

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CURSO DE MESTRADO

SELEÇÃO DE LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES E CARACTERES TEOR DE ÓLEO E
PESO DE SEMENTES POR PLANTA

HELISON SANTOS BRASILEIRO

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
FEVEREIRO-2014

SELEÇÃO DE LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES E CARACTERES TEOR DE ÓLEO E
PESO DE SEMENTES POR PLANTA

HELISON SANTOS BRASILEIRO

Engenheiro Agrônomo
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2009

Dissertação submetida ao Colegiado de
Curso do Programa de Pós-Graduação
em Recursos Genéticos Vegetais da
Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia e Embrapa Mandioca e
Fruticultura, como requisito parcial para
obtenção do Grau de Mestre em
Recursos Genéticos Vegetais.

ORIENTADOR: PROF.^a DRA. SIMONE ALVES SILVA
COORIENTADOR: PROF.^a DRA. EDNA LOBO MACHADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
MESTRADO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA – 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

B823s

Brasileiro, Helison Santos.

Seleção de linhagens elites de mamoneira por meio de marcadores microssatélites e caracteres teor de óleo e peso de sementes por planta / Helison Santos Brasileiro. – Cruz das Almas, BA, 2014.

76f.; il.

Orientadora: Simone Alves Silva.

Coorientadora: Edna Lôbo Machado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Mamona – Melhoramento genético. 2.Mamona – Cultivares. 3.Variabilidade genética – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 633.8

COMISSÃO ORGANIZADORA

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

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO:
HELISON SANTOS BRASILEIRO**

D. Sc Prof.^a Simone Alves Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
(Orientadora)

D.Sc Pesq.^o Rogério Mercês Ferreira Santos
Embrapa Mandioca e Fruticultura

D. Sc Prof.^a Catiane Sacramento Souza
Faculdade Maria Milza – FAMAM

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais em, conferindo o Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais em

Aos meus pais, Carlos Maria Brasileiro e Edelvita Carvalho de Souza (*in memoriam*), que sempre priorizaram a minha formação acadêmica e me incentivaram; A minha querida esposa Georgia Leite Bispo Brasileiro, pelo carinho, amor, dedicação e as minhas queridas filhas: Camila Leite Bispo Brasileiro e Carolina Leite Bispo Brasileiro pela singela demonstração do amor;

Dedico

AGRADECIMENTOS

Registro aqui meus sinceros agradecimentos primeiramente ao Deus pai todo poderoso e o seu filho Cristo Jesus que morreu para que pudéssemos ter uma chance de vida eterna num futuro próximo. Agradeço também as seguintes instituições e pessoas, sem as quais o presente trabalho não teria sido desenvolvido:

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Ao Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa;

A Petrobrás biocombustível e Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível (ANP) pelo apoio financeiro necessário no desenvolvimento deste trabalho;

A Prof^a. Dr^a. Simone Alves Silva pela orientação, paciência, oportunidade, confiança e contribuição para meu desenvolvimento e crescimento profissional e a minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Edna Lobo Machado, por toda contribuição, preocupação e presteza sempre que necessitei.

A todos os professores do curso que contribuíram para meu crescimento científico, intelectual e profissional.

A banca examinadora, pelo auxílio na conclusão desta pesquisa;

Um agradecimento especial aos meus pais Carlos e Edelvita (*in memoriam*) por serem vencedores em suas trajetórias de vida, por me darem educação em todos os sentidos, moral e acadêmico, por cuidarem de mim com tanto zelo e dedicação, em especial minha mãe até os meus 12 anos. Muitíssimo obrigado!

A minha amada esposa Georgia que com muito carinho chamo-a de Nina, por ter me incentivado e apoiado do início ao fim nessa longa trajetória, sem ela, seria muito mais difícil cumprir essa jornada;

As minhas queridas e amadas filhas Camila e Carolina, vocês são minha fonte de inspiração;

Aos meus cunhados Leonardo, Thiago pelos momentos de descontração, consideração e cuidado comigo e minha família.

Ao meu sogro Lusitano e sua esposa Solange pela preocupação, atenção e cuidados;

Registro também o reconhecimento aos meus novos amigos pela troca de conhecimento e experiências em todo período do mestrado e pelos bons momentos de convivência em especial: Camila, Tati, Elaine, Keilla, Pedro, Luciel, Ciro, Raony, Nara, Mariane, Selma, Admílson, Adriana, Mayane. Meu muito obrigado!

Aos colegas de turma, pela amizade construída e a estagiária Lívia, por sua grandiosa contribuição no desenvolvimento do trabalho.

As grandes amigas do Lab.: Vanessa, Laurenice e Dyane pela grande atenção e contribuição dada.

Aos meus velhos amigos: Fábio, Marcos, Adelmo, Tingo, Almir e Dona Maria primos Davi, Daniel, Márcia, Damares e Débora, tio Cláudio e tia Clarice que acompanharam toda minha trajetória, mesmo alguns estando distantes;

Aos meus novos amigos e irmãos da congregação central das Testemunhas de Jeová de Cruz das Almas, em especial Wendell, Sílvia e D. Tereza pelo verdadeiro ensino da palavra de Deus e ajuda nos momentos difíceis.

A todos que aqui não foram mencionados, mas que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

Muito obrigado!

Melhor é ouvir a censura de um sábio, do que ser o homem que ouve o canto dos estúpidos.

Eclesiastes: 7:5

SUMÁRIO

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....1

CAPÍTULO 1

SELEÇÃO DE LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES MICROSSÁTELITES.....20

CAPÍTULO 2

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE ANÁLISE CONJUNTA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E OS CARACTERES TEOR DE ÓLEO NA SEMENTE PESO DE SEMENTES.....42

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....65

SELEÇÃO DE LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E CARACTERES TEOR DE ÓLEO E PESO DE SEMENTES POR PLANTA

Autor: Helison Santos Brasileiro

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Simone Alves Silva

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Edna Lobo Machado

RESUMO

Os marcadores SSR possuem alta relevância nos estudos de divergência genética por possuírem características significativas como o multialelismo e o alto grau de polimorfismo. Outra ferramenta relevante em análises de variabilidade genética é a análise conjunta, envolvendo marcadores moleculares e caracteres fenotípicos simultaneamente. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar dentre 47 linhagens elites de mamoneira, as mais divergentes, por meio de marcadores SSR e caracteres fenotípicos quantitativos, teor de óleo nas sementes (TOS) e o peso de sementes por planta (PSP). As análises moleculares geraram fragmentos que variaram de 84 a 439 pb, sendo polimórficos 36 loci microssatélites dos 53 avaliados, gerando 119 alelos com média de 3,31 alelos por locu. Os caracteres fenotípicos teor de óleo na semente, avaliado por técnica de Ressonância Magnética Nuclear – RMN e peso de semente por planta, utilizando balança digital de precisão, aferindo-se o primeiro, terceiro e quarto racemo de cada planta. A análise molecular revelou a formação de sete grupos, enquanto que a análise conjunta dos dados moleculares e fenotípicos gerou 17 grupos, sendo mais eficiente na expressão da divergência genética entre as linhagens de mamona. Pode-se concluir que os marcadores SSR foram eficientes na indicação de polimorfismo e a análise conjunta mais eficaz na detecção de variabilidade.

Palavras-chave: Variabilidade, marcadores SSR, caracteres fenotípicos

SELECTION OF ELITES LINEAGES CASTOR BEAN BY MICROSATELLITE MARKERS CHARACTER AND OIL CONTENT AND WEIGHT OF SEEDS FOR PLANT

Author: Helison Santos Brasileiro

Advisor: Simone Alves Silva

Co-advisor: Edna Lobo Machado

ABSTRACT

The simple sequence repeat (SSR) markers have high relevance in studies of genetic diversity by having significant features as the multi allelic high degree of polymorphism. Another important tool for the analysis of genetic variability is the joint analysis, involving molecular markers and phenotypic characters simultaneously. Thus, the aim of this study is to evaluate among 47 elite inbred lines of castor bean, the most divergent through SSR markers and quantitative phenotypic traits, oil content in seeds (TOS) and seeds weight per plant (PSP). The molecular analysis generated fragments ranging from 84 to 439 bp (base pairs), being polymorphic 36 microsatellite loci of the 53 evaluated, generating 119 alleles with an average of 3.31 alleles per locus. The phenotypic characters oil content in the seed measured by Nuclear Magnetic Resonance technique (RMN) and seeds weight per plant, using digital precision, gauging up of the first, third and fourth racemes of each plant. The molecular analysis revealed the formation of 07 groups, while the combined analysis of molecular and phenotypic data generated 17 groups, being more efficient in the expression of genetic divergence between strains castor. It can be concluded that the SSR markers were effective in indicating polymorphism and the joint analysis more effective in detecting variability.

Keywords: Variability, SSR markers, phenotypic characters

INTRODUÇÃO

Origem da mamoneira

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), uma dicotiledônea pertencente à família Euphorbiaceae, é uma planta xerófila e heliófila, provavelmente originária da Ásia, explorada comercialmente entre as latitudes 40°N e 40°S (LIMA *et al.*, 2008). A origem desta planta é muito discutida, já que existem relatos, em épocas bastante longínquas, de seu cultivo na Ásia e na África. A diversificação de um grande número de variedades desta planta, encontradas tanto no continente africano, como no asiático, impossibilita qualquer tentativa de estabelecer uma procedência efetiva da mamona.

No Brasil a mamona foi trazida pelos portugueses com a finalidade de utilizar seu óleo para iluminação e lubrificação dos eixos das carroças. O clima tropical e, predominante no Brasil, facilitou a sua expansão natural. A mamoneira é considerada um arbusto silvestre, tendo se aclimatado com facilidade no Brasil, onde se desenvolve espontaneamente, em especial no Norte e Nordeste (CRUZ, 1982).

Características da Mamoneira

É uma espécie monóica, que possui flores unissexuais ocorrendo numa mesma inflorescência, o que possibilita a obtenção de plantas homozigotas através da polinização controlada. Na parte superior são encontradas as flores femininas e as masculinas na parte inferior, entretanto, são observadas flores masculinas entre as femininas, e com baixa frequência o surgimento de flores hermafroditas, além de registros de alogamia em uma taxa superior a 40% (SAVY FILHO, 1999).

A mamoneira possui número de cromossomos igual a 10 ($n = 10$), sendo possíveis tetraploides, oriundos de progenitores diploides já extintos (VENANCIO,

2013). Todas as variedades botânicas da mamoneira apresentam $2n = 20$ cromossomos, no entanto, algumas dessas variedades possuem barreiras genéticas que impossibilitam o cruzamento entre si (BELTRÃO *et al.*, 2007b).

A mamoneira é uma espécie perene que pode viver mais de 12 anos e atingir até 10 metros de altura. É uma planta de hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas e frutos, tipo racemos (cachos), podendo possuir cera no caule e pecíolo. Os frutos, geralmente, possuem espinhos, as sementes apresentam diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração (MOREIRA *et al.*, 1996; AZEVEDO *et al.*, 1997). Seus frutos são do tipo cápsula tricoca de deiscência explosiva, com saliências espiniformes, contendo três sementes oleaginosas de superfície brilhosa e desenhada com manchas escuras. Esta espécie apresenta uma raiz axial e raízes secundárias que podem chegar até 2,0 m de profundidade, seu caule é arredondado, liso, esverdeado e recoberto com cera, também apresenta folhas grandes, de coloração verde-escuro, com 5-11 lóbulos, flores agrupadas na panícula terminal (cacho).

Óleo da mamona

O óleo da mamona possui características bem peculiares quando comparadas à maioria dos óleos vegetais e é obtido a partir de sua semente. Além da presença do triglicerídeo do ácido ricinoléico, que é um ácido graxo hidroxilado pouco freqüente nos óleos vegetais, está presente numa faixa de 84,0% a 91,0% da sua composição (MOSHKIN, 1986). A Tabela 1 mostra a composição média do teor de ácidos graxos no óleo de mamona.

Tabela 1 - Variação do teor de ácidos graxos no óleo de mamona.

Ácido Graxo	Porcentagem
Ácido Ricinoléico	84 -91
Ácido Linoléico	2,9-6,5
Ácido Oléico	3,1-5,9
Ácido Esteárico	1,4-2,1
Ácido Palmítico	0,9-1,5

A estrutura molecular do triglicerídeo do ácido ricinoléico, cuja fórmula molecular ($C_{17}H_{32}O_2$) é mostrada na Figura 1, possui a particularidade de ser um dos poucos ácidos graxos naturais cuja estrutura química possui três grupos funcionais altamente reativos: o grupo carbonila no primeiro carbono, a dupla ligação (ou insaturação) no 9º carbono e o grupo hidroxila no 12º carbono (CANGEMI, 2006). Esses grupos funcionais fazem com que o óleo de mamona possa ser submetido a diversos processos químicos, nos quais pode ser obtida uma enorme gama de produtos.

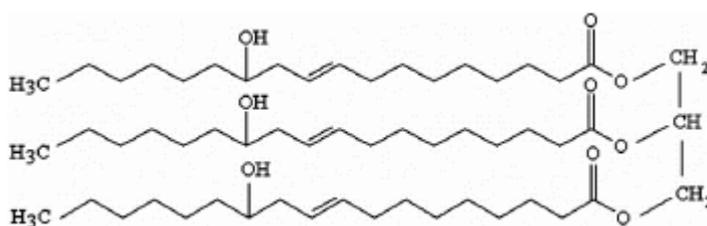


Figura 1 – Triglicerídeo do ácido ricinoléico

O ácido ricinoléico caracteriza-se por possuir alto peso molecular (298 g.mol^{-1}) e baixo ponto de fusão ($5 \text{ }^\circ\text{C}$). O grupo hidroxila presente na ricinoleína confere ao óleo de mamona a propriedade exclusiva de solubilidade em álcool (WEISS, 1983; MOSHKIN, 1986).

Estudos realizados pela Universidade Federal do Piauí apontaram que o óleo de mamona, quando submetido à transesterificação (reação entre um éster e um álcool, com formação de outro éster e outro álcool) tendo como catalisador KOH com utilização do etanol³, obtém-se um rendimento de 64%, inferior àquele produzido quando se usa o metanol⁴, cujo rendimento é de 72%. A transesterificação pela via etílica apresenta densidade fora das especificações da ANP (Agência Nacional do Petróleo), obtendo-se um valor de $910,3 \text{ kg.m}^{-3}$ sendo que as especificações limitam de 850 a 900 kg.m^{-3} quando submetidos a uma temperatura de 20°C . Entretanto, de acordo pesquisadores esse valor não ocasiona grandes problemas na qualidade do biodiesel (VENTURA, 2010).

Mesmo a densidade do óleo de mamona estando fora das especificações, o grande problema encontrado na sua produção é a sua viscosidade em elevados níveis com relação às normas da ANP. Segundo estudo realizado pelo Laboratório de Combustíveis da Universidade Federal de Pernambuco, a viscosidade cinemática média do biodiesel de mamona foi da ordem de $13,52$

$\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$ enquanto a ANP padroniza um valor máximo de $5,5\text{mm}^2.\text{s}^{-1}$ (VENTURA, 2010).

Importância da cultura e mercado econômico

Por ser uma planta de fácil adaptabilidade a certas condições edafoclimáticas, tais como: baixo índice pluviométrico e tolerância à seca há um incremento do plantio por produtores que se concentram na região semiárida do nordeste brasileiro, criando a possibilidade de desenvolvimento da economia dessa região e a capacidade de geração de empregos no campo assim como matéria prima para a indústria (LUZ, 2012). Mesmo assim, a agricultura familiar para a produção de mamona necessita de políticas públicas governamentais, além de investimentos em pesquisas agrícolas locais e em tecnologia de manejo para que realmente possam viabilizar essa atividade agrícola num ambiente competitivo (PINOTTI e AMARAL, 2013).

Nos últimos anos, observa-se uma baixa produtividade na cultura, cerca de $500 \text{ Kg}.\text{ha}^{-1}$, ocasionando problemas na sua utilização como óleo para produção de biocombustível (LUZ, 2012). Tais problemas são oriundos de plantios com uso de sementes de baixa qualidade, possivelmente multiplicadas pelos próprios produtores ocasionando grande heterogeneidade, e aliado a esses problemas soma-se a falta de tecnologias de produção (LUZ, 2012). Além disso, a mamona possui preços crescentes elevados no mercado internacional, nos últimos anos em média cerca de US\$ 1650,00/tonelada. Para que seu preço se reduza ao patamar dos demais óleos vegetais também empregados na produção de biodiesel, deveria haver um incremento significativo na oferta desta matéria-prima. (PINOTTI e AMARAL, 2013).

Além do uso de material melhorado e tecnificação nos plantios, outro fator importante que deve ser levado em consideração na produtividade final da mamona é o preparo do solo. A Secretaria de Desenvolvimento Agrário do Ceará, na Safra de 2012/13, a partir de dados da agricultura familiar daquele estado informou os custos de produção de três sistemas de mamona consorciada com feijão que se divergem pelo nível de produtividade: $600 \text{ Kg}.\text{ha}^{-1}$, $1 \text{ ton}.\text{ha}^{-1}$ e $1,2 \text{ ton}.\text{ha}^{-1}$ (Tabela 2), sendo todos os dados analisados pelo centro de referência da cadeia de produção de biocombustíveis para a agricultura familiar.

Tabela 2 - Discriminação dos custos de produção de mamona (em R\$/ha) na agricultura familiar no Ceará na safra 2012/13.

Produtividades esperada ton./ha	1,2 t/ha	1 t/ha	0,6 t/ha
Preparo do solo	R\$ 120,00	R\$ 120,00	R\$ -
Plantio	R\$ 60,00	R\$ 60,00	R\$ 60,00
Operações Manuais	R\$ 450,00	R\$ 390,00	R\$ 630,00
Sementes (Mamona+Feijão)	R\$ 79,60	R\$ 79,60	R\$ 79,60
Insumos	R\$ 345,00	R\$ 320,00	R\$ 60,00
Colheita e transporte	R\$ 150,00	R\$ 120,00	R\$ 90,00
Descascamento secagem e ensaque	R\$ 90,00	R\$ 60,00	R\$ 60,00
Total	R\$ 1.294,60	R\$ 1.149,60	R\$ 979,60

(Fonte: Secretaria de Desenvolvimento Agrário do Ceará).

A planta de mamoneira é exigente em diversos nutrientes minerais, por esse motivo o preparo do solo é importante e corresponde a aproximadamente 10% do custo total de produção para os dois sistemas com níveis de produtividade de 1,2 e 1,0 ton.ha⁻¹. No entanto, para o sistema com menor produtividade, não há preparo do solo. A operação de plantio corresponde a 5% do custo total. As operações manuais são diferentes para cada nível: no nível de 600 kg.ha⁻¹ corresponde a aproximadamente 65%, no nível 1,0 ton.ha⁻¹ corresponde a 33,94% e no nível de 1,2 ton.ha⁻¹ corresponde a 34,75% (Figura 2). Essa diferença de participação é devido à utilização de tração animal para os sistemas com maior produtividade, uma vez que a capina é realizada manualmente no sistema com menor tecnologia.

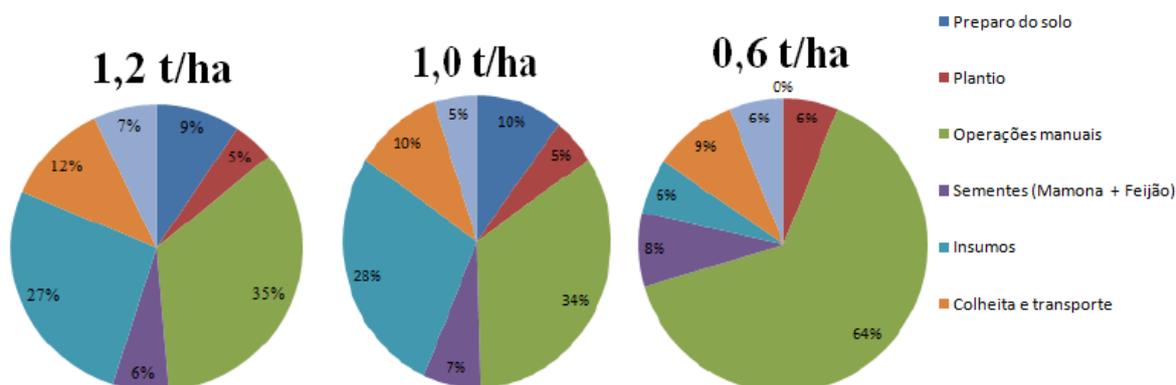


Figura 2 – Composição percentual do custo de produção da mamona no Ceará em três níveis de produtividade na safra 2012/13. (Fonte: Centro de referência da cadeia de produção de biocombustíveis para a agricultura familiar)

Na Bahia as safras de 2010/11 tiveram uma área plantada de 140 mil hectares dedicados à cultura, no entanto, as duas safras seguintes 2012/13 foram ruins, derrubando a área plantada para 69,2 mil hectares (BIODIESELBR, 2013), muito disso em motivo da seca registrada nesse período. Além disso, o preço da saca de mamona chegou a cair abaixo de R\$ 28, pelo fato da indústria química só conseguir absorver volumes relativamente modestos da produção o que também desestimulou o plantio (BIODIESELBR, 2013).

Em 2013, os agricultores baianos colheram cerca de 600 quilos de sementes por hectare de mamona, mas a Secretaria de Agricultura do Estado (SEAGRI) garante que seria possível mais do que dobrar essa média com a adoção de técnica relativamente simples de manejo (BIODIESELBR, 2013).

Segundo a secretaria de agricultura do estado da Bahia, depois de muitas colheitas e anos de produção, o solo está muito compactado, só a descompactação desse solo já dobraria a produtividade. Além disso, a distribuição de sementes de melhor qualidade aliadas a práticas de adubação melhores, poderia proporcionar uma produtividade de 1.500 kg por hectare. Ainda de acordo a secretaria de agricultura, na principal região produtora de mamona da Bahia, Irecê, a irrigação que é uma possibilidade bastante real, e se tudo for feito direito, daria para chegar a quatro ou cinco mil quilos de mamona por hectare (BIODIESELBR, 2013). De acordo Ribeiro Filho, (1966) citado por Bahia (2007) a mamoneira tem potencial para produzir mais de 10.000 kg.ha⁻¹, pois já produziu mais de 8.500 kg.ha⁻¹ de sementes (bagas) com cultivares de porte baixo, 13 em regime de irrigação com fertilização e controle total de plantas daninhas, pragas e sem a incidência de doenças.

Mercado econômico mundial

No mercado internacional, a comercialização da mamona pode ser feita tanto na forma bruta e de pouco valor agregado (em baga), quanto em formas intermediárias (óleo bruto ou refinado) ou através da exploração de seus derivados de alto valor agregado (ácido graxo destilado do óleo de mamona desidratado, óleo de mamona hidrogenado, óleo de mamona sulfurinado, ácido 12-hidróxido esteárico e outros). A demanda por óleo não é muito grande, pois o principal consumidor tem sido a indústria química fina (ricinoquímica), que utiliza

essa matéria prima para fabricação de nylon 11, poliuretanos, vidros especiais a prova de bala, lentes de contato, plásticos de elevada resistência e outros (SANTOS e KOURI, 2006).

Atualmente, o maior produtor mundial de mamona é a Índia, com mais de 1.600.000 toneladas em 2012, de acordo com dados da FAO, colocando-se bem acima da produção chinesa de 170 mil toneladas, à moçambicana com 62 mil toneladas e da produção brasileira que despencou após mais um ano de seca, atingindo mais de 25 mil toneladas, como apresentado no (Figura 3) (CONAB, 2013).

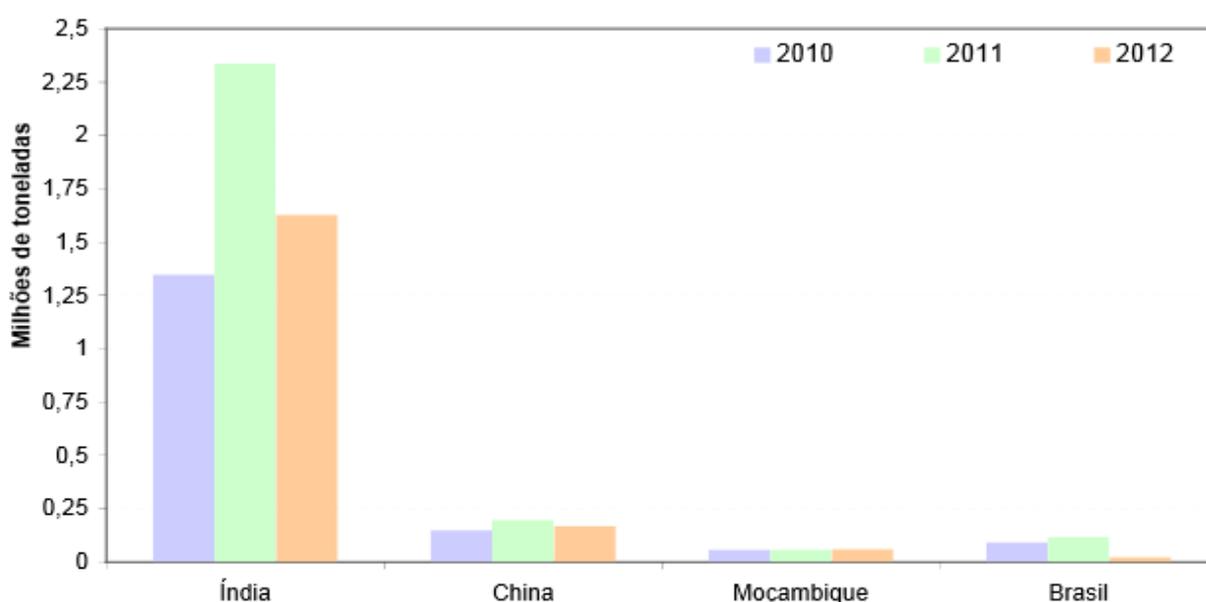


Figura 3: Produção de mamona dos maiores produtores mundiais, entre 2010 e 2012. (Fonte: FAO (2013))

No ano de 2013, considerando dados da Associação Indiana de Extratores de Solvente, a área plantada teve uma leve queda na Índia, sem, entretanto, tal fato servir para diminuir a queda dos preços do óleo deste produto (CONAB, 2013).

O cenário econômico atual no Brasil é caracterizado por meio da divulgação do "3º Levantamento de Avaliação da Safra 2013/14" (Tabela 3) estima-se grande aumento, tanto na área quanto na produção de mamona, valores esses puxados pela retomada de produção na Bahia, que concentra grande percentual da produção no Brasil e que sofreu uma grande quebra na safra passada, ou seja, é mais uma recuperação que um crescimento

propriamente dito. Ressalta-se que na safra 2011/12, também houve seca na região (CONAB, 2013).

Tabela 3 - Área plantada, produtividade e produção de mamona.

Mamona - Brasil									
REGIÃO/UF	Série Histórica de área plantada (em mil hectares)			Série Histórica de Produtividade (em Kg/ha)			Série Histórica de Produção (em mil toneladas)		
	2011/12	2012/13	2013/14	2011/12	2012/13	2013/14	2011/12	2012/13	2013/14
NORDESTE	123,9	84,4	133,2	172	163	609	21,4	13,8	81,2
PI	0,8	1	1,4	96	75	480	0,1	0,1	0,7
CE	33,8	12,8	12,8	79	140	305	2,7	1,8	3,9
RN	0,1	-	-	571	-	-	0,1	-	-
PE	2,7	1,4	1,4	231	267	415	0,6	0,4	0,6
BA	86,5	69,2	117,6	207	166	646	17,9	11,5	76,6
SUDESTE	3,3	2,1	2,0	862	694	1.025	2,9	1,5	2,1
MG	2,8	2	1,9	738	630	975	2,1	1,3	1,9
SP	0,5	0,1	0,1	1.554	1.98	1.965	0,8	0,2	0,2
SUL	1	0,9	0,9	620	600	1.500	0,6	0,5	1,4
PR	1	0,9	0,9	620	600	1.5	0,6	0,5	1,4
NORTE/NORDESTE	123,9	84,4	133,2	172	163	609	21,4	13,8	81,2
CENTRO-SUL	4,3	3	2,9	805	666	1.166	3,5	2	3,5
BRASIL	128,2	87,4	136,1	175	180	622	24,9	15,8	84,7

Fonte: 3º levantamento da safra 2013/2014/ Conab.

Melhoramento Genético da Mamoneira

Um dos principais objetivos do melhoramento genético da mamoneira é a obtenção de cultivares mais produtivas, com porte reduzido, precoces e com elevados teores de óleo (PASSOS, 2009). No Brasil o melhoramento da mamoneira teve início na década de 30 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em São Paulo. A contribuição deste órgão para o melhoramento da espécie permitiu o lançamento de cultivares como Zanzibar, Sanguínea, IAC 38, Campinas, Guarani, IAC 80 e IAC 226 (SAVY FILHO, 1999; FREIRE *et al.*, 2001; MYCZKOWSKI, 2003; BELTRÃO, 2004).

Na Bahia, o melhoramento da cultura começou na década de 60 pelo Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Leste (IPEAL), localizado em Cruz das Almas. A partir da década de 70 passou a ser conduzido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia – EPABA, até esta ser

transformada no Centro de Mandioca e Fruticultura da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A partir da década de 80 o melhoramento da mamoneira no Estado passou a ser conduzido pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA, com sede no município de Itaberaba.

Durante todo o período de pesquisa foram desenvolvidas e lançadas várias cultivares no Brasil, dentre as quais: 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 (SAVY FILHO, 1999; FREIRE *et al.*, 2001; MYCZKOWSKI, 2003; BELTRÃO, 2004). Segundo estes autores essas cultivares se destacam por apresentar características importantes tais como: aumento de produtividade, aumento do teor de óleo na semente, diminuição do porte da planta, o que facilita a colheita mecânica, diminuição do grau de deiscência do fruto a fim de evitar o desperdício no campo e proporcionar um menor número de colheitas e aumento do nível de resistência a algumas das principais doenças que ocorrem no país.

Na década de 90, a Embrapa concentrou os trabalhos de pesquisa e experimentação da cultura da mamoneira no Centro Nacional de Pesquisas do Algodão (CNPA), localizado em Campina Grande-PB, com enfoque maior para germoplasma adaptados ao semiárido do Nordeste, desenvolvendo linhagens como a CNPA M. SM4 e CNPA M. 90-210, lançadas como cultivares, quais sejam: BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina, respectivamente (SAVY FILHO, 1999; FREIRE *et al.*, 2001).

Outras instituições nacionais, também trabalharam no melhoramento da mamoneira como a UFV (Universidade Federal de Viçosa), a ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”), o IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária), a EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) e a antiga EPACE (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará). Apesar de não lançarem cultivares, participaram 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, lançadas pela Embrapa em 1998 e 1999, respectivamente, para toda a área zoneada para a mamona no Nordeste e norte de Minas Gerais (BELTRÃO, 2004).

Visando obter materiais superiores de mamoneira para regiões de baixa altitude e para o semiárido da Bahia, no ano de 2005, o Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO), pertencente à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizada em Cruz das Almas, Bahia, iniciou seus trabalhos com a introdução de cultivares (BAHIA *et al.*, 2008; CERQUEIRA, 2008; SILVA, 2008, SAMPAIO FILHO, 2009; DIAMANTINO, 2013), por processos de hibridações (PASSOS *et al.*, 2010), por condução de população segregantes e autofecundações para avanços de gerações (OLIVEIRA, 2011) com desenvolvimento de linhagens homozigotas na geração F6 com presença de alta variabilidade genética e ganhos genéticos com a seleção, envolvendo avaliações moleculares (MACHADO,2011, MACHADO e SILVA 2013) e morfoagronômicas, seguido de seleção de linhagens elites (SANTOS, 2013).

É possível determinar caracteres em comum, que são buscados pelas instituições de pesquisa, como: o alto teor de óleo, o porte reduzido, caracteres de produção (peso, número, tamanho de bagas, de grão e potencial produtivo) aliado a resistência/tolerância as principais doenças, a exemplo de mofo-cinzento causado pelo fungo *Amphobotrys ricini*. Somando-se a esses objetivos, o melhoramento da mamoneira na UFRB está direcionado para atender as regiões do recôncavo baiano e semi-árida da Bahia, visando principalmente ao alto teor de óleo na semente, ao peso e número de sementes, a estatura reduzida e a resistência/tolerância ao mofo-cinzento.

Método de Melhoramento SSD (SINGLE SEED DESCENT)

No método SSD (*Single Seed Descent*) a partir da geração F₂ é feita a colheita de uma única semente por planta de todas as plantas. Esta semente é utilizada para semear a geração seguinte, quando este procedimento será repetido (geralmente até F5 ou F6), fazendo em seguida uma seleção artificial das melhores linhagens e colheita de cada linha em bulk para compor o ensaio de rendimento (CARVALHO *et. al.*; 2008).

Neste método, a seleção natural não influencia as populações, a não ser que os genótipos não produzam pelo menos uma semente. Por isso, as populações segregantes podem ser plantadas fora da época normal de plantio (na entressafra, por exemplo) e em qualquer ambiente, a exemplo de casa-de-

vegetação. Pela possibilidade de conduzir as populações segregantes durante a entressafra, pode-se reduzir o tempo necessário para a obtenção das linhagens puras e conseqüentemente para a obtenção de uma nova variedade (BESPALHOK FILHO *et al.*, 2006; CARVALHO *et. al.*; 2008).

De acordo com Bueno (2006), à medida que as gerações de autofecundação são naturalmente avançadas, a probabilidade de fixação dos loci com alelos favoráveis aumenta.

Algumas das vantagens do método consiste na maior chances de manter a variabilidade genética da geração F_6 similar à da F_2 ; pela seleção ser realizada somente em geração avançada, próxima à homozigose, o que facilita os avanços genéticos, pois é realizada sem a interferência dos efeitos não aditivos; fácil para conduzir populações, permite conduzir grande número cruzamentos; interessante para regiões temperadas, onde não é possível fazer mais de uma safra por ano; não há perda por amostragem dos indivíduos F_2 ; não há necessidade de fazer muitas anotações, é preciso apenas manter a identidade e a geração em que a constituição genética se encontra; maior facilidade de manter a população segregante com a possibilidade do cultivo de várias gerações por ano, em uma pequena área, reduzindo os custos financeiros e o tempo para obtenção de novas linhagens; as gerações de autofecundação que conduzem à homozigose podem ser cultivadas fora do ambiente a que estas se destinam, sendo apenas levadas para o ambiente de cultivo quando as linhas já atingiram a homozigose para que seja praticada a seleção. (BESPALHOK FILHO *et al.*, 2006; BUENO, 2006; CARVALHO *et. al.*; 2008).

Como desvantagens do método podem-se citar o risco de perder variabilidade se perder um indivíduo (doenças, pragas, déficit hídrico, enxarcamento, etc.); não ocorre recombinação nas linhas selecionadas; ter que avaliar grande número de linhagens para identificar as superiores; pouca chance de seleção precoce.

Marcadores Microsatélite (SSR – Simple Sequence Repeat)

Após o advento das técnicas moleculares foi possível à análise da variação dos organismos em nível de DNA, observando diferenças nas sequências gênicas com uso de marcadores (ZUCCHI, 2002). Marcadores moleculares são pontos de

referência nos cromossomos, definidos como todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso (isoenzimas) ou de um segmento de DNA, que pode ser regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA e GRATTAPLAGIA, 1998).

A sequência de nucleotídeos e a função de um marcador molecular podem ou não ser conhecidas e, em geral, são desconhecidas. Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, um marcador molecular é adicionalmente definido como marcador genético. Isto é feito, por exemplo, através do estudo do comportamento do marcador em uma população segregante (LIMA, 2008). Portanto, é importante enfatizar que o simples fato do marcador ser de DNA, ou produto da transcrição e tradução de uma sequência de DNA, não implica em que se constitua em um marcador “genético”, como frequentemente se supõe (BECKMANN, 1988)

Os genomas de eucariotos são densamente povoados por microsatélites ou sequências simples repetidas (SSRs), as quais consistem de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em tandem, e são classificadas pelo motivo repetido, podendo ser mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos e, também, pelo tipo de sequência repetitiva, como microsatélites perfeitos, imperfeitos, interrompidos ou compostos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os microsatélites possuem um alto polimorfismo, decorrente das altas taxas de mutação nestes locos, que variam de 10^{-2} a 10^{-6} por geração (ELLEGREN, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006). No entanto, são flanqueados por sequências únicas e por isso podem ser amplificados através de PCR, o que fazem deles ótimos marcadores moleculares (ANTONANGELO, 2012).

Cada “ilha” microsatélite, independente do elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. O polimorfismo nestes loci é resultado de variações do número de repetições das sequências de nucleotídeos (AKKAYA *et al.*, 1992).

Nesse contexto, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de diversidade genética. Os SSR são muito frequentes e distribuídos ao acaso, permitindo uma grande cobertura de qualquer genoma eucarioto o que o torna uma das melhores opções para uso na caracterização de cultivares, especialmente em germoplasma aparentado e de baixa variabilidade (FERREIRA e GRATTAPLAGIA, 1998; MILLACH, 1998).

O fato dos marcadores microssatélites serem altamente polimórficos é de fundamental importância para a detecção de polimorfismo em uma população que já tem sofrido pressão de seleção por meio de caracteres morfoagronômicos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é identificar dentre as 47 linhagens de uma população (F6), as linhagens mais divergentes por meio dos marcadores microssatélites, aplicando outra pressão de seleção de aproximadamente 20%. Análises multivariadas com base em caracteres morfo-agronômicos e moleculares serão feitas, utilizando o algoritmo de Gower (1971), para identificar as distâncias genéticas entre os indivíduos, verificando assim se há diferenças significativas na formação dos grupos e interferência do ambiente. Posterior à seleção, esses genótipos irão compor ensaios em diversas cidades no estado da Bahia para avaliação de sua distinguibilidade, adaptabilidade e estabilidade em diversas condições edafoclimáticas.

REFERÊNCIAS

- AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A; CREGAN, P. B. **Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean**. *Genetics*, v.132, p.1131-1139, 1992.
- ANTONANGELO, A. T. B. F. **Genotipagem de leveduras presentes no processo industrial de produção de álcool combustível e estudo do polimorfismo de genes envolvidos no processo fermentativo em *Saccharomyces cerevisiae*** – Botucatu: [s.n.], 2012.
- AZEVEDO, D. M. P. de; et. al. **Recomendações técnicas para o cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1997. 52 p. (Circular técnica, 25).
- 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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.3, p.357-362, 2008.

BAHIA, Henrique Fortes. **Avaliação e seleção de genótipos de mamoneira (*Ricinus communis* L.) / Henrique Fortes Bahia.** Cruz das Almas, BA, 2007.

BELTRÃO, N. E. M.; AZEVEDO, D.M.P. Fitologia. In: AZEVEDO, D.M.P.; BELTRÃO, N. E. M. (Ed.). O Agronegócio da mamona no Brasil. 2.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007b. p.116-137.

BELTRÃO, N. E. M.; ARAÚJO, A. E.; AMARAL, J. A. B.; SEVERINO, L. S.; CARDOSO, G. D.; PEREIRA, J. R. **Zoneamento e época de plantio da mamoneira para o nordeste brasileiro.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004.

BERTINI, C. H. C. M.; SILVA, F. P. S.; NUNES, R. P.; SANTOS, J. H. R. Ação gênica, heterose e depressão endogâmica de caracteres de produção em linhagens mutantes de algodoeiro herbáceo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.7, p.941-948, 2001.

BESPALHOK FILHO, J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, R. **Introdução ao Melhoramento de Plantas.** Curitiba: UFP, 2006. Disponível em: <www.bespa.agrarias.ufpr.br>. Acesso em: janeiro de 2014.

BESPALHOK, G. e O. **Melhoramento de Plantas Autógamas por Híbridação.** Disponível em: Acesso em: janeiro de 2014.

BIODIESELBR. **A Bahia ainda aposta na mamona.** 08 Ago 2013 BiodieselBR.com. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/noticias/materia-prima/mamonas/a-bahia-ainda-aposta-na-mamona-080813.htm>. Acesso em Abril de 2014.

BUENO, L. C. de S.; et al. **Melhoramento Genético de Plantas: Princípios e Conceitos**, 2 ed. UFLA, p. 99-115, 2006.

CANGEMI, J. M. **Biodegradação de poliuretano derivado do óleo de mamona**. 2006. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

CARVALHO, B. C. L. **Manual do cultivo da mamona**. Salvador: EBDA, 2005. 65p. il.

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 capaz de detectar polimorfismo em mamoneira**, III Congresso Brasileiro de Mamona Energia e Ricinoquímica, 2008.

COIMBRA, J. L. M.; CARVALHO, F. I. F. de ; OLIVEIRA, A. C. de ; GUIDOLIN, A. F. Criação de variabilidade genética no caráter estatura de Planta em aveia: hibridação artificial x mutação induzida. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v.10, n.3, p. 273-280, 2004.

CONAB. **Mamona/Dezembro de 2013**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_01_14_08_58_56_mamonadezembro2013.pdf. Acesso em: janeiro de 2014.

COSTA, M. N. da. **Análise dialéctica das capacidades geral e específica de combinação utilizando técnicas uni e multivariadas de divergência genética em mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. 2006. 132f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Areia, 2006.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Editora Civilização Brasileira S.A. 2a edição; Rio de Janeiro, RJ, 1982, 599p.

DIAMANTINO, M. S. A. S.. **Variabilidade genética, viabilidade de pólen e estresse salino em genótipos de mamoneira** / Maria Selma Alves Silva Diamantino._ Cruz das Almas, BA, 2013.

ELLEGREN, H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Rev. Genetics** 5: 435-445.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª edição. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FREIRE, E. C.; LIMA, E. F.; ANDRADE, F. P. de. Melhoramento genético. **In: AZEVÊDO, D. M. P. de.; LIMA, E. F. (Ed.). O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa-Algodão, p. 230-256. 2001.

GOWER, J. C. **A general coefficient of similarity and some of its properties**. **Biometrics**, v.27, p. 857-874, 1971.

LIMA, R. L. S. et al. **Casca e torta de mamona avaliados em vasos como fertilizantes orgânicos**. *Caatinga*, Mossoró, v. 21, n. 5, p. 102-106, 2008.

LIMA, A. A. et al.; **Identificação molecular de linhagens de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* utilizando marcadores RAPD**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 1676-1340; 218. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

MACHADO, E. L. **Genotipagem, Teor de Óleo, Otimização do Método Gravimétrico e Desenvolvimento de Marcadores Microsatélite em (*Ricinus communis* L.)**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB. 118 p, Cruz das Almas, 2011. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias).

MACHADO, E.L.; SILVA, S. A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 1457-1463, 2013.

MILLACH, Sandra. **Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas**. Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para

o Nordeste Brasileiro. Departamento de Plantas de Lavoura. Fac. Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

MOREIRA, J. A. N.; LIMA, E. F.; FARIAS, F. J. C.; AZEVEDO, D. M. P. de. **Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande. EMBRAPA-CNPA, 1996. 29p. (EMBRAPA-CNPA. Documentos, 44).

MOSHKIN, V.A. **Castor**. New Delhi: Amerind, 1986. p. 65-92.

MYCZKOWSKI, M. L. **Variabilidade genética para o teor de óleo entre progênes autofecundadas de mamona (*Ricinus communis* L.) da cultivar Guarani**. Botucatu: UNESP, 38 p., 2003 (Dissertação de mestrado).

OLIVEIRA, R. S. de. **Avaliação de população segregante (F3) de mamoneira em condições do recôncavo baiano**. 2011. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia Cruz das Almas, 2011.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R. & VIEIRA, M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecul Biol.**29 (2): 294-307.

PASSOS, A. R. **Estudo genético e agrônômico da mamoneira em baixas altitudes do Recôncavo Baiano**. 2009. 109f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, UFRB, Cruz das Almas, 2009.

PINOTTI, R. N. ; AMARAL, J. G. C. do; **Informações Econômicas da Mamona como Biocombustível**. Pesquisa & Tecnologia, vol. 10, n. 1, Jan-Jun 2013.

QUEIROGA, V. P.; BELTRÃO, N. E. M. **Produção e Armazenamento de Sementes de Mamona (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande: Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, 2004. (Comunicado Técnico nº 206).

RIBEIRO FILHO, J. **Cultura da mamoneira**. Viçosa: UFV, 75 p., 1966.

SAMPAIO FILHO, O. M. **Análise descritiva, agrupamento e análise de trilha de cultivares de mamoneira em dois anos de cultivo em Cruz das Almas – BA.** Cruz das Almas, 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

SANTOS, R. F. dos.; KOURI, J. Panorama mundial do agronegócio da mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracajú. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 1 CD-ROM.

SAVY FILHO, A. Hibridação em mamoneira. In: BORÉM, A. Hibridação artificial de plantas. 1ª edição. Viçosa: Editora Universitária-UFV, p.331-356. 1999.

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

SAVY FILHO, A. Melhoramento da Mamona. In: Borém, Aluizio. (Org.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 385-407, 1999.

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.

VENANCIO, M. M. H. **Caracterização agro-morfológica e molecular de acessos de mamona.** Campinas, 2013. 110 fls.

VENTURA, D. A. M. F.; et al. **Análise Comparativa Entre o Biodiesel de Girassol e o Biodiesel de Mamona.** IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, João Pessoa, PB – 2010.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 130f. Tese (Doutorado em agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CAPÍTULO 1

SELEÇÃO DE LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES MICROSSÁTELITES¹

¹Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Pesquisa Agropecuária Brasileira.

SELEÇÃO DE LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES MICROSSÁTELITE

Resumo

O fato dos marcadores microssatélites serem altamente polimórficos é de fundamental importância para a detecção de polimorfismo em uma população que já tem sofrido pressão de seleção por intermédio de caracteres morfoagronômicos. Selecionou-se um total de 47 indivíduos por apresentarem características morfo-agronômicas importantes para a cultura, sendo estes avaliados por meio de 53 pares de primers SSR. O tamanho dos alelos variou de 84 pb a 439 pb sendo que trinta e seis loci microssatélites apresentaram polimorfismo gerando 119 alelos com média de 3,31 alelos por loco. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,06 até 0,81 sendo considerados loci altamente informativos valores de PIC superiores a 0,5. A partir da análise desses loci polimórficos foi possível o agrupamento dos genótipos em sete grupos distintos, mostrando que há divergência genética entre eles. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é identificar dentre as 47 linhagens de uma população (F_6), as linhagens mais divergentes por meio dos marcadores microssatélites (SSRs), aplicando outra pressão de seleção de aproximadamente 20% para a composição de 20 linhagens elites distintas. Essas análises favoreceram a seleção dessas linhagens mais divergentes, para posterior avaliação de desempenho em ensaios sob condições de diferentes ambientes.

Palavras-chave: pressão de seleção, alelos, polimorfismo

SELECTION OF ELITES LINEAGES CASTOR BEAN BY MICROSATELLITE MARKERS

ABSTRACT

The fact of microsatellite markers being highly polymorphic is crucial for the detection of polymorphism in a population that has already undergone selection pressure by morph agronomic characters. It was selecting a total of 47 individuals from a F6 population by presenting important phenotypic characteristics to the culture, and these individuals were evaluated by 53 pairs of SSR primers. The molecular analysis revealed alleles that ranging to 84 pb to 439 pb, and 36 microsatellite loci showed polymorphism, generating 119 alleles with average of 3,31 alleles per loci. The Content Information of Polymorphism (PIC) varied from 0,06 to 0,81 being considered highly informative loci values above the PIC 0,5. From the analysis of these polymorphic loci was possible to group the genotypes into seven distinct groups, showing that there is genetic divergence between them. Thus, the aim of this study was to identify among the 47 lines from a population, the most divergent by microsatellite markers. Then, applying other selection pressure of approximately 20%, based on the greatest genetic distances among the individuals were selected the 20 most divergent lineages elites. Subsequently, tests will be conducted to evaluate the performance in distinct environment conditions.

Keywords: Selection pressure, alleles polymorphism

INTRODUÇÃO

A mamoneira, cientificamente conhecida como *Ricinus communis* L., é uma planta arbustiva, monoica, pertencente à família Euphorbiaceae (SAVY FILHO, 1999), cujo fruto se extrai um óleo de excelentes propriedades, de largo uso em diversos seguimentos da indústria devido a uma característica peculiar, possui uma hidroxila (OH) ligada na cadeia de carbono, não existindo outro óleo vegetal produzido comercialmente com esta propriedade. Isto lhe confere uma alta viscosidade e solubilidade em álcool à baixa temperatura. É também utilizado como matéria prima para a produção de biodiesel (COSTA *et al.*, 2006).

De modo geral a mamoneira é caracterizada por ser uma cultura agrícola que exige pouco investimento e também por ser de fácil adaptação em diversas regiões do país, por outro lado, essas características acarretam baixa produtividade em relação a outras culturas (PINOTTI e AMARAL, 2013), pois o agricultor em sua grande parte pertencente à agricultura familiar, na maioria das vezes não possui material vegetal de boa qualidade, não dispõe de tecnologia sendo muitas vezes possível até preparar o solo de maneira eficaz.

De acordo o Mapa (2005) a produção de mamona possui elevado teor de óleo quando comparado a outros tipos de grãos como soja, algodão, girassol, amendoim e canola. Ainda segundo Pinotti e Amaral (2013), o preço no mercado internacional do óleo de mamona é muito elevado quando comparado a outros tipos de óleos, o que pode ser causado pela grande diversidade na utilização da indústria química fina.

Os principais problemas para a exploração racional de espécies vegetais, para produção de biodiesel, na região Nordeste, estão relacionados ao baixo potencial produtivo de cultivares, principalmente quanto ao elevado teor de óleo e tolerância a pragas e doenças. Ou seja, não há sementes de cultivares que

atendam às necessidades dos agricultores e dos processadores da matéria prima produzida (PALMIERI e MAIA, 2007; BAHIA *et al.*, 2008).

Por sua vez, 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). Estratégias de seleção que permitam o desenvolvimento de cultivares de mamoneira *R. communis*, com maiores teores de óleo e adaptadas às diferentes condições ambientais, são indispensáveis para que a cultura da mamona se consolide como importante componente do programa nacional de produção de biodiesel (BAHIA, *et. al.*, 2008; DIAMANTINO, 2013; MACHADO *et al.*, 2013).

De posse dessas informações o objetivo desse trabalho é identificar dentre 47 indivíduos de uma população avançada (F6), linhagens mais divergentes por meio dos marcadores microssatélites, aplicando uma pressão de seleção de aproximadamente 20%. Posterior à seleção, essas linhagens irão compor ensaios em diversas cidades no estado da Bahia para avaliação de seu desempenho e sua interação com os ambientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As linhagens elites foram obtidas a partir de cruzamentos entre os parentais: BRS Nordestina, Sipeal, EBDA MPA-17, Mirante e Paraguaçu e desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - NBIO/UFRB, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

O município de Cruz das Almas está 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 método de melhoramento utilizado para condução das populações foi o SSD (*Single Seed Descent*) até a geração avançada F6, constituindo nessa geração alto grau de homozigose. Esse método proporcionou a seleção individual de plantas pertencentes à população avançada (F6). De um total de 240 linhagens, 47 foram selecionados, o que sugere uma pressão de seleção de aproximadamente 20%. Esta seleção levou em consideração os caracteres morfológicos, baseada naqueles indivíduos que apresentaram as melhores médias para o teor de óleo e peso de sementes em relação aos demais.

Estas 47 linhagens foram avaliadas com marcadores moleculares do tipo SSR por meio de distância genética entre os indivíduos. Ou seja, aquelas linhagens que apresentaram maior valor dentro da matriz de dissimilaridade, foram as mais divergentes, sendo então escolhidas para compor os ensaios em diferentes localidades.

Isolamento do DNA

O DNA genômico foi extraído segundo protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) com modificações (Tabela 1). Para tanto, foram coletadas folhas jovens e saudáveis sendo encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) da UFRB. As folhas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% e enxaguadas com água destilada. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em freezer há temperatura de -30°C até o momento da extração. Procedendo-se a extração, as amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz, sendo transferidas para microtubos seguida da adição de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4M; Tris-HCl 100mM (pH 8,0); EDTA 20mM pH 8,0; polivinilpirrolidona 2% MW10000; β -mercaptoethanol 0,8% e água ultra-pura q.s.p.). Após, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria durante 45 minutos a 65°C, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Um total de 700 μ l da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado as amostras. Então, as amostras foram homogeneizadas por 5 minutos e centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm em centrífuga e o sobrenadante foi recuperado e transferido para novos tubos pré identificados. Foram adicionados mais 700 μ l da mistura clorofórmio: álcool isoamílico e novamente as amostras foram centrifugadas a

10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado mais uma vez e a ele adicionados 600µl de álcool isopropílico (gelado), ficando à proporção de 1:1 do volume coletado, com objetivo de precipitação do DNA.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm, e o isopropanol descartado com recuperação do DNA precipitado. Ao precipitado foram acrescentados 600 µl de TE (Tris-Hcl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) mais 200 µl de acetato de amônio 7,5M. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos no gelo, e em seguida centrifugadas. Para a precipitação das amostras um total de 1,5 mL de etanol absoluto gelado foi adicionado, sendo as mesmas incubadas por uma hora a -20°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm e em seguida lavadas com um mL de etanol 70%, centrifugando por três minutos à 12000 rpm, repetindo-se esse mesmo processo mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o precipitado, permaneceram por duas horas a temperatura ambiente, para secagem. Logo após, o precipitado foi solubilizado em 100µl de tampão TE contendo dois microlitros de RNase (10mg.ml⁻¹), posteriormente as amostras foram incubadas em banho maria à 37°C por 30 minutos e armazenadas a -20°C.

Tabela 1 – Comparação entre os protocolos Doyle & Doyle 1987 e Doyle & Doyle 1987 com modificações.

Doyle & Doyle 1987		Doyle & Doyle 1987 com modificações	
Reagentes	[] Final	Reagentes	[] Final
CTAB	2%	CTAB	2%
Tris-HCl pH 8,0 (1M)	100mM	Tris-HCl pH 8,0 (1M)	100mM
NaCl	1,4M	NaCl	1,4M
EDTA (0,5M)	20mM	EDTA (0,5M)	20mM
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	1%	*Polyvinylpyrrolidone (PVP)	2%
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	3%	***Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	-
2-mercaptoetanol	0,2%	*2-mercaptoetanol	0,8%
**Água destilada q.s.p.		**Água destilada q.s.p.	

* Reagentes que sofreram alterações em suas concentrações

** Completar para o volume desejado

*** Não foi utilizado

Quantificação do DNA genômico

Para avaliação da quantidade e integridade do DNA extraído, um total de cinco microlitros do DNA foi adicionado a uma solução de azul de bromofenol (0,25%), e glicerol (60%) no volume de cinco microlitros. O DNA genômico foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo, e submerso em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA). A quantidade e qualidade do DNA em cada amostra foi estimada por meio de análise comparativa com (DNA lambda-Invitrogen) de concentração conhecida. Posteriormente, todas as amostras foram ajustadas para uma concentração de cinco $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ para proceder a PCR (Polymerase Chain Reaction).

Condições de Amplificação e Eletroforese

Para amplificação das regiões SSRs, foram utilizados 53 pares de iniciadores, sendo 23 desenvolvidos por Bajay et al. (2009, 2011) e 30 por Machado & Silva (2013). As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 25 μL . Cada reação conteve 3 μL de DNA genômico (5 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 2,5 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), 0,65 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,5 μL de cada iniciador (*forward* e *reverse*, 20 mM), 0,2 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL - Invitrogen) e água ultra-pura q.s.p. A PCR foi feita em um termociclador Biocycler MJ96+ /MJ96G (Applied Biosystems do Brasil Ltda., São Paulo, SP) programado para cinco minutos a 94 °C para desnaturação inicial do DNA, seguida por 35 ciclos de um minuto a 94 °C, um minuto com temperaturas entre 60 e 64 °C a depender do par de iniciador (Tabela 2) e 1 minuto a 72 °C. O ciclo final foi seguido por uma extensão de dez minutos à 72 °C.

A separação dos fragmentos se deu por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (7%), contendo 5,6M de uréia em tampão TBE 1 X (LITT et al., 1993). A eletroforese foi conduzida em cuba vertical com capacidade para 80 amostras em gel de 0,5 mm de espessura. Antecedendo a aplicação das amostras, submeteu-se o gel a uma pré-corrída por 30 minutos a 60 Watts de potência, com objetivo de deixar a placa de vidro aquecida, impedindo que a molécula de DNA se renature durante a aplicação das amostras.

A eletroforese das amostras foi realizada a 70 watts de potência por duas horas. A coloração do gel com nitrato de prata foi mediante as seguintes etapas: 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).

O tamanho dos fragmentos foi obtido utilizando-se padrão de peso molecular 100 pb (Invitrogen, São Paulo, SP). Após seco, o gel foi fotografado com câmera digital modelo Sony (16 megapixels) de resolução.

Análise de Dados

A leitura do gel foi feita mediante a identificação dos loci polimórficos e estimativa do tamanho dos fragmentos por pares de bases (pb) para cada linhagem.

Para os dados moleculares as estimativas das frequências alélicas, número de alelos por loco, heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC - *Polymorphic information content*), coeficiente médio de endogamia (F) e equilíbrio de Hardy-weimberger foram obtidos com o auxílio do programa PowerMarker versão 3.25 (LIU; MUSE, 2005), bem como, a matriz de dissimilaridade genética usando o índice de Nei e Li (1973)

$$S_{SD} = \frac{2a}{2a+b=c}$$

A heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no loco marcador e depende do número de alelos e de sua frequência na população, ou seja, é simplesmente a proporção de indivíduos heterozigotos na população. Num único loci, calcula-se como:

Heterozigose estimada como base Nei (1978):

$$\hat{H}_l = 1 - \sum_{u=1}^k \tilde{P}_{luu}$$

- Sendo P – a frequência estimada do iésimo alelo.

A análise de agrupamento hierárquico foi realizada usando o método UPGMA *Unweighted Pair-Group Method Averages*, (SNEATH e SOKAL, 1973). O dendrograma foi construído por meio do software STATISTICA (STATISTICA, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 53 pares de primers SSR testados geraram fragmentos com bom padrão de amplificação. A amplitude dos fragmentos variou entre 84 pb a 439 pb para os locos RcoM30 e Rco40, respectivamente (Tabela 2). Destes, 36 foram polimórficos (67,92%) para as linhagens avaliadas. A figura 2 mostra o perfil eletroforético dos locos RcoM28, Rco11, Rco23 e RcoM2. O número total de alelos obtidos foi 119, com média de 3,31 alelos por loco. Resultado semelhante foi obtido por Bajay (2009), de 41 locos de SSR analisados em 76 acessos de mamona pertencente ao Banco de Germoplasma da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (BAG-EMBRAPA) e 35 acessos a UNESP de Botucatu, 26 foram polimórficos (63,4%) e a partir destes foi observado um total de 111 alelos (4,27 alelos/loco).

Machado (2011) trabalhou com 24 acessos do banco de germoplasma de mamoneira da UFRB/NBIO encontrando 118 locos polimórficos totalizando 31,13%. Já Diamantino (2012), trabalhou com 15 genótipos da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) testando 53 iniciadores, dos quais, 50 geraram polimorfismo (94,33%), num total de 279 alelos com média de 5,58 alelos por loco.

Dos 119 alelos obtidos, 24 (20,17%) apresentaram frequência inferior a 5%, sendo considerados, alelos raros. Bajay (2009) observou 37 alelos (33,33%), com uma frequência inferior a 5%, o que os caracteriza como alelos raros, ou seja, são aqueles alelos que surgem na população em uma frequência inferior a 5%, neste caso, são requeridas grandes amostras para a permanência desse alelo na nova população. Por sua vez, Diamantino (2012) encontrou 27 alelos (8,27%) com frequência inferior a 5%.

A presença destes alelos pode ser importante na contribuição da variabilidade genética da espécie, porém, são sensíveis a perdas, em função da

seleção de plantas para manutenção da coleção, sobretudo em função do sistema reprodutivo (autógama) que tem um pouco menos diversidade genética do que espécies alógamas ou com sistema de cruzamento misto (HAMRICK e GODT, 1997).

Quando considerado a maior frequência alélica dentre os 36 loci, 25 (69,44%) alelos mais comuns apresentaram grau de polimorfismo satisfatório, ou seja, inferior a 90% (MACMANUS et al., 2011). Ainda, dos 119 alelos comuns 37 (31,09%), apresentaram frequência ($4\% < \text{alelo comum} < 20\%$) e 58 alelos frequentes (48,74%), com frequência ($>20\%$). O loco Rco23 foi o que apresentou o maior número de alelos, 9. Doze iniciadores tiveram apenas dois alelos (Rco3, Rco12, Rco15, Rco18, Rco20, Rco40, Rco41, RcoM4, RcoM6, RcoM14, RcoM21 e RcoM28) (Figura 1).

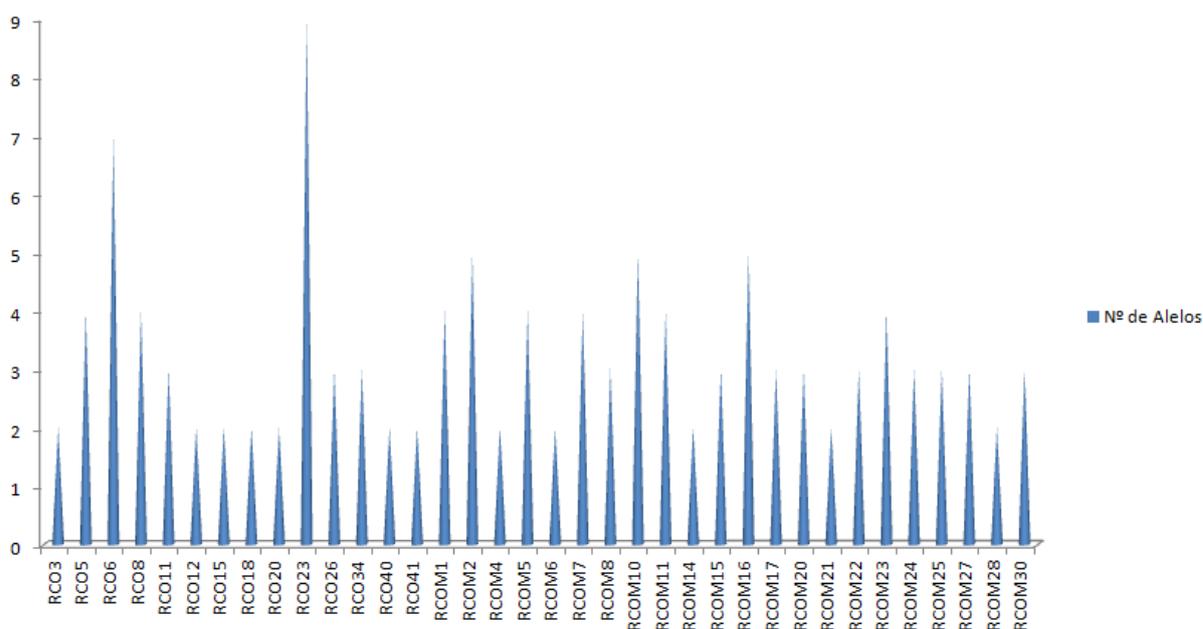


Figura 1. Nº de alelos gerados por cada marcador microsatélite.

Bajay (2009) em seu trabalho encontrou no máximo seis alelos em germoplasmas da Embrapa por meio do marcador Rco5. Já os marcadores Rco11, Rco12, Rco22 e Rco33 apresentaram apenas dois alelos nas três populações em seu trabalho.

Na figura 2 pode-se observar o padrão eletroforético de quatro dos 36 loci polimórficos, dentre eles, destaca-se o primer Rco23, que gerou o maior número

de alelos e o maior conteúdo de informação polimórfica, podendo até ser recomendado em trabalhos futuros.

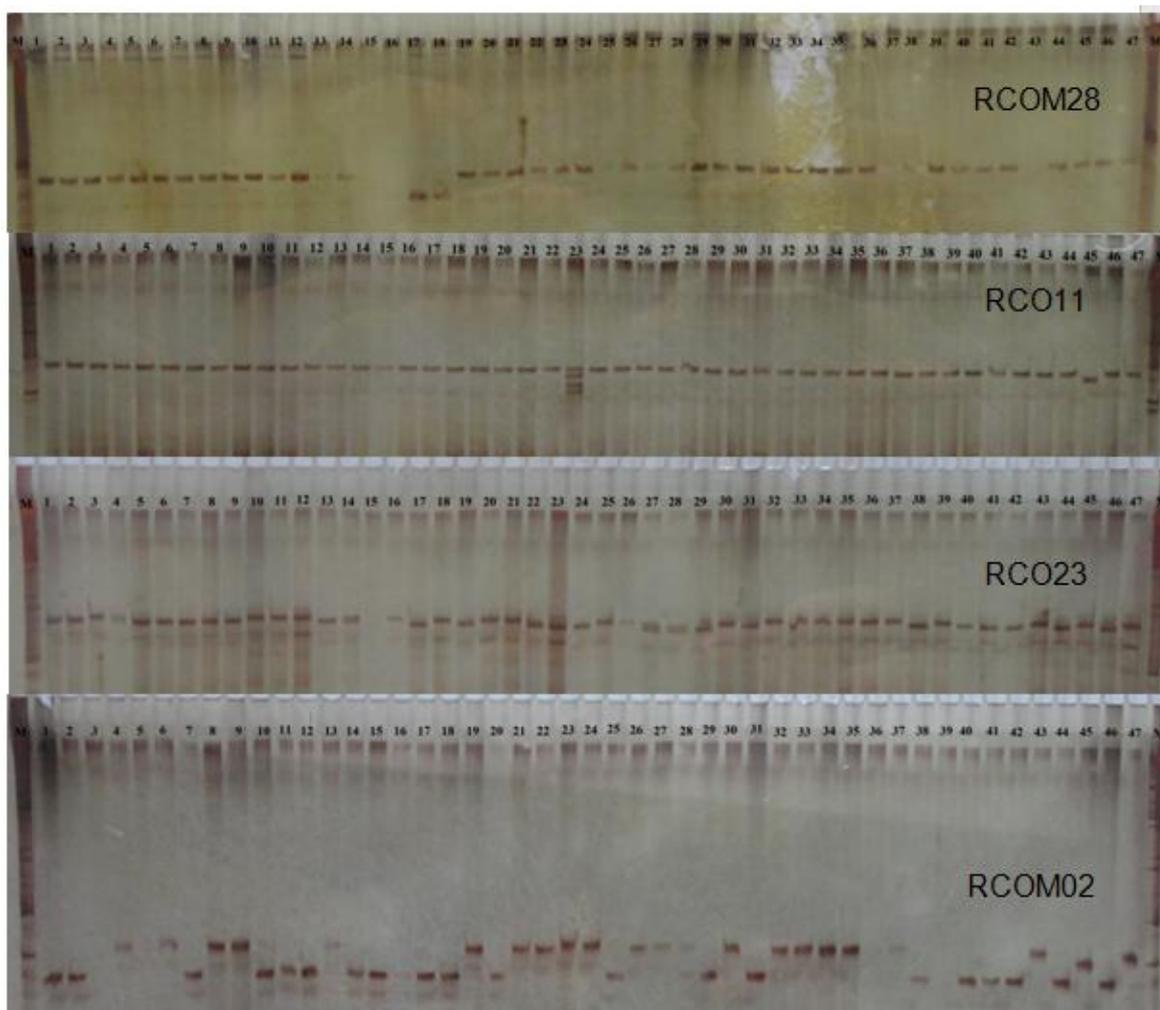


Figura 2. Loci SSR de mamoneira amplificados por meio dos pares de iniciadores RCOM28, RCO11, RCO23, RCOM02; M=marcador de peso molecular de 100 pb, de 1 a 47 linhagens elites de *R. communis*.

A maioria dos loci SSR apresentou heterozigosidade observada (H_o) menor que a esperada (H_e) para os loci Rco5, Rco40, RcoM5, RcoM11, RcoM23 (1,0; 0,08; 1,0; 1,0; 0,69, respectivamente. A heterozigosidade média esperada H_e (0,40) foi maior que a heterozigosidade observada H_o (0,15), o que indica uma taxa de endogamia nos acessos avaliados. Esse resultado era esperado pois, os genótipos analisados trata-se de linhagens elites pertencentes a uma população F_6 com alto grau de homozigose.

O teste de Hardy-Weinberg detectou que ocorreram, em média, desvios na proporção do equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os loci. Esse resultado era

esperado uma vez que o Equilíbrio de Hardy-Weinberg só é atingido em populações panmíticas (BAJAY, 2009), ou seja, populações em que os cruzamentos entre os indivíduos de diferentes genótipos devem ocorrer ao acaso, sem qualquer preferência.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,06 para o iniciador Rco11 a 0,81 para o iniciador Rco23, sendo considerado pouco informativo e altamente informativo, respectivamente (Tabela 2). Valores de PIC variando entre 0,25 e 0,50 foram observados para locos Rco5, Rco8, Rco12, Rco15, Rco20, Rco34, RcoM2, RcoM4, RcoM8, RcoM11, RcoM16, RcoM17, RcoM20, RcoM25 E RcoM30 (Tabela 2). Esses loci foram considerados moderadamente informativos de acordo com a classificação de Botstein et al. (1980). Para estes autores os valores de PIC são agrupados em três níveis: altamente informativo ($PIC > 0,5$); moderadamente informativo ($0,25 < PIC < 0,5$) e pouco informativo ($PIC < 0,25$). Além disso, o PIC fornece uma estimativa do poder discriminatório do loco, levando-se em conta não apenas o número de alelos que são expressos, mas também as frequências relativas destes alelos. Verifica-se que a maioria dos loci foi moderadamente informativos, uma vez constatada no presente estudo uma média de 0,35 para o valor de PIC.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein *et al.* (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade) (MENEZES *et al.*, 2006). É um parâmetro importante em análises moleculares, pois possibilita uma melhor visualização do poder de polimorfismo de cada primer avaliado, podendo até recomendá-los em trabalhos futuros de forma mais objetiva e precisa.

Tabela 2. Composição alélica (motivo), número de alelos por loco (N_A), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), conteúdo informativo de polimorfismo (PIC), coeficiente de endogamia (F), equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e maior frequência alélica (>FA) em 36 locos polimórficos selecionados para *Ricinus communis* L. avaliados em 47 indivíduos. Cruz das Almas - BA, 2013.

Locus	Sequência 5'-3'	Motivo	TA	Amplitude/ segmentos	N_A	H_e	H_o	PIC	F	p - value HW
RCO3	F: GAGTGAGCCCATTATGCTG R: TCAGAAATACCTCTAGGCGACA	(GA) ₂₂	60	202-214	2	0.11	0.00	0.10	0.36	0.03
RCO5	F: AGCCCAGAAATTGGAAAAGA R: CAAACCCAAGCAAACCTCA	(TG) ₆ (GA) ₂₂ (GAA) ₄	60	198-210	4	0.54	1.00	0.43	1.00	0.00
RCO6	F: GGGTGAAAATGAAGAGATTGG R: ATAACCCGTGAAGCATGGAC	(TG) ₁₁	60	204-215	7	0.77	0.50	0.73	0.85	0.00
RCO8	F: CGTGTGTCTGTGTGCATGTC R: CCTCAACCCTTTGCTGTTTC	(TG) ₁₀	60	206-225	4	0.53	0.00	0.48	0.94	0.00
RCO11	F: GCGTGGAATAACTTCAAGCA R: CCCATTAGCATCGAGAAAG	(TC) ₁₀ (GT) ₆	60	105-212	3	0.06	0.02	0.06	1.00	0.01
RCO12	F: AAGACTGCACCTCCTCCTA R: TGCTGGAACAAACCCTGATA	(TG) ₈ (GA) ₆	62	182-191	2	0.42	0.00	0.33	0.94	0.00
RCO15	F: CACGCACGTTAAAGCAAAC R: GCGAAGAAACCAAATGGAG	(AG) ₁₈	60	96-104	2	0.46	0.00	0.36	1.00	0.00
RCO18	F: AGGGGGATAAGCGTGATATG R: CCGTTATGAAAAGGAAAGCA	(CA) ₁₇	60	96-102	2	0.20	0.00	0.18	0.96	0.00
RCO20	F: CCAAAGGAATGTGGGACTC R: TGTGGAGAGGATGAAGAGGAA	(TC) ₂₃	60	290-317	2	0.32	0.00	0.27	0.85	0.00
RCO23	F: CATGGATGTAGAGGGTCGAT R: CAGCCAAGCCAAAGATTTTC	(GA) ₁₅ (AG) ₈	62	211-245	9	0.83	0.67	0.81	0.98	0.00

Continua

RCO26	F: TTGCTTGTCAAAGGGGAGTT R: TCATTTTGAGGGAGAAACCA	(CT) ₁₉	60	222-230	3	0.16	0.00	0.15	0.98	0.00
RCO34	F: TCGGTTAAGGGTATGGGTTG R: CACACTTCATTTTCGCAGACC	(GT) ₁₁	60	206-222	3	0.50	0.00	0.40	0.98	0.00
RCO40	F: AACTGGATAAAGGGGTATTTGG R: GCTTTTTGGTAGCAGGTTTGA	(TC) ₅ (CT) ₇	60	84-90	2	0.08	0.08	0.08	0.77	1.00
RCO41	F: CATGTTGTTTTGGCAGCTC R: CGTTCACACTCATCAATCCA	(CT) ₁₇ (CA) ₁₁	60	88-96	2	0.16	0.00	0.15	0.96	0.00
RCOM1	F: GACGGGATGAAAGAGGATA R: TGGCTGCTGTTGTTACTCTA	(TA) ₁₈	63	236-245	4	0.61	0.00	0.53	0.47	0.00
RCOM2	F: ATGTCTGCTCTTGGTCTGTC R: ATGGTATGGTTTTGATGAGG	(CT) ₁₄	64	108-204	5	0.58	0.05	0.49	0.89	0.00
RCOM4	F: TCATAACCAACTCCTCACCAGA F: TTGTGATCGTTGTGGCTTGT	(TCCTAC) ₂ e (GGTAGG) ₂	62	274	2	0.47	0.00	0.36	0.98	0.00
RCOM5	F: AATGAGTCGCAATCTATGAACG R: ATGGTGAAGAGAATGGCTG	(AAAAGA) ₃	62	204	4	0.74	1.00	0.70	0.60	0.00
RCOM6	F: GTTCCAACCTCCCAAACAGAC R: GCTCTTACCTACTCCTCCCC	(AAAAGA) ₃	64	196-199	2	0.04	0.00	0.04	0.98	0.01
RCOM7	F: CGGGTGAGAAGCAAGAGAAG R: TACAAGCCAAATAGTGCCCC	(TTAATT) ₃	63	213-225	4	0.67	0.00	0.62	0.13	0.00
RCOM8	F: GCTATCCACATTGGTTCCCT R: AAGTTTTGGTGATGGCTGCT	(GAA) ₅	63	237-365	3	0.53	0.00	0.46	0.91	0.00
RCOM10	F: GGGCGGGCTCTGTAAAGTA R: TTACCCAAACACCCTCTCCA	(TA) ₁₅	62	259-324	5	0.54	0.06	0.51	1.00	0.00
RCOM11	F: AACATCCCCTCCACTCACAG R: CCTGACCCTCCTGATTGTTC	(CAA) ₆	63	252-270	4	0.52	1.00	0.41	0.96	0.00
RCOM14	F: GATGAAAAGGAAATGGAGTGG R: AGTGAGGGTTGTATGGGGAG	(TAT) ₁₆	62	85-87	2	0.13	0.00	0.12	0.30	0.04
RCOM15	F: ATGGAGGTCTTGTGAGGTGC R: AGCCCCCTCCTTGTAGTTTTG	(GAA) ₅	62	105-106	3	0.12	0.00	0.12	0.98	0.00

Continua

RCOM16	F:AGGGGTATCCTTATGCTCCAAC R: CCCAAACTCAAGACATTCATCA	(AAGA) ₇	62	213-224	5	0.31	0.00	0.29	0.85	0.00
RCOM17	F: GAAGATTCACAACACCCCATAA R: CAGCAGAAGAAAGAAAAGGCA	(GAA) ₈ (GA) ₁₃	63	197-213	3	0.55	0.06	0.45	0.68	0.00
RCOM20	F:GCCGACGCATAAGGTAAGAG R: TCTCAACAAACACACCCACG	(GAA) ₁₃	64	91-97	3	0.41	0.03	0.35	0.74	0.00
RCOM21	F: CGGAACGACGACAAGAAAG R:CGTTATGGAAGGGAAAAGAAAG	(AAG) ₁₂	63	201-252	2	0.14	0.00	0.13	0.83	0.00
RCOM22	F: TTCACCCGCTATTCTCAACC R: CTCAACGACTTCCCTCCAAA	(ACT) ₅	62	113-118	3	0.24	0.11	0.23	0.96	0.00
RCOM23	F: CCTTTTGGAGGGTCCTTAGC R: CGCATCCTTTCATTCTCTTCTT	(AG) ₁₈	63	214-221	4	0.68	0.69	0.62	0.77	0.00
RCOM24	F: ACTTCATTGCCCTTGGACAC R: TTAGGGAGATTGAGGACTGATG	(AT) ₁₀ (TG) ₇	62	111-125	3	0.63	0.00	0.56	0.74	0.00
RCOM25	F: TCACTAACACAACAAGACGGA R: GAACGCAAAAGATTGGTCA	(TAT) ₁₂	62	165-210	3	0.52	0.02	0.43	0.91	0.00
RCOM27	F: TCAAGTGACAAAGGACACATCT R: GTGACAGAATCAGCCTAAACC	(AG) ₂₀	63	251-330	3	0.13	0.00	0.13	0.91	0.00
RCOM28	F: TTGGGTGTTATCCTCATTCC R:GGAGAAGAAGAAAGAAAAGGTG	(GAA) ₆ (AGA) ₅ (AAG) ₆	63	201-208	2	0.08	0.00	0.08	0.96	0.00
RCOM30	F: TCCAAAATATAAGCCCTGCC R: TGGTCTGTTCTAAGCAATCCC	(CT) ₁₇ (TA) ₂₅	63	436-439	3	0.56	0.00	0.48	0.91	0.00
Média						3.31	0.40	0.15	0.35	0.83

O dendrograma, gerado a partir da análise dos loci SSR polimórficos, possibilitou a separação das linhagens elites em sete grupos, mostrando que há dissimilaridade genética entre elas (Figura 3). As linhagens foram agrupadas com a seguinte distribuição: G1: UFRB11 e UFRB50; G2: UFRB13, UFRB264, UFRB258, UFRB261, UFRB262, UFRB263, UFRB227 e UFRB160; G3: UFRB14 e UFRB15; G4: UFRB19, UFRB22, UFRB46, UFRB57, UFRB89, UFRB93, UFRB59, UFRB145, UFRB86, UFRB85, UFRB23, UFRB25, UFRB31, UFRB32, UFRB54, UFRB88 e UFRB151; G5: UFRB182, UFRB208, UFRB255, UFRB213, UFRB214, UFRB217, UFRB219, UFRB220, UFRB221, UFRB226, UFRB233, UFRB222, UFRB232, UFRB238 e UFRB241; G6: UFRB 242 e UFRB254 e G7: UFRB248. A linhagem UFRB248 foi a que apresentou maior distância genética em relação às demais.

A correlação cofenética obtida foi de 79,69%, 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.

A detecção de dissimilaridade genética entre linhagens elites é importante para auxiliar na seleção das mais divergentes. Segundo Barbosa-Neto (1999) e Federizzi (1998) a utilização de marcadores moleculares em 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. 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).

O agrupamento das linhagens possibilitou a seleção das 20 linhagens mais divergentes dentre as 47 analisadas, baseado em suas distâncias genéticas. As linhagens selecionadas foram: UFRB11, UFRB15, UFRB19, UFRB23, UFRB31, UFRB86, UFRB93, UFRB151, UFRB160, UFRB208, UFRB214, UFRB222, UFRB227, UFRB241, UFRB242, UFRB248, UFRB255, UFRB258, UFRB262 e UFRB264. Essas linhagens serão submetidas a ensaios em diferentes cidades da Bahia, para verificar seu comportamento produtivo em diferentes ambientes, dando continuidade assim ao programa de melhoramento genético da mamoneira para futuro lançamento de cultivares adaptadas a região, principalmente a região do Recôncavo Baiano e semi-árida da Bahia, onde os ensaios serão instalados.

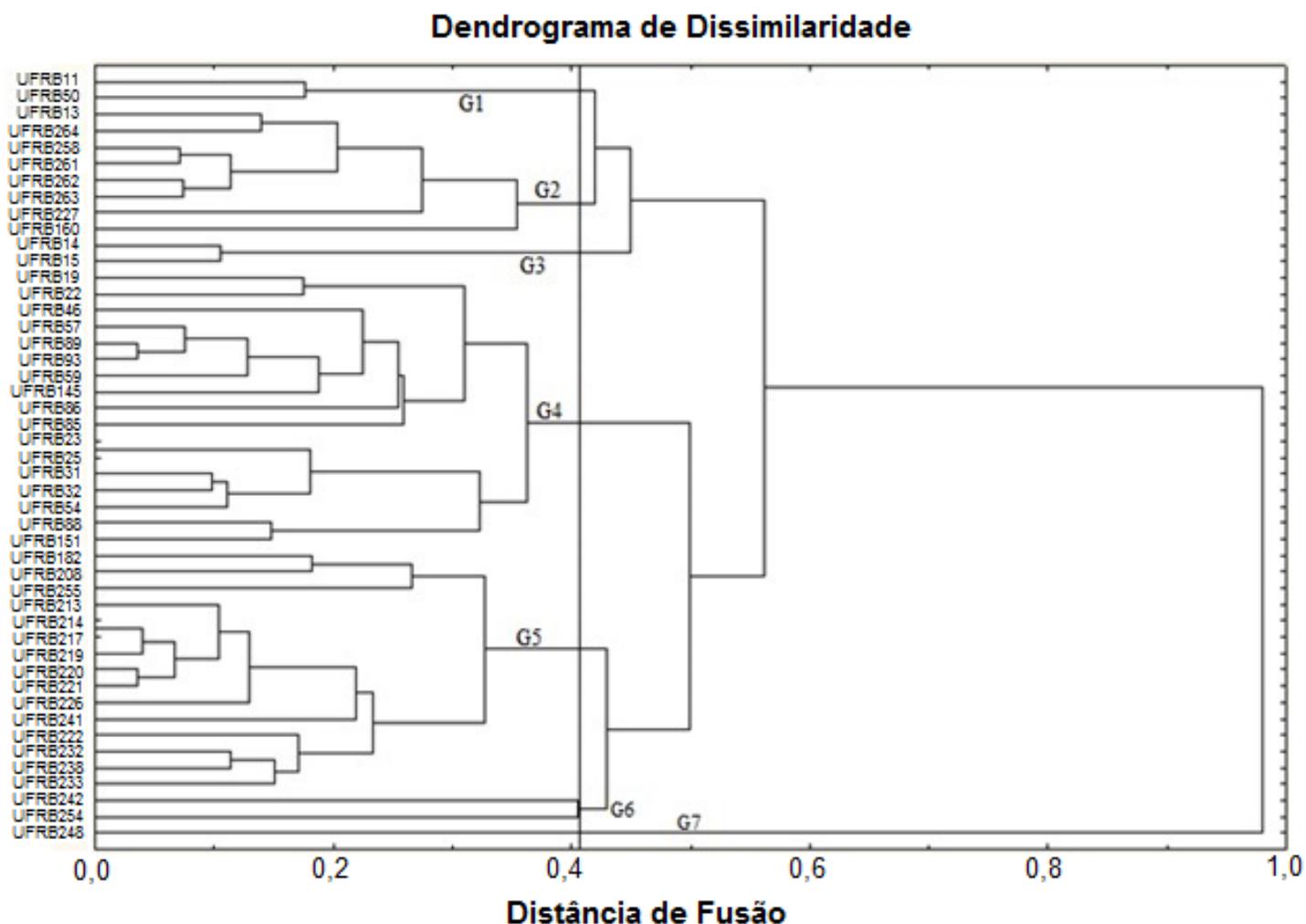


Figura 3. Dendrograma, gerado pelo método de agrupamento UPGMA, a partir do coeficiente de dissimilaridade de Nei e Li (1973), mostrando as relações genéticas entre as 47 linhagens de mamoneira baseada em marcadores microssatélites (SSR). Cruz das Almas – BA, 2014.

CONCLUSÕES

Existe divergência genética entre as 47 linhagens elites analisadas, indicando que o método SSD é apropriado para o programa de melhoramento genético da mamoneira;

As linhagens elites encontram-se em elevado grau de homozigose para a maioria dos locos analisados, permitindo ganhos de seleção e fixação dos genes selecionados;

Os marcadores microssatélites foram eficientes para indicar polimorfismo nas linhagens analisadas.

REFERÊNCIAS

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.43, n.3, p.357-362, 2008.

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.; 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.

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.; CARDOSO, G. D. **Informações sobre os sistemas de produção utilizados na ricinocultura na região nordeste, em especial o semi-árido e outros aspectos ligados a sua cadeia**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 5 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 213).

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

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNIEK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p. 314-331, 1980.

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.

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.

CRUZ, C. D. **Programas Genes: Biometria**. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.

DIAMANTINO, M. S. A. S. **Variabilidade genética, viabilidade de pólen e estresse salino em genótipos de mamoneira** / Maria Selma Alves Silva Diamantino._ Cruz das Almas, BA, 2013.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.** 19: 11-15.

EMBRAPA, 2007. **Sistema de Produção da Mamona**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/botanica.htm>. Acesso em: 20-12-13.

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

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.

K. LIU AND S. V. MUSE. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics** 21(9): 2128-2129 (2005).

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in cultivated crops. **Crop science**, v. 37, p. 26-30, 1997.

LIMA, C. B. E. et al. **Desenvolvimento da mamoneira, cultivada em vasos, sob diferentes níveis de salinidade da água em latossolo vermelho-amarelo eutrófico**. Caatinga, Mossoró, RN, v.21, n.5, p.50-56, dez. 2008. Número especial.

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.

MACMANUS, C.; PAIVA, S.; CORRÊA, P. S.; SEIXAS, L.; MELO, C. B. de; **Estatísticas para descrever genética de populações**. INCT: Informação genético-Sanitária da pecuária brasileira. Série técnica: Genética. Publicado on-line em www.animal.unb.br, 2011.

MACHADO, E. L. **Genotipagem, Teor de Óleo, Otimização do Método Gravimétrico e Desenvolvimento de Marcadores Microssatélite em (*Ricinus communis* L.)**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB. 118 p, Cruz das Almas, 2011. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias).

MACHADO, E. L. et al. Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.3, p.342-345, mar. 2013.

MACHADO, E.L. ; SILVA, S. A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 1457-1463, 2013.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Plano Nacional de Agroenergia. Secretaria de Produção e Agroenergia.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005.110p.

MENEZES, M. P. C.; et al. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v.35, n.4, p.1336-1341, 2006.

MORAES E SILVA, R. D. de. Produção de biodiesel em pequena escala com aproveitamento de co-produtos. **In: CONGRESSO BRASILEIRO DA MAMONA, BA, 3. , 2008. Salvador. Mini-curso. Salvador: Governo da Bahia: Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 1 CD-ROM.**

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 583-590, 1978.

OLIVEIRA, N. S. **Variabilidade genética em *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de DAF.** 2004. 73 f. Dissertação (Mestrado em Genética) da Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2004.

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.**

PINOTTI, R. N.; AMARAL, J. G. C. do; Informações Econômicas da Mamona como Biocombustível. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 10, n. 1, Jan-Jun 2013.

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

REVISTA GLOBO RURAL. **Produção de mamona na Bahia vai crescer 560% em 2013/2014.** Disponível em: <http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Agricultura/>

noticia/2013/12/producao-de-mamona-na-bahia-vai-crescer-560-em-20132014.html.
Acesso em: fevereiro de 2013.

SANTOS, V. M. et al. Avaliação do crescimento e da produtividade da mamoneira BRS 149 Nordestina em dois níveis tecnológicos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 2, N. 3: pp. 58-66, August 2011.

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

STATSOFT, Inc. (2005). **STATISTICA (data analysis software system)**, version7.1. www.statsoft.com.

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.

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.

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 2

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE ANÁLISE CONJUNTA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E OS CARACTERES TEOR DE ÓLEO E PESO DE SEMENTES¹

¹Artigo para submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Pesquisa Agropecuária Brasileira.

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE ANÁLISE CONJUNTA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES E OS CARACTERES TEOR DE ÓLEO E PESO DE SEMENTES

RESUMO

A análise multivariada é um recurso muito importante para determinação da dissimilaridade genética. Uma análise de agrupamento usando variáveis quantitativas e moleculares demonstrou ser uma ferramenta confiável para estimar a diversidade genética entre 47 linhagens de mamoneira. O objetivo do presente estudo foi avaliar a divergência genética entre 47 linhagens elite de mamoneira em uma população avançada (F6) para posterior seleção. Foram avaliados 36 locos SSR e dois caracteres morfológicos quantitativos, teor de óleo na semente (TOS) e peso de sementes por planta (PSP) simultaneamente. O coeficiente de correlação genético da análise conjunta foi mais elevado quando comparado com o coeficiente apenas da análise molecular. A quantidade de grupos também foi maior na análise conjunta, 17 grupos, o que indica alta variabilidade nas linhagens avaliadas. Com a expressão desses resultados a análise simultânea das variáveis quantitativas e moleculares se mostrou mais eficiente na expressão da diversidade genética entre as linhagens elite de mamoneira em comparação com a análise individual envolvendo apenas os marcadores.

Palavras chave: Seleção, variabilidade, população avançada

GENETIC DIVERGENCE IN CASTOR BEAN ELITE LINEAGES BY JOINT ANALYSIS OF MICROSATELLITE MARKERS AND THE CHARACTER OIL CONTENT AND WEIGHT OF SEEDS

ABSTRACT

The multivariate analysis is a very important resource to determine genetic divergence. A cluster analysis using quantitative variables and molecular shown to be a reliable tool to estimate the genetic diversity among 47 strains of castor bean, selected based on their oil content in the seed (TOS) and seed weight per plant (PSP). The aim of this study was to evaluate the genetic divergence among 47 castor bean elite strains in an advanced population (F6) for subsequent selection. Thirty-six SSR loci were evaluated and two quantitative morphological characters, oil content in the seed and seeds weight per plant simultaneously. The dissimilarity matrix was obtained by the coefficient of Gower, whereas the cophenetic correlation between the matrix and dendrogram of the joint analysis was higher, having a value of 83,32%, when compared to the coefficient of molecular analysis, that was 79,69%. The amount of groups formed was higher in the combined analysis, revealing 17 groups against seven, in analyzes conducted only with molecular markers of the type SSR, indicating high variability in the tested strains. With the expression of these results, the simultaneous analysis of the quantitative and molecular variables proved quite effective in the expression of genetic diversity between inbred lines of castor bean.

Keywords: Selection, variability, advanced population

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta pertencente à família Euphorbiácea, é considerada originária da antiga Abissínia, atual Etiópia, no continente Africano (MOSHKIN, 1986). Pertence à classe dicotiledônea, ordem Geraniáceas; é uma planta bastante tolerante a escassez de água, sendo exigente em calor e luminosidade. Está espalhada em quase todo o Nordeste, cujas características climáticas são propícias ao seu desenvolvimento e crescimento, de acordo zoneamento feito pela Embrapa (EMBRAPA, 2006).

Seu sistema de produção pode ser praticado por pequenos produtores, é intensivo em mão-de-obra, o que gera empregos, podendo ser consorciada com outros plantios e/ou rotação de outras culturas, além de utilizar pouco agrotóxico é possível extrair de suas sementes um óleo de características ímpares (FREITAS e FREDO, 2005).

Os teores de óleo das sementes de mamona variam de 35 a 55%, cujo padrão comercial é de 45% (VIEIRA *et al.*, 1998). Esse óleo possui propriedades químicas peculiares que lhe fazem único na natureza: trata-se do ácido graxo ricinoleico. Esse ácido possui uma hidroxila (OH) que lhe confere propriedades como alta viscosidade (SANTOS, 2008), e único glicerídeo feito pela natureza que é solúvel em álcool (SANTOS, 2008 e BELTRÃO, 2003). Em variações bruscas de temperatura, não sofre alterações nas suas características, razão do seu imprescindível emprego na aviação (CARVALHO, 1991).

De acordo com Chan *et al.* (2010), a mamoneira possui 71 genes que apresentam similaridade com genes envolvidos na biossíntese dos ácidos graxos e triacilgliceróis que correspondem, principalmente, ao ácido ricinoleico. A mamona não só evolui 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), cerca de 90% (SILVA *et al.*, 1984).

Por apresentar tais características, o óleo de mamona tem centenas de aplicações dentro da indústria química, sendo uma matéria prima versátil com a qual se podem fazer diversas reações, dando origem a produtos variados, tais como fabricação de graxas e lubrificantes, tintas, vernizes, espumas e materiais plásticos para diversos fins. Ainda, derivados de óleo de mamona podem ser encontrados desde em cosméticos até produtos farmacêuticos (EMBRAPA, 2007).

Nesse cenário, a caracterização e avaliação das diferentes constituições genéticas 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, PASSOS *et al.*, 2010).

O melhoramento genético tem sido um dos grandes responsáveis pelos avanços na agricultura, com o desenvolvimento de cultivares superiores, quer pela maior produtividade, quer pela melhor adaptação aos ambientes adversos. O sucesso de um programa de melhoramento genético depende fundamentalmente de algumas etapas, que podem ser auxiliadas e aceleradas por meio da utilização mais efetiva dos marcadores moleculares. A utilização dos marcadores moleculares na obtenção de perfis genéticos fornece uma elevada precisão na caracterização da diversidade genética dentro de germoplasmas melhorados, uma vez que acessam a variabilidade diretamente em nível do DNA (GUIMARÃES, 2004).

Uma caracterização detalhada com base em dados moleculares dos acessos que compõem os Bancos de Germoplasma pode contribuir estrategicamente para otimizar a seleção de novas linhagens. O conhecimento da diversidade genética dentro do germoplasma melhorado auxilia na organização da variabilidade desses materiais e potencializa a maximização dos ganhos genéticos em programas de melhoramento (GUIMARÃES, 2004).

Os microssatélites ou SSR (Sequência Simples Repetida) têm sido muito utilizados em programas de melhoramento. Estes marcadores são compostos de seqüências simples repetidas de 2 a 6 nucleotídeos “in tandem” na seqüência de DNA, tais como (CA)_n, (AGAG)_n, (ATTATT)_n, etc. O polimorfismo nestes loci é resultado de variações do número de repetições das seqüências de nucleotídeos (AKKAYA *et al.*, 1992). A repetição pode ser perfeita ou interrompida por muitos nucleotídeos não repetidos, sendo chamada de repetições compostas (SAGHAI-MAROOF *et al.*, 1994).

Atualmente uma gama de marcadores como RFLP, RAPD, AFLP e SSR têm sido utilizados para diferentes espécies (PHILIPS *et al.*, 2001 e VARSHNEY *et al.*, 2004). Os marcadores SSR são úteis para uma variedade de aplicações em genética de plantas e melhoramento pela sua reprodutibilidade, natureza multialélica, alto grau de polimorfismo, herança co-dominante, relativa abundância e boa cobertura do genoma (POWELL *et al.*, 1996).

As seqüências das regiões que flanqueiam os SSRs são conservadas em indivíduos da mesma espécie. Dessa maneira, os SSRs são amplamente distribuídos em todo genoma de eucariotos e podem ser amplificados por oligos específicos sintetizados a partir destas regiões flanqueadoras (PONCET *et al.*, 2004). Os SSRs polimórficos aumentam a possibilidade de detecção de diferenças alélicas entre espécies próximas, dentro de uma espécie, ou até mesmo entre indivíduos numa população (YU *et al.*, 1999). O polimorfismo é detectado após a amplificação do DNA via PCR e separação dos produtos por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose (WU & TANKSLEY, 1993).

Diversos trabalhos são conduzidos por meio de marcadores moleculares do tipo SSR em mamona, exemplos como o trabalho de Diamantino (2013), Bajay (2009), Machado (2011), Machado e Silva (2013), o que permitiu avaliar genótipos, linhagens e cultivares de mamoneira (*R. communis* L), com o objetivo de determinar variabilidade genética.

Dentre as ferramentas utilizadas na estimativa da distância genética, destacam-se a utilização de caracteres morfológicos, dados moleculares e genealógicos (BERTAN, *et al.*, 2007). Há uma estimativa de análise precisa envolvendo dados oriundos de características morfológicas e moleculares simultaneamente (GOWER, 1971).

Visto a importância e o grau de polimorfismo que esses marcadores podem alcançar, o presente trabalho visa utilizar 53 primers microssatélites na análise de diversidade genética entre 47 linhagens elites de mamoneira de uma população (F6), em alto grau de homozigose, visando à seleção de 20 linhagens mais promissoras para o programa de melhoramento genético da mamoneira. Aliado aos resultados obtidos pelos 53 marcadores SSR será feita uma análise multivariada com os caracteres quantitativos teor de óleo na semente (TOS) e peso de sementes por planta (PSP).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de campo foi desenvolvido em dois anos agrícolas de 2010 e 2011 em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições, instalado em área experimental do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCAAB/UFRB), localizada no município de Cruz das Almas – Bahia.

As 47 Linhagens Elites foram selecionadas de uma população avançada com 220 linhagens, na geração $F_5:F_6$ conduzida pelo método SSD, descendentes dos seguintes cruzamentos: BRS 149 Nordestina x EBDA MPA 17; BRS 149 Nordestina x Sipeal 28; BRS 188 Paraguaçu x EBDA MPA 17; BRS 188 Paraguaçu x Mirante 10; BRS 188 Paraguaçu x Sipeal 28; EBDA MPA 17 x Mirante 10; EBDA MPA 17 x Sipeal 28; Mirante 10 x Sipeal 28; Nordestina x Paraguaçu e Nordestina x Mirante 10.

A área para a instalação do experimento foi devidamente preparada, com realização de aração e gradagem. A partir da análise de solo, foi realizada a correção de acidez e, posteriormente a adubação N-P-K, na cova de plantio. O plantio foi feito por meio de semeadura direta no campo, utilizando três sementes por cova, com posterior desbaste. O espaçamento utilizado foi de 3 m entre fileiras e 1 m entre plantas. Aproximadamente, 30 dias após o plantio, foi realizado o desbaste manual, deixando-se uma planta, a mais vigorosa, por cova.

Os caracteres morfoagronômicos avaliados foram: peso de sementes por planta (PSP) e teor de óleo na semente (TOS). O caráter teor de óleo na semente (Figura 1) em porcentagem (TOS) foi analisado no Laboratório Avançado de Tecnologia Química da Embrapa Algodão, localizado em Campina Grande - PB. Foi utilizada a técnica de Ressonância Magnética Nuclear – RMN sendo um método não destrutivo em instrumento MQA Oxford 7005 com um eletroímã de 0,47 T. Para otimizar o método da Ressonância Magnética Nuclear – RMN, as amostras permaneceram por 24 horas em um ambiente controlado com temperatura a 20° C e umidade inicial de 60%. O resultado dos espectros foi obtido por meio de uma sonda com um tubo de acrílico em formato cilíndrico, onde as sementes foram alocadas e após 18 segundos os teores de óleo foram lidos no computador acoplado ao aparelho.

Para aferir o caráter peso de semente por planta (Figura 2) foi analisado e computado o peso do primeiro, terceiro e quarto racemo de cada planta, utilizando balança digital de precisão.

Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído de acordo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) com modificações (Tabela 1). Foram coletadas folhas jovens e saudáveis que por sua vez foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do NBIO. As folhas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% e enxaguadas com água destilada. Posteriormente, as amostras foram acondicionadas em freezer com temperatura de -30°C até o momento da extração.

As amostras foliares foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de almofariz. Na sequência foram transferidas para microtubos onde foi adicionado tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4M; Tris-HCl 100mM (pH 8,0); EDTA 20mM pH 8,0; polivinilpirrolidona 2% MW10000; β-mercaptoethanol 0,8% e água ultra-pura q.s.p.). Após, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria durante 45 minutos a 65°C, sendo homogeneizadas de 15 em 15 minutos. Um total de 700µl da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado as amostras, sendo homogeneizadas por 5 minutos e centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm em centrífuga com recuperação do sobrenadante e transferência para novos tubos pré identificados. Foram adicionados mais 700µl da mistura clorofórmio: álcool isoamílico e novamente as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recuperado e a ele adicionados 600µl de álcool isopropílico (gelado), ficando à proporção de 1:1 do volume coletado, com o objetivo de precipitar o DNA.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm, e o isopropanol foi descartado com recuperação do DNA precipitado. Ao precipitado foram acrescentados 600 µl de TE (Tris-Hcl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) mais 200 µl de acetato de amônio 7,5M. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos no gelo, e em seguida centrifugadas. Para a precipitação das amostras um total de 1,5 mL de etanol absoluto gelado foi adicionado ficando incubadas por uma hora a -20°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas à 12000 rpm sendo em seguida lavadas com 1mL de etanol 70%, centrifugando por 3

minutos à 12000 rpm, repetindo-se esse mesmo processo mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o precipitado, permaneceram por duas horas a temperatura ambiente, para secagem. Logo após, o precipitado foi solubilizado em 100µl de tampão TE contendo 2µl de RNase (10mg/ml). As amostras foram incubadas em banho Maria à 37°C por 30 minutos e armazenadas a -20°C.

Com o objetivo de analisar a concentração e qualidade do DNA extraído, um total de 5 µl do mesmo foi adicionado a uma solução de azul de bromofenol (0,25%), e glicerol (60%) no volume de 5 µl. O DNA genômico foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo, e submerso em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA). A quantidade de DNA em cada amostra foi estimada por meio de análise comparativa com um de concentração conhecida (DNA lambda-derivado). Posteriormente, todas as amostras foram ajustadas para uma concentração de 5 ng.µL⁻¹ para proceder a PCR (Polymerase Chain Reaction).

Tabela 1 – Comparação entre os protocolos Doyle & Doyle 1987 e Doyle & Doyle 1987 com modificações.

Doyle & Doyle 1987		Doyle & Doyle 1987 com modificações	
Reagentes	[] Final	Reagentes	[] Final
CTAB	2%	CTAB	2%
Tris-HCl pH 8,0 (1M)	100mM	Tris-HCl pH 8,0 (1M)	100mM
NaCl	1,4M	NaCl	1,4M
EDTA (0,5M)	20mM	EDTA (0,5M)	20mM
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	1%	*Polyvinylpyrrolidone (PVP)	2%
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	3%	***Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	-
2-mercaptoetanol	0,2%	*2-mercaptoetanol	0,8%
**Água destilada q.s.p.		**Água destilada q.s.p.	

* Reagentes que sofreram alterações em suas concentrações

** Completar para o volume desejado

*** Não foi utilizado

Condições de Amplificação e Eletroforese

Um total de 53 pares de primers foram testados, sendo 23 desenvolvidos por Bajay et al. (2009, 2011) e 30 por Machado e Silva (2013). As reações de amplificação foi montada em um volume final de 25 µL, contendo os seguintes

reagentes: 3 μL de DNA genômico (5 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 2,5 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), 0,65 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,5 μL de cada primer (*forward e reverse*, 20 mM), 0,2 μL de Taq DNA polimerase, (5 U/ μL - Invitrogen) e água ultra-pura q.s.p. A PCR foi feita em um termociclador Biocycler MJ96+ /MJ96G (Applied Biosystems do Brasil Ltda., São Paulo, SP) programado para 5 minutos a 94 °C para desnaturação inicial do DNA, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto com temperaturas entre 60 e 64 °C a depender do primer e 1 minuto a 72 °C. O ciclo final foi seguido por uma extensão de 10 minutos à 72 °C.

A separação dos fragmentos foi feita por meio de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (7%), contendo 5,6 M de uréia em tampão TBE 1 X (LITT *et al.*, 1993). A eletroforese foi conduzida em cuba vertical com capacidade para 80 amostras em gel de 0,5 mm de espessura. Antes da aplicação das amostras, o gel foi submetido a uma pré-corrída com duração de 30 minutos a 60 Watts de potência, com objetivo de aquecer a placa de vidro, impedindo que a molécula de DNA se renature durante a aplicação das amostras. O tempo de eletroforese foi de duas horas com potência média de 70 Watts. A coloração do gel com nitrato de prata foi mediante as seguintes etapas: 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).

O tamanho dos fragmentos foi analisado utilizando-se padrão de peso molecular 100 pb (Invitrogen, São Paulo, SP). Após seco, o gel foi fotografado com câmera digital modelo Sony (16 megapixels).

A genotipagem foi feita convertendo-se os dados obtidos a partir da amplificação dos marcadores SSR em código numérico por loco para cada alelo. Foram atribuídos valores de um até o número máximo de alelos encontrados por loco. Os acessos homocigotos foram descritos como 11, 22, 33 no loco com três alelos, representando as formas A_1A_1 , A_2A_2 , A_3A_3 . Já os acessos heterocigotos foram designados como 12, 13 e 23 demonstrando as formas alélicas A_1A_2 , A_1A_3 e A_2A_3 . Por meio dessa codificação determinou-se a matriz de distância numérica.

A divergência genética foi realizada por meio da análise conjunta dos marcadores moleculares com os caracteres quantitativos, teor de óleo na semente (TOS) e peso de sementes por planta (PSP). Para determinação da dissimilaridade entre os genótipos foi utilizado o coeficiente descrito por de Gower (1971), os agrupamentos hierárquicos dos acessos foram obtidos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Averages*), a validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenética (SOKAL e ROHLF, 1962) entre as matrizes de dissimilaridade e agrupamento e sua significância calculada pelo teste de Mantel com 10000 permutações (MANTEL, 1967). Todos os resultados foram obtidos por meio dos recursos computacionais dos programas: R® 2.6.2 (<http://www.r-project.org>), STATISTICA, versão 7.1 e Genes (CRUZ, 2008) respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo de mamoneira possui várias aplicabilidades, devido a características que lhe são bem peculiares. É também a principal fonte de matéria prima para os diversos ramos industriais, desde o setor de cosméticos até o bioenergético. Por esse motivo, é importante o estudo e análise do teor de óleo em plantas de mamoneira. Na (Figura 1), por exemplo, podemos observar os valores de máximo e mínimo referentes ao teor de óleo encontrado nas 47 linhagens elites, utilizadas no presente estudo, sendo essa característica, um dos critérios para seleção das mesmas. O valor de máximo para teor de óleo foi 58,97%, e o de mínimo foi 49,98%, vale ressaltar que o mínimo valor aqui analisado foi superior ao padrão comercial descrito por Vieira *et al.* (1998), que foi de 45%.

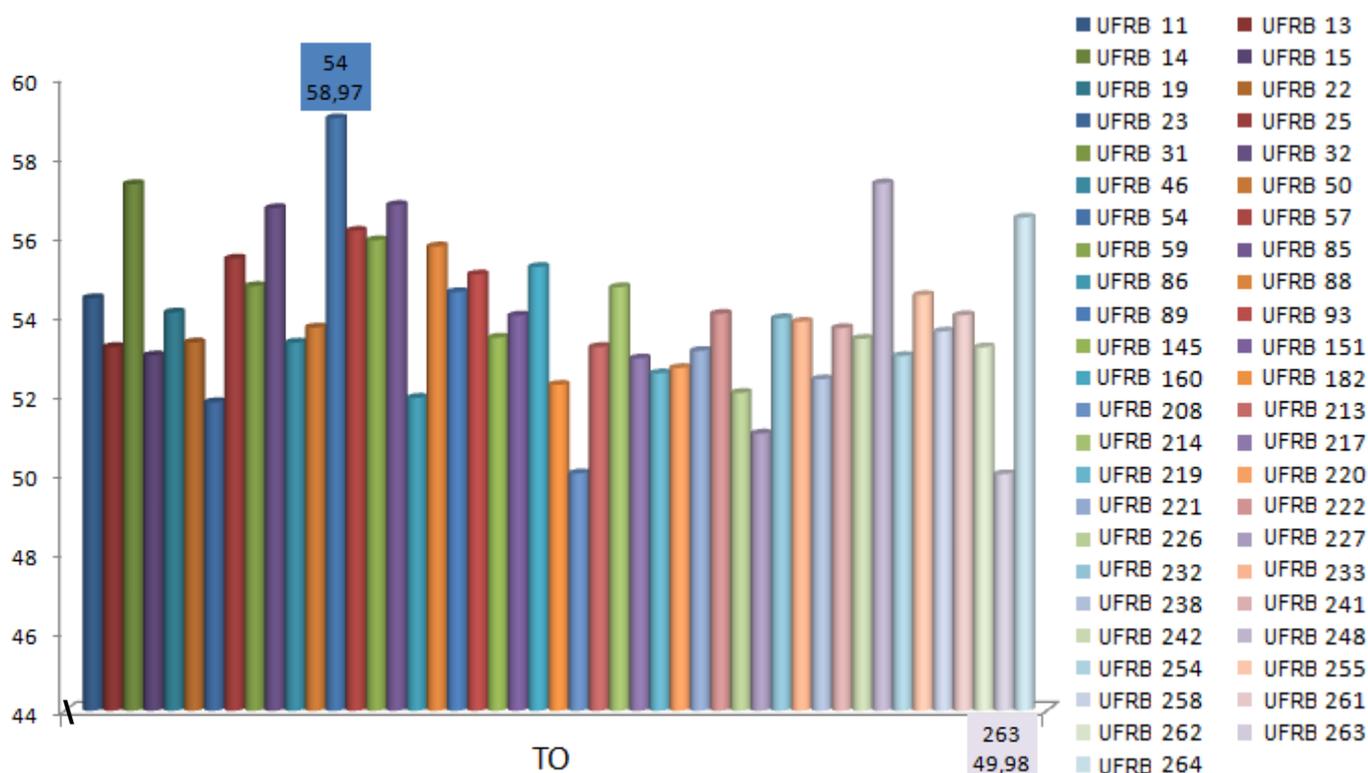


Figura 1 – Teor de óleo das 47 linhagens, mais os valores de máximo (linhagem UFRB54) e mínimo (linhagem UFRB263) expresso em percentuais.

Outro caractere importante para seleção das linhagens foi o peso de sementes por planta (PSP). De acordo os resultados obtidos por Oliveira (2011), os caracteres peso de sementes e teor de óleo, são independentes, ou seja, uma determinada planta que possua peso de sementes elevado necessariamente não terá um teor de óleo elevado. A (Figura 2) ressalta os valores de máximo e mínimo relativo ao peso de sementes por planta, e a (Figura 3) traça um paralelo entre o teor de óleo e o peso de sementes em cada uma das 47 linhagens. Podemos observar que a linhagem 29 (UFRB219) obteve um peso de sementes de 68,89 gramas com teor de óleo de 52,53%, por outro lado a linhagem 35 (UFRB232) obteve um valor de 23,74 gramas para peso de sementes e um teor de óleo de 53,92%. Já a linhagem 17 (UFRB86) obteve um valor de 56,83 gramas para peso de sementes com teor de óleo 51,91%, por sua vez a linhagem 47 (UFRB264), obteve 28,54 gramas para peso de sementes com um valor de 56,46% para teor de óleo.

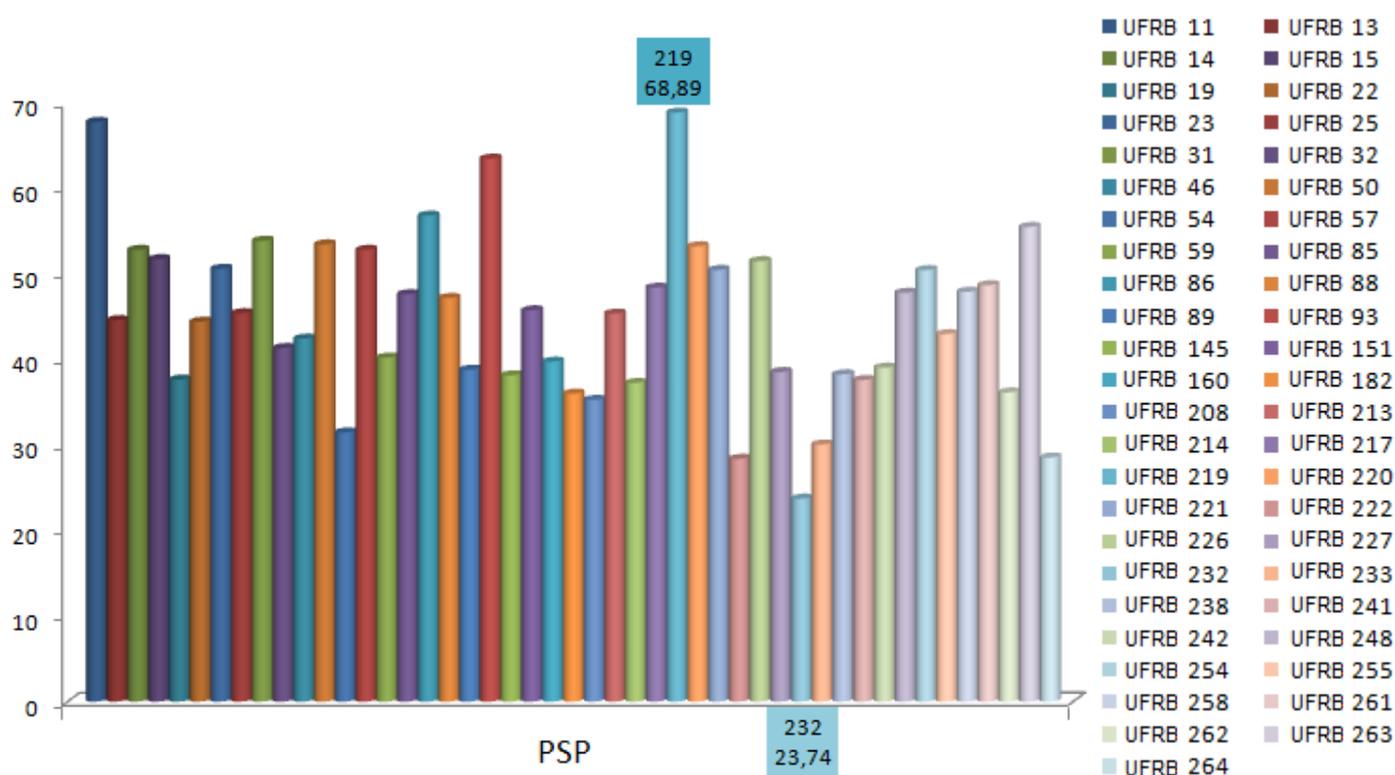


Figura 2 – Peso de sementes por planta das 47 linhagens, mais os valores de máximo (linhagem UFRB219) e mínimo (linhagem UFRB232) expresso em gramas.

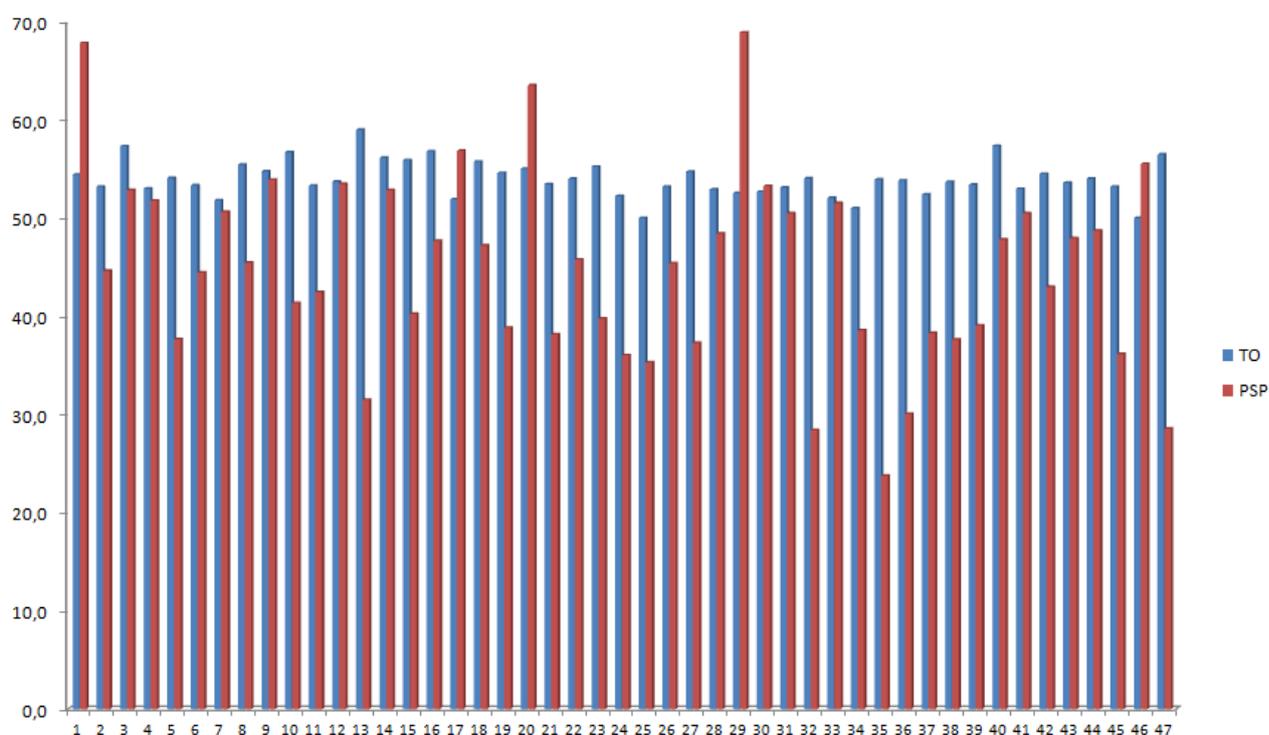


Figura 3 – Comparação simultânea entre peso de semente por planta (PSP) e o teor de óleo (TO) entre as 47 linhagens selecionadas.

Teste de primers e análise conjunta

Dentre os 53 primers testados em 47 linhagens de mamoneira foram obtidos um total de 119 alelos, com média de 3,19 alelos por loco, representando (67,92%) de primers polimórficos, Machado (2011) e Diamantino (2013) encontraram 31,13% e 94,13% como taxa de polimorfismo ao analisarem 118 e 50 locos, respectivamente.

Ainda, dos 119 alelos comuns 37 (31,09%), apresentaram frequência (4% < alelo comum < 20%) e 58 alelos frequentes (48,74%), com frequência (>20%). O loco Rco23 foi o que apresentou o maior número de alelos, 9, o que revela um conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) muito alto, acima de 80% de acordo classificação de Botstein *et al.* (1980) (Figura 4). Doze iniciadores geraram apenas dois alelos (Rco3, Rco12, Rco15, Rco18, Rco20, Rco40, Rco41, RcoM4, RcoM6, RcoM14, RcoM21 e RcoM28) (Tabela 2).

Para determinação da dissimilaridade entre as linhagens por meio da análise conjunta dos marcadores moleculares SSRs e os caracteres teor de óleo na semente (TOS) e o peso de sementes por planta (PSP), obteve-se a formação de 17 grupos, sendo eles: G1= UFRB11 e UFRB13; G2= UFRB14; G3= UFRB15, UFRB19, UFRB22, UFRB25, UFRB31, UFRB32 e UFRB23; G4= UFRB46 e UFRB50; G5= UFRB54 e UFRB57; G6= UFRB59, UFRB85, UFRB86, UFRB88 e UFRB93; G7= UFRB89, UFRB145, UFRB214, UFRB213, UFRB217, UFRB151 e UFRB160; G8= UFRB182; G9= UFRB208 e UFRB219 G10= UFRB220, UFRB221 e UFRB241; G11= UFRB248, UFRB254 e UFRB255; G12= UFRB222, UFRB226, UFRB227, UFRB232, UFRB233, UFRB238 e UFRB242; G13= UFRB258; G14= UFRB261; G15= UFRB263; G16= UFRB262 e G17= UFRB264 (Figura 5). A matriz de distância foi obtida levando em consideração o algoritmo de Gower (1971), já o agrupamento foi feito utilizando o método UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Averages* (SNEATH & SOKAL 1973).

A correlação cofenética entre a matriz de distância e a matriz de agrupamento foi de 0,8332** (significativo pelo teste de Mantel com 10000 permutações), o que indica ótima correlação segundo Vaz Patto (2004).

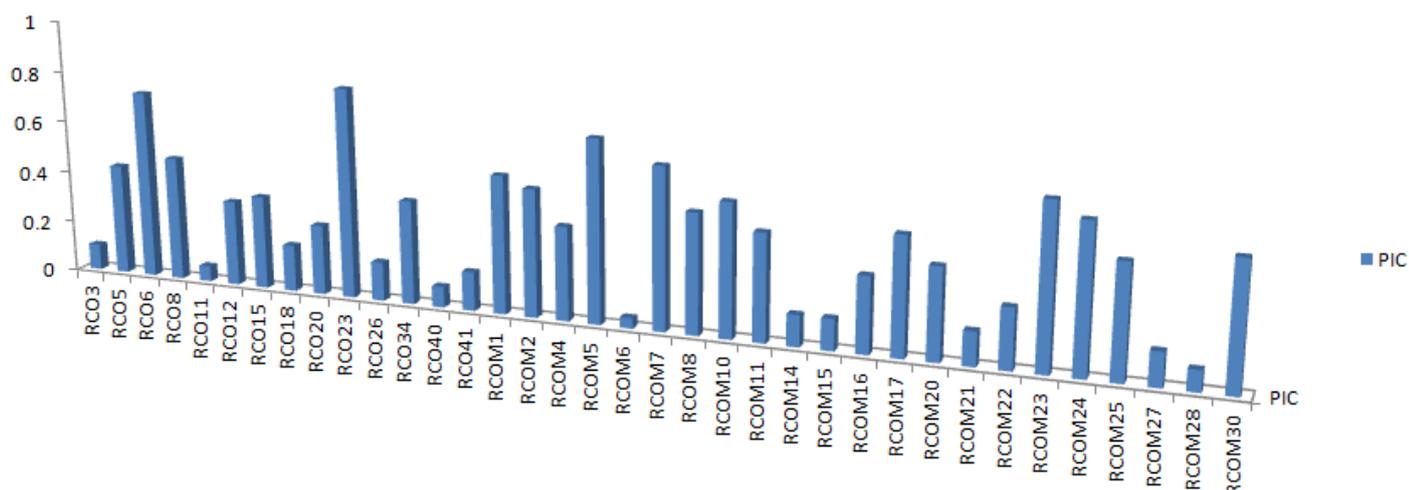


Figura 4. Descrição do conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) dos 36 primers utilizados no estudo.

*O PIC segue a seguinte classificação: loci altamente informativo ($PIC > 0,5$); loci moderadamente informativo ($0,25 < PIC < 0,5$) e loci pouco informativo ($PIC < 0,25$). Eixo vertical valores dados em percentuais.

De acordo Borém e Caixeta (2009) a seleção assistida por marcadores moleculares e a seleção fenotípica tradicional não são estratégias excludentes e a maior eficiência dos programas de melhoramento deverá ser atingida mediante uma combinação das duas estratégias. De fato, a análise conjunta entre os dados moleculares e morfológicos foram eficientes na detecção de variabilidade entre as 47 linhagens, ao revelar formação de dezessete grupos, dez grupos a mais que a divergência avaliada apenas via marcadores.

Tabela 2. Descrição dos 36 primers utilizados no estudo e número de alelos gerados, onde, (TA) significa temperatura de anelamento e (NA) o número de alelos.

Loci	Sequência 5'-3'	Motivo	TA	Amplitude/ segmentos	NA
RCO3	F: GAGTGAGCCCATTATGCTG R: TCAGAAATACCTCTAGGCGACA	(GA) ₂₂	60	202-214	2
RCO5	F: AGCCCAGAAATTGGAAAAGA R: CAAACCCAAGCAAACCTCA	(TG) ₆ (GA) ₂₂ (GAA) ₄	60	198-210	4
RCO6	F: GGGTGAAAATGAAGAGATTGG R: ATAACCCGTGAAGCATGGAC	(TG) ₁₁	60	204-215	7
RCO8	F: CGTGTGTCTGTGTGCATGTC R: CCTCAACCCTTTGCTGTTTC	(TG) ₁₀	60	206-225	4
RCO11	F: GCGTGGACTAACTTCAAGCA R: CCCATTAGCATCGAGAAAG	(TC) ₁₀ (GT) ₆	60	105-212	3
RCO12	F: AAGACTGCACCTCCTCCTA R: TGCTGGAACAAACCCTGATA	(TG) ₈ (GA) ₆	62	182-191	2
RCO15	F: CACGCACGTTAAAGCAAACCT R: GCGAAGAAACCAAATGGAG	(AG) ₁₈	60	96-104	2

Continua

RCO18	F: AGGGGGATAAGCGTGATATG R: CCGTTATGAAAAGGAAAGCA	(CA) ₁₇	60	96-102	2
RCO20	F: CCAAAGGAATGTGGGACTC R: TGTGGAGAGGATGAAGAGGAA	(TC) ₂₃	60	290-317	2
RCO23	F: CATGGATGTAGAGGGTCGAT R: CAGCCAAGCCAAAGATTTTC	(GA) ₁₅ (AG) ₈	62	211-245	9
RCO26	F: TTGCTTGTCAAAGGGGAGTT R: TCATTTTGAGGGAGAAACCA	(CT) ₁₉	60	222-230	3
RCO34	F: TCGGTTAAGGGTATGGGTTG R: CACACTTCATTTGCGAGACC	(GT) ₁₁	60	206-222	3
RCO40	F: AACTGGATAAAGGGTATTTGG R: GCTTTTTGGTAGCAGGTTTGA	(TC) ₅ (CT) ₇	60	84-90	2
RCO41	F: CATGTTGTTTTGGCAGCTC R: CGTTCACACTCATCAATCCA	(CT) ₁₇ (CA) ₁₁	60	88-96	2
RCOM1	F: GACGGGATGAAAGAGGATA R: TGGCTGCTGTTGTTACTCTA	(TA) ₁₈	63	236-245	4
RCOM2	F: ATGTCTGCTCTTGGTCTGTC R: ATGGTATGGTTTTGATGAGG	(CT) ₁₄	64	108-204	5
RCOM4	F: TCATAACCAACTCCTCACCAGA F: TTGTGATCGTTGTGGCTTGT	(TCCTAC) ₂ e (GGTAGG) ₂	62	274	2
RCOM5	F: AATGAGTCGCAATCTATGAACG R: ATGGTGGAAGAGAATGGCTG	(AAAAGA) ₃	62	204	4
RCOM6	F: GTTCCAACCTCCCAAACAGAC R: GCTCTTACCTACTCCTCCCC	(AAAAGA) ₃	64	196-199	2
RCOM7	F: CGGGTGAGAAGCAAGAGAAG R: TACAAGCCAAATAGTGCCCC	(TTAATT) ₃	63	213-225	4
RCOM8	F: GCTATCCACATTGGTTCCCT R: AAGTTTTGGTGATGGCTGCT	(GAA) ₅	63	237-365	3
RCOM10	F: GGGCGGGCTCTGTAAAGTA R: TTACCCAAACACCCTCTCCA	(TA) ₁₅	62	259-324	5
RCOM11	F: AACATCCCCTCCACTCACAG R: CCTGACCCTCCTGATTGTTT	(CAA) ₆	63	252-270	4
RCOM14	F: GATGAAAAGGAAATGGAGTGG R: AGTGAGGGTTGTATGGGGAG	(TAT) ₁₆	62	85-87	2
RCOM15	F: ATGGAGGTCTTGTGAGGTGC R: AGCCCCTTCTTGTAGTTTTG	(GAA) ₅	62	105-106	3
RCOM16	F:AGGGGTATCCTTATGCTCCAAC R: CCCAAACTCAAGACATTCATCA	(AAGA) ₇	62	213-224	5
RCOM17	F: GAAGATTCACAACCCCCATAA R: CAGCAGAAGAAAGAAAAGGCA	(GAA) ₈ (GA) ₁₃	63	197-213	3
RCOM20	F:GCCGACGCATAAGGTAAGAG R: TCTCAACAAACACACCACG	(GAA) ₁₃	64	91-97	3
RCOM21	F: CGGAACGACGACAAGAAAG R:CGTTATGGAAGGGAAAAGAAAG	(AAG) ₁₂	63	201-252	2
RCOM22	F: TTCACCCGCTATTCTCAACC R: CTCAACGACTTCCCTCCAAA	(ACT) ₅	62	113-118	3

Continua

RCOM23	F: CCTTTTGGAGGGTCCTTAGC R: CGCATCCTTTTCATTCTCTTCTT	(AG) ₁₈	63	214-221	4
RCOM24	F: ACTTCATTGCCCTTGGACAC R: TTAGGGAGATTGAGGACTGATG	(AT) ₁₀ (TG) ₇	62	111-125	3
RCOM25	F: TACTAACAACAACAAGACGGA R: GAACGCAAAAAGATTGGTCA	(TAT) ₁₂	62	165-210	3
RCOM27	F: TCAAGTGACAAAGGACACATCT R: GTGACAGAATCAGCCTAAACC	(AG) ₂₀	63	251-330	3
RCOM28	F: TTGGGTGTTATCCTCATTCC R: GGAGAAGAAGAAAGAAAAGGTG	(GAA) ₆ (AGA) ₅ (AAG) ₆	63	201-208	2
RCOM30	F: TCCAAAATATAAGCCCTGCC R: TGGTCTGTTCTAAGCAATCCC	(CT) ₁₇ (TA) ₂₅	63	436-439	3
Média					3.31

Comparando os agrupamentos, apenas dos dados moleculares e dos obtidos por meio da análise conjunta dos dados moleculares e morfoagronômicos, percebe-se que nove linhagens, do total de 20, representando 45% dos indivíduos selecionados, se mantiveram em pelo menos um grupo, em ambos os agrupamentos, como mostra a (Tabela 3), caracterizando assim alto grau de dissimilaridade genética entre essas linhagens.

Tabela 3. Comparação entre agrupamentos das 20 linhagens selecionadas; (agrupamento 1) = apenas dados moleculares; (agrupamento 2) = oriundo de dados moleculares mais morfoagronômicos.

Linhagens	Grupos	Linhagens	Grupos
UFRB11	1	UFRB11	1
UFRB15	3	UFRB15	3
UFRB19	4	UFRB19	3
UFRB23	4	UFRB23	3
UFRB21	4	UFRB21	3
UFRB86	4	UFRB86	6
UFRB93	4	UFRB93	6
UFRB151	4	UFRB151	7
UFRB160	2	UFRB160	7
UFRB208	5	UFRB208	9
UFRB214	5	UFRB214	7
UFRB222	5	UFRB222	12
UFRB227	2	UFRB227	12
UFRB241	5	UFRB241	10
UFRB242	6	UFRB242	12
UFRB248	7	UFRB248	11
UFRB255	5	UFRB255	11
UFRB258	2	UFRB258	13
UFRB262	2	UFRB262	16
UFRB264	2	UFRB264	17
Agrupamento 1		Agrupamento 2	

O agrupamento feito simultaneamente a partir dos dados moleculares mais os dados morfoagronômicos revelou, além de um número maior de grupos, maior quantidade de grupos formados por apenas uma linhagem, sete no total, contra um grupo formado quando a análise é feita apenas por dados moleculares. Para Vieira et al. (2005), os grupos formados por apenas um indivíduo indicam que tais acessos sejam mais divergentes em relação aos demais, como pôde ser observado neste trabalho.

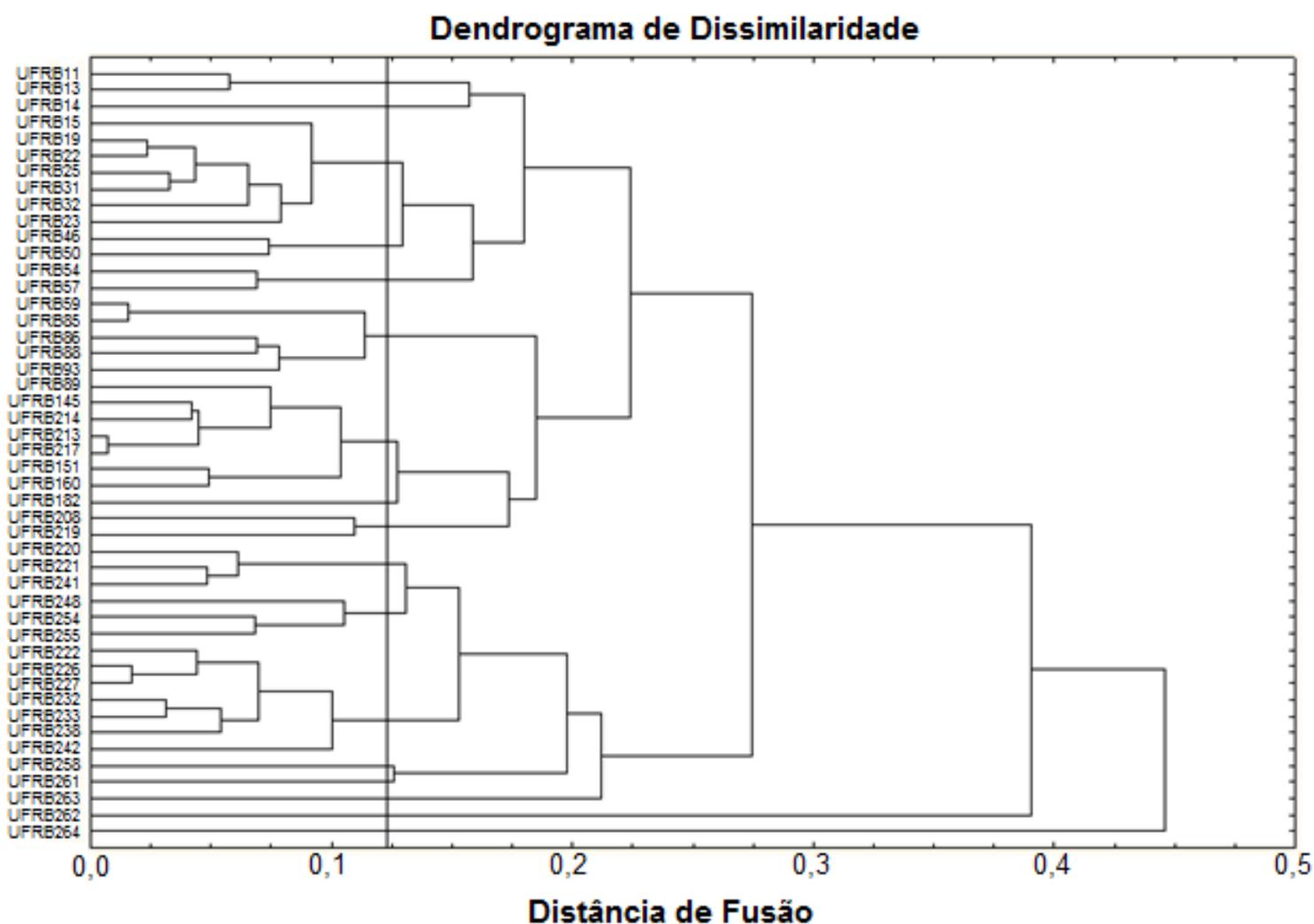


Figura 5. Dendrograma de dissimilaridade obtido a partir da análise conjunta de dados moleculares por meio de marcadores SSR's e os dados morfológicos teor de óleo na semente (TOS) e peso de sementes por planta (PSP).

CONCLUSÕES

A análise conjunta dos marcadores moleculares SSRs com os caracteres teor de óleo na semente (TOS) e peso de sementes por planta (PSP) foi eficiente, com formação de 17 grupos distintos.

A análise simultânea dos dados moleculares e morfoagronômicos se mostrou mais eficaz que a análise apenas por meio de marcadores, sendo o algoritmo matemático de Gower mais eficiente na detecção de dissimilaridade genética.

REFERÊNCIAS

AKKAYA, M. S.; BHAGWAT, A. A.; CREGAN, P. B. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p.1131-1139, 1992.

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.; 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.

BELTRÃO, N. E. M. **Mamona: árvore do conhecimento e sistemas de produção para o Semi-Árido Brasileiro**. Campina Grande: EMBRAPA-Algodão, 2003. 19 p. (EMBRAPA-CNPA. Circular técnica, 70).

BERTAN, Ivandro; et al. **Associação entre a distância genética em Trigo (*Triticum aestivum*) estimada por meio de caracteres morfológicos, marcadores moleculares aflu e coeficiente de parentesco**. Centro de Genômica e Fitomelhoramento –CGF – FAEM/UFPel; Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900. 2007.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 2009. 532p.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNIEK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p. 314-331, 1980.

CARVALHO, L. O. de. **Cultura da mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. São Paulo: CATI, 1991. 17p. FOL3650

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.

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.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**. Diversidade Genética. 1. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2008. v. 1. 278 p.

DIAMANTINO, M. S. A. S. **Variabilidade genética, viabilidade de pólen e estresse salino em genótipos de mamoneira** / Maria Selma Alves Silva Diamantino. Cruz das Almas, BA, 2013.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.** 19: 11-15.

EMBRAPA, 2007. **Sistemas de produção da mamona**. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/co_produtos.htm. Acesso em: Janeiro de 2014.

EMBRAPA, 2006. **Zoneamento da Mamona no Nordeste**. Disponível em; <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/zoneamento.html>. Acesso em: Março de 2014.

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 communis* L.) baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

FREITAS S. M.; FREDO C. E. Biodiesel à base de óleo de mamona: algumas considerações. **Informações econômicas**, São Paulo, v.35, n. 1, 2005. p. 37-42.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v.27, p. 857-874, 1971.

GUIMARÃES, C. T. **Aplicação de Marcadores Moleculares no Melhoramento Genético**. XXV Congresso Nacional de Milho e Sorgo – 29/08 a 02/09 de 2004. Cuiabá, Mato Grosso.

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.

MACHADO, Edna Lobo ; SILVA, Simone Alves. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** (Online), v. 28, p. 1457-1463, 2013.

MACHADO, E. L. **Genotipagem, Teor de Óleo, Otimização do Método Gravimétrico e Desenvolvimento de Marcadores Microssatélite em (*Ricinus communis* L.)**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB. 118 p, Cruz das Almas, 2011. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias).

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research Chestnut**, v. 27, n. 2, p 209-220, 1967.

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

MOSHKIN, V. A.; PERESTOVA, T. A. Morfology and anatomy. **In:** MOSHKIN, V.A. (Ed.). **Castor**. New Delphi: Amerinda, 1986. p. 28-33.

OLIVEIRA, E. M. de. Avaliação do Teor de Óleo e Peso em Sementes de Mamona Utilizando Diversos Acessos. **Engenharia Ambiental** - Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 1, p. 205-211, jan. /mar. 2011.

PONCET, V.; HAMON, P.; MINIER, J.; CARASCO, C.; HAMON, S.; NOIROT, M. SSR cross- amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). **Genome**, v. 47, p.1071-1081, 2004.

PHILIPS, R. L.; VASIL, I. K. (Ed.). **DNA-Based Markers in Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.497, 2001.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Science**, v.1, p.215-222, 1996.

R Development Core Team. **R' a language and environment for statistical computing**. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Áustria. 2004. Disponível em <http://www.rproject.org>.

SAGHAI MAROOF, M. A.; BIYASHEV, R. M.; YANG, G. P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R. W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy Science**, v.91, p.5466-5470, 1994.

SANTOS, Sueli Freitas dos. **Desempenho produtivo e qualidade do leite de cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo quatro níveis de casca de mamona** / Sueli Freitas dos Santos, 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.

SNEATH, P.H.A. AND SOKAL, R.R. 1973. **Numerical taxonomy — the principles and practice of numerical classification.** (W. H. Freeman: San Francisco.)

SOKAL, R. R. AND F. J. ROHLF. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, 11:33 - 40.

VARSHNEY, R. K.; KORZUN, V. BÖRNER, A. Molecular maps in cereals: methodology and progress. **In:** GUPTA, P. K.; VARSHNEY, R. K. (Ed.). Cereal Genomics. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.35-82, 2004.

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.

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; FUKUDA, W. M. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. Variabilidade genética para caracteres morfológicos entre acessos do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Cerrados. **In:** CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 11, 2005, Campo Grande. Anais...CD-ROM

VIEIRA, R. de M.; LIMA, E. F.; AZEVEDO, D. M. P. de; BATISTA, F. A. S.; SANTOS, J. W. dos; DOURADOS, R. M. F. **Competição de cultivares e linhagens de mamoneira no Nordeste do Brasil- 1993/96.** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, b. 4p, 1998. (Comunicado técnico, 71).

WU, K. S.; TANKSLEY, S. D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. **Molecular Genetics and Genomics**, v.241, p.225-235, 1993.

YU, K.; PARK, S. J.; POYSA, V. Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*). **Genome**, v.42, p.27-34, 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise simultânea das variáveis quantitativas e marcadores moleculares foi mais eficiente na expressão da diversidade genética entre os genótipos de mamoneira em comparação com a análise feita apenas por marcadores, por apresentar maior coeficiente de correlação cofenético, ou seja, na análise conjunta houve uma correlação superior entre as matrizes de agrupamento e dissimilaridade, 83,32% e 79,69% respectivamente, além da obtenção de 17 grupos na análise conjunta e sete grupos na análise por meio apenas de marcadores, demonstrando assim maior variabilidade entre as linhagens estudadas.