5, RcoM11 e RcoM17 foram eficientes para identificação de locos polimórficos na população F_2 , oriunda dos parentais BRS Nordestina e EBDA MPA-17, de *Ricinus communis*.

Faz-se necessária a identificação de um maior número de locos polimórficos que possibilite a associação de marcadores SSR a uma caráter fenotípico, a exemplo do teor de óleo na semente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, D. E.; SILVELA, S. L.; COLLINS, F. I. e RODGERS, R. C. Analysis of oil content of maize by wide-line NMR. **Journal of American Oil Chemists Society**, 44, 555-558, 1967.

ALMEIDA, O. A. **Informações meteorológicas do CNP: Mandioca e Fruticultura tropical**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA – CNPMF. 1999. 35 p. (EMBRAPA – CNPMF. Documentos, 34).

BAHIA, H. F.; SILVA, S. A., FERNANDEZ, L. G., L. C. A. DA S.; M. R. F. C. Divergência genética entre cinco cultivares de mamoneira. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.3, p.357-362, 2008.

BAJAY, M. M.; ZUCCHI, M. I.; KIIHL, T. A. M.; BATISTA, C. E. A.; MONTEIRO, M.; PINHEIRO, J. B. Development of a novel set of microsatellite markers for castor bean, *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**: e1–e3, 2011.

BAJAY, M. M. **Desenvolvimento de marcadores microssatélite e caracterização do banco de germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.)**. ESALQ-USP. 96 p, São Paulo, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração Genética e Melhoramento de plantas).

BAJAY, M. M.; PINHEIRO J. P.; BATISTA, C. E. A.; NÓBREGA, M. B. M.; ZUCCHI M. I. Development and characterization of microsatellite markers for castor (*Ricinus communis* L.), an important oleaginous species for biodiesel production. **Conservation Genetic Resources**, Durham, 2009. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/t6677g608151t1l3/>>. Acesso em: 25/08/10. As 16h38min.

BARBOSA-NETO. Progresso genético no melhoramento de aveia no sul do Brasil. In: **Reunião da Comissão BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA**, 19. 1999, Porto Alegre. Resultados experimentais. Porto Alegre: UFRGS, 1999. P. 23-26.

BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, C. L.; VASCONCELOS, O. L.; AZEVEDO, D. M. P. de.; VIEIRA, D. J. Fitologia. In: AZEVÊDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa-Algodão, cap. 2, p. 37-61, 2001.

BEZERRA NETO, F.; NUNES, G. H. S.; NEGREIROS, M. Z. Avaliação de procedimentos de comparações múltiplas em trabalhos publicados na revista Horticultura Brasileira de 1983 a 2000. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 05-09, 2002.

BORÈM, A. e MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2009.

BRIM, C. A.; SCHULTZ, W. M.; COLLINS, F. I. Nuclear magnetic resonance analysis for oil in soybeans *Glycine max* (L.) Merrill, with implications in selection. **Crop Science**, 7:220-222, 1967.

BURTON, J. W.; BRIM, C. A. **Recurrent selection in soybeans**. III. Selection for increased percent oil in seeds. **Crop Science**, 21(1):31-34, 1981.

CHAN, A. P.; CRABTREE, J. T.; ZHAO, Q. I.; LORENZI, H.; ORVIS, J.; PUIU, D.; MELAKE-BERHAN, A.; JONES, K. M.; REDMAN, J.; CHEN, G.; CAHOON, E.; GEDIL, M.; STANKE, M.; HAAS, B. J.; WORTMAN, J. R.; FRASER-LIGGETT, C. M.; RAVEL, RABINOWICZ, J. P. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. **Nature biotechnology**, 28 (9), 951-956, 2010.

COLLINS, F. J.; ALEXANDER, D. E.; RODGERS, R. C.; SILVELA, S. L. Analysis of oil content soybeans by wide-line NMR. **Journal of American Oil Chemists Society**, 44:708-710, 1967.

COLNAGO, L. A. **Análise do teor de óleo em sementes por RMN**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 13 p., Circular Técnica, 3, 1996.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19: 299-306, 2001.

DOYLE, J. J. e DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, 12:13–15, 1990

FEDERIZZI, L. C. Estrutura de um programa de melhoramento de plantas e possíveis aplicações de marcadores moleculares: visão do melhorista. In:

MILACH, S. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: S. C. K. Milach, 1998. p. 3-15

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium (Lavras)**, v. 6, p. 36-41, 2008

FERREIRA, M. A. J. da F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 63p. (Embrapa Roraima. Documentos, 1), 2003.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. EMBRAPA - CENARGEN, Brasília, 220 p., 1995.

FREIRE, M. M.; SOUSA, R. L.; SALDANHA, L. Avaliação da Qualidade do Óleo de Mamona de Diferentes Genótipos. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA. **Anais**. Campina Grande, 2006.

FICK, G. N. Heritability of oil content in sunflowers. **Crop Science**, 15:77-78,1975.

FOSTER, J. T.; ALLAN, G. J; CHAN, A. P.; RABINOWICZ, P. D.; RAVEL, J.; JACKSON, P. J.; KEIM, P. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). **BMC Plant Biology**,10:13, 2010. <http://www.biomedcentral.com>.

LAKSHMINARAYANA, M. R.; SEETHARAM, A.; RAMANATHAN, K. V. e KHETRAPAL, C. L. NMR Study of the oil build-up in sunflowers seeds. **Current Science**, 49(8):308-309,1980.

LITT, M.; HAUGE, X.; SHARMA, V. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. **BioTechniques** v.15, p.280-284, 1993.

LOPES, A. C. DE A.; VELLO, N. A.; PANDINI, F.; ROCHA, M. DE M.; TSUTSUMI, C. Y. variabilidade e correlações entre caracteres em cruzamentos de soja. **Scientia Agricola**, v.59, n.2, p.341-348, 2002

MILLER, R. L.; DUDLEY, J. W.; ALEXANDER, D. E. High intensity selection for percent oil in corn. **Crop Science**, 21(3):433-437, 1981.

MOREIRA, L. L.; ÁVILA, T. T. de; LEMÕES, J. S.; CASAGRANDE JÚNIOR, J. G.; SILVA, S. D. dos A. e. VARIABILIDADE DE ACESSOS DE MAMONA PARA PESO E TEOR DE ÓLEO DAS SEMENTES III congress Brasileiro de Mamona: Energia e Ricinoquímica. **Anais**. Salvador, de 04 a 07 de agosto de 2008.

PRANAVI, B., SITARAM, G; YAMINI, K. N.; DINESH, K. V. Development of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.) and their utilization for genetic purity testing of hybrids. **Genome**, 54 (8), 684-91, 2011.

PALMIERI, D. A.; MAIA, L. C. Marcadores microssatélite para estudos genéticos em mamona (*Ricinus communis* L.) e pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). In: Congresso Internacional de Agroenergia e Biocombustíveis, **Anais**. Teresina, PI. p. 138-138, 2007

POWELL, W.; MACHRAY, G.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci**, 1: 215–222, 1996.

PORTO, M. S.; MACEDO, F. da C. de O.; DANTAS, F. V.; MILANI, M. Teor de óleo em genótipos de mamona autofecundados. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, Salvador - Bahia, 2008. **Anais...** Salvador 2008.

QIU, L.; YANG, C.; TIAN, B. YANG, J.; LIU, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.). **BMC Plant Biology**, 10:278, 2010, <http://www.biomedcentral.com>.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2006.

RIVAROLA, M.; FOSTER, J. T.; CHAN, A. P.; WILLIAMS, A. L.; RICE, D. W.; LIU, X.; MELAKE-BERHAN, A.; CREASY, H. H.; PUIU, D.; ROISOVITZ, M. J.; KHOURI, H. M.; BECKSTROM-STERBERG, S.M.; ALLAN, G. J.; KEIM, P.; RAVEL, J.; RABINOWICZ, P. D. Castor Bean Organelle Genome Sequencing and Worldwide Genetic Diversity Analysis. **PLoS ONE** 6(7): 2011, e21743. doi:10.1371/journal.pone.0021743,

SANTOS, R. F. dos; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. de T.; REQUIÃO, L. E. G. Análise Econômica. In: Azevêdo, D. M. P. de; Lima, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Algodão. p. 17-35, 2001.

SAS Institute Inc. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.1 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2003.

SAVY FILHO, A. **Melhoramento da Mamona**. In BORÉM, A. (ed.): Melhoramento de Espécies Cultivadas. Viçosa: UFV, 817p., 1999.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; MORAES, C. R. de A.; GONDIM, T. M. de S.; CARDOSO, G. D. Avaliação da produtividade e teor de óleo de dez genótipos de mamoneira cultivados em altitude inferior a 300 metros. **Revista Ciência Agronômica**, v.37, n.2, p.188-194, 2006

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507 - 512, Sept. 1974.

VARGAS, D. M. S. **Mamona (*Ricinus communis* L.): cultura de antera, viabilidade e conservação de pólen**. Universidade Federal de Pelotas. 98 p. Pelotas, 2006. Dissertação de Mestrado.

VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. Diagnóstico e perspectivas da mamoneira no Brasil. In: Reunião temática matérias-primas oleaginosas no Brasil, 1997, Campina Grande. **Anais**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA/MAA/ABIOVE, 1997. p.139-150.

VIEIRA, R. M. e LIMA, E. F. **Importância socioeconômica e melhoramento genético de mamoneira no Brasil**. In: Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste do Brasil, 1998, Petrolina. Simpósio de Recursos Genéticos e Melhoramento de para o Nordeste do Brasil, 1998.

CAPÍTULO 4

DESENHO E OTIMIZAÇÃO DE INICIADORES MICROSSATÉLITES PARA *Ricinus communis* L.¹

¹ Artigo a ser ajustado para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico: Conservation Genet Resour.

DESENHO E OTIMIZAÇÃO DE INICIADORES MICROSSATÉLITES PARA *Ricinus communis* L.

Autor: Edna Lôbo Machado

Orientadora: Profa. Dra. Simone Alves Silva

Co-orientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

RESUMO: Este trabalho teve como objetivos o desenho e a otimização de iniciadores SSR para *Ricinus communis* L. a partir de sequências depositadas em banco de domínio público (GenBank/NCBI). Para tanto, regiões genômicas, contendo os microssatélites, foram identificadas e o desenho dos pares de iniciadores realizado por meio do aplicativo da web, Websat. A qualidade do desenho dos iniciadores foi verificada por meio do aplicativo web NetPrimer. Para a otimização das condições de PCR, diferentes concentrações de DNA, cloreto de magnésio e temperatura de anelamento (TA) foram testadas. Um total de 30 pares de iniciadores SSR foi desenhado e sintetizado. Os pares de iniciadores apresentaram porcentagem média de GC igual a 47,29% e os tamanhos dos produtos amplificados variaram entre 128pb a 381pb. Dos trinta pares de iniciadores SSR desenhados, 29 (96,7%) foram validados com sucesso. Os marcadores microssatélites aqui desenvolvidos representam um acréscimo significativo no número de marcadores moleculares para a mamoneira para fins de aplicação no estudo de diversidade genética e estrutura de populações, seleção de parentais para hibridação em programa de melhoramento e identificação de locos de características quantitativas (QTLs) associados a características de interesse agrônomo.

Palavras-chave: Marcadores SSR, Melhoramento genético, mamoneira.

DESIGN AND OPTIMIZATION OF MICROSATELLITE PRIMERS FOR *Ricinus communis* L.

Author: Edna Lôbo Machado

Adviser: Prof. Dr. Simone Alves Silva

Co-adviser: Dr. Cláudia Fortes Ferreira

ABSTRACT: The objective of the present work was to design and optimize SSR primers for *Ricinus communis* L. from sequences deposited in public data banks (GenBank/NCBI). Genomic regions containing microsatellites were identified and primer pairs designed by the Websat web application. The quality of the primer design was verified using the NetPrimer web application. For the optimization of PCR conditions, different DNA, magnesium chloride and annealing temperatures (Ta), were tested. A total of 30 primer pairs were designed and synthesized. The primer pairs presented average percentage of GC of 47.29% and sizes of amplified fragments varied from 128 bp to 381 bp. Of the 30 SSR primers designed, 29 (96.7%) were successfully validated. The SSR markers developed represent a significant increase in the number of molecular markers in castor beans to be used in genetic diversity, population structure and parental selection in the castor bean genetic breeding program and identification of quantitative trait loci (QTLs) associated to agronomically important traits.

Key-words: SSR markers, Genetic breeding, Castor beans.

INTRODUÇÃO

Pertencente à família Euphorbiaceae, a mamoneira (*Ricinus communis*) é uma oleaginosa de grande importância econômica, principalmente, pelo seu alto teor de óleo na semente e pela facilidade com que pode ser cultivada em regiões áridas e semi-áridas do mundo (GOVAERTS et al., 2000). Trata-se de uma planta perene sendo encontrada em regiões tropicais e subtropicais do mundo (SEO et al., 2011).

A mamoneira é diploide, ou seja, contém um conjunto cromossômico de $2n=2X=20$. Sua reprodução acontece tanto por fecundação cruzada quanto por autofecundação.

Cerca de 90% do óleo das sementes de mamona é composto pelo ácido ricinoléico, um ácido graxo incomum aos vegetais. A grande concentração de ácido ricinoléico confere ao óleo das sementes da mamoneira propriedades químicas únicas, o que leva à alta valorização dessa cultura (da SILVA et al., 1984). O óleo da mamoneira é utilizado na fabricação de lubrificantes de peças de avião, cosméticos, aplicações médicas e outros químicos (da SILVA et al., 2006). Há relatos de que o óleo de mamona foi usado primeiramente como uma pomada há 4.000 anos no Egito, de onde se espalhou para outras partes do mundo, incluindo Grécia e Roma, onde foi usado como um laxante há 2.500 anos (SCARPA e GUERCI, 1982). O óleo da mamona também tem sido proposto como uma fonte potencial para produção de biodiesel (JEONG e PARK, 2009).

No Brasil, o melhoramento genético da mamoneira já permitiu um grande avanço na tecnologia de produção dessa oleaginosa, destacando-se o desenvolvimento de cultivares com alto teor de óleo na semente, mais produtivas, adaptadas a diversas regiões do país, apropriadas para diferentes tecnologias de colheita e resistentes a algumas doenças (FREIRE et al., 2001). Entre as demandas atuais para o melhoramento genético da mamona no Brasil, inclui-se a adaptação de genótipos à baixa altitude, o que permitirá a inclusão sustentável de

muitos municípios onde o cultivo não é recomendado pelo risco de obtenção de baixas produtividades.

Ao ser assistida por marcadores moleculares, a seleção de plantas com resistência/tolerância a patógenos e com um maior teor de óleo nas sementes pode eliminar certos aspectos indesejáveis da seleção puramente fenotípica, o que melhora a eficiência do processo. Isso porque os marcadores não são influenciados pelo ambiente e são transmitidos de forma mendeliana. Com o auxílio de marcadores moleculares, a seleção pode ser feita precocemente, de forma não destrutiva, diminuindo os custos e acelerando o programa de melhoramento genético da cultura (FUGANTI et al., 2004).

Microssatélites, ou sequências simples repetidas (*SSR-Simple Sequence Repeats*), compõem-se por sequências de um a seis pares de base de comprimento. Essas sequências são repetidas em tandem, abundantes e dispersas por todo o genoma dos organismos eucariotos.

As variações de microssatélites originam-se de mutações, cujo mecanismo mais comum é o deslizamento ou *slippage* da DNA polimerase durante a replicação do DNA. O deslizamento é um processo que envolve adição ou remoção de um ou mais nucleotídeos. Além desse mecanismo, outros também podem ser considerados responsáveis por mutações, tais como *crossing over* desiguais, substituições de nucleotídeos ou eventos de duplicação (LEVINSON e GUTMAN, 1987; HANCOCK, 1999).

Os marcadores SSR são bastante úteis em estudos de diversidade e mapeamento genético, pois não apenas são locos específicos, mas também geram grande número de alelos por loco e possuem caráter co-dominante.

Até o momento, o número de microssatélites disponíveis para *R. communis* é bastante baixo, necessitando do desenvolvimento de novos marcadores SSR para serem usados no programa de melhoramento da cultura. Entretanto, com o avanço das técnicas de NGS (*Next Generation Sequencing*), o sequenciamento do genoma de espécies de interesse econômico tem viabilizado, a custos relativamente baixos, o desenvolvimento de iniciadores capazes de amplificar regiões ricas em microssatélites. Este é o caso do *Ricinus communis* (CHAN et al., 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou o desenho de iniciadores SSR para *Ricinus communis* L, a partir de sequências depositadas em banco de

domínio público (GenBank/NCBI), bem como a sua otimização. Objetivou, ainda, a seleção de iniciadores polimórficos por meio da genotipagem de três cultivares (BRS Nordestina, EBDA MPA-17 e Sipeal 28) da cultura. Tais iniciadores poderão ser utilizados, no futuro, para avaliar populações segregantes derivadas desses cruzamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho dos oligonucleotídeos de DNA

Com a finalidade de identificar regiões contendo microssatélites e de desenhar iniciadores *Forward* e *Reverse*, foram utilizadas as sequências do genoma de *Ricinus communis* L. que se encontram depositadas no GenBank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=AASG02>) no formato FASTA. Após, a identificação das regiões genômicas que contém os microssatélites e os desenhos dos pares de iniciadores que flanqueiam essas regiões foram feitos utilizando-se o aplicativo web Websat (MARTINS et al., 2009, <http://wsmartins.net/websat/>). Os parâmetros utilizados na identificação de SSRs foram os seguintes: SSR composto por motivos di-nucleotídeos com no mínimo sete repetições por motivo; SSR compostos por motivos tri, tetra e penta-nucleotídeos com no mínimo cinco repetições; e SSR compostos por hexa-nucleotídeos com no mínimo três repetições do motivo.

Com a finalidade de realizar a padronização das reações de PCR, utilizaram-se os seguintes critérios: (i) o produto final da amplificação deveria estar no intervalo de 150 a 300 pb, que é um tamanho compatível com eletroforese em géis de poliacrilamida a 7% corados com nitrato de prata; (ii) os tamanhos dos iniciadores deveriam estar entre 19 a 22 pb; (iii) a porcentagem de GC deveria estar no intervalo de 40 a 60%; (iv) a t_m deveria estar entre 55 a 62°C e com diferença máxima de 1°C entre os iniciadores de cada par.

A qualidade do desenho dos iniciadores, que flanqueiam as regiões microssatélites, foi verificada por meio do aplicativo web NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Esse aplicativo pode não somente confirmar os valores acima, mas também acusar a formação de estruturas

secundárias (auto-anelamento, ou dímeros, anelamento cruzado ou formação de grampos), que são indesejáveis se ocorrerem em temperaturas próximas das de reação de PCR. Dessa maneira, foi possível avaliar a qualidade de cada par de iniciador a ser obtido. Os mais adequados foram selecionados para as reações de PCR.

Material vegetal

Neste experimento foram utilizadas as cultivares BRS Nordestina, EBDA MPA17 e Sipeal 28. Essas cultivares foram escolhidas por se tratarem de parentais utilizados em processo de hibridações para geração de populações segregantes no programa de melhoramento genético da mamona do NBIO (Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia) da UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia).

Para o isolamento do DNA genômico, foram realizadas coletas de folhas jovens e saudáveis das 3 cultivares. Esse material foi desinfestado em solução de hipoclorito de sódio a 20%, enxaguado com água destilada em abundância e armazenado em ultra-freezer a -80°C até o momento da extração de DNA.

Extração de DNA

A extração de DNA das três cultivares foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). Para tanto, foram macerados aproximadamente 300 mg de tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, transferiu-se o macerado para microtubos de 2 mL e adicionou-se 700 µL do tampão de extração a 65°C (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP 1,0% e água ultra-pura q.s.p.). As amostras foram homogeneizadas suavemente por inversão durante 5 minutos e incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Decorrido o tempo, as amostras foram retiradas do banho-maria e adicionaram-se 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O material foi homogeneizado suavemente e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm (em centrífuga *micro high speed*

refrigerated centrifuge VS-15000c. FNII). Logo após, coletou-se o sobrenadante, que foi transferido para novos tubos devidamente identificados. Para uma maior purificação do material, as etapas de extração com clorofórmio: álcool-isoamílico foram repetidas. Ao sobrenadante foram adicionados 400 μL de álcool isopropílico gelado, o que equivale a aproximadamente 2/3 do volume coletado. As amostras foram homogeneizadas suavemente e incubadas a -20°C por 20 minutos. Centrifugou-se o precipitado por 10 minutos a 12.000 rpm. Ressuspendeu-se o DNA em 600 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) e adicionado-lhe 200 μL de acetato de amônio a 7,5 M. Para homogeneizar a solução, as amostras foram misturadas suavemente por inversão e incubadas no gelo por 15 minutos. Decorrido esse tempo, centrifugou-se o material por 15 minutos a 12.000 rpm. Transferiu-se, então, o sobrenadante para tubos novos de 2 mL, adicionando-lhe 800 μL de etanol absoluto. Em seguida, incubaram-se as amostras por uma hora a -20°C . Logo após, centrifugou-se o material por 10 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% (v/v) e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 12.000 rpm. Depois o precipitado foi seco e ressuspendido em tampão TE contendo 1 μL de RNase (10 mg/mL). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C durante uma hora. Finalmente, as amostras foram armazenadas em freezer a -28°C .

Quantificação do DNA genômico

Para a avaliação da qualidade e quantidade do DNA extraído, um total de 3 μL do DNA foi adicionado a 5 μL de solução corante (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) e submetido à eletroforese por aproximadamente uma hora e vinte minutos a 80 vts. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa com um DNA de concentração conhecida, DNA lambda-Invitrogen (Figura 1). A fim de realizar as reações de amplificação, diluíram-se as amostras em tampão TE para ajuste de sua concentração (5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Figura 1b).

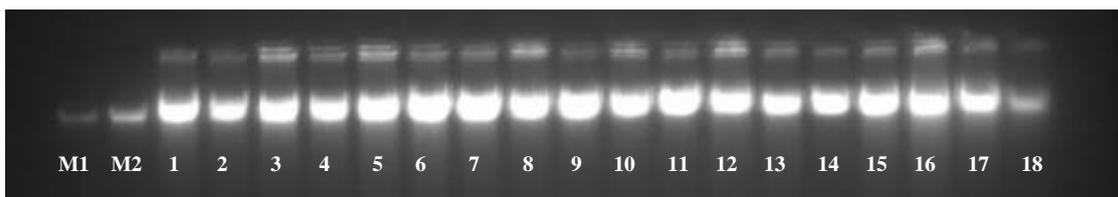


Figura 1a: DNA Genômico de *Ricinus communis* visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$). As duas primeiras bandas são M1=100 e M2=200ng, respectivamente, de DNA lambda. 1 a 18: DNA genômico de 18 indivíduos da população F_2 .

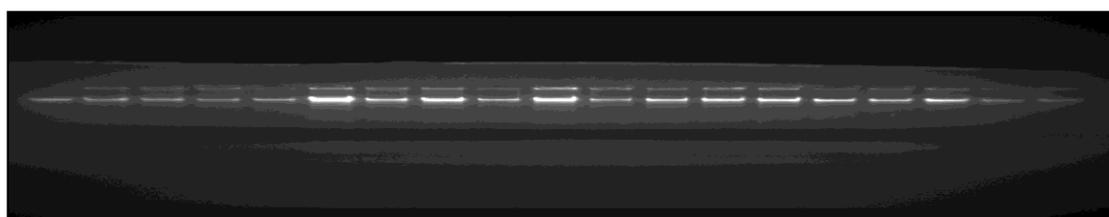


Figura 1b: DNA Genômico de *Ricinus communis* visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$). A primeira banda é M1= 50 ng, de DNA lambda. 1 a 18: DNA genômico de 18 indivíduos da população F_2 .

Otimização dos iniciadores microssatélites (SSR)

Os pares de iniciadores SSR (*Forward e Reverse*) desenhados foram sintetizados pela empresa Invitrogen-USA na escala de 25 nmol. Diferentes concentrações de DNA, cloreto de magnésio, iniciadores, dNTPs e temperatura de anelamento (T_a) foram testados para que a obtenção de melhores condições de amplificação dos fragmentos desejados e livres de bandas inespecíficas (Tabela 1).

Tabela 01: Concentrações dos componentes e temperaturas de anelamento utilizadas nos testes de amplificação por meio da PCR

Componentes	Concentrações testadas						
	50 ng	25 ng					
DNA	50 ng	25 ng					
Tampão	1 X						
MgCl ₂	1,5 mM	1,3 mM	1,2 mM	1 mM			
Iniciadores <i>F e R</i>	0,8 mM de cada	0,4 mM de cada					
dNTPs	0,1 mM	0,8 mM					
Taq	1 U/μL						
Ta °C.	55	58	60	61	62	63	64

As amplificações, do DNA das três cultivares com os pares de iniciadores SSR desenhados, foram conduzidas em termociclador Biocycler MJ96+/MJ96G (*Biosystems*) com uma temperatura de desnaturação inicial de 94°C por um minuto, seguida de 35 ciclos de amplificação [94°C (1 min), 1 min com temperatura de anelamento (55°C a 64°C), 72°C (1min)] e uma extensão final de 72°C por 10 min.

Inicialmente, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹). Esses produtos foram visualizados por meio de luz UV e fotografados em sistema de fotodocumentação em um sistema digital *Kodak Science*.

De acordo com Sonah et al. (2011), para a visualização de pequenas diferenças de tamanho dos produtos amplificados, faz-se necessária a separação desses produtos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, uma vez que o gel de agarose não permite tal separação. Assim, os produtos amplificados também foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a

7% para uma melhor análise da qualidade dos produtos amplificados e da ocorrência de polimorfismo entre as três cultivares

Então, aos produtos amplificados foram misturados 30% do volume de formamida e separados em gel desnaturante de poliacrilamida a 7%, contendo 5,6 M de ureia, em TBE 1X (89 mM Tris-borato, 2 mM EDTA), conforme protocolo proposto por Litt et al. (1993). Utilizou-se uma cuba vertical de eletroforese com capacidade para 80 amostras e o gel foi preparado com espessura de 0,4 mm. Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma pré - corrida a 60 watts de potência por 40 min. Após aplicar os produtos de amplificação, realizou-se a corrida a 70 watts de potência por 2 horas. O gel foi corado com nitrato de prata em um procedimento de quatro passos (CRESTE et al., 2001): i- fixação do gel com uma solução de etanol 10% e ácido acético glacial 1% por 10 minutos; ii- fixação do gel com uma solução de ácido nítrico a 1% por 5 minutos; iii- coloração do gel por uma solução de nitrato de prata (0,2%) acrescido de formaldeído 37 % por 30 minutos; iv- revelação do gel com uma solução de carbonato de sódio 2% até a visualização das bandas, aproximadamente 5 minutos. Para confirmação do tamanho esperado dos fragmentos utilizou-se o padrão de peso molecular de 50 pb (invitrogen). Depois de seco, escaneou-se o gel em equipamento *HP ScanJet N8460*, afim de utilizá-lo em uma análise futura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade genética de uma espécie é um componente essencial em um programa de melhoramento de plantas. Avaliar a diversidade genética em plantas tem envolvido estratégias cada vez mais sofisticadas tais como: polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (*AFLP-Amplified Fragment Length Polymorphism*) e microssatélites. O desenvolvimento de marcadores SSR ou microssatélite, muitas vezes, é a melhor opção para investigar polimorfismos de populações (FOSTER et al., 2010). Esses marcadores são preferidos pelos melhoristas por apresentarem natureza co-dominante, serem encontrados em todo o genoma e possuir alta repetibilidade. No entanto, o desenvolvimento de marcadores SSRs requer o conhecimento prévio do genoma da espécie. O grande avanço nos projetos de sequenciamento genético tem possibilitado, a baixo custo e maior rapidez, o desenvolvimento desses marcadores.

Dessa forma, a localização e o desenho dos iniciadores SSR são realizados rapidamente e com baixo custo por meio de programas computacionais que identificam seqüências SSR. Estes marcadores possibilitam distinguir genótipos proximamente relacionados, permitindo assim uma maior eficiência e orientação em futuros cruzamentos, estudos genéticos e seleção assistida por marcadores.

Um total de 30 pares de iniciadores SSR foi desenhado através do vasculhamento do genoma da mamoneira por micrissatélites (Tabela 2). Esses pares de iniciadores foram denominados pelas iniciais RcoM seguidas por números. Os pares de iniciadores SSR desenhados apresentaram porcentagem média de GC igual a 47,29%.

Os pares de iniciadores foram sintetizados e utilizados na amplificação do DNA das cultivares BRS Nordestina, EBDA MPA-17 e Sipeal 28. Os tamanhos dos produtos amplificados, por meio dos pares de iniciadores, variaram de 128 pb a 381 pb. Apenas o par de iniciadores RcoM30 amplificou um produto acima de 300 pb. Os demais amplificaram produtos abaixo desse valor. Os marcadores SSR foram classificados como perfeitos (76,7%, sendo 30%, 30%, 6,7% 10% com repetições di, tri, tetra e hexanucleotídeos, respectivamente) e compostos (23,3%) (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Bajay (2009). O autor desenvolveu 41 pares de iniciadores, através da montagem de uma biblioteca genômica enriquecida, para mamoneira sendo assim classificados: 70,73% como perfeitos; 19,51% como compostos; e apenas 9,75% como interrompidos.

Tabela 2: Iniciadores SSRs desenhados a partir de sequências do genoma de *Ricinus communis* depositadas no GenBank/NCBI (acesso: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=AASG02>)

Locos	Sequência 5'-3'	Ta	%CG	Motivo	Amplitude dos fragmentos	Tipo de repetição	Nº de alelos	Classificação
RcoM 01	F: GACGGGATGAAAGAGGATA R: TGGCTGCTGTTGTTACTCTA	63	47,37 45	(TA)₁₈	277	dinucleotídeos	1	M
RcoM 02	F: ATGTCTGCTCTTGGTCTGTC R: ATGGTATGGTTTTGATGAGG	64	50 40	(CT)₁₄	185	dinucleotídeos	3	P
RcoM 03	F: ATGACCCCTTTGATGTGCTC R: GGCAGGTTTTGGACTCGTTA	62	50 50	(TA)₁₈ e (AATAAA)₂	234	Composto dinucleotídeos e hexanucleotídeo s	1	M
RcoM 04	F: TCATAACCAACTCCTCACCAGA F: TTGTGATCGTTGTGGCTTGT	62	45,45 45	(TCCTAC)₂ e (GGTAGG)₂	274	Composto hexanucleotídeo s	1	M
RcoM 05	F: AATGAGTCGCAATCTATGAACG R: ATGGTGAAGAGAATGGCTG	62	40,91 50	(AAAAGA)₃	204	hexanucleotídeo s	2	M
RcoM 06	F: GTTCCAACCTCCAAACAGAC R: GCTCTTACCTACTCCTCCCC	64	40,91 50	(AAAAGA)₃	204	hexanucleotídeo s	1	M
RcoM 07	F: CGGGTGAGAAGCAAGAGAAG R: TACAAGCCAAATAGTCCCC	63	55 50	(TTAATT)₃	205	hexanucleotídeo s	1	M
RcoM 08	F: GCTATCCACATTGGTTCCCT R: AAGTTTTGGTGATGGCTGCT	63	50 45	(GAA)₅	237	trinucleotídeos	1	M
RcoM 09	F: GGCATTTTGGGAAGTTGTGT R: AATGGTCTAATCCCCGCTCT	62	45 50	(AT)₈	211	dinucleotídeos	1	M
RcoM 10	F: GGGCGGGCTCTGTAAAGTA R: TTACCCAAACACCCTCTCCA	62	57,89 50	(TA)₁₅	259	dinucleotídeos	1	M
RcoM 11	F: AACATCCCCTCCACTCACAG R: CCTGACCCTCCTGATTGTTTC	63	55 55	(CAA)₆	252	trinucleotídeos	2	M
RcoM 12	F: GATTGGGGAGTGCATAGA R: CCAGCAATATACACCATGACAA	62	52,63 40,91	(TAT)₇(TTA)₁₁	189	Composto trinucleotídeos	1	M
RcoM 13	F: TCAGATGCGATTGAGAGTCT R: CCTTTGATGGCTTATTGCGT	62	47,62 45	(TAT)₈	136	trinucleotídeos	1	M
RcoM 14	F: GATGAAAAGGAAATGGAGTGG R: AGTGAGGGTTGTATGGGGAG	62	42,86 55	(TAT)₁₆	176	trinucleotídeos	1	M
RcoM 15	F: ATGGAGGTCTTGTGAGGTGC R: AGCCCTTCCTTGTAGTTTTG	62	55 47,62	(GAA)₅	176	trinucleotídeos	1	M
RcoM 16	F: AGGGGTATCCTTATGCTCCAAC R: CCCAAACTCAAGACATTCATCA	62	50 40,91	(AAGA)₇	220	tetranucleotídeo s	1	M
RcoM 17	F: GAAGATTCACAACACCCATAA R: CAGCAGAAGAAAGAAAAGGCA	63	40,91 42,86	(GAA)₈(GA)₁₃	248	Composto tri e dinucleotídeos tetranucleotídeo s	3	P
RcoM 18	F: CCTGCGTTATCTGTTGTTGC R: GGGTCTTGAGCCAGGTTGTA	60	50 55	(AATA)₅	245	tetranucleotídeo s	1	M
RcoM 19	F: TCATTCACTTCACTTCTTGCC R: TCAAAGATTGGTTAGAGGTCAG	64	40,91 40,91	(CT)₁₈	298	dinucleotídeos	1	M
RcoM 20	F: GCCGACGCATAAGGTAAGAG R: TCTCAACAAACACACCCACG	63	55 50	(GAA)₁₃	128	trinucleotídeos	2	P

RcoM 21	F: CGGAACGACGACAAGAAAG R: CGTTATGGAAGGGAAAAGAAAG	63	40,91 52,63	(AAG)₁₂	253	trinucleotídeos	2	P
RcoM 22	F: TTCACCCGCTATTCTCAACC R: CTCAACGACTTCCCTCCAAA	62	50 50	(ACT)₅	227	trinucleotídeos	2	P
RcoM 23	F: CCTTTTGGAGGGTCCTTAGC R: CGCATCCTTTCATTCTTCTT	63	55 40,91	(AG)₁₈	283	dinucleotídeos	1	M
RcoM 24	F: ACTTCATTGCCCTTGGACAC R: TTAGGGAGATTGAGGACTGATG	N	50 45,45	(AT)₁₀(TG)₇	159	composto dinucleotídeos	-	M
RcoM 25	F: TCACTAACACAACAAGACGGA R: GAACGCAAAAAGATTGGTCA	62	42,86 42,11	(TAT)₁₂	232	trinucleotídeos	1	M
RcoM 26	F: TGTAAGTGTGAGGGGTGGAA R: GGAAGAAGTGACAGATGGTGC	63	42,86 52,38	(AT)₇	264	dinucleotídeos	1	M
RcoM 27	F: TCAAGTGACAAAGGACACATCT R: GTGACAGAATCAGCCTAAACC	63	40,91 47,62	(AG)₂₀	287	dinucleotídeos	2	P
RcoM 28	F: TTGGGTGTTATCCTCATTCC R: GGAGAAGAAGAAAAGAAAGGTG	63	45 40,91	(GAA)₆(AGA)₅ (AAG)₆	215	composto trinucleotídeos	2	P
RcoM 29	F: AACAAAACGCTCACCCAT R: AAGCGTCCAAAAGCAAAGAA	63	45 40	(AG)₁₉	250	dinucleotídeos	1	M
RcoM 30	F: TCCAAAATATAAGCCCTGCC R: TGGTCTGTTCTAAGCAATCCC	63	45 47,62	(CT)₁₇(TA)₂₅	381	composto dinucleotídeo	1	M

* M: monomórfico; P: polimórfico

Dentre as concentrações dos componentes da reação de amplificação testadas as que apresentaram melhor resultado foram: 25 ng de DNA genômico, 1,2 mM de cloreto de magnésio, 0,4 mM de cada iniciador (*F* e *R*), 0,1 mM de cada dNTP, 2 U de Taq DNA polimerase e 2,5 X de tampão.

De um total de 30 pares de iniciadores SSR desenhado, 29 (96,7%) foram validados com sucesso por meio da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), ou seja, amplificaram regiões genômicas da mamoneira (Figura 2). Apenas o par de iniciadores RcoM24 não amplificou as amostras (Figura 2). Os produtos amplificados (regiões SSR do genoma de mamoneira) apresentaram tamanho compatível ao esperado (Figura 2).

Para Markoulatos et al. (2002), a otimização de uma reação de PCR, principalmente quando se trata de um par de primers, requer, em geral, planejamento estratégico. O sucesso na reação de PCR está relacionado à concentração relativa dos primers, à concentração do tampão, ao equilíbrio entre o cloreto de magnésio, às concentrações dos desoxiribonucleotídeos, à quantidade do DNA e da Taq, bem como à temperatura de anelamento (*T_a*).

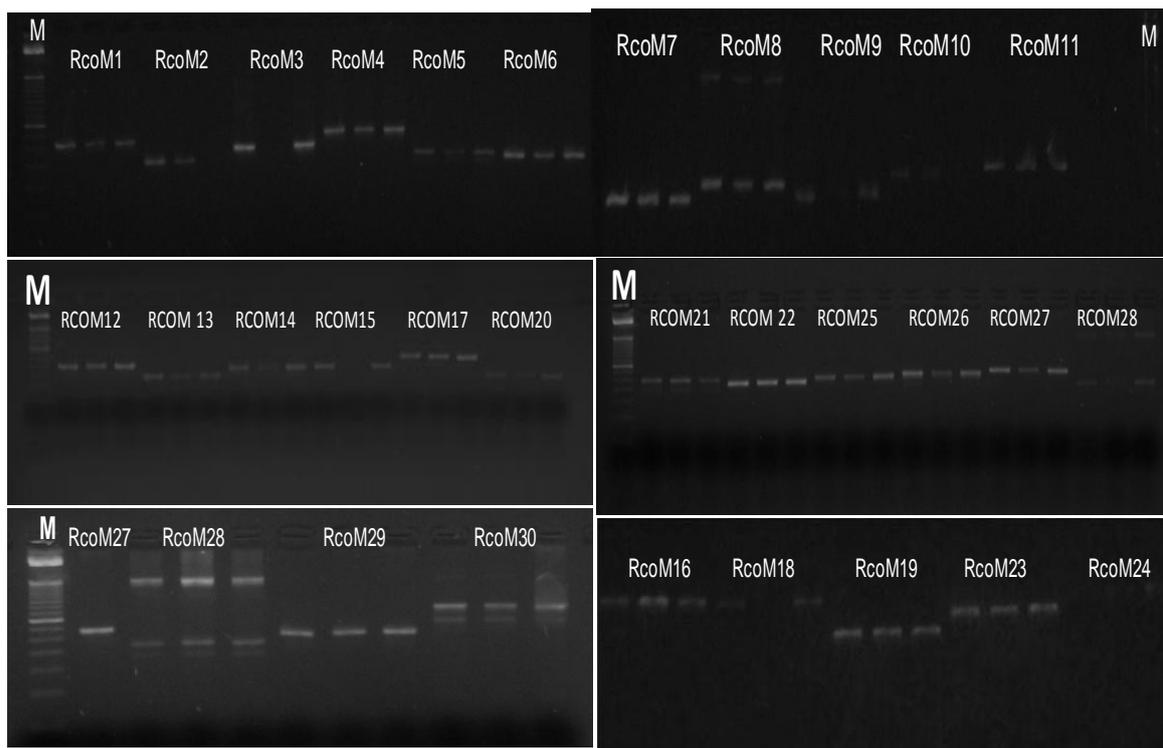
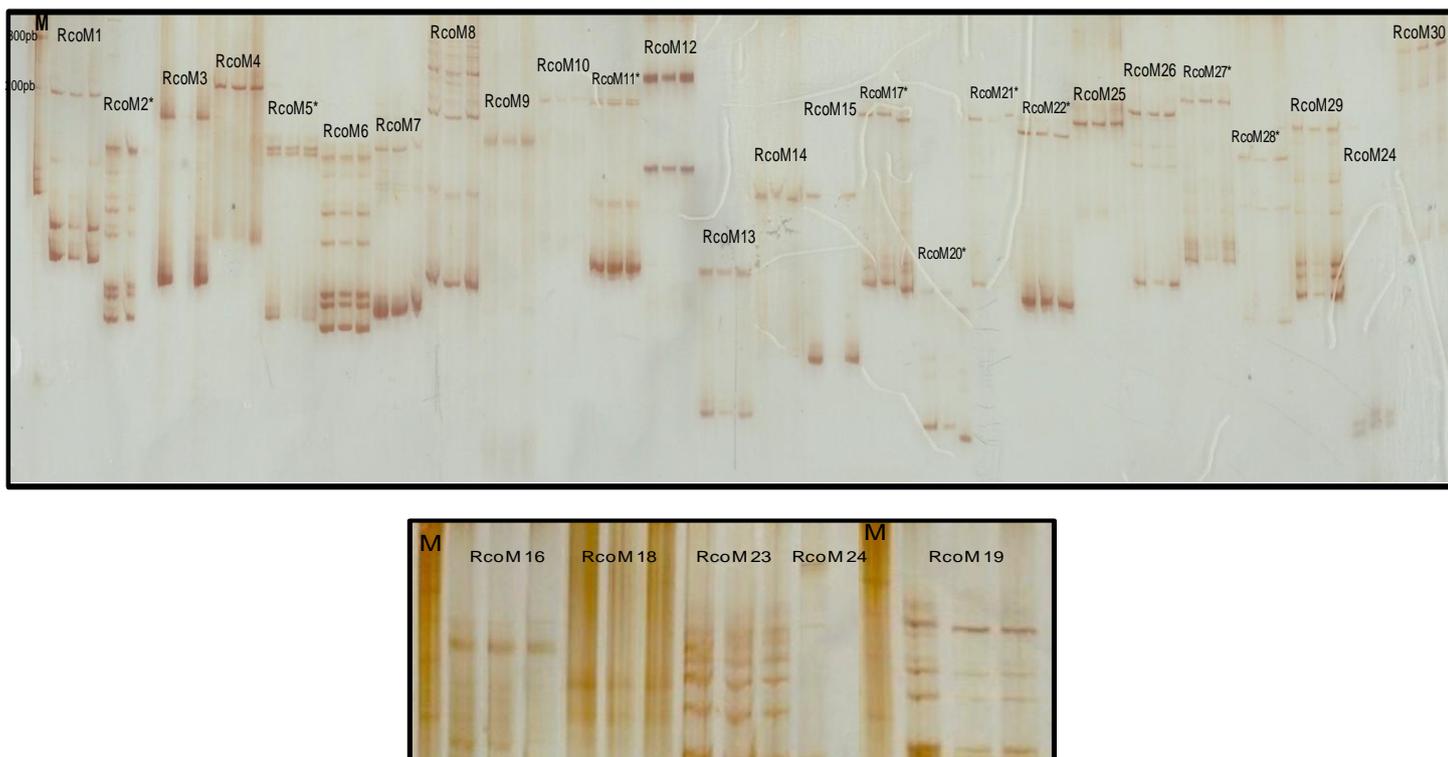


Figura 2: Locos SSR das cultivares BRS Nordestina, EBDA MA17 e Sipeal 28 de mamoneira, amplificados utilizando os pares de iniciadores SSR denominados RCoM1 à RCoM 30. M= marcador *ladder* de 50 pb (Invitrogen).

Para a qualidade da amplificação, foram observados dois aspectos: o primeiro refere-se ao número de locos originados, visto que o par de iniciadores pode amplificar locos únicos ou múltiplos; o segundo diz respeito à presença de bandas *stutter* ou “fantasmas” (PEREIRA, 2004). Já em relação ao polimorfismo, os locos foram caracterizados como polimórficos ou monomórficos, em função da existência de alelos distintos entre as cultivares utilizadas.

Dos 29 locos amplificados, à temperatura de anelamento de 62°C, 21 (72,4%) apresentaram locos únicos e sem “bandas fantasmas” (Figuras 3A e 3B) e apenas 8 locos amplificados apresentaram “bandas fantasmas” (3%).

Um total de sete pares de iniciadores, RcoM2, RcoM17, RcoM20, RcoM21, RcoM22, RcoM27 e RcoM28 (23,3%), foi eficiente na identificação de polimorfismo para as três cultivares analisadas (Figura 3 A).



Figuras 3A e 3B: Eletroforese em gel desnaturante de poliarilamida a 7% de locos SSR amplificados utilizando os pares de iniciadores (*F* e *R*) à temperatura de anelamento de 62°C, corado com nitrato de prata.

De 379 pares de iniciadores EST-SSR utilizados na amplificação de 24 acessos de banco de germoplasma de mamoneira coletados em 14 diferentes países, 118 foram polimórficos (31,13%) (QIU et al., 2010).

No entanto, Bajay (2009) genotipou por meio de marcadores microssatélite 37 e 76 acessos do banco de germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), respectivamente, também foram avaliados neste trabalho 7 genótipos cedidos pela UNESP de Botucatu-SP. De um total de 41 locos analisados, 26 apresentaram polimorfismo (63,41%). A diferença na porcentagem de locos polimórficos encontrada em nosso trabalho e no de Bajay (2009) pode ser explicada não apenas pelo maior número de genótipos analisados por esse autor, mas também por tratar-se de acessos de um banco de germoplasma e não de cultivares já estabelecidas.

Os pares de iniciadores RcoM5 e RcoM11 identificaram locos monomórficos para as três cultivares genotipadas (Figura 3b). No entanto, as

cultivares são heterozigotas para esses locos. A heterozigose de um determinado locos, em um cruzamento, pode gerar uma progênie polimórfica (genótipos homozigotos para o alelo 1 ou 2 e genótipos heterozigotos). Sendo assim, os pares de iniciadores RcoM2, RcoM17, RcoM20, RcoM21, RcoM22, RcoM27, RcoM28, RcoM5 e RcoM11 podem ser utilizados na genotipagem e seleção assistida de genótipos oriundos de cruzamentos entre essas cultivares.

Com exceção dos locos RcoM5 e RcoM11, todos os outros apresentaram-se em homozigose para as 3 cultivares. Foster et al. (2010) estudaram a genética de populações de *R. communis* em uma coleção mundial de germoplasma utilizando 48 locos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e constataram baixos níveis de diversidade genética para a mamoneira. Bajay et al. (2009) caracterizou 37 acessos de mamoneira do banco de germoplasma da Embrapa utilizando 12 marcadores SSR. Os resultados mostraram que a heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) oscilou entre os valores de 0,000 a 0,108 (0,060 em média) e 0,188 a 0,712 (0,416 em média), respectivamente. Os baixos valores da heterozigosidade esperada sugerem predominância de autogamia nesta espécie que apresenta sistema reprodutivo misto com autofecundação e polinização cruzada pelo vento (BAJAY et al., 2009).

Baixa variação genética é uma característica chave de algumas culturas agronomicamente importantes e que estão sujeitas a uma intensa seleção a favor de um número limitado de fenótipos específicos. A perda da diversidade é comum no processo de domesticação de muitas espécies de planta (FOSTER et al., 2010), a exemplo da mamoneira.

O desenvolvimento de marcadores moleculares SSR para *Ricinus communis* é essencial para a investigação em curso sobre esta cultura no Brasil e no mundo. A informação é de grande importância para a identificação, exploração racional, conservação da variabilidade genética desta espécie e utilização em programas de melhoramento.

CONCLUSÕES

Desenho e otimização de novos marcadores microsátélites de mamoneira representam um acréscimo no número de marcadores moleculares para a espécie, incrementando os estudos de variabilidade genética, seleção de parentais para hibridação em programa de melhoramento e identificação de locos de características quantitativas (QTLs) associados com características de interesses agronômicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, O. A. **Informações meteorológicas do CNP: Mandioca e Fruticultura tropical**. Cruz das Almas, BA: EMBRAPA – CNPMF. 1999. 35 p. (EMBRAPA – CNPMF. Documentos, 34).

BAJAY, M. M. **Desenvolvimento de marcadores microssatélite e caracterização do banco de germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.)**. ESALQ-USP. 96 p, São Paulo, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências. Área de concentração Genética e Melhoramento de plantas).

BAJAY, M. M.; PINHEIRO, J. B.; BATISTA, C. E. A.; NOBREGA, M. B. M.; ZUCCHI, M. I. Development and characterization of microsatellite markers for castor (*Ricinus communis* L.), an important oleaginous species for biodiesel production. **Conservation Genetic Resource**, 2009.

CHAN, A. P.; CRABTREE, J. T.; ZHAO, Q. I.; LORENZI, H.; ORVIS, J.; PUIU, D.; MELAKE-BERHAN, A.; JONES, K. M.; REDMAN, J.; CHEN, G.; CAHOON, E.; CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19: 299-306, 2001.

GEDIL, M.; STANKE, M.; HAAS, B. J.; WORTMAN, J. R.; FRASER-LIGGETT, C. M.; RAVEL, RABINOWICZ, J. P. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. **Nature biotechnology**, 28 (9), 951-956, 2010.

GOVAERTS, R., FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World checklist of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. v.2. Euphorbiaceae: Croton to Excoecariopsis. Royal Botanic Gardens, Kew, 2000.

da SILVA R. L. C.; SHOGIRO, T. J.; SAVI, A.; LEAL, N. R. Variability for oil and fatty acid composition in castorbean varieties. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 61, p. 1841–1843, 1984.

da SILVA N. D. E. L.; MACIEL, M. R.; BATISTELLA, C. B.; MACIEL FILHO, R. Optimization of biodiesel production from castor oil. **Applied Biochemistry Biotechnology**. 130, p. 405–414, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L.; HORTORIUM, L. H. B.; Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p. 13-15, 1990.

FREIRE, E. C.; LIMA, E. F.; ANDRADE, F. P. **Melhoramento Genético**. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). O agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão, Brasília: Embrapa. Informação Tecnológica, 2001. p. 229-256.

FOSTER, J. T.; ALLAN, G. J; CHAN, A. P.; RABINOWICZ, P. D.; RAVEL, J.; JACKSON, P.J.; KEIM, P. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). **BMC Plant Biology**,10:13, 2010. <http://www.biomedcentral.com>.

FUGANTI, R.; BENEVENTI, M. A.; SILVA, J. F. V.; ARIAS, C. A. A.; MARIN, S. R. R.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L. Identificação de Marcadores Moleculares de Microssatélites para Seleção de Genótipos de Soja Resistentes a *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, Vol. 28(2):125-130, 2004.

HANCOCK, J. M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In *Microsatellites: Evolution and applications* Ed Goldstein D, Schlo"tterer C, **New York: Oxford University Press** 1-9, 1999.

JEONG, G. T., PARK, D. H. Optimization of biodiesel production from castor oil using response surface methodology. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 156: 431-441, 2009.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, 4: 203–221, 1987.

LITT, M.; HAUGE, X.; SHARMA, V. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. **BioTechniques** v.15, p.280-284, 1993.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: **A Practical Approach Journal of Clinical Laboratory Analysis** 16:47–51 (2002)

MARTINS, W.S; LUCAS, D.C.S; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformatics**, 3(6):282-283, 2009.

PEREIRA, G. da S. **Desenvolvimento de marcadores SSR, M-AFLP e SNP visando a integra"o de mapas gen"ticos-moleculares de *Passiflora alata* Curtis**. ESALQ-USP. 154 p, S"o Paulo, 2010. Disserta"o (Mestrado em Ci"ncias. "rea de concentra"o Gen"tica e Melhoramento de plantas).

QIU, L.; YANG, C.; TIAN, B. YANG, J.; LIU, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.). **BMC Plant Biology**, 10:278, 2010, <http://www.biomedcentral.com>.

SCARPA, A. e GUERCI, A. Various uses of the castor oil plant (*Ricinus communis* L.). **A review Journal. Ethnopharmacol**, **5**, 117–137, 1982.

SEO, K. - I.; LEE, G. – A.; MA, K. –H.; HYUN, D. – Y.; PARK, Y. – J.; JUNG, J. – W.; LEE, S. – Y.; GWAG, J. – G.; KIM, C. – K.; LEE, M. – C. Isolation and characterization of 28 polymorphic SSR loci from castor bean (*Ricinus communis* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, Volume 14, Number 2, 97-103, 2011.

SONAH, H.; DESHMUKH, R. K.; SHARMA, A.; SINGH, V. Y. P.; GUPTA, D. K., GACCHE; R. N., RANA; J. C., SINGH, N. K.; SHARMA, T. R. Genome-Wide Distribution and Organization of microsatellites in Plants: An Insight into Marker Development in *Brachypodium*. **PLoS ONE | www.plosone.org**. Vol.6, Issue 6, e21298: 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cultura da mamona deve se consolidar como o principal componente do biodiesel a ser produzido no Brasil, podendo se tornar em curto prazo, no cenário do Nordeste, um dos principais componentes do programa nacional de biodiesel. A estimativa é de que cerca de 40% do biodiesel produzido no Brasil nos próximos anos, sejam obtidos a partir dessa oleaginosa. Dentre as demais oleaginosas é a que apresenta as maiores potencialidades para o Nordeste, seja pela relativa familiaridade do agricultor com a cultura, seja pela possibilidade do uso de tecnologias mais simples para a sua produção, pelo elevado teor de óleo que apresenta, e ainda, pela boa produtividade e qualidade. Assim, torna-se imprescindível à implementação de estratégias que possibilitem o desenvolvimento de novos genótipos, com maiores teores de óleo e ajustados às condições do Recôncavo Baiano. Isto possibilitará também a consolidação da cultura da mamona no Recôncavo Baiano de forma a garantir, no futuro, a expansão do agronegócio dessa oleaginosa no estado da Bahia.

Os marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho, representam um acréscimo significativo no número de marcadores moleculares para a mamoneira. Esses marcadores podem ser aplicados no estudo de diversidade genética, seleção de parentais para hibridação em programas de melhoramento e na identificação de locos de características quantitativas (QTLs) associados às características de interesse agrônomo.

Nosso trabalho mostra que há variabilidade genética entre os genótipos da população F_2 e seus parentais. No entanto, o número de locos polimórficos identificados nesse trabalho é insuficiente para correlacioná-los a um caráter quantitativo, a exemplo do teor de óleo na semente.

Os marcadores moleculares baseados em RAPD foram eficientes na detecção da dissimilaridade genética entre as cultivares introduzidas de

mamoneira. Esse estudo é importante para direcionar os cruzamentos entre as cultivares geneticamente divergentes. A informação da divergência para organizar os cruzamentos é necessária para a obtenção de populações segregantes com alto grau de variabilidade. Entretanto, também, devem-se levar em consideração as avaliações fenotípicas das cultivares.

O método analítico de gravimetria implementado neste trabalho apresentou-se como uma alternativa para a quantificação de teor de óleo em mamoneira. Pelo método gravimétrico foi possível detectar variabilidade para o caráter teor de óleo na semente entre os genótipos da população F_3 de mamoneira obtida pelo NBIO/UFRB.