



UFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM AGRONOMIA



CECA

MUCIANA ARACELY DA SILVA CUNHA

**ANÁLISE MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE
GENÓTIPOS DE *Ricinus communis* L. REVELADA POR
MARCADORES RAPD**

RIO LARGO - AL

2006

MUCIANA ARACELY DA SILVA CUNHA

**ANÁLISE MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE
GENÓTIPOS DE *Ricinus communis* L. REVELADA POR
MARCADORES RAPD**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Agronomia (Área de Concentração em Produção Vegetal) da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Ramalho Neto

RIO LARGO - AL

2006

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- C972a Cunha, Muciana Aracely da Silva.
Análise molecular da variabilidade genética entre genótipos de *Ricinus communis* L. revelada por marcadores RAPD / Muciana Aracely da Silva Cunha.
– Rio Largo, 2006.
61 f. : il. tabs., grafs.
- Orientadora: Eduardo Ramalho Neto.
Dissertação (mestrado em Agronomia : Produção Vegetal) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2006.
- Inclui bibliografia.
1. Mamona – Genética. 2. *Ricinus communis*. 3. Variabilidade genética. 4. Marcadores. I. Título.

CDU: 633.85

TERMO DE APROVAÇÃO

MUCIANA ARACELY DA SILVA CUNHA

2004M21D013S-3

**ANÁLISE MOLECULAR DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE
GENÓTIPOS DE *Ricinus communis* L. REVELADA POR
MARCADORES RAPD**

APROVADA em: 11 de 09 de 2006.

BANCA EXAMINADORA



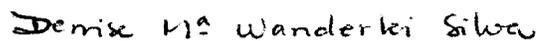
Prof. Dr. Eduardo Ramalho Neto (CECA/UFAL)

Orientador



Prof. Dr. Lailton Soares (CECA/UFAL)

Examinador



Prof. Dr. Denise Wanderlei Silva (CCBI/UFAL)

Examinadora

Prof. Dr. Marcondes Maurício de Albuquerque
(Embrapa Tabuleiros Costeiros / UEP Rio Largo - AL)

Examinador

RIO LARGO - AL

2006

*A papai (Múcio), mamãe (Ana),
meu irmão (Marlécio), minha irmã (Marusa),
pelo amor incondicional que tanto nos une,
o qual sempre foi e será minha maior fortaleza.*

Dedico.

*“Um dia, quando o sertão se preparar pro saber
da carta do abc e dominar toda ciência,
terá auto-suficiência, será do mundo um celeiro,
profetizou Conselheiro há idos tempos atrás
e o nó, enfim, se desfaz é tempo de redenção...”*

Flávio Leandro / Miguel Filho

Agradecimentos

A Deus, por me abençoar com saúde e paz de espírito e, especialmente, por ter-me concedido a chance de viver mais uma vez!

Aos meus pais e irmãos, por serem, incondicionalmente, sinônimo de amor, conforto e amizade. A papai e mamãe, por todos os esforços dedicados a minha educação, pelos ensinamentos e por constituírem meu maior exemplo de coragem e determinação. Ao meu irmão, Marlécio, por ter sido, ao longo da minha caminhada profissional, meu guia e mestre, pelo incentivo e por acreditar em mim sempre. A minha irmã, Marusa, pela inestimável amizade, fidelidade e carinho que teremos eternamente!

Ao professor Eduardo Ramalho Neto, por proporcionar a oportunidade de realizar este trabalho, concedendo-me tamanha confiança, apoio e respeito.

À professora Denise Wanderlei Silva, por ter demonstrado satisfação em contribuir, de alguma maneira, pela melhoria dos nossos trabalhos, apoiando-nos com informações formidáveis!

À querida amiga Janinha, pela companhia, ajuda, dedicação, colaboração e responsabilidade compartilhadas durante a execução deste trabalho que, num futuro bem próximo, nos remeterá a ótimas lembranças e deixará muitas saudades!

Ao meu “cunhado” do coração, Ronald, pelo carinho que nos une!

Aos amigos Adriana, Sarah e Thelmo, que ocupam um lugar especial em meu coração, por estarem presentes em inesquecíveis momentos de minha vida e por terem compartilhado comigo tantas alegrias e ensinamentos.

A Gil, Gedalva, Kirley, Manoel, Maria José, Marcos (Marquito!), Jessé, Paulo (PP!), Velber, Rívia, Francisco, Manu, Netinho, Marquinhos, Daniel, Sandro, Léa, pelos quais, embora tenhamos tido pouco tempo de convivência, tenho um enorme carinho.

Ao secretário Geraldo de Lima, pela excelência no desempenho de sua função, compreendendo um grande exemplo de profissionalismo e dedicação.

Ao pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros (UEP/Rio Largo), João Gomes da Costa, e ao agrônomo Francisco Ferreira de Oliveira, pela valiosa colaboração e atenção, imprescindíveis na execução deste trabalho.

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Agronomia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas, Fapeal, pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE APÊNDICES	xi
LISTA DE ANEXOS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. A cultura da mamona.....	04
2.1.1. Taxonomia e origem.....	04
2.1.2. Características morfológicas gerais.....	04
2.1.3. Aplicações industriais.....	06
2.1.4. Biodiesel e agronegócio.....	07
2.1.5. Melhoramento genético.....	09
2.2. Variabilidade genética através de polimorfismos de DNA.....	10
2.2.1. Extração de DNA.....	11
2.2.2. Marcadores moleculares RAPD.....	12
3. METODOLOGIA	
3.1. Material vegetal.....	16
3.2. Extração do DNA genômico total.....	17
3.2.1. Protocolo de Graham <i>et al.</i> (1994) modificado.....	18
3.2.2. Protocolo alternativo proposto.....	18
3.2.3. Qualidade e pureza do DNA.....	19
3.3. Amplificação RAPD-PCR.....	19

3.3.1. Análise fenética.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Análise da extração de DNA genômico.....	21
4.2. Análise da amplificação RAPD-PCR.....	24
4.2.1. Variabilidade genética.....	27
5. CONCLUSÕES.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
APÊNDICES.....	38
ANEXOS.....	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características morfológicas gerais apresentadas pela mamoneira. (A) Folhas simples com pecíolos longos característicos; (B) Detalhe da disposição das flores femininas e masculinas na inflorescência; (C) Frutos (cápsulas) com estruturas semelhantes a espinhos.....06
- Figura 2.** Estrutura molecular do ácido ricinoléico.....06
- Figura 3.** Produção mundial de biodiesel em mil toneladas. Fonte: Fertilizer Society of South Africa; Disponível em: www.fssa.org.za/pebble.asp?relid=317.....08
- Figura 4.** Variabilidade fenotípica observada nas sementes dos genótipos CNPAM 2002 189 (A), CSRN 142 (B), CSDR 2 (C), CNPAM 2002 154 (D), CNPAM 2002 135 (E), CNPAM 2002 157 (F), CNPAM 2002 219 (G), EPABA OURO (G).....18
- Figura 5.** Perfil eletroforético de DNA total extraído de folhas de *R. communis* L., através do protocolo de Graham *et al.* (1994) modificado. (A) Colunas de 1 a 10 correspondem aos genótipos descritos na Tabela 1. (B) Cultivar BRS 149 (colunas 1, 2 e 3) e Cultivar BRS 188 (colunas 4, 5 e 6).....22
- Figura 6.** Análise eletroforética de DNA total proveniente de duas extrações de DNA (A e B) de tecido foliar de *R. communis* L., através do protocolo alternativo proposto. Colunas de 1 a 10 correspondem aos genótipos descritos na Tabela 1.....23
- Figura 7.** Amostras após etapa de incubação à 70°. A) Matriz viscosa e marrom caracteristicamente formada após exposição prolongada em banho-maria. B) Otimização do aspecto da amostra após redução no tempo de incubação, adição de PVP e NaCl 2M ao tampão CTAB.....23
- Figura 8.** Aspecto gelatinoso na parte superior do tubo, evidenciado após desproteínização; variedades CNPAM 2002-219 (A) e BRS 149 (B).....24
- Figura 9.** Produtos da amplificação RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordeste (9), BRS-188 Paraguai (10).....24

(10), gerados pelos iniciadores OPA 9 (A) e OPA 20 (B)..... 26

Figura 10. Fenograma de agrupamento UPGMA gerado na análise dos marcadores RAPD em genótipos de mamona, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.....28

Figura 11. Fenograma de agrupamento UPGMA gerado na análise dos marcadores RAPD em genótipos de mamona, baseado no coeficiente de similaridade de Dice.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genótipos de mamona (<i>Ricinus communis</i> L.) utilizados no estudo de variabilidade genética por meio de marcadores RAPD.....	17
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises RAPD.....	20
Tabela 3. Bandas monomórficas e polimórficas dos genótipos de mamona, geradas pelas ampliações RAPD-PCR com os iniciadores selecionados para análise.....	25
Tabela 4. Similaridade genética entre dez genótipos de <i>R. communis</i> estimada pelo coeficiente de Jaccard.....	27
Tabela 5. Similaridade genética entre dez genótipos de <i>R. communis</i> estimada pelo coeficiente de Dice.....	27

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1A. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 1.....39

Apêndice 1B. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 2.....40

Apêndice 1C. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 4.....41

Apêndice 1D. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 9.....42

Apêndice 1E. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 10.....43

Apêndice 1F. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 16.....44

Apêndice 1G. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu

(10), gerado pelo iniciador OPA 20.....45

Apêndice 2. Matriz binária gerada pelos marcadores RAPD obtidos das ampliações com os oligonucleotídeos OPA 1, OPA 2, OPA 4, OPA 9, OPA 10, OPA 16 e OPA 20.....46

Apêndice 3A. Coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard e o fenograma resultante, obtidos através do programa NTSYS-pc.....47

Apêndice 3B. Coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Dice e o fenograma resultante, obtidos através do programa NTSYS-pc.....48

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Trabalho apresentado no 45º Congresso Brasileiro de Oleicultura, 15º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 2º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos, realizados em Fortaleza – CE, 2005.....51

Anexo 2. Trabalho encaminhado e aceito para apresentação no II Congresso Brasileiro de Mamona, a ser realizado no período de 15 a 18 de agosto de 2006 em Aracaju – SE.....53

Anexo 3. Trabalho encaminhado e aceito para apresentação no II Congresso Brasileiro de Mamona, a ser realizado no período de 15 a 18 de agosto de 2006 em Aracaju – SE.....58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg - micrograma (s)

µL - microlitro (s)

ng - nanograma (s)

nm - nanômetro (s)

°C - Graus Celsius

1 X - Uma vez

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

AL - Alagoas

BSA - Bovine serine albumine

cm - Centímetros

CECA - Centro de Ciências Agrárias

CIA - Chloroform isoamyl-alcohol

CNPA - Centro Nacional de Pesquisa do Algodão

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CTAB - Cetyl trimethyl ammonium bromide

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos trifosfato

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPABA - Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia

FAPEAL - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas

g - Aceleração da gravidade

GEMPRO - Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica

ha - Hectare

HCl - Ácido clorídrico

IAC - Instituto Agronômico de Campinas

IPEAL - Instituto de Pesquisas Agronômicas do Leste

Kb - Quilobase (mil pares de bases)

KCl – Cloreto de potássio

L - Litro

M - Molar

mg - Miligrama (s)

MgCl₂ - Cloreto de magnésio
Milli Q - Água destilada deionizada
min - minuto (s)
mL - Mililitro (s)
mM - Milimolar
NaCl - Cloreto de sódio
NTSYS - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
OD - Optical density
pb - Pares de bases
PCR - Polymerase Chain Reaction
pH - Potencial de hidrogênio
PVP - Polyvinylpirrolidone
RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism
t - Toneladas
Taq - *Thermus aquaticus*
TBE - 1M Tris Borato, 20mM EDTA
TE - 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA
Tris - Tris[hidroximetil] aminometano
U - unidade (s)
UFAL - Universidade Federal de Alagoas
UPGMA - Unweighted pair group method using arithmetic averages
UV - Ultra violeta
V - Volts

RESUMO

A elevada demanda energética mundial faz necessária a busca por fontes renováveis e menos agressivas ao meio ambiente. O cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) constitui uma excelente alternativa na composição da matriz energética nacional por ser tradicionalmente praticado por pequenos e médios produtores, destacando-se como uma cultura de elevado apelo econômico e social, em especial na região Nordeste. Existe uma escassez de informações, especialmente no âmbito molecular, acerca da grande variabilidade genética apresentada por essa oleaginosa. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a diversidade genética entre dez genótipos de *Ricinus communis* L. por meio de marcadores moleculares RAPD. Foram avaliadas cinco linhagens do BAG da Embrapa Algodão, duas linhagens provenientes da Costa Rica e três variedades comerciais da região Nordeste. A extração do DNA genômico total dos genótipos foi realizada segundo metodologia descrita por Graham *et al.* (1994) e através de um protocolo alternativo proposto nesse estudo. O emprego de sete iniciadores arbitrários na amplificação RAPD-PCR permitiu avaliar a eficiência dos protocolos na extração do DNA genômico total, o padrão de bandas de DNA gerado e o cálculo de índices de similaridade. A matriz de dados de similaridade entre os genótipos foi convertida num dendrograma. Na análise dos fragmentos amplificados foram reveladas 58 bandas polimórficas com fragmentos de 2394 a 3386 pb. Ainda na avaliação dos resultados, a distância genética e o agrupamento gerado pelo dendrograma evidenciaram a grande variabilidade genética existente entre os indivíduos. Os marcadores moleculares RAPD mostraram-se eficientes na detecção de polimorfismos de DNA dos demais genótipos avaliados, tornando possível seu emprego em posteriores estudos de caracterização correlacionados com os principais caracteres agroindustriais de germoplasma de mamona.

Palavras-chave: *Ricinus communis* L.; variabilidade genética; polimorfismo; RAPD.

ABSTRACT

The high world energy demand requires a search for renewable sources which are less harmful to environment. Castor bean (*Ricinus communis* L.) cultivation is an excellent alternative to compound the national energy matrix due to its traditional small and intermediate producers, standing out as a culture with high economical and social appeal, especially in Northeast region. There is a lack of information, especially at molecular level, related to the amount of high genetic variability available in this oil crop. The objective of this work was to characterize the genetic diversity within ten genotypes of *Ricinus communis* L. by using RAPD molecular markers. A total of seven lines and three cultivars were evaluated, which included five lines from Germplasm Bank of Embrapa Algodão, two lines from Costa Rica and three Northeastern cultivars. Genomic DNA extraction was performed according both to Graham *et al.* (1994) and an alternative protocol proposed in this study. Seven arbitrary oligonucleotides employed in the RAPD-PCR amplification permitted to evaluate the efficiency of the genomic DNA extraction protocols, DNA banding profiles and calculation of similarity indexes. Similarity and cluster analysis were conducted using both Jaccard and Dice coefficient and the unweighted pair group method. The similarity data matrix was converted into a dendrogram. The amplified fragments yielded a total of 58 polymorphic bands ranging from 2394 to 3386 bp. On the basis of the performed analysis, similarity indexes and data clustering revealed the occurrence of high genetic variability among the genotypes. RAPD molecular markers were efficient on the detection of DNA polymorphism within genotypes evaluated, suggesting that this marker could be suitable for further characterization studies related to the main agroindustrial features of castor bean germplasm.

Keyword: *Ricinus communis* L.; genetic variability; polymorphism; RAPD.

1. INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis* L.) pode ser encontrada como planta nativa em diferentes partes do mundo, devido a sua fácil propagação, adaptação e estabelecimento. Esta oleaginosa é de utilização preponderantemente industrial, tendo no seu principal produto, o óleo extraído da semente, a possibilidade de obtenção de inúmeros derivados químicos com aplicações na área de cosméticos, lubrificantes, polímeros etc., podendo, ainda, ser potencial substituto do petróleo na síntese de diversos outros materiais.

A cultura da mamona está amplamente disseminada por quase toda a extensão territorial brasileira, onde encontra condições edafoclimáticas adequadas ao seu desenvolvimento. No semi-árido nordestino, seu plantio é reconhecido como fator fixador de mão-de-obra, gerador de emprego e matéria-prima indispensáveis ao desenvolvimento da região e do país (AZEVEDO *et al.*, 1997), refletindo o alcance social e econômico gerados pelo desenvolvimento da cadeia produtiva desta euforbiácea. O Brasil possui mais de 500 municípios situados no ótimo ecológico para a sua produção, conferindo ao nosso país condição de destaque, frente aos principais países produtores como a Índia e a China (CARTAXO *et al.*, 2004).

As oleaginosas em geral terão destaque tanto como meio para proteção do meio-ambiente – ao produzirem óleo menos poluente – quanto compondo a tecnologia da matriz energética deste século, no qual se prevê a escassez das reservas de petróleo. O uso do biodiesel, denominação genérica para combustíveis derivados de oleaginosas como a mamona, incentivado pela consciência mundial da necessidade de preservação ambiental, propicia uma melhoria significativa na redução da emissão de poluentes atmosféricos, criando uma perspectiva real para a expansão do cultivo de mamona em escala comercial no semi-árido brasileiro.

Existe uma elevada demanda pela exploração racional da mamona, com vistas à utilização do óleo extraído da semente na indústria, devido a sua enorme versatilidade química, além, ainda, do emprego de outras partes da planta, resíduos vegetais e cascas dos frutos, na composição de diversos produtos, como papel e tecidos, agregando valor à produção. Especificamente, tendo como objetivo a produção de óleo, a ricinocultura parece constituir o verdadeiro caminho e vocação para o semi-árido (PARENTE, 2005) por diversas razões, dentre elas: fácil adaptação às condições ecológicas, sendo caracteristicamente resistente aos períodos de seca; envolvimento de pequenos agricultores rurais, prestando-se

para a agricultura familiar; aproveitamento da torta como adubo orgânico de excelência e, se destoxicada, constitui rica fonte protéica para alimentação animal etc.

Por outro lado, os baixos índices de produtividade nacional, verificados nas últimas décadas, decorrem de fatores diversos, podendo variar de uma região para outra. De acordo com Savy Filho (2005), tal fato deveu-se ao pouco uso de tecnologia disponível pelos produtores, resultando na baixa competitividade, somado ao fato da estrutura agricultor-indústria de comercialização concorrer para o desestímulo do uso de tecnologia de produção, uma vez que a remuneração do produtor não reflete os preços praticados pela indústria. Outros fatores relevantes para a redução da produtividade podem ser considerados, tais como os citados por Santos *et al.* (2001), sejam eles: reduzida oferta de sementes de cultivares melhoradas geneticamente; utilização de sementes impróprias para o plantio; emprego de técnicas culturais inadequadas; reduzida oferta de crédito e de assistência técnica ao produtor agrícola; utilização da mesma área para sucessivos plantios da cultura etc.

No Nordeste, onde se concentra a maior produção nacional, atingindo um valor de 154.085 t de bagas em 2006 (IBGE), o principal entrave para a exploração racional da mamona encontra-se na inadequada disponibilidade de sementes de cultivares adaptadas, produtivas, com alto teor de óleo e tolerantes às pragas e doenças (FIGUEIREDO NETO *et al.*, 2004). Verifica-se o emprego de um método de cultivo rudimentar, onde materiais genéticos locais de origem desconhecida são amplamente utilizados, acarretando, segundo Freire *et al.* (2001), degenerescência generalizada dos materiais cultivados, com predominância de variedades locais pouco produtivas.

A grande variabilidade apresentada pela mamona é observada em características botânicas e agronômicas, podendo, de forma complementar, ser avaliada através de polimorfismo de DNA, com o emprego de técnicas tais como: RAPD, RFLP, AFLP e microssatélites. Os marcadores moleculares representam ferramentas importantes em diversos estudos, permitindo avaliar, em curto prazo, um número elevado de genótipos, um alto grau de polimorfismo, além de não sofrerem influência ambiental, pleiotrópica ou epistática como ocorre com marcadores morfológicos que apresentam relativa limitação, especialmente com cultivares proximamente relacionadas.

Existe uma escassez de informações acerca da variabilidade genético-molecular das coleções de germoplasma, linhagens, cultivares e híbridos brasileiros de *Ricinus communis* L. Nesse contexto, a caracterização e avaliação das diferentes variedades disponíveis comercialmente e de populações naturais, quanto ao seu potencial de uso, são consideradas essenciais no estabelecimento de diferenças ou semelhanças, imprescindíveis para os

programas de melhoramento da espécie (FIGUEIREDO NETO *et al.*, 2004), visando, ainda, assegurar informações sobre essas fontes de genes e suas utilizações futuras, fundamentais para o sucesso da ricinocultura.

No entanto, para a aplicação das técnicas moleculares, se faz necessário a obtenção de metodologias adequadas para o isolamento de DNA de mamona, uma vez que a caracterização bioquímica foliar desta espécie determina a presença de diversas classes de substâncias que constituem contaminantes potenciais durante o processo.

Inúmeros estudos de diversidade genética, identificação de genes de interesse, análises filogenéticas e caracterização de germoplasma de diversas plantas têm sido conduzidos com sucesso através da técnica de RAPD, uma tecnologia amplamente utilizada dentre os demais marcadores moleculares baseados em PCR. O uso de oligonucleotídeos iniciadores de seqüência arbitrária que não requer clonagem, seqüenciamento ou outra caracterização genética prévia do genoma em questão, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados constituem características peculiares da técnica de RAPD.

Por meio de estudos preliminares com a classe de marcadores RAPD, este trabalho teve como objetivos principais:

1. Estabelecer protocolos rápidos e eficientes para o isolamento de DNA de dez genótipos de mamona;
2. Analisar o polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD e estimar a variabilidade genética existente entre os genótipos considerados;

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura da mamona

2.1.1. Taxonomia e origem

A mamona (*Ricinus communis* L.), também denominada carrapateira, mamoneira, rícino, palma-christi, palma-de-cristo e enxerida, compreende uma das mais de 7.000 espécies da família Euphorbiaceae. De acordo com Chierice & Claro Neto (2001), pertence à subfamília Crotonoideae, tribo Acalyphae, subtribo Ricinae e gênero monoespecífico *Ricinus*. Com base na variabilidade existente na espécie, Popova & Moshkin (1986), reuniram os tipos, além das cultivares e híbridos, em seis subespécies e 25 variedades botânicas.

Sua origem é bastante discutida, porém constitui, ainda, objeto de controvérsia, sendo o leste africano (AZEVEDO *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2002), especialmente a Etiópia (CARTAXO *et al.*, 2004) e a Ásia (BELTRÃO *et al.*, 2002) citados, freqüentemente, como centro de origem. A ocorrência de mamona tem sido estimada desde épocas imemoriais. Sementes desta espécie foram encontradas em urnas funerárias no antigo Egito, datando de mais de 4.000 anos, evidenciando sua relevância na Antigüidade, onde, provavelmente, eram-lhe atribuídas propriedades medicinais. A introdução desta espécie no Brasil se deu durante a colonização portuguesa, por ocasião da vinda dos escravos africanos (BELTRÃO *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2002), com a finalidade de utilizar seu óleo na iluminação e para lubrificação de eixos de carroças (CHIERICE & CLARO NETO, 2001).

2.1.2. Características morfológicas gerais

A mamona é uma espécie polimórfica: apresenta grande variação no hábito de crescimento, cor da folhagem e do caule, tamanho das sementes, teor e coloração do óleo e porte (WEISS, 1983; MAZZANI, 1983 *apud* Beltrão *et al.*, 2001), sendo seu desenvolvimento, principalmente, influenciado pelas condições locais e variedade utilizada (SAVY FILHO, 2005).

Em geral, a mamona apresenta sistema radicular vigoroso, do tipo pivotante, profundo, com desenvolvimento de poucas raízes laterais, apresentando, ainda, forte emissão de radicelas ao longo das raízes, conferindo grande área de absorção de umidade e nutrientes do solo (SAVY FILHO, 2005). Em condições de baixa umidade do solo, a raiz principal atinge uma maior penetração e as raízes secundárias assumem caráter bem desenvolvido, de particular importância para as variedades resistentes à seca.

Com relação à parte aérea, o caule pode apresentar grande variação, especialmente, na coloração e na presença de cera. Observa-se o crescimento do ramo principal, verticalmente, sem ramificação, até o surgimento da primeira inflorescência, o que, em alguns genótipos, segundo Baldanzi *et al.* (2003) ocorre somente após a formação de seis nós. O nó de onde surge o primeiro racemo é uma importante característica agrônômica, associada à maturidade da planta (BELTRÃO, 2003a). As ramificações de 2ª, 3ª e 4ª ordens apresentam crescimento limitado, terminando sempre em uma inflorescência, formando uma estrutura simpodial (BELTRÃO *et al.*, 2001).

As folhas da mamona são simples, digitilobadas, denticuladas, apresentando pecíolos longos, com 20 a 50 cm de comprimento, e filotaxia alternada (Figura 1A). De acordo com Mazzani (1983) *apud* Beltrão *et al.* (2001), as principais variações nas folhas da mamoneira são na cor, cerosidade, número de nervuras principais, comprimento do pecíolo, número de glândulas e na profundidade dos lóbulos.

A mamona apresenta florescimento simpodial (SAVY FILHO, 2005), sendo classificada como uma planta monóica (RIBEIRO FILHO (1966) *apud* BELTRÃO *et al.*, 2001), na qual as flores femininas encontram-se na parte superior do eixo da ráquis, e masculinas na inferior (Figura 1B). A proporção flores femininas/flores masculinas pode ser afetada por fatores ambientais, como temperatura, idade da planta, comprimento do dia e, ainda, pela variedade utilizada. Deficiência hídrica, assim como temperatura muito alta, induz a formação de flores masculinas, enquanto que, solo fértil ou bem balanceado quimicamente, eleva a porcentagem de flores femininas (SAVY FILHO, 2005).

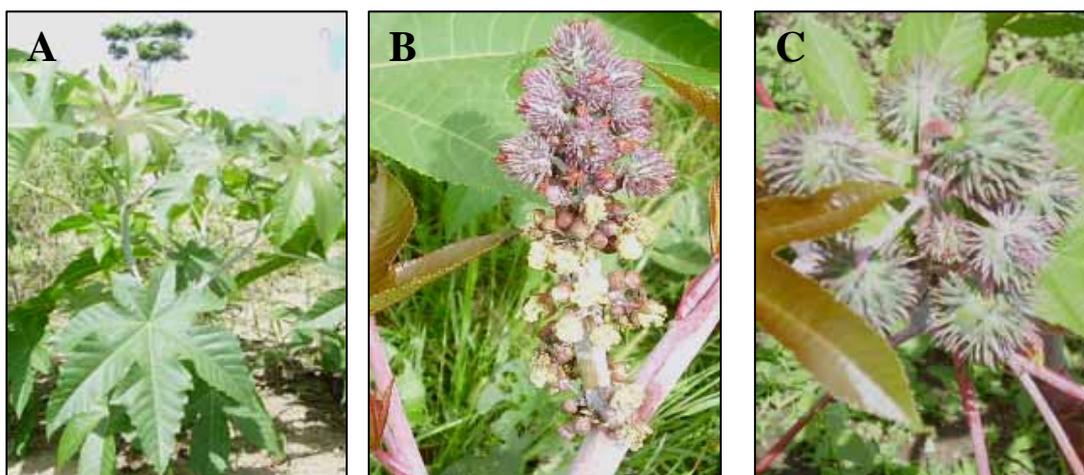


Figura 1. Características morfológicas gerais apresentadas pela mamoneira. (A) Folhas simples com pecíolos longos característicos; (B) Detalhe da disposição das flores femininas e masculinas na inflorescência; (C) Frutos (cápsulas) com estruturas semelhantes a espinhos.

O fruto da mamona é uma cápsula, tricoca, que normalmente, apresenta estruturas semelhantes a espinhos (Figura 1C). Quanto à deiscência, característica agronomicamente importante, pode ser classificada em deiscentes, semideiscentes e indeiscentes, de acordo com o comportamento de abertura dos frutos na época da maturação dos racemos.

As sementes são de formas e tamanhos diversos, encontrando-se, ainda, variações na cor, peso, proporção do tegumento, presença ou ausência de carúncula e aderência do tegumento ao endosperma. Segundo Ribeiro Filho (1996), o tegumento externo da semente é representado pela casca, dura e quebradiça, tendo uma película interna, fina, que envolve o albúmen, que é branco, compacto e rico em óleo.

2.1.3. Aplicações industriais

A composição química da semente de mamona varia de acordo com a cultivar e região de cultivo, com teor de óleo atingindo valores de 35% a 55% (COSTA *et al.*, 2004) desta composição. Em variedades comerciais, o conteúdo do óleo se situa, em geral, entre 40% e 60% (FREIRE, 2001). O óleo de mamona possui, caracteristicamente, uma estrutura química peculiar com altos níveis de ácido ricinoléico (aproximadamente 900 g kg^{-1}) e baixos níveis de outros ácidos graxos (ROJAS-BARROS *et al.*, 2004). Não obstante, o ácido ricinoléico apresenta três grupos funcionais altamente reativos (Figura 2) que permitem a síntese de um grande número de derivados, ampliando ainda mais o potencial industrial do óleo.

Outra importante característica do óleo de mamona é a sua solubilidade em solventes como etanol, metanol, éter, clorofórmio e no ácido acético glacial (FREIRE, 2001). A presença do grupo hidroxila na ricinoleína confere ao óleo a propriedade exclusiva de solubilidade em álcool (MAZZANI, 1983; WEISS, 1983). As características singulares de alta estabilidade e viscosidade, mesmo quando exposto a altas

temperaturas, devem-se também à presença do grupo hidroxila no carbono 12 que torna o composto do óleo de mamona, um excelente lubrificante, largamente empregado em motores de alta rotação.

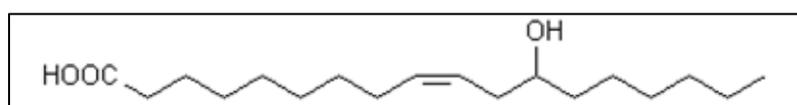


Figura 2. Estrutura molecular do ácido ricinoléico.

Em termos quantitativos, este óleo é mais usado na fabricação de tintas, vernizes, cosméticos e sabões, sendo também importante na síntese de plásticos e de fibras sintéticas (SANTOS *et al.*, 2001). Derivados do óleo são também indispensáveis na manufatura de

ceras, conservantes de frutas (ANJANI *et al.*, 1999), desinfetantes, germicidas, papéis, corantes, colas, aderentes, velas etc.

Outro emprego do óleo de mamona a ser considerado é na biomedicina, como substituto do silicone, na elaboração de próteses e implantes. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de avaliar a ação de polímeros de mamona na neoformação óssea (LEONEL *et al.*, 2004), obtendo-se resultados promissores no processo de cicatrização de tecidos ósseos.

2.1.4. Biodiesel e agronegócio

A análise das séries históricas do petróleo no século XX revela um crescimento contínuo no seu consumo, implicando na grande demanda por fontes alternativas de energia, segundo Rathmann *et al.* (2006), capazes de manter o modo de produção em condições que permitam a reprodução do capital, uma vez que se prevê o esgotamento das reservas petrolíferas.

O que tem sido denominado de biodiesel é um combustível renovável, biodegradável e ambientalmente correto, sucedâneo ao óleo diesel mineral, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (PARENTE, 2005).

A demanda mundial por combustível de origem renovável é inquestionável, incentivando a introdução de oleaginosas na matriz energética global, de forma a dar suporte a projetos de mecanismos de desenvolvimento limpo, reduzindo a emissão de carbono e retirando gases poluentes do ambiente. Segundo Beltrão (2003b), com somente 5% de biodiesel misturado ao diesel mineral, este combustível denominado B-5, acarretaria uma redução de mais de 13% na poluição da atmosfera. Dados estatísticos revelam o crescente consumo mundial de biodiesel nas últimas décadas (Figura 3), sendo a produção mundial liderada pela Europa, destacando-se os países da Alemanha, França e Itália (FERTILIZER SOCIETY OF SOUTH AFRICA, 2006).

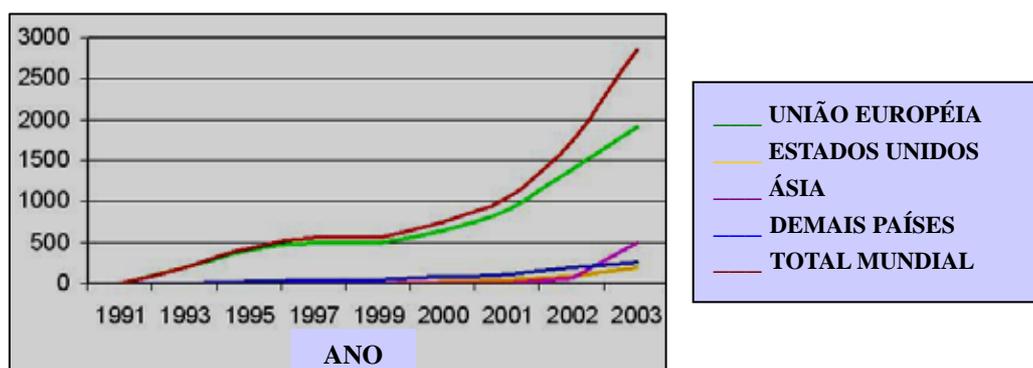


Figura 3. Produção mundial de biodiesel em mil toneladas. Fonte: Fertilizer Society of South Africa; Disponível em: www.fssa.org.za/pebble.asp?relid=317

O emprego da mamona como matéria-prima na síntese de biodiesel, em larga escala e em âmbito nacional, constitui objeto de debate, uma vez que, conforme ressaltado por Lopes *et al.* (2005) e Parente (2005), as diversidades sociais, econômicas e ambientais geram distintas motivações regionais para sua produção e consumo. Em adição, várias são as possibilidades de se produzir um combustível capaz de movimentar um motor diesel (PARENTE, 2005), ampliando ainda mais as controvérsias existentes nesta discussão. No entanto, vale ressaltar que o rendimento do biodiesel com o óleo de mamona é muito elevado, visto que um litro de óleo fornece um litro de biodiesel, e o álcool é, em parte, recuperado, produzindo a glicerina, como subproduto (BELTRÃO, 2003b).

A produção mundial de mamona no período de 2000 a 2004 esteve em torno de um milhão de toneladas em grão e cerca de 400 mil toneladas de óleo de mamona (SAVY FILHO, 2005). Potencialmente a mamona tem capacidade de produzir mais de 9.000 Kg de baga por hectare, no entanto a média mundial é baixa, devido à baixa produtividade da Índia e da China, principais produtores (BELTRÃO, 2003b). Em regime de sequeiro no semi-árido nordestino, a mamona tem produtividade média de 1.000 Kg/ha/ano podendo superar a marca dos 2.000 Kg/ha/ano, desde que as melhores condições e recomendações sejam seguidas, segundo dados de Parente (2003).

No âmbito nacional, o Estado da Bahia é o maior produtor tanto em área quanto em produção com participação em 90,81% da área colhida e em 87,22% de mamona em grão, segundo levantamento de previsão de safra da CONAB (SAVY FILHO, 2005). Seguido, destacam-se os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Ceará (FREIRE *et al.*, 2001).

A produção de biodiesel, tanto para consumo interno quanto para exportação, corresponde a uma real possibilidade de independência energética e economia de divisas com a redução das importações de diesel mineral, propiciando ainda emprego e renda nas regiões mais carentes do país. No entanto, segundo Beltrão (2004), alguns problemas e ameaças devem ser considerados na cadeia produtiva de mamona, tais como uso de sementes não-certificadas ou fiscalizadas e com baixa capacidade de germinação, vigor, pureza das cultivares recomendadas; falha na difusão das técnicas de produção; ausência de associações ou cooperativas de produtores; comercialização com vários níveis de intermediários etc.

Portanto, o sucesso da produção de mamona no Brasil, com vistas à exportação e síntese de derivados, depende de diversos fatores, os quais devem assegurar a integração de toda a cadeia produtiva, promover o desenvolvimento e a transferência de tecnologias de

produção, disponibilizar o melhor nível tecnológico aos agricultores e incentivos fiscais à indústria processadora do óleo, garantindo, dessa forma, maior competitividade no mercado.

2.1.5. Melhoramento genético

No Brasil, o primeiro programa de melhoramento genético da mamoneira foi iniciado em São Paulo, pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, em 1936 (KRUG *et al.*, 1943 *apud* Freire *et al.*, 2001; SAVY FILHO, 2005). Naquele ano, a secção de genética do Instituto lançou as bases de um plano de melhoramento, com o objetivo de desenvolver cultivares de mamoneira mais produtivas, com maiores níveis de resistência às doenças e pragas e com outras características agronômicas desejáveis (VIEIRA & LIMA, 2006; FREIRE *et al.*, 2001).

O programa do IAC possui em coleção, germoplasmas introduzidos de diversos estados e países, além de cerca de 500 linhagens e progênies obtidas através de hibridação artificial e seleção de plantas (SAVY FILHO, 2005).

Diversas cultivares foram desenvolvidas pelo IAC, distintas pela sua performance agronômica, podendo-se destacar: IAC 38, Campinas, Guarani, IAC 80 e IAC 226.

Na Bahia, principal produtor nacional, o programa de melhoramento de mamona iniciou-se na década de 60 pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária do Leste – Ipeal (VIEIRA & LIMA, 2006; FREIRE *et al.*, 2001) e, a partir de 1974, passou a ser conduzido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia – Epaba, através da qual foram lançadas diversas cultivares com a sigla SIPEAL, como a SIPEAL 28.

Mais recentemente, há cerca de quinze anos, a Embrapa / CNPA – Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, Campina Grande – PB, vem desenvolvendo tecnologia de produção com foco principal nas características ecológicas do semi-árido nordestino. Há duas cultivares comerciais disponíveis, a BRS 149 (Nordestina) e BRS 188 (Paraguaçu) (SAVY FILHO, 2005).

Outras Instituições de Pesquisa, bem como algumas empresas de processamento de óleo e derivados, também se encontram envolvidas no aperfeiçoamento de tecnologias de produção de mamona.

Vários problemas inerentes à cultura da mamona já foram solucionados pelo melhoramento genético, tais como aumento da produtividade e teor de óleo na semente; diminuição do porte da planta e do grau de deiscência do fruto; aumento do nível de resistência a algumas das principais doenças que ocorrem no país (VIEIRA & LIMA, 2006; FREIRE *et al.*, 2001). No entanto, o emprego de sementes produzidas ou coletadas pelos

próprios agricultores predomina em grande parte da área sob cultivo no País, ocasionando variedades locais com características agronômicas indesejáveis.

Com vistas a solucionar os problemas existentes, as pesquisas com enfoque no melhoramento da cultura da mamona devem atender aos seguintes objetivos: aumento da produtividade; precocidade; porte da planta; grau de deiscência do fruto; teor de óleo na semente; resistência às principais pragas e doenças. Segundo Laureti & Brigham (1987) *apud* Savy Filho (1999), alguns caracteres devem ser considerados no melhoramento para compor os atributos de cultivares e híbridos, tais como: coloração da haste, tolerância à seca, espinhos, racemo etc.

2.2. Variabilidade genética através de polimorfismos de DNA

Os programas de melhoramento de plantas têm papel fundamental no desenvolvimento de novas variedades com desempenho agronômico superior. A seleção de genitores utilizados no melhoramento ocorre com base na variabilidade genética da espécie, sendo esta, segundo Bered *et al.* (2000), determinada pelos efeitos genéticos e ambientais. O cruzamento de materiais progenitores superiores objetiva, freqüentemente, a maximização da distância genética com a finalidade de recombinar genes ou complexos gênicos em novas combinações gênicas favoráveis (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores de DNA ou moleculares representam uma alternativa ao acesso da variabilidade genética existente em populações, possibilitando, ainda, um aumento na eficiência de seleção, melhor conhecimento e caracterização do germoplasma e maximização de ganhos genéticos, objetivos constantemente perseguidos pelo melhoramento de plantas (MILACH, 1998).

A utilização de marcadores moleculares no melhoramento de plantas possibilita o acesso direto ao genótipo, permitindo a seleção de indivíduos superiores, portanto, sem sofrer os efeitos da interação genótipo-ambiente. Nesse contexto, diversos métodos têm sido empregados na caracterização molecular da diversidade genética existente em germoplasmas de espécies de interesse agronômico. Segundo Milach (1998), os distintos tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar variabilidade em nível de DNA e, assim, variam quanto à habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade. Um número teoricamente ilimitado de marcadores moleculares altamente polimórficos pode ser obtido em qualquer organismo vivo, através de diversas técnicas, tais quais: isoenzimas, RFLP, RAPD, microssatélites e AFLP.

Todavia, independentemente do método e da espécie a serem utilizados nas análises moleculares, é imprescindível a obtenção de DNA de alto peso molecular nas etapas preliminares do estudo. O grande número de indivíduos geralmente envolvidos nesses trabalhos impõe a necessidade de extrair DNA de forma rápida e eficiente. Diversos protocolos para o isolamento de DNA encontram-se descritos na literatura, refletindo a variabilidade bioquímica que pode ser encontrada em diferentes plantas e tecidos. Tais diferenças de composição impossibilitam o desenvolvimento de um protocolo único ideal para diferentes espécies vegetais (ROMANO, 1998).

2.2.1. Extração de DNA

A obtenção de DNA permite análises de organismos asselejados e transgênicos, estudos de integração de genes transformantes, isolamento de genes homólogos e heterólogos, estudos de variabilidade genética de populações, bem como taxonomia de organismos (VALADARES-INGLES & MELO, 1998). DNA genômico pode ser obtido em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, constituindo indiretamente umas das vantagens apresentadas nas análises de polimorfismo através de marcadores moleculares.

Fatores como quantidade e pureza são extremamente relevantes na escolha de um protocolo para isolamento de DNA, no intuito de fornecer material intacto, livre de substâncias que podem inibir reações enzimáticas e livre de contaminação por DNA não-nuclear (por exemplo, de cloroplasto e mitocôndria).

Uma das considerações mais importantes em qualquer procedimento de extração de DNA de plantas é a maneira utilizada para coletar e preservar o tecido vegetal, a qual irá afetar significativamente o processo, a depender da condição do tecido antes da extração. DNA de plantas oferece maiores dificuldades de obtenção quando comparado a DNA de origem animal, devido à presença de metabólitos secundários e polissacarídeos que interferem com o procedimento de extração e co-purificam com o DNA (TOWNER, 1991). Alguns desses problemas podem ser superados quando utilizado material vegetal jovem. De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), tecido novo colhido na fase ativa de crescimento das plantas freqüentemente fornece os melhores resultados.

De modo geral, todos os procedimentos para extração de DNA envolvem a quebra ou digestão de paredes e membranas para liberação dos constituintes celulares. Essa etapa, geralmente, é realizada em presença de gelo seco ou nitrogênio líquido e posterior quebra mecânica. Para extrações em pequena escala, freqüentemente destinadas a reações de PCR,

as preparações podem ser realizadas somente na presença de tampão de extração (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

Após a etapa inicial de quebra, o DNA é liberado em tampão de extração que normalmente contém detergentes, sendo o CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*), segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), amplamente utilizado em espécies vegetais. O pH do tampão de extração, em torno de 8,0, juntamente com o detergente EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), comumente adicionado ao tampão, fornecem proteção contra nucleases endógenas. O EDTA é um agente quelante de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Ca^{+2} e, portanto, inibe a ação de DNAses que usam metais como co-fatores (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Para evitar os efeitos indesejáveis da oxidação, diferentes produtos podem ser incluídos nos tampões de extração, como PVP (*polyvinylpyrrolidone*) e/ou BSA (*bovine serine albumine*). O PVP é um antioxidante que inibe a ação de compostos fenólicos, enquanto que o BSA atua absorvendo os polifenóis, evitando, portanto, a ação dessas substâncias que tornam o DNA oxidado e inacessível às enzimas de restrição. O agente redutor 2-mercaptoetanol protege o DNA contra as atividades de enzimas tais como peroxidases e polifenoloxidasas, desnaturando-as (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Na próxima etapa, é realizada uma extração com solventes orgânicos, como fenol e/ou clorofórmio:álcool isoamílico para desnaturação das proteínas, as quais ficam retidas na interface, enquanto que o DNA e outros contaminantes mantêm-se na fase aquosa.

Após a etapa de desproteínização, o DNA pode ser precipitado ou sofrer diferentes tratamentos que o separam dos outros componentes (ROMANO, 1998). A adição de álcool (isopropanol ou etanol) à fase aquosa promove a precipitação do DNA na presença de sal, que pode ser sedimentado por centrifugação.

Ao término do isolamento, o DNA é lavado e suspenso em água ou tampões que permitam seu armazenamento. Purificações por centrifugação em gradientes de densidade de CsCl, apesar de laboriosas, são eficientes na remoção de RNA, polissacarídeos, proteínas e outros contaminantes da amostra de DNA (ROMANO & BRASILEIRO, 1999).

2.2.2. Marcadores moleculares RAPD

A utilidade dos marcadores moleculares é geralmente determinada pela tecnologia utilizada para revelar polimorfismos baseados em DNA (BARDAKCI, 2001). Marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*; WILLIAMS *et al.*, 1990) são largamente empregados na análise da variabilidade genética de espécies cultivadas e

indivíduos geneticamente relacionados, dentre outros propósitos. Esta técnica baseia-se na detecção de polimorfismos de DNA através da amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*; MULLIS & FALOONA, 1987), revelando diversos *loci* dispersos pelo genoma.

O sucesso da análise por meio de RAPD deve-se especialmente ao fato de que a técnica proporciona um grande número de marcadores genéticos que requerem quantidades reduzidas de DNA sem a necessidade de clonagem, seqüenciamento ou qualquer outra caracterização molecular do genoma da espécie em questão (BARDAKCI, 2001).

A base genética dos marcadores RAPD define-se no emprego de oligonucleotídeos curtos (geralmente decâmeros) de seqüência arbitrária que hibridizam com seqüências genômicas complementares, quando submetidos a condições apropriadas de temperatura na reação de amplificação. Para que ocorra amplificação, há necessidade de que os sítios complementares ao oligonucleotídeo iniciador estejam localizados a uma distância de até 4000 pares de bases e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Os produtos resultantes da amplificação por RAPD podem ser resolvidos em géis de agarose ou poliacrilamida, visualizados após coloração com nitrato de prata ou brometo de etídeo (EtBr) sob luz UV, sendo os polimorfismos inferidos pela presença ou ausência de fragmentos de DNA amplificados (bandas) no gel.

O polimorfismo detectado por marcadores RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios ou no próprio sítio de hibridização do iniciador. Diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação (LOPES *et al.*, 2002). Em geral, cada iniciador dirige a amplificação de diversos discretos locos no genoma, de forma que o alelismo não é distinguível nos padrões RAPD, sendo, portanto, classificado como um marcador dominante.

Embora um grande número de pesquisadores tenha utilizado os marcadores RAPD como método de investigação de diversidade genética, a baixa reprodutibilidade da técnica deve ser considerada, devido a sua extrema sensibilidade às condições da reação. Segundo Lopes *et al.* (2002), a quantidade e a qualidade do DNA, a concentração de íons magnésio e da enzima *Taq polimerase* são alguns dos aspectos que devem ser considerados nos ensaios de RAPD, necessitando, sobretudo, de rigor na leitura e análise dos fragmentos visualizados no gel. Dessa forma, alguns cuidados devem ser tomados na padronização da técnica em laboratório, para a caracterização de cultivares (MILLACH, 1999).

A caracterização molecular em associação com a avaliação da divergência genética de mamona têm sido pobremente investigadas. Todavia, inúmeras pesquisas foram conduzidas

com sucesso na caracterização genética de espécies pertencentes à família Euphorbiaceae, com especial destaque para a mandioca (*Manihot esculenta*) e a seringueira (*Hevea brasiliensis*), parentes mais próximos da mamona (WEISS, 1983). Diversas dessas análises foram conduzidas através da técnica de RAPD, devido às suas reconhecidas vantagens frente aos demais marcadores moleculares utilizados.

Carvalho & Schaal (2001) utilizaram marcadores baseados em PCR, na tentativa de analisar diversos temas relacionados à coleção de germoplasma brasileiro de mandioca. Os objetivos desse trabalho incluíram a resolução de questões específicas, como: a) Qual a relação entre espécies de mandiocas cultivadas proximamente agrupadas com base na morfologia? b) Marcadores moleculares e caracteres agronômicos revelam o mesmo padrão de relação entre acessos de mandioca? c) Qual a diversidade genética de cultivares num mesmo habitat e entre diferentes habitats no Brasil? Os estudos interespecíficos permitiram a confirmação da relação de similaridade entre a mandioca e seus relativos silvestres, *Manihot esculenta* ssp. *esculenta* com *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia*, bem como identificaram diversas outras espécies selvagens intimamente relacionadas. Os marcadores moleculares permitiram, ainda, o agrupamento das variedades, de acordo com a sua região de cultivo no Brasil. No entanto, o agrupamento de acessos baseados em caracteres agronômicos não foi completamente congruente com o padrão de similaridade revelado pelos marcadores RAPD.

Mühlen *et al.* (2000), por meio do polimorfismo gerado por RAPD, quantificaram a variabilidade genética de etnovarietades de mandioca e examinaram a distribuição entre grupos de etnovarietades de diferentes locais de origem e tipos, o que permitiu a separação de variedades de mandioca de mesa das bravas. Costa *et al.* (2003), também analisaram a diversidade genética, através de RAPD, entre acessos de mandioca de diferentes procedências, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental, observando variabilidade potencial para o programa de melhoramento genético e informações úteis para o direcionamento de coleta de germoplasma para enriquecimento do BAG. Colombo *et al.* (2000) encontraram reduzida estrutura genética revelada por 88 bandas RAPD polimórficas, num estudo de diversidade genética de germoplasma americano de mandioca, associando os resultados à alta frequência de troca de materiais botânicos entre pequenos produtores, prática bastante comum em materiais de propagação vegetativa.

Em outro estudo com marcadores RAPD, conduzido por Faleiro *et al.* (2005), buscou-se avaliar a similaridade entre acessos, mantidos no banco de germoplasma da Embrapa Cerrados, os quais apresentavam características morfológicas típicas da etnovarietade 'Buriti'. Santos *et al.* (2005) utilizaram marcadores RAPD num estudo de variabilidade

genética entre acessos de mandioca de raízes de coloração amarelo-laranja, presentes no banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. O objetivo deste estudo foi fornecer subsídios aos trabalhos de melhoramento, tornando possível a obtenção de novas variedades de mandioca com elevados teores de β -caroteno, pigmento que, ao ser ingerido, é transformado, no fígado, em vitamina A.

Venkatachalam *et al.* (2004) identificaram um marcador RAPD de 1,4 Kb, específico para nanismo, em clones altamente produtivos de seringueira (*Hevea brasiliensis*), utilizando um total de 115 oligonucleotídeos, dos quais, 19 produziram bandas nítidas. A detecção de marcadores RAPD em progênies de híbridos indica o potencial desta ferramenta na identificação de segmentos do genoma herdados após diferentes métodos de hibridização em espécies arbóreas perenes. Diferente estudo com seringueira foi conduzido por Marques *et al.* (2002), empregando marcadores RAPD para acessar a variabilidade genética de nove clones, onde encontrou uma alta diversidade, capaz de evidenciar uma ampla base genética envolvida no programa de melhoramento conduzido pelo Centro de Pesquisas do Cacau, no Estado da Bahia.

Marcadores RAPD foram também utilizados por Wincler *et al.* (2003) na determinação da diversidade genética de populações de amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla* L.), euforbiácea daninha resistente aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase, revelando variabilidade quanto à resistência ao herbicida entre populações que ocorrem no planalto do Estado do Rio Grande do Sul.

Estudos de diversidade genética foram conduzidos com *Phyllanthus amarus*, importante planta medicinal, com propriedades antivirais, utilizada no tratamento contra infecções por hepatite. O estudo de acessos de *P. amarus*, coletados de diferentes localidades geográficas da Índia, permitiu avaliar a extensão da polinização cruzada e o fluxo gênico através da técnica de RAPD (JAIN *et al.*, 2003).

Duas populações de *Mabea fistulifera*, importante espécie arbórea recomendada em programas de preservação de ambientes degradados, foram investigadas através de suas características genéticas e ecológicas, no intuito de fornecer informações sobre a ecologia e a evolução da espécie, podendo ser útil em estratégias de conservação e manejo de populações. No trabalho conduzido por Goulart *et al.* (2005), os dados genéticos foram acessados por meio de 43 marcadores RAPD, revelando maior variação genética dentre indivíduos de uma população e cerca de 9% de variação localizada entre as populações.

3. METODOLOGIA

3.1. Material vegetal

O material vegetal utilizado no presente estudo foi cedido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros (Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo), constituindo 10 variedades de mamona (*Ricinus communis* L.), provenientes da Embrapa Algodão (CNPQ) (Tabela 1). Amostras dos genótipos foram obtidas na Estação Experimental de Igaci, localizada no município de Igaci, Estado de Alagoas, em duas coletas realizadas, cada uma, nos meses de agosto e outubro de 2005.

Amostras de folhas frescas foram coletadas do campo e encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica (GEMPRO) pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA / UFAL), localizado no município de Rio Largo, Estado de Alagoas, para fins de extração de DNA genômico e posteriores análises biomoleculares. Cada uma das amostras consistia de folhas coletadas de plantas em estádios intermediários de crescimento. O material vegetal coletado foi envolto em papel toalha e armazenado em sacos plásticos, devidamente identificados e acondicionados em caixas de isopor contendo bolsas de gelo em gel para auxiliar na manutenção da integridade do material durante o seu transporte do município de Igaci ao Laboratório GEMPRO, em Rio Largo, onde foram armazenadas a 4° C até o momento do isolamento de DNA.

Tabela 1. Genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) utilizados no estudo de variabilidade genética por meio de marcadores RAPD.

GENÓTIPO	
1	CNPAM 2002 - 189
2	CSRN 142
3	CNPAM 2002 - 219
4	EPABA OURO
5	CNPAM 2002 - 135
6	CSRD 2
7	CNPAM 2002 - 154
8	CNPAM 2002 - 157
9	BRS 149 - NORDESTINA
10	BRS 188 - PARAGUAÇU

Diante da variabilidade fenotípica dos genótipos, como por exemplo no padrão da cor, forma e tamanho das sementes (Figura 4), procedeu-se uma avaliação qualitativa das plantas, ainda em campo, para detecção do padrão predominante e conseqüente seleção das amostras de trabalho.

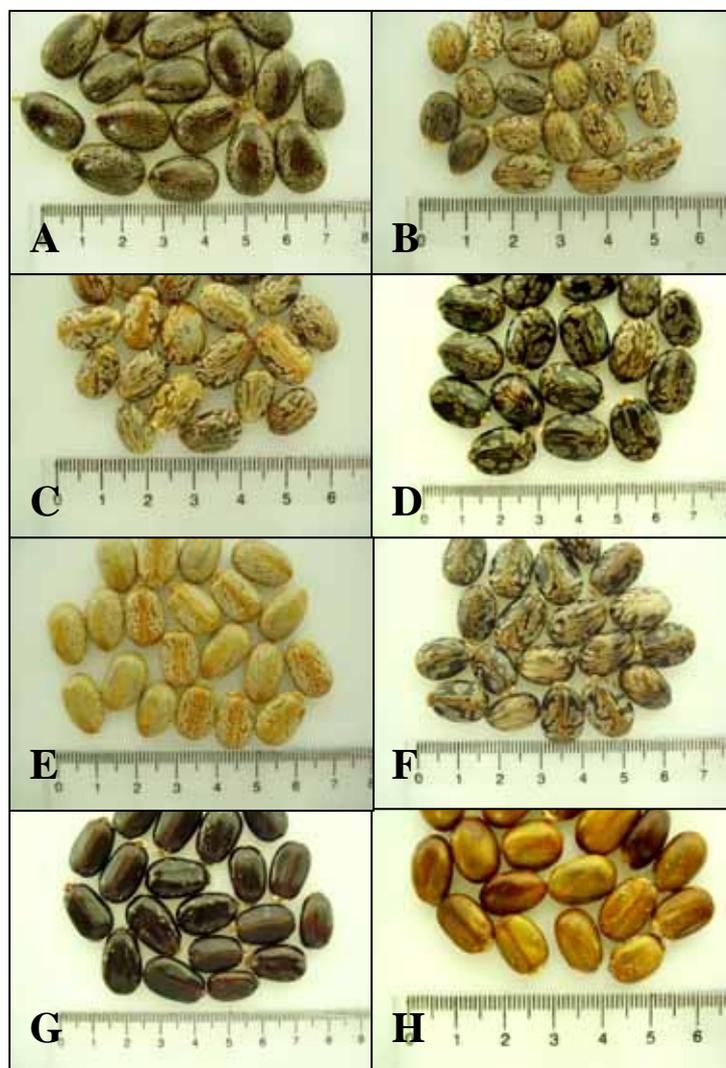


Figura 4. Variabilidade fenotípica observada nas sementes dos genótipos CNPAM 2002 189 (A), CSRN 142 (B), CSDR 2 (C), CNPAM 2002 154 (D), CNPAM 2002 135 (E), CNPAM 2002 157 (F), CNPAM 2002 219 (G), EPABA OURO (G).

3.2. Extração do DNA genômico total

Para o isolamento do DNA genômico total foram testados dois protocolos, ambos utilizando CTAB 2% na composição do tampão de extração. Inicialmente, o isolamento de DNA dos genótipos de mamona foi realizado com base no protocolo descrito por Graham *et al.* (1994) com algumas modificações abaixo descritas. Um protocolo alternativo foi proposto, considerando-se passos descritos em metodologias utilizadas por diferentes autores.

A quantidade de tecido foliar utilizada no isolamento variou de 50 a 150 mg. As paredes e membranas celulares foram rompidas por meio de maceração do tecido vegetal em microtubos, na presença do tampão de extração. O DNA isolado foi acondicionado a -20° C.

3.2.1. Protocolo Graham *et al.* (1994) modificado

Tecido foliar fresco foi macerado dentro de microtubos contendo 500 µL de solução do tampão de extração [2 % (m/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 8,0]. Depois de homogeneizadas, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65° C durante 30 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 11.336g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo microtubo. Adicionou-se o mesmo volume de CIA (24:1) e, em seguida, os tubos foram invertidos 3 vezes durante 2 minutos, para formar uma emulsão homogênea. Após centrifugar a 12.045g por 30 segundos, o sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo microtubo. Adicionou-se 1/10 do volume coletado de acetato de amônio 7,5 M e 2 vezes o volume de etanol absoluto gelado (previamente armazenado a -20° C). Os tubos foram cuidadosamente invertidos para precipitação do DNA e, em seguida, incubados a -20° C por, no mínimo, uma hora. Após centrifugar a 12.045g por 90 segundos, foi descartado o sobrenadante. O precipitado de DNA foi lavado com etanol 70 % e os tubos foram invertidos para secar a temperatura ambiente. O DNA extraído foi dissolvido em 80 µL de TE [Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0] e incubado em banho-maria a 37° C por 30 minutos.

3.2.2. Protocolo alternativo proposto (CUNHA *et al.*, 2006)

À solução do tampão de extração CTAB 2% foi acrescentado PVP (Sigma, PM 360.000) na proporção de 100 mg para 1g de material vegetal, segundo metodologia descrita por Warude *et al.* (2003). A concentração de NaCl no tampão de extração foi elevada para 2M, de acordo com metodologia de Purchooa (2004). Foram estabelecidas as seguintes alterações nas demais etapas do protocolo: (I) adição do tampão de extração (pré-aquecido a 70° C) ao macerado de folhas frescas, numa proporção de 4:1 (tampão: folhas) (v/m); (II) redução do tempo de incubação das amostras para 10 minutos a uma temperatura de 70° C; (III) repetição das etapas de adição de CIA (24:1) e centrifugação a 12.045g por 30 segundos por duas vezes subsequentes; (IV) adição de acetato de amônio 7,5 M, igual volume de isopropanol gelado (previamente armazenado a -20° C) e 250 µL de NaCl 5 M para precipitação do DNA; (V) redução do tempo de incubação a -20° C para 30 minutos, segundo

descrito por Sharma *et al.* (2000); (VI) centrifugação a 3.287g por 5 minutos para sedimentação do DNA.

3.2.3. Qualidade e pureza do DNA

Para determinação da qualidade do DNA, uma alíquota de 5µL de cada amostra foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, previamente corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), submetido a 3,3 V/cm por uma hora. DNA genômico foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotodocumentado por meio do Sistema Digital Kodak Science.

3.3. Amplificação RAPD-PCR

Onze iniciadores decâmeros arbitrários (IDT[®], Integrated DNA Technologies, Inc) foram testados e, destes, sete foram adotados nas reações RAPD por produzirem padrões consistentes e revelarem a presença de DNA polimórfico. Os oligonucleotídeos empregados no estudo encontram-se descritos a seguir com suas respectivas seqüências:

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises RAPD.

<i>PRIMER</i>	SEQUÊNCIA DO INICIADOR (5'→3')	TEOR DE GC (%)
OPA 1	CAG GCC CTT C	70,0
OPA 2	TGC CGA GCT G	70,0
OPA 3	AGT CAG CCA C	60,0
OPA 4	AAT CGG GCT G	60,0
OPA 7	GAA ACG GGT G	60,0
OPA 8	GTG ACG TAG G	60,0
OPA 9	GGG TAA CGC C	70,0
OPA 10	GTG ATC GCA G	60,0
OPA 16	AGC CAG CGAA	60,0
OPA 18	AGG TGA CCG T	60,0
OPA 20	GTT GCG ATC C	60,0

Cada reação de amplificação compreendeu um volume total de 50 µL, consistindo de dNTPs Mix 200µM, Tampão PCR 1 X (Tris-HCl 50mM, KCl 20 mM), MgCl₂ 2mM, 0,5 µM de cada iniciador, 8U de *Taq* DNA polimerase (Biosystems), 20 ng de DNA genômico, água Milli Q estéril. As amplificações foram conduzidas num termociclador PTC-200 Peltier

Thermal Cycler (MJ Research), empregando-se um programa com etapa inicial de pré-desnaturação a 92° C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 45 segundos a 92° C, 1 minuto e 30 segundos a 40° C e 1 minuto e 30 segundos a 72° C. Após, foi realizado um ciclo adicional de extensão final de 5 minutos a 72° C.

Os produtos das reações de amplificação foram resolvidos em gel de agarose 2% (p/v), submerso em tampão TBE (Tris-borato 89mM, EDTA 2mM), aplicando-se 3 V/cm durante 5 horas. Foi utilizado o marcador de 1Kb (Promega) como padrão para estimativa do peso molecular dos fragmentos amplificados. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizado sob luz UV e fotodocumentado através do Sistema Digital Kodak Science.

3.3.1. Análise fenética

Os fragmentos gerados pelas amplificações RAPD foram analisados e codificados quanto à presença (1) ou ausência de bandas (0) de DNA homólogas dentre as variedades, o que permitiu a construção de uma matriz de dados binária. A partir dos dados obtidos, a similaridade genética dos genótipos foi estimada utilizando os coeficientes de Jaccard e Sorensen-Dice do programa NTSYS-pc [*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*; versão 2.1; Rohlf (2000)]. A análise de agrupamento dos materiais foi efetuada através do método UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averages*), onde a média da similaridade entre os indivíduos é baseada no número total dos indivíduos dos grupos formados. Os resultados gerados pela análise do agrupamento foram plotados em um fenograma para demonstrar a distância genética entre os genótipos. Matrizes de similaridade geradas por ambos os coeficientes foram ainda utilizadas para cálculo do coeficiente de correlação, objetivando verificar o grau de relacionamento entre os coeficientes de similaridade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise da extração de DNA genômico

DNA genômico isolado de tecido foliar de dez genótipos de *Ricinus communis* L. foi submetido à análise através de eletroforese em gel de agarose. Com base nos protocolos testados nesse estudo, foram avaliados, principalmente, parâmetros como qualidade do DNA, tempo de execução dispensado no processo de isolamento e eficiência no isolamento de DNA de todos os genótipos.

Quando empregado o protocolo para extração de DNA genômico de Graham *et al.* (1994) modificado, foi possível a obtenção de DNA de boa quantidade e qualidade dos genótipos analisados, como observado na Figura 5.

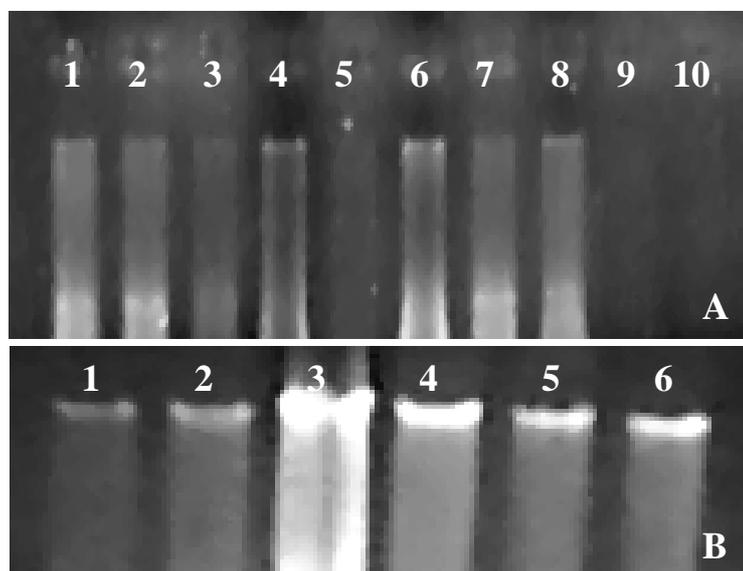


Figura 5. Perfil eletroforético de DNA total extraído de folhas de *R. communis* L., através do protocolo de Graham *et al.* (1994) modificado. (A) Colunas de 1 a 10 correspondem aos genótipos descritos na Tabela 1. (B) Cultivar BRS 149 (colunas 1, 2 e 3) e Cultivar BRS 188 (colunas 4, 5 e 6).

Essa metodologia de extração de DNA caracterizou-se pela utilização de reduzida quantidade de tecido foliar; pelo baixo custo do processo, onde volumes reduzidos de soluções químicas são utilizadas; e finalmente por não apresentar compostos voláteis e tóxicos em sua composição, como por exemplo, o 2- β -mercaptoetanol, antioxidante largamente empregado no isolamento de DNA de plantas com altos níveis de compostos fenólicos.

A maioria dos protocolos utilizados no isolamento de DNA de espécies de plantas com altos níveis de compostos secundários constitui versões modificadas de protocolos padrões,

incluindo comumente mudanças na composição do tampão de extração. No entanto, este procedimento frequentemente acaba por fornecer DNA em baixa quantidade. Baseando-se no protocolo alternativo (Cunha *et al.*, 2006) proposto neste estudo, foi possível isolar DNA de alto peso molecular, com reduzido dispêndio de tempo sem, contudo, comprometer a sua reprodutibilidade. Bandas de DNA de alto peso molecular podem ser observadas através da Figura 6.

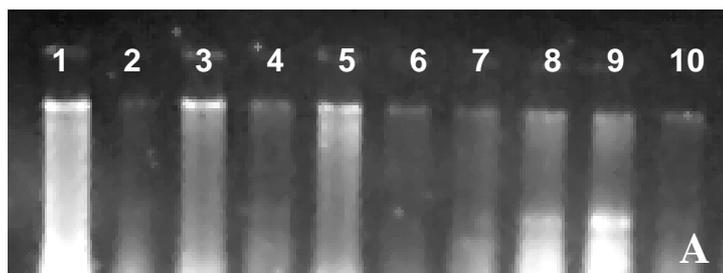


Figura 6. Análise eletroforética de DNA total proveniente de duas extrações de DNA (A e B) de tecido foliar de *R. communis* L., através do protocolo alternativo proposto. Colunas de 1 a 10 correspondem aos genótipos descritos na Tabela 1.

As classes de substâncias como alcalóides, esteróides, flavonóides, saponinas, taninos, compostos fenólicos (FONSECA, 2001), glicósidos e triterpenos (HILAL *et al.*, 1979 *apud* RODRIGUES *et al.*, 2002) presentes nas folhas de mamona podem interferir no processo de isolamento e, conseqüentemente, em digestões de DNA e PCRs, por formar caracteristicamente uma matriz espessa, marrom e gelatinosa (Figura 7). A redução do tempo de incubação das amostras para 10 minutos, a adição de PVP (PM 360.000) ao tampão de extração CTAB 2% e, ainda, o emprego de NaCl em alta concentração (5M) auxiliou na redução dos teores de polissacarídeos, polifenóis e compostos secundários, bem como resultou numa desaceleração do processo oxidativo, bastante comum durante as etapas iniciais do isolamento de DNA desta espécie, otimizando a cor da solução do ácido nucléico obtido.

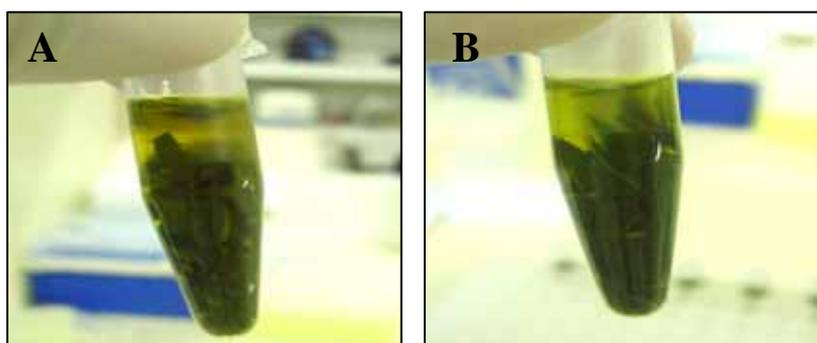


Figura 7. Amostras após etapa de incubação à 70°. **A)** Matriz viscosa e marrom caracteristicamente formada após exposição prolongada em banho-maria. **B)** Otimização do aspecto da amostra após redução no tempo de incubação, adição de PVP e NaCl 2M ao tampão CTAB.

Não foram verificadas diferenças significativas acerca da repetição da adição de CIA (24:1) em relação ao protocolo de Graham *et al.* (1994). No entanto, alguns genótipos, especialmente CNPAM 2002-219, BRS-149 Nordestina e BRS-188 Paraguaçu apresentaram um acúmulo de substâncias gelatinosas, em diversos graus de concentração, após a desproteinização, presentes na fase superior do tubo (Figura 8). Nesses casos, tais substâncias acabavam por influenciar o aspecto final do DNA e, ainda, intervinham na sua solubilização em TE ao final do processo.

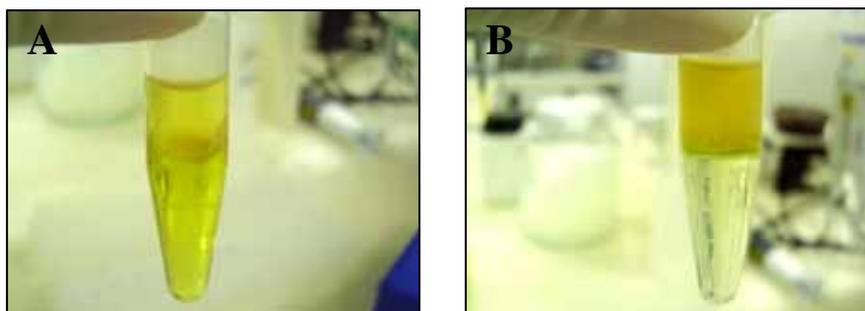


Figura 8. Aspecto gelatinoso na parte superior do tubo, evidenciado após desproteinização; variedades CNPAM 2002-219 (A) e BRS 149 (B).

Não obstante, nas análises dos métodos utilizados, a qualidade do DNA isolado não foi completamente satisfatória, devido ao co-isolamento de compostos indesejáveis. Permingeat *et al.* (1998) propôs o emprego de glicose 0,5M como constituinte do tampão de extração CTAB para o isolamento de DNA de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Foi constatado que a adição de glicose naquela concentração funcionou como agente redutor, elevando drasticamente a qualidade do DNA e inibindo a contaminação e o escurecimento causado pelos polifenóis.

Purchooa (2004), conduzindo experimentos com lichia (*Litchi chinensis* Sonn.), testou diferentes quantidades de materiais, constatando que a relação 4:1 (v/m) (tampão/material vegetal) constitui a mínima necessária para obtenção de DNA puro.

Das diferentes etapas e modificações seguidas em ambos os protocolos, verificou-se que a utilização de folhas bastante jovens implicava numa maior oxidação do material durante a etapa inicial de extração na presença do tampão, tendo sido preferido o emprego de folhas em estágio intermediário de crescimento, uma vez que folhas maduras contêm altos níveis de compostos secundários e apresentam-se menos tenras, dificultando inclusive a maceração. Foi ainda constatado relativo dispêndio de tempo na preparação de um grande número de amostras destinadas à maceração, devido a sua realização em microtubos, o que acabou retardando o processo em geral, sugerindo a substituição dos microtubos por outros materiais, caso se julgue necessária uma redução no tempo de execução da extração.

É oportuno ainda destacar que a maior parte das extrações foi realizada partindo-se de amostras armazenadas a 4° C por períodos de tempo maiores até do que 24 horas, deixando, portanto, de constituir material completamente fresco, como recomenda a literatura para as demais espécies vegetais (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Uma vez que, os genótipos a serem analisados, com vistas à detecção de variabilidade genética, eram provenientes de experimento instalado em um município geograficamente distante do laboratório onde seriam processados, era inevitável o armazenamento em geladeira até o momento do isolamento de DNA.

Os padrões de ampliações por PCR apresentados adiante nesta discussão evidenciam a eficiência de ambos os protocolos no isolamento de DNA, prestando-se para aplicações analíticas, tais como RAPD. É importante salientar que os dados aqui apresentados, embora bastante satisfatórios, constituem resultados preliminares, sugerindo a otimização dos protocolos utilizados, a fim de apresentarem boa reprodutibilidade em diversas preparações, especialmente quando se destinarem às demais tecnologias moleculares, nas quais é essencial o emprego de DNA íntegro.

4.2. Análise da amplificação RAPD-PCR

A técnica de RAPD foi utilizada para a detecção de polimorfismo entre dez genótipos de *R. communis*. Os sete oligonucleotídeos iniciadores selecionados geraram 57 bandas polimórficas (Tabela 3). O número de marcadores polimórficos amplificados variou entre 5 e 10, com média de 7,5 bandas por iniciador.

Tabela 3. Bandas monomórficas e polimórficas dos genótipos de mamona, geradas pelas ampliações RAPD-PCR com os iniciadores selecionados para análise.

Primer	Seqüência (5'→3')	Bandas Polimórficas	Total
OPA 1	CAG GCC CTT C	7	7
OPA 2	TGC CGA GCT G	9	9
OPA 4	AAT CGG GCT G	10	10
OPA 9	GGG TAA CGC C	10	10
OPA 10	GTG ATC GCA G	6	7
OPA 16	AGC CAG CGA A	10	10
OPA 20	GTT GCG ATC C	5	7

Dentre os fragmentos amplificados, revelou-se a ocorrência de padrões de bandas específicos para o genótipo CNPAM 2002-189, evidenciados nas reações com os iniciadores OPA 9 e OPA 20, onde podem ser respectivamente observados a presença de uma banda de

aproximadamente 2350 pb e a ausência de um fragmento de 1500 pb comum aos demais genótipos (Figura 9).

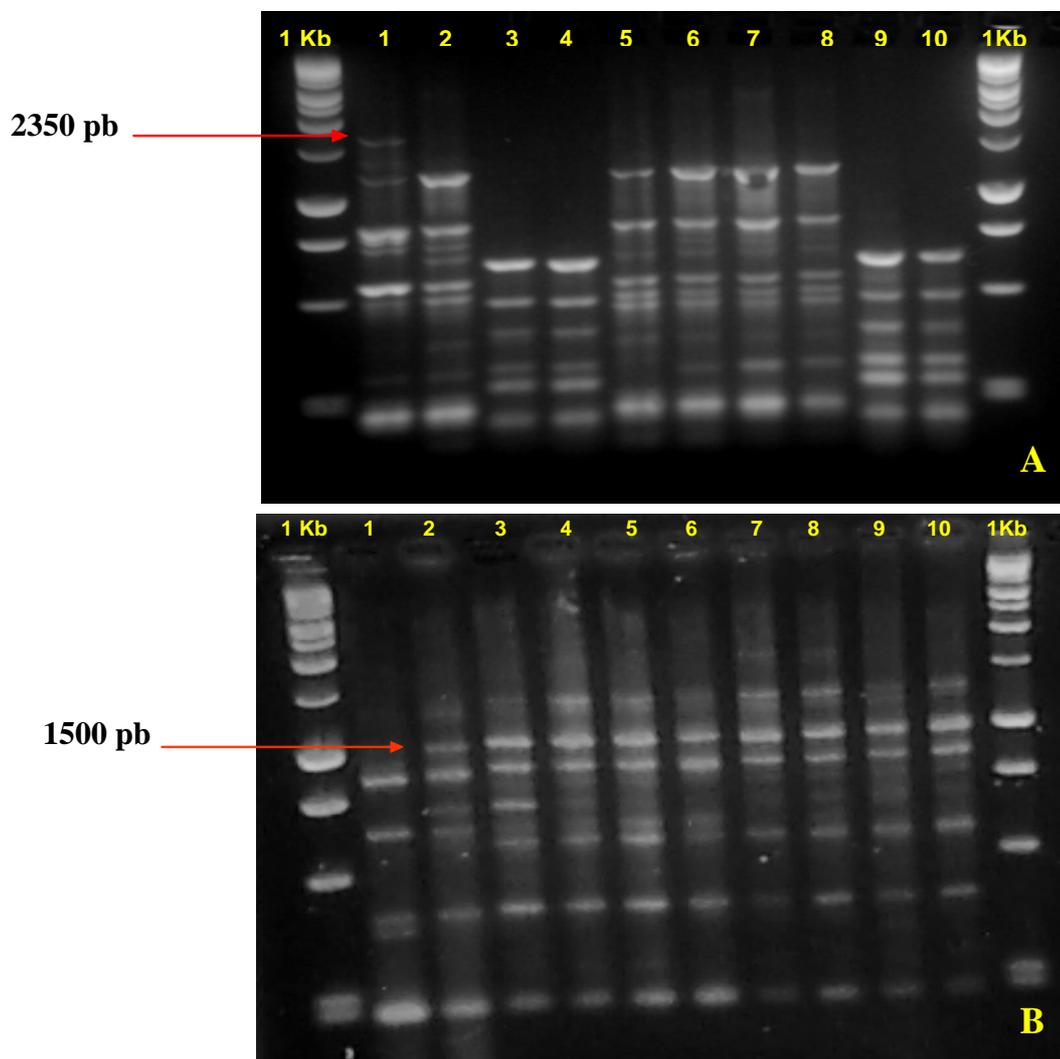


Figura 9. Produtos da amplificação RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerados pelos iniciadores OPA 9 (A) e OPA 20 (B).

A análise das amplificações permitiu a construção de matrizes com dados de valores de similaridades genéticas entre os genótipos, gerados pelos coeficientes de Jaccard e Dice (Tabelas 4 e 5, respectivamente) e posterior elaboração do fenograma resultante.

Foi encontrada uma correlação cofenética de 0.73 entre a matriz de similaridade e o dendrograma gerado pelo coeficiente de Jaccard, enquanto que para o coeficiente de Dice o valor encontrado foi de 0.69, indicando a acuracidade na representação da estimativa da similaridade genética entre os genótipos sob forma de dendrograma.

Tabela 4. Matriz de similaridade genética entre dez genótipos de *R. communis* estimada pelo coeficiente de Jaccard.

GENÓTIPOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. CNPAM189	1.0000									
2. CSRN142	0.5862	1.0000								
3. CNPAM219	0.3421	0.4722	1.0000							
4. EPABAOURO	0.2000	0.2941	0.5313	1.0000						
5. CNPAM135	0.1220	0.2308	0.2326	0.2222	1.0000					
6. CSRD2	0.3714	0.6129	0.3095	0.1795	0.4706	1.0000				
7. CNPAM154	0.3611	0.5455	0.4359	0.2703	0.4571	0.5588	1.0000			
8. CNPAM157	0.1500	0.3333	0.3250	0.2941	0.6552	0.3889	0.5938	1.0000		
9. BRS149	0.1944	0.2857	0.3250	0.4138	0.3636	0.3056	0.4118	0.4516	1.0000	
10. BRS188	0.1795	0.2632	0.4324	0.5172	0.2000	0.1905	0.2750	0.4516	0.4063	1.0000

Tabela 5. Matriz de similaridade genética entre dez genótipos de *R. communis* estimada pelo coeficiente de Dice.

GENÓTIPOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. CNPAM189	1.0000									
2. CSRN142	0.7391	1.0000								
3. CNPAM219	0.5098	0.6415	1.0000							
4. EPABAOURO	0.3333	0.4545	0.6939	1.0000						
5. CNPAM135	0.2174	0.3750	0.3774	0.3636	1.0000					
6. CSRD2	0.5417	0.7600	0.4727	0.3043	0.6400	1.0000				
7. CNPAM154	0.5306	0.7059	0.6071	0.4255	0.6275	0.7170	1.0000			
8. CNPAM157	0.2609	0.5000	0.4906	0.4545	0.7917	0.5600	0.7451	1.0000		
9. BRS149	0.3256	0.4444	0.7200	0.5854	0.5333	0.4681	0.5833	0.6222	1.0000	
10. BRS188	0.3043	0.4167	0.6038	0.6818	0.3333	0.3200	0.4314	0.3750	0.5778	1.0000

Os coeficientes de Jaccard e Dice foram escolhidos para as análises por se tratarem dos mais utilizados, na prática, em estudos de variabilidade genética por meio de marcadores moleculares. O coeficiente de correlação avalia a possibilidade de alterações na classificação dos genótipos com base nas distâncias genéticas, isto é, verificando se os diferentes coeficientes classificam diferentemente os genótipos quanto à divergência. A informação sobre quais linhagens são mais divergentes é importante para os programas de melhoramento, especificamente no planejamento de cruzamentos pelos geneticistas. Diferenças nos postos, estabelecidas pelos diferentes coeficientes, implicam em linhagens classificadas como mais divergentes, o que não se repete para todos os coeficientes, gerando dúvidas quanto à escolha

correta (MEYER, 2002). Nesse contexto, a correlação de 0,99 verificada no presente estudo, permite afirmar que ambos os coeficientes utilizados na análise dos RAPD, geraram padrões de classificação semelhantes, evidenciada ainda pela similaridade entre os dendrogramas gerados.

4.2.1. Variabilidade genética

Foram estimados, a partir dos marcadores RAPD, índices de similaridade para todos os indivíduos analisados. A análise de similaridade revelou que a distância genética entre os dez genótipos variou de 0,88 a 0,35 e 0,78 a 0,21, com base nos coeficientes de Jaccard e Dice, respectivamente, evidenciando grande variabilidade entre os indivíduos. As maiores distâncias genéticas foram observadas entre as linhagens CNPAM 2002-189 e CNPAM 2002-135, com 12% e 22% de similaridade na análise com os coeficientes de Jaccard e Dice, respectivamente. Isto indica que estes genótipos constituem candidatos potenciais como fonte de variabilidade em programas de hibridização da espécie, visando o melhoramento genético.

Nas Figuras 10 e 11, encontram-se os dendrogramas gerados pelo método UPGMA, através do programa NTSYS-pc, 2.1.

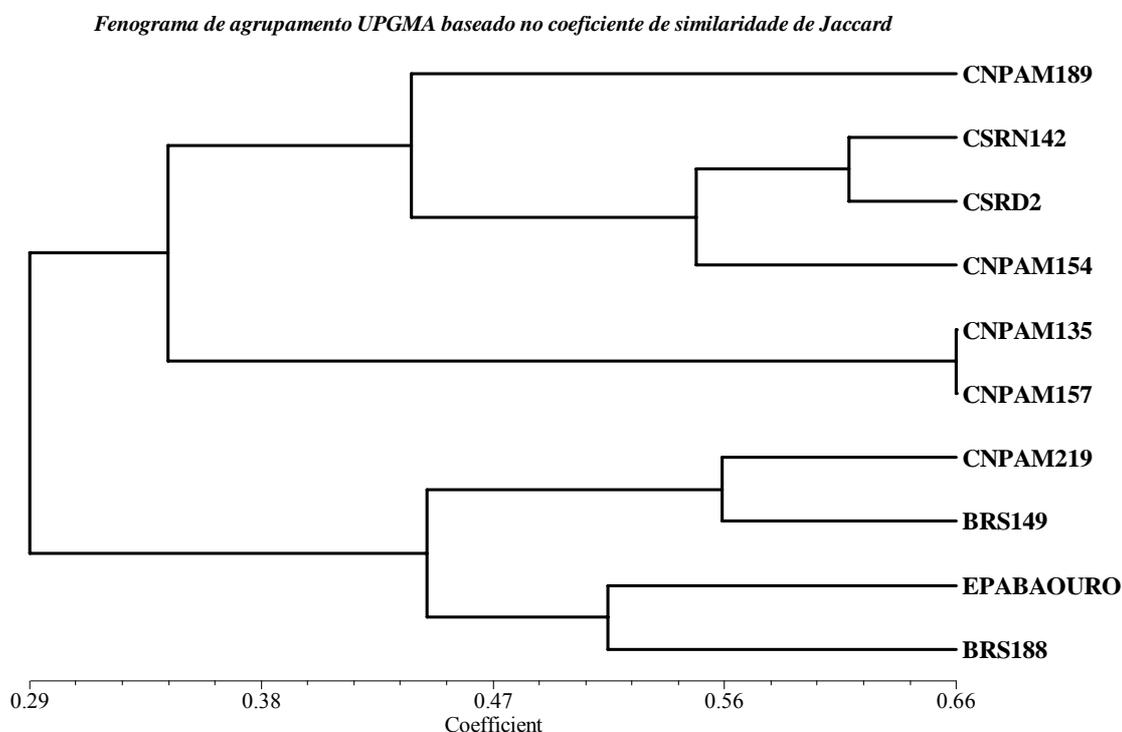


Figura 10. Fenograma de agrupamento UPGMA gerado na análise dos marcadores RAPD em genótipos de mamona, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard.

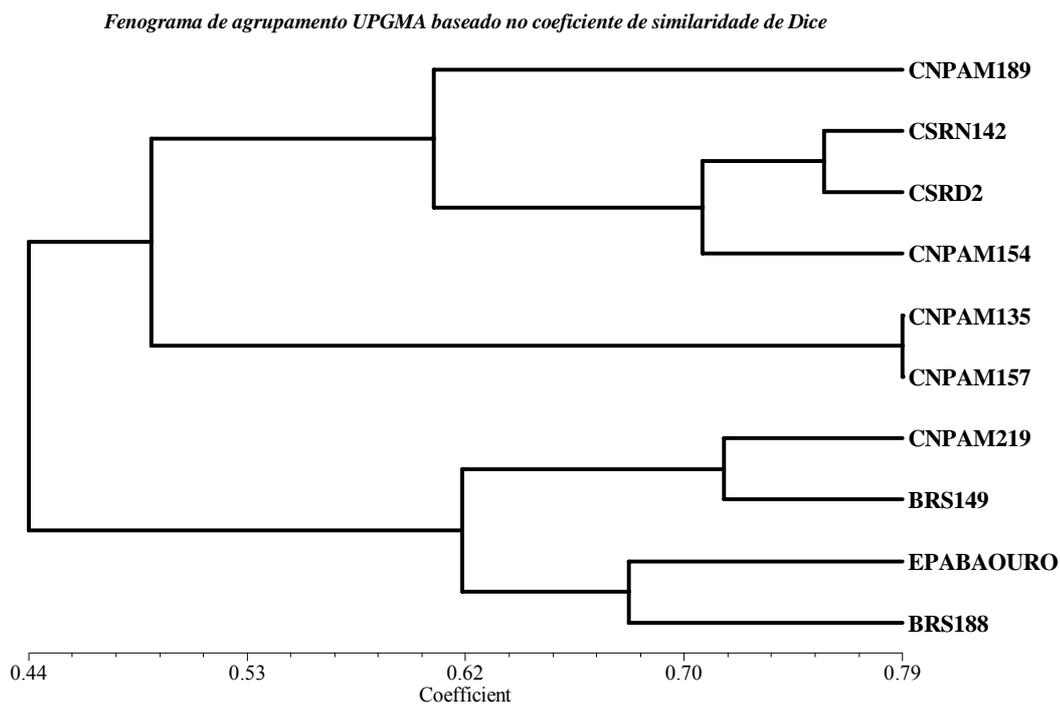


Figura 11. Fenograma de agrupamento UPGMA gerado na análise dos marcadores RAPD em genótipos de mamona, baseado no coeficiente de similaridade de Dice.

A análise de agrupamento, igual para ambos os coeficientes de similaridade, permitiu a separação dos genótipos em dois grupos principais, sendo um constituído pelos genótipos com padrão rajado nas sementes e o outro, composto por sementes de cor lisa. No primeiro grupo incluem-se as demais linhagens do programa de melhoramento da Embrapa Algodão e dois acessos importados da Costa Rica (CRSD 2 e CRSN 142). No segundo grupo, encontram-se as cultivares desenvolvidas pela Embrapa Algodão e IPEAL e, ainda, uma linhagem proveniente de seleção do BAG mantido pela Embrapa Algodão (CNPAM 2002-219). O agrupamento representado no dendrograma foi suficiente para estimar relações genéticas dentre as linhagens e demais variedades testadas.

Albuquerque *et al.* (2006) avaliaram o desempenho de novas linhagens de mamona, quanto à produtividade em dois municípios inseridos no semi-árido do estado de Alagoas. Segundo resultados provenientes dessa análise, as linhagens CNPAM 154, CNPAM 135, CNPAM 157 e o acesso CRSN 142, inseridos no primeiro grupo no dendrograma, destacaram-se, dentre outras linhagens, por apresentar rendimento acima da média geral do ensaio no município de Igaci (1.398 kg/ha), enquanto que em Delmiro Gouveia, o acesso CRSN 142 também alcançou rendimento acima da média geral do ensaio (1.021 kg/ha).

A linhagem CNPAM 2002-189 apresentou distanciamento genético considerável dos demais genótipos inclusos em seu grupo. Essa análise confirma o padrão eletroforético diferenciado, anteriormente discutido, formado pelos fragmentos RAPD.

Ainda no primeiro grupo do dendrograma, os valores de similaridade de 0,62 e 0,76 para os coeficientes de Jaccard e Dice, respectivamente, obtidos para os acessos provenientes da Costa Rica, CSRN 142 e CSRD 2, podem ser explicados pela sua origem geográfica. No dendrograma, esses acessos encontram-se agrupados com a linhagem CNPAM 2002-154, de origem brasileira. Miguel Júnior *et al.* (2004) conduziram estudo de caracterização taxonômica de acessos de mamona e identificaram o acesso CSRD 2, ao nível de subespécie, como *ruderalis*. Esta subespécie é caracteristicamente tardia, tolerante à seca, adapta-se bem a temperaturas elevadas, constituindo, provavelmente, material de fácil adaptação às condições climáticas da região Nordeste. Ainda nesse mesmo estudo, o acesso CSRN 142 foi identificado como sendo da subespécie *sinensis* por apresentar porte anão e sementes com tamanho variando de médio a grande. Os acessos da Costa Rica constituem material adaptado a baixas altitudes, fator importante e limitante no desempenho agroindustrial. No zoneamento agroecológico nordestino, onde estão situados mais de 400 municípios aptos ao cultivo de mamona em condições de sequeiro, é requerida uma altitude de pelo menos 300 m para o plantio dessa oleaginosa (BELTRÃO *et al.*, 2003). Dessa forma, a utilização da linhagem CNPAM 2002-154 em programas de pesquisa deve ser precedida de uma avaliação preliminar, de forma a analisar e considerar sua adaptação em ambientes de baixa altitude e com condições climáticas semelhantes às apresentadas no semi-árido nordestino.

O maior índice de similaridade da presente análise foi observado entre CNPAM 135 e CNPAM 157. Segundo dados de Albuquerque *et al.* (2006), a linhagem CNPAM 135 apresentou-se como genótipo altamente promissor para cultivo no semi-árido, uma vez que obteve o maior rendimento médio dentre as demais linhagens em questão com produtividade de 1.627,46 kg/ha. Em se tratando ainda do referido estudo, a linhagem CNPAM 157 também obteve destaque com uma produtividade acima da média geral do ensaio, como citado anteriormente.

Na avaliação do dendrograma obtido, pode ser observada a formação de um subgrupo contendo a cultivar BRS-149 Nordestina e a linhagem CNPAM 2002-219. De acordo com Freire *et al.* (2001), ocorre, na mamoneira, grande número de cruzamentos, devido à polinização livre. Nessa cultura, onde a polinização cruzada é freqüente, a hibridação acaba por alterar a constituição genética da semente, e pode provocar ainda a miscigenação de genótipos e cultivares, segundo Crisóstomo & Sampaio (1975) *apud* Freire *et al.* (2001),

favorecida pela própria biologia da espécie. Dessa forma, a similaridade genética entre BRS-149 Nordestina e CNPAM 2002-219 pode ser decorrente de uma possível correlação existente entre os ancestrais da cultivar e a linhagem referida.

As cultivares BRS-149 Nordestina e BRS-188 Paraguaçu apresentam características agronômicas semelhantes, tais como período entre emergência da plântula e floração do primeiro racemo, semideiscência dos frutos, teor de óleo na semente e produtividade média. Os índices de similaridade (0,40 e 0,58) entre essas cultivares foram, em alguns casos, menores do que aqueles detectados entre essas cultivares e genótipos não-relacionados, como por exemplo entre a cultivar BRS-188 Paraguaçu e Epaba Ouro, as quais constituem materiais provenientes de diferentes programas de pesquisa e desenvolvimento dos estados da Paraíba (Embrapa Algodão) e Bahia (IPEAL), respectivamente. As cultivares BRS-149 Nordestina e BRS-188 Paraguaçu são provenientes de diferentes linhagens desenvolvidas pela Embrapa Algodão. Por meio de seleção individual com testes de progênies na variedade local Baianita foi obtida a linhagem de porte médio CNPAM 90-210 (BRS-149 Nordestina) e através de seleção massal realizada na variedade local Sangue de Boi, originou-se a linhagem CNPAM SM 4 (BRS-188 Paraguaçu). Portanto, a expectativa para detecção de índices de similaridade mais elevados entre essas cultivares não foi correspondida, certamente por constituírem linhagens obtidas de diferentes variedades locais, materiais genéticos de origem desconhecida.

As linhagens CNPAM 2002-189, CNPAM 2002-154, CNPAM 2002-135, CNPAM 2002-157, CNPAM 2002-219, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão, ainda necessitam de estudos aprofundados de caracterização e avaliação de germoplasma, no intuito de conhecer a diversidade e potencialidade dos genótipos que irão atender aos vários segmentos da cadeia produtiva da cultura da mamona, como citado por MIGUEL JÚNIOR *et al.* (2004). Não obstante, as pesquisas na área de melhoramento genético dessa oleaginosa conduzidas pela Embrapa Algodão, instituição de procedência do material vegetal sob análise, encontram-se em fase experimental, ainda tornando indisponíveis maiores informações a respeito das principais características fenotípicas de interesse agroindustrial do material genético utilizado, o que acaba estreitando maiores discussões e conclusões a respeito dos marcadores RAPD empregados no presente estudo.

5. CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas a partir dos resultados do presente trabalho foram:

- A extração de DNA de tecido foliar de mamona permitiu o desenvolvimento de um protocolo eficiente, rápido e de baixo custo, prestando-se para aplicações RAPD;
- Sete oligonucleotídeos iniciadores selecionados foram capazes de gerar bandas de DNA com padrão polimórfico para os genótipos estudados, evidenciando a sensibilidade dos marcadores RAPD em estudos de variabilidade genética com *Ricinus communis* L.;
- A alta diversidade genética revelada pelos marcadores RAPD, possivelmente refletiu a ampla variabilidade morfológica e agronômica contida no germoplasma de *Ricinus communis* L., permitindo sugerir que o material avaliado é bastante representativo da diversidade genética existente nessa espécie;
- Os marcadores RAPD mostraram-se eficientes na discriminação dos genótipos de *Ricinus communis* L., tornando possível seu emprego em posteriores estudos de caracterização correlacionados com os principais caracteres agroindustriais de germoplasma de mamona.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. M. de *et al.* Novas linhagens de mamona avaliadas no semi-árido alagoano. In: II Congresso Brasileiro de Mamona, 2006, Aracaju. **Anais...** Aracaju, Centro de Convenções de Sergipe, 2006. 1 CD ROM.

ANJANI, K.; DUHON, S. S.; YADAV, W. S. Collecting castor (*Ricinus communis* L.) germplasm in northweastnr India. **Plant Genetic Resources Newsletter**, n. 120, p. 48-51, 1999.

AZEVEDO, D. M. P. de *et al.* **Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Nordeste do Brasil.** Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 1997. 52 p. (CNPAC: Circular Técnica, 25).

BALDANZI M.; FAMBRINI M.; PUGLIESI, C. Redesign of castorbean plant body plan for optimal combine harvesting. **Ann. appl. Biol.**, v. 142, p. 299-306, 2003.

BARDAKCI, F. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. **Turk J Biol**, v. 25, p. 185-196, 2001.

BELTRÃO, N. E. de M. *et al.* Fitologia. In : AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. P. 37-59.

BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, L. C.; MELO, F. B. **Cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) consorciada com feijão-caupi [*vigna unguiculata* (L.) Walp] para o semi-árido nordestino, em especial do Piauí.** Campina Grande: EMBRAPA Algodão/Embrapa – CPAMN, 2002. 44p. (CNPAC: Documentos, 97).

BELTRÃO, N. E. de M. **Crescimento e desenvolvimento da mamoneira (*Ricinus communis* L.).** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003a. 4p. (CNPAC: Comunicado Técnico, 146).

BELTRÃO, N. E. de M. **Informações sobre o biodiesel, em especial feito com o óleo de mamona.** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2003b. 3p. (CNPAC: Comunicado Técnico, 177).

BELTRÃO, N. E. de M. *et al.* **Observações sobre a mamona (*Ricinus communis* L.) asselvajada e cultivada em areia e em solo próximo ao mar.** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2003. 4p. (CNPAC: Comunicado Técnico, 193).

BELTRÃO, N. E. de M. **A cadeia de mamona no Brasil, com ênfase para o segmento P&D: estado da arte, demandas de pesquisa e ações necessárias para o desenvolvimento.** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2004. 19p. (CNPAC: Documentos, 129).

BERED, F.; CARVALHO, F. I. F.; BARBOSA NETO, J. F. Variabilidade genética em trigo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 14, ano 3, p. 14-17, 2000.

CARTAXO, W. V. *et al.* **O cultivo da mamona no semi-árido brasileiro.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 20p. (CNPAC: Circular Técnica, 77).

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR-based markers. **Euphytica**, v. 120, p. 133-142, 2001.

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

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARTTER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.

COSTA, H. M. da *et al.* Efeito do óleo de mamona em composições de borracha natural contendo sílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. V. 14, n. 1, p. 46-50, 2004.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHASE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 158-165, 2003.

CRISÓSTOMO, J. R.; SAMPAIO, H. S. de V. **Mamona: aspectos importantes para a produção de sementes selecionadas no Estado da Bahia**. Salvador: Embrapa – Representação no Estado da Bahia, 1975. 10 p. (Embrapa: Representação do Estado da Bahia. Comunicado Técnico, 13).

CUNHA, M. A. da S. *et al.* Método para isolamento de DNA de tecido foliar de mamona (*Ricinus communis* L.). In: II Congresso Brasileiro de Mamona, 2006, Aracaju. **Anais...** Aracaju, Centro de Convenções de Sergipe, 2006. 1 CD ROM.

FALEIRO, F. G. *et al.* Variabilidade genética de acessos de mandioca morfológicamente similares à etnovarietade 'Buriti' com base em marcadores moleculares. In: XI Congresso Brasileiro de Mandioca, 2005, Petrolina. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://www.suct.ms.gov.br/mandioca/trabalhos/PASTA14a.pdf>> Acesso em: 20 abr. 2006.

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

FERTILIZER SOCIETY OF SOUTH AFRICA. Disponível em: <<http://www.fssa.org.za/>> Acesso em: 01 abr. 2006.

FIGUEIREDO NETO, A.. *et al.* Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus comunnis* L.) baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004. Disponível em: <<http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/pdf/divergencia.pdf>> Acesso em: 01 dez. 2005.

FONSECA, A. M. **Caracterização farmacognóstica das folhas de palma-christi – *Ricinus communis* L. – Euphorbiaceae**. 2001. 97f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Estudos Pós Graduated em Farmácia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2001.

FREIRE, E. C.; LIMA, E. F.; ANDRADE, F. P. de. Melhoramento genético. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa

Informação Tecnológica, p. 229-252, 2001.

FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 295-333, 2001.

GOULART, M. F.; RIBEIRO, S. P.; LOVATO, M. B. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 2, p. 275-284, 2005.

GRAHAM, G. C.; MEYERS, P. & HENRY, R. J. A simplified method for preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. **BioTechniques**, v.16, n.1, p. 48-50, 1994.

HILAL, S. H.; HAGGAG, M. Y.; REDA, M. Phytochemical study of *Ricinus communis* L. **Egypt. J. Pharm. Sci.**, v. 20, n. 14, p. 63-70, 1979.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal 2005. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?z=p&o=18&i=P>> Acesso em: 06 jul. 2006.

JAIN, N. *et al.* Molecular diversity in *Phyllanthus amarus* assessed through RAPD analysis. **Current Science**, v. 85, n. 10, p. 1454-1458, 2003.

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

LAURETI, D. di; BRIGHAM, R. D. Genética e miglioramento Del rícino. In: Ministero dell' Agricoltura e Foreste, ed. II, Ricino-obiettivi, **Strategie e ricerca**, p.11-22, 1987.

LEONEL, E. C. de F. *et al.* A ação do polímero de mamona durante a neoformação óssea. **Acta Cir Bras**, v. 19 (4), p. 342-350, 2004.

LOPES, R. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, ano 5, p. 56-60, 2002.

LOPES, J. da S.; BELTRÃO, N. E. de M.; PRIMO JÚNIOR, J. F. Produção de mamona e biodiesel: uma oportunidade para o semi-árido. **Bahia Agríc**, v. 7, n. 1, p. 37-41, 2005.

MARQUES, J. R. B. *et al.* Diversidade genética entre clones de seringueira das séries SIAL e Fx com base em marcadores RAPD. **Agrotrópica**, v. 14, n. 3, p. 159-164, 2002.

MAZZANI, B. Euforbiáceas oleaginosas. Tártago. In: MAZZANI, B. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, p. 277-360, 1983.

MEYER, A. S. **Comparação de coeficientes de similaridade usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 2002. 106f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo,

Piracicaba, 2002.

MIGUEL JÚNIOR, S. R. *et al.* Caracterização taxonômica de acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão. In: I Congresso Brasileiro de Mamona, 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD ROM.

MILACH, S. C. K Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 5, p. 14-17, 1998.

MILACH, S. C. K Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. 1999. Disponível em: <<http://www.cpatas.embrapa.br/catalogo/livroorg/index.html>> Acesso em: 20 abr. 2006.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polimerase catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** v. 55, p. 335-350, 1987.

MÜHLEN, G. S.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Variabilidade genética de etnovarietades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 2, p. 319-328, 2000.

PARENTE, E. J. de S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Disponível em: <<http://www.tecbio.com.br/Downloads/Livro%20Biodiesel.pdf>> Acesso em: 15 jul. 2005.

PERMINGEAT, H. R.; ROMAGNOLI, M.; VALLEJOS, R. H. A simple method for isolating high yield and quality DNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaves. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 16, p. 1-6, 1998.

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

PURCHOOA, D. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 253-255, 2004.

RATHMANN, R. *et al.* Biodiesel: uma alternativa estratégica na matriz energética brasileira? Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/ArtigoBiodieselGINCOB-UFRGS.pdf>> Acesso em: 20/04/2006.

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

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

ROJAS-BARROS, P.; HARO, A. de; FERNANDÉZ-MARTINÉZ, J. M. Isolation of a natural mutant in castor with high oleic/low ricinoleic acid content in the oil. **Crop Science**, v. 44, p. 76-80, 2004.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. Owner manual. New York: University of New York, 2000.

ROMANO, E. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (eds.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa Cenargen, 1998. 309 p.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 9, ano 2, p. 40-43, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, E. A. *et al.* Caracterização molecular de acessos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com raízes amarelo-laranja utilizando marcadores do tipo RAPD. In: XI Congresso Brasileiro de Mandioca, 2005, Petrolina. **Anais eletrônicos...** Disponível em: <<http://www.suct.ms.gov.br/mandioca/trabalhos/PASTA104.pdf>> Acesso em: 20 abr. 2006.

SANTOS, R. F. dos *et al.* Análise Econômica. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (eds.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 17-35, 2001.

SAVY FILHO, A. **Mamona Tecnologia Agrícola**. Campinas, SP: EMOPI, 2005. 105p.

SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. In: BORÉM, A (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. P. 385-407.

SHARMA, K. K.; LAVANYA, M.; ANJIAH, V. A method for isolation and purification of peanut genomic DNA suitable for analytical applications. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 18, p. 393a-393h, 2000.

TOWNER, PAUL. Purification of DNA. In: BROWN, T. A. **Essencial Molecular Biology – A Practical Approach**. V. I. Oxford University Press, New York, USA. 1991. 299 p.

VALADARES-INGLES, M. C.; MELO, I. S. de Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. 488 p.

Venkatachalam, P. *et al.* Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD marker in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]. **Plant Cell Rep**, v. 23, p. 327-332, 2004.

VIEIRA, R. de M.; LIMA, E. F. Importância sócio-econômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livroorg/index.html>> Acesso em: 20 abr. 2006.

WARUDE, D. *et al.* DNA isolation from fresh and dry plant samples with highly acidic tissue extracts. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 21, p. 467a-467f, 2003.

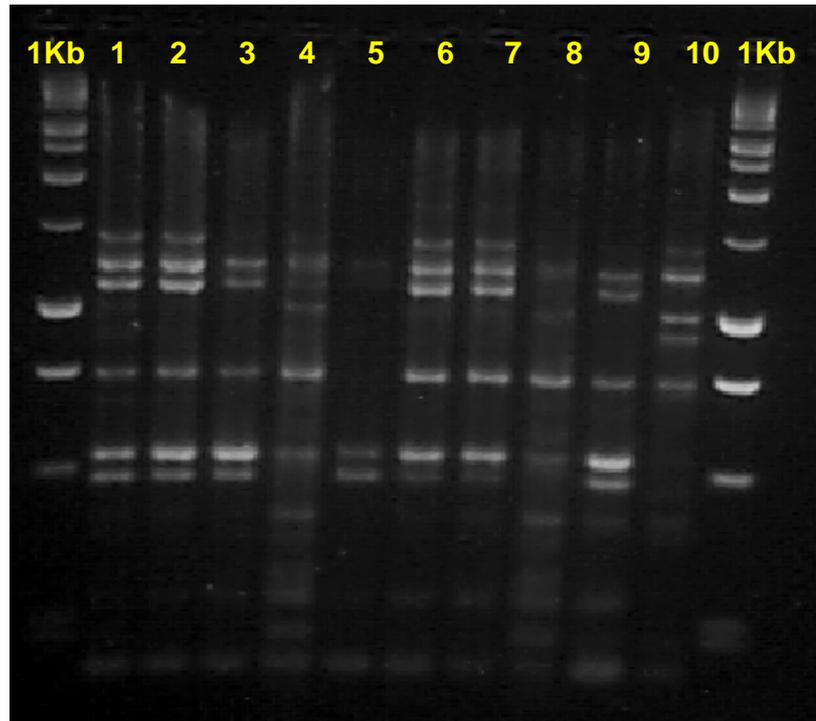
WEISS, E. A. Castor. In: WEISS, E. A. **Oilseed crops**. London: Longman, 1983. P. 31-99.

WILLIAMS, J. G. *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers as are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

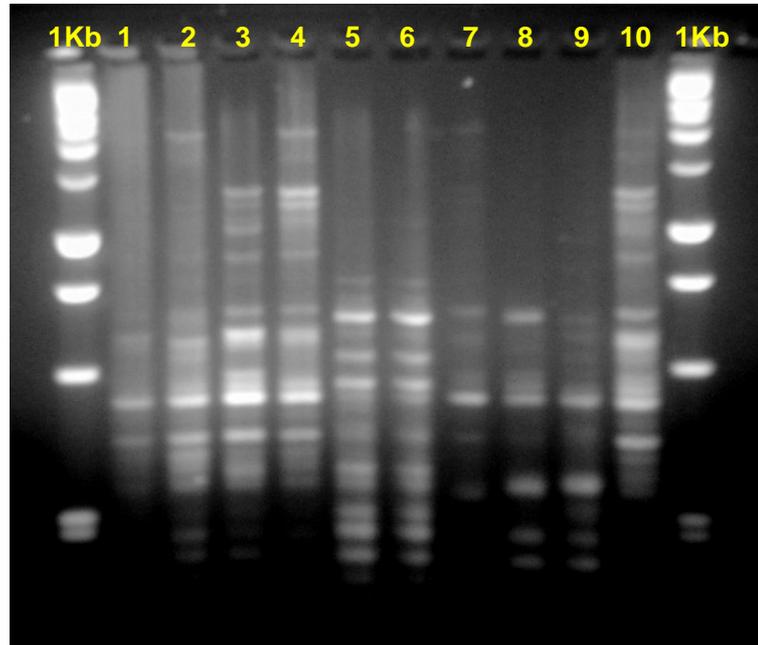
WINCLER, L. M.; VIDAL, R. A.; BARBOSA NETO, J. F. Caracterização genética de *Euphorbia heterophylla* resistente a herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Pesq. agropec. bras.**, v. 38, n. 9, p. 1067-1072, 2003.

APÊNDICES

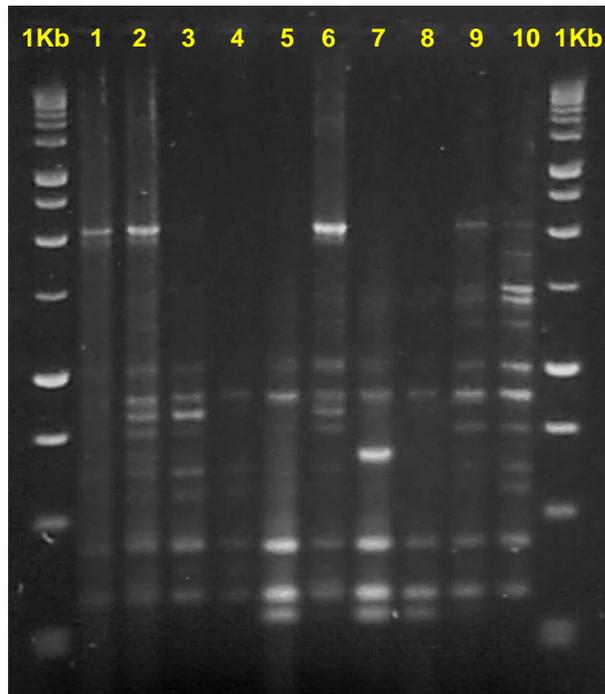
Apêndice 1A. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 1.



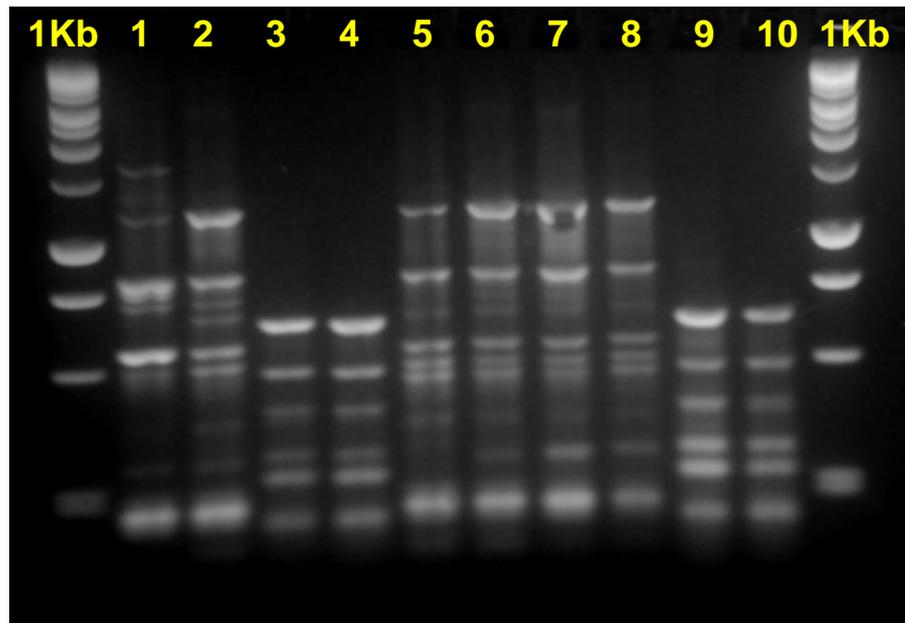
Apêndice 1B. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 2.



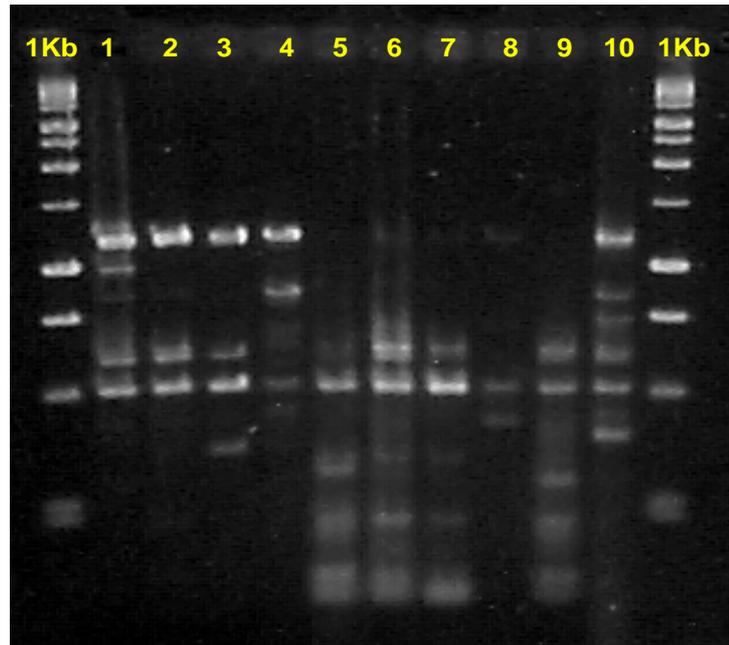
Apêndice 1C. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 4.



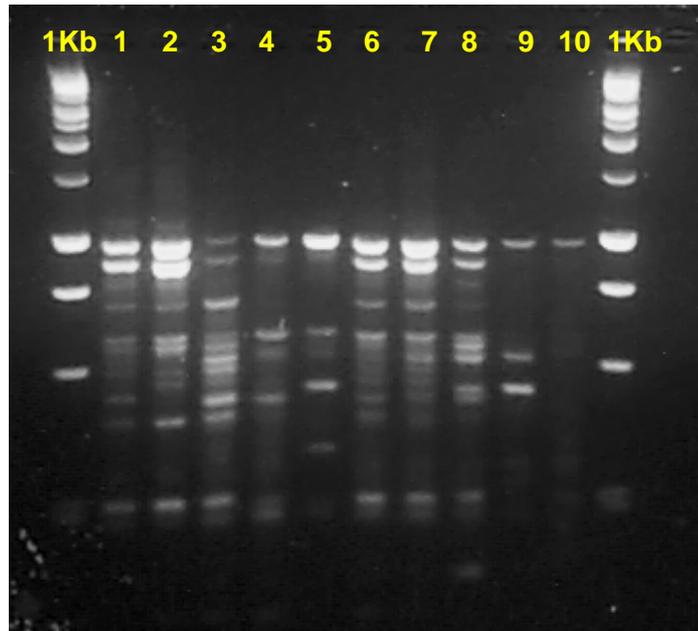
Apêndice 1D. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 9.



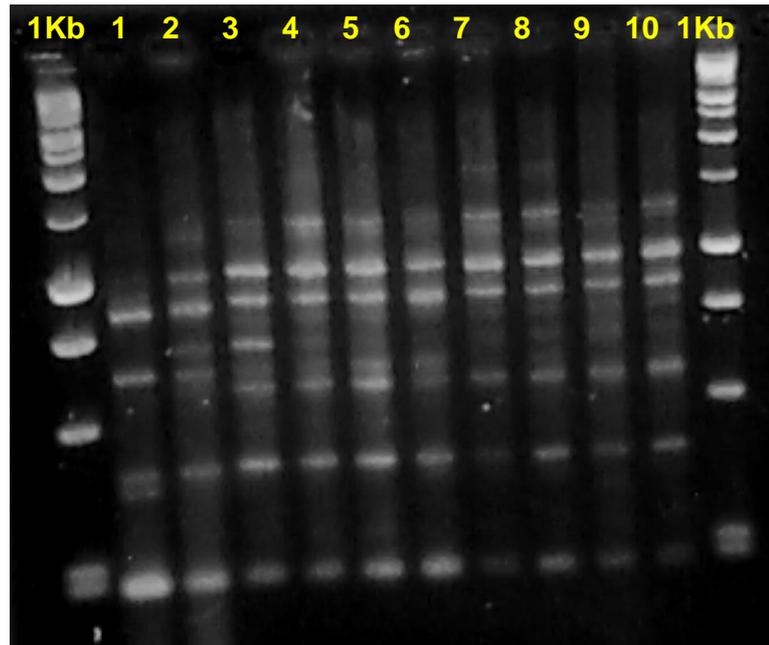
Apêndice 1E. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 10.



Apêndice 1F. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 16.



Apêndice 1G. Perfil eletroforético RAPD dos genótipos de mamona CNPAM 2002-189 (1), CSRN 142 (2), CNPAM 2002-219 (3), Epaba Ouro (4), CNPAM 2002-135 (5), CSRD 2 (6), CNPAM 2002-154 (7), CNPAM 2002-157 (8), BRS-149 Nordestina (9), BRS-188 Paraguaçu (10), gerado pelo iniciador OPA 20.



Apêndice 2. Matriz binária gerada pelos marcadores RAPD obtidos das ampliações com os oligonucleotídeos OPA 1, OPA 2, OPA 4, OPA 9, OPA 10, OPA 16 e OPA 20.

```

1 57L 10L 0
OPA1 OPA2 OPA4 OPA9 OPA10 OPA16 OPA20
CNPAM189 CSRN142 CNPAM219 EPABAOURO CNPAM135 CSRD2 CNPAM154 CNPAM157 BRS149 BRS188
1 1 0 0 0 1 1 0 0 1
1 1 1 1 0 1 1 0 1 1
1 1 1 0 0 1 1 0 1 0
0 0 0 1 0 0 0 0 0 1
1 1 1 1 0 1 1 1 1 1
1 1 1 1 1 1 1 1 1 0
1 1 1 0 1 1 1 0 1 0
0 0 0 0 1 1 1 1 0 0
0 0 1 1 0 0 0 0 0 1
0 0 0 0 1 1 0 0 0 0
0 0 0 0 1 1 0 0 0 1
1 1 1 1 0 0 1 1 1 1
1 1 1 1 0 0 0 0 0 1
0 0 0 0 1 1 0 1 1 0
0 0 0 0 1 1 0 0 0 0
0 0 0 0 1 1 0 1 1 0
1 1 0 0 0 1 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
0 1 1 0 0 1 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 1 0 0 0
0 0 1 0 1 0 1 1 1 1
0 0 1 0 1 0 1 1 1 1
0 0 0 0 1 0 1 1 0 0
1 0 0 0 0 0 0 0 0 0
1 1 0 0 1 1 1 1 0 0
0 1 0 0 1 1 1 1 0 0
1 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 1 1 0 0 0 0 1 1
0 0 0 0 1 1 1 1 0 0
1 1 0 0 1 1 1 1 0 0
0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
0 0 1 1 0 0 0 0 1 1
0 0 1 1 0 0 0 0 1 1
1 1 1 1 0 0 0 0 0 1
1 0 0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 1 0 0 0 0 0 0
1 1 1 0 0 1 1 0 1 1
0 0 0 0 0 0 0 0 0 1
0 0 1 0 0 0 0 0 0 0
0 0 1 1 1 0 0 1 1 1
1 1 0 0 0 1 1 0 0 0
1 1 1 0 0 1 1 1 0 0
1 1 1 0 0 1 1 0 0 0
0 1 1 1 1 1 1 1 0 0
0 1 0 0 0 0 0 1 0 0
0 0 1 0 0 0 1 1 1 0
0 0 0 0 1 0 0 1 1 0
1 0 1 1 0 0 0 0 0 0
1 1 1 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 1 1 0 1 1 0 1
0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
0 0 1 0 0 0 0 0 0 0
1 0 0 0 1 0 0 0 0 0
0 0 1 1 1 0 1 1 1 0

```

Apêndice 3A. Coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard e o fenograma resultante, obtidos através do programa NTSYS-pc.

```

coph.j.valor - Bloco de notas
Arquivo  Editar  Formatar  Exibir  Ajuda
MxComp: NTSYSpc 2.10m, (C) 2000-2001, Applied Biostatistics Inc.
Date & time: 9/7/2007 15:54:54
-----
Input parameters
Read X input from file: C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\matriz.jaccard.NTS
Read Y input from file: C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\coph.j.NTS
Mantel statistic will be normalized.
-----
X matrix:
Comments:
Matriz binária gerada pelos marcadores RAPD"
SIMQUAL: input=C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\matriz.binária.NTS, coeff=J
by Cols, += 1.00000, -= 0.00000
Matrix type = 3, size = 10 by 10, missing value code = "none" (similarity)
Y matrix:
Comments:
Matriz binária gerada pelos marcadores RAPD"
SAHN: input=C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\matriz.jaccard.NTS, method=UPGMA, tie=
COPH: tree=C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\treej.NTS, method=ultrametricDis
Matrix type = 3, size = 10 by 10, missing value code = "none" (similarity)
-----
2-way Mantel test -- Mantel (1967) method.
N = 45 points
Mean X = 0.3607 SSx = 0.8767
Mean Y = 0.3607 SSy = 0.4634
-----
Tests for association:
Matrix correlation: r = 0.72698
(= normalized Mantel statistic Z)
Approximate Mantel t-test: t = 4.9764
Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000
Ending date & time: 9/7/2007 15:54:54
    
```

Apêndice 3B. Coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Dice e o fenograma resultante, obtidos através do programa NTSYS-pc.

```

coph.d value - Bloco de notas
Arquivo Editar Formatar Editar Ajuda
NtComp: NTSYSpc 2.10m, (C) 2000-2001, Applied Biostatistics Inc.
Date & time: 9/7/2007 16:03:27
-----
Input parameters
Read X input from file: C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\matrix\matriz.dice.NTS
Read Y input from file: C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\cophenetic correlation\coph.
Mantel statistic will be normalized.
X matrix:
Comments:
Matriz binária gerada pelos marcadores RAPD"
SIMQUAL: input=C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\matrix.binária.NTS, coeff=DICE
by cols, += 1.00000, -= 0.00000
Matrix type = 3, size = 10 by 10, missing value code = "none" (similarity)
Y matrix:
Comments:
Matriz binária gerada pelos marcadores RAPD"
SAHN: input=C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\matrix\matriz.dice.NTS, method=UPGMA,
COPH: tree=C:\Documents and Settings\Murciana\Meus documentos\dissertação\resultados\trees\treed.NTS, method=ultrametricDis
Matrix type = 3, size = 10 by 10, missing value code = "none" (similarity)
2-way Mantel test -- Mantel (1967) method.
N = 45 points
Mean X = 0.5148 SSX = 1.0125
Mean Y = 0.5148 SSY = 0.4823
Tests for association:
Matrix correlation: r = 0.69014
(= normalized Mantel statistic Z)
Approximate Mantel t-test: t = 4.8152
Prob. random Z < obs. Z: p = 1.0000
Ending date & time: 9/7/2007 16:03:27
    
```



ANEXOS

Anexo 1. Trabalho apresentado no 45º Congresso Brasileiro de Oleicultura, 15º Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 2º Congresso Brasileiro de Cultura de Tecidos, realizados em Fortaleza – CE, 2005.

Métodos de propagação *in vitro* de *Ricinus communis* L. a partir de diferentes explantes.

Muciana Aracely da Silva Cunha^{1*}; Ricardo Manoel dos Santos Silva¹; Eurico Eduardo Pinto de Lemos¹; Denise Wanderlei Silva¹; Cícero Eduardo Ramalho Neto¹.

¹Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, CEP 57100-000, Rio Largo, AL, Brasil. E-mail:cern@fapeal.br.

*Bolsista da FAPEAL.

O cultivo da mamona constitui-se numa atividade de elevada importância tanto para a economia do semi-árido nordestino como para o mercado mundial, devido especialmente à produção de óleo vegetal de múltiplas aplicações, especificamente como lubrificantes para motores a jato, como fluidos hidráulicos, preparo de tintas e vernizes, fabricação de plásticos, produtos farmacêuticos e cosméticos, além de seu uso energético como combustível renovável e como biopolímeros para a reconstrução de tecido ósseo de vítimas de acidentes. A obtenção de plântulas matrizes *in vitro*, em consequência do alto índice de contaminação das sementes, vem sendo testada a partir de explantes como sementes e eixos embrionários. Considerando-se a necessidade de avaliação da variabilidade genética existente entre sucessivas gerações de plantas micropropagadas através de tecnologias como RAPD, RFLPs e AFLPs, objetivou-se, com o presente trabalho, desenvolver protocolos para regeneração da cultivar BRS 149 Nordestina, utilizando-se explantes de folhas em diferentes estágios de desenvolvimento, inflorescência e frutos. Os explantes foram desinfetados em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo durante 20 minutos e cultivados em meio básico MS contendo 30g.L⁻¹ de sacarose, 2,5.L⁻¹ de gelrite, acrescido de BAP em diferentes concentrações (0 mg.L⁻¹; 1 mg. L⁻¹; 2 mg. L⁻¹) para indução da formação de brotos, em delineamento estatístico inteiramente casualizado. As culturas foram incubadas em câmara de crescimento sob intensidade luminosa de 50 $\mu\text{mol.m}^{-2} .\text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 27°C. Após 20 dias de cultivo, foi verificada organogênese direta nos explantes de folhas jovens, com formação de parte aérea. Nas próximas etapas, os

brotos serão subcultivados em meio para alongamento e, posteriormente, transferidos para meio apropriado visando enraizamento.

Anexo 2. Trabalho encaminhado e aceito para apresentação no II Congresso Brasileiro de Mamona, a ser realizado no período de 15 a 18 de agosto de 2006 em Aracaju – SE.

MÉTODO PARA ISOLAMENTO DE DNA DE TECIDO FOLIAR DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.)*

Muciana Aracely da Silva Cunha, Janice Silva Sales, Thelmo de Albuquerque Moraes, Cícero Eduardo Ramalho Neto

Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Campus Delza Gitaí, BR 104 N, Km 85, CEP 57100-000, Rio Largo, AL. E-mail: mucianacunha@hotmail.com

Introdução

A mamona (*Ricinus communis* L.) pode ser encontrada como planta nativa em diferentes partes do mundo, devido à sua fácil propagação, adaptação e estabelecimento. Esta oleaginosa é de utilização preponderantemente industrial, tendo no seu principal produto, o óleo extraído da semente, a possibilidade de obtenção de inúmeros derivados químicos com aplicações na área de cosméticos, lubrificantes, polímeros etc., podendo, ainda, ser potencial substituto do petróleo na síntese de diversos outros materiais.

Existe uma elevada demanda pela exploração racional da mamona, com vistas à utilização do óleo extraído da semente na indústria, devido à sua enorme versatilidade química, além, ainda, do emprego de outras partes da planta, resíduos vegetais e cascas dos frutos, na composição de diversos produtos, como papel e tecidos, agregando valor à produção. Especificamente, tendo como objetivo a produção de óleo, a ricinocultura parece constituir o verdadeiro caminho e vocação para o semi-árido (PARENTE, 2003) por diversas razões, dentre elas: fácil adaptação às condições ecológicas, sendo caracteristicamente resistente aos períodos de seca; envolvimento de pequenos agricultores rurais, prestando-se para a agricultura familiar; aproveitamento da torta como adubo orgânico de excelência e, se destoxicada, constitui rica fonte protéica para alimentação animal etc.

A grande variabilidade apresentada pela mamona é observada em características botânicas e agronômicas, podendo ser avaliada através de polimorfismo de DNA, com o emprego de técnicas tais como: RAPD, RFLP, AFLP e microssatélites. Os marcadores moleculares representam ferramentas importantes em diversos estudos, permitindo avaliar, em curto prazo, um número elevado de genótipos, um alto grau de polimorfismo, além de não sofrerem influência ambiental, pleiotrópica ou epistática como ocorre com marcadores morfológicos que apresentam relativa limitação, especialmente com cultivares proximamente relacionadas.

Existe uma enorme escassez de informações acerca da variabilidade genética, ao nível de DNA, de coleções de germoplasma, linhagens, cultivares e híbridos brasileiros de *Ricinus communis* L. Nesse contexto, a caracterização e avaliação das diferentes variedades disponíveis comercialmente e de populações naturais, quanto ao seu potencial de uso, são consideradas essenciais no estabelecimento de diferenças ou semelhanças, imprescindíveis para os programas de melhoramento da espécie (FIGUEIREDO NETO *et al.*, 2004), visando, ainda, assegurar informações sobre essas fontes de genes e suas utilizações futuras, fundamentais para o sucesso da ricinocultura.

No entanto, para a aplicação das técnicas moleculares, faz necessário a obtenção de metodologias adequadas para o isolamento de DNA de mamona, uma vez que a caracterização bioquímica foliar desta espécie determina a presença de diversas classes de substâncias que constituem contaminantes potenciais durante o processo.

Este trabalho teve como objetivo principal o estabelecimento de protocolos rápidos e eficientes para o isolamento de DNA de 10 genótipos de mamona.

Metodologia

Material vegetal

O material vegetal utilizado no presente estudo foi cedido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros (Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo), constituindo 10 variedades de mamona (*Ricinus communis* L.), provenientes da Embrapa Algodão (CNPA) (Tabela 1). Amostras dos genótipos foram obtidas na Estação Experimental de Igaci, localizada no município de Igaci, Estado de Alagoas, em duas coletas realizadas, cada uma, nos meses de agosto e outubro de 2005.

Extração do DNA genômico total

Aproximadamente 150mg de tecido foliar de cada genótipo foi suspenso em tampão de extração (100mM Tris-HCl, pH 8,0; 2M NaCl; 20mM EDTA; 2% CTAB, 3,7g PVP) pré-aquecido em banho-maria à 70°C, na proporção de 4:1 (tampão:folhas) (v/m). Em seguida, as paredes e membranas celulares foram rompidas por meio de maceração do tecido com micropistilo. Após maceração, a suspensão foi incubada a 70°C durante dez minutos e, posteriormente desproteinizadas com CIA (Clorofórmio Álcool Isoamílico) (24:1), centrifugadas por 30 segundos em microcentrífuga (Eppendorf) a 12.045g e a fase aquosa transferida para um novo microtubo. As etapas de desproteinação foram repetidas por mais duas vezes subsequentes procedendo-se a mistura por inversões. O DNA foi precipitado com a adição de 1/10 do volume de acetato de amônio 7,5M, igual volume de isopropanol gelado (-20°C) e 250µL de NaCl 5M. Para otimizar a precipitação do DNA, as amostras foram

incubadas em posição vertical a -20°C por 30 minutos, segundo descrito por SHARMA et al. (2000). Realizou-se uma nova centrifugação por 5 minutos a 3.287 g descartando-se o sobrenadante e adicionando-se 500 μL etanol 70% (TA) para lavar o precipitado e em seguida descartado. Esperou-se a evaporação do álcool por 20 minutos e o DNA foi eluído em 80 μL de TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA), incubado por 30 minutos a 37°C . O DNA isolado foi acondicionado a -20°C para posterior quantificação.

Para determinação da qualidade do DNA, uma alíquota de 5 μL de cada amostra foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 0,8 %, previamente corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), submetido a 3,3 V/cm por uma hora. DNA genômico foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotodocumentado por meio do Sistema Digital Kodak Science.

Resultados e Discussão

A maioria dos protocolos utilizados no isolamento de DNA de espécies de plantas com altos níveis de compostos secundários constituem versões modificadas de protocolos padrões, incluindo comumente mudanças na composição do tampão de extração. No entanto, este procedimento comumente acaba por fornecer DNA em baixa quantidade. Seguindo o protocolo proposto neste estudo, foi possível isolar DNA de alto peso molecular, com reduzido dispêndio de tempo sem, contudo, comprometer a sua reprodutibilidade. Bandas de DNA de alto peso molecular podem ser observadas através da Figura 1.

As classes de substâncias como alcalóides, esteróides, flavonóides, saponinas, taninos, compostos fenólicos (FONSECA, 2001), glicósidos e triterpenos (HILAL *et al*, 1979 *apud* RODRIGUES *et al.*, 2002) presentes nas folhas de mamona podem interferir no processo de isolamento e, conseqüentemente, em digestões de DNA e PCRs, por formar caracteristicamente uma matriz espessa, marrom e gelatinosa (Figura 2). O tempo de incubação das amostras por 10 minutos, a adição de PVP (PM 360.000) ao tampão de extração CTAB 2% e, ainda, o emprego de NaCl em alta concentração (5M) auxiliou na redução dos teores de polissacarídeos, polifenóis e compostos secundários, bem como resultou numa desaceleração do processo oxidativo, bastante comum durante as etapas iniciais do isolamento de DNA desta espécie, otimizando a cor do ácido nucléico obtido.

Alguns genótipos, especialmente CNPAM 2002 219, BRS 188 e BRS 149, apresentaram um acúmulo de substâncias gelatinosas, em diversos graus de concentração, após a desproteinização, presentes na fase superior do tubo. Nesses casos, tais substâncias acabavam por influenciar o aspecto final do DNA e, ainda, intervinham na sua solubilização em TE ao final do processo.

Os padrões de ampliações por PCR apresentados adiante (Figura 2) comprovam a eficiência do protocolo no isolamento de DNA, prestando-se para aplicações analíticas, tais como RAPD. É importante salientar que os dados aqui apresentados, embora bastante satisfatórios, constituem resultados preliminares, sugerindo a otimização do protocolo utilizado, a fim de apresentar boa reprodutibilidade em diversas preparações, especialmente quando se destine às demais tecnologias moleculares, nas quais é essencial o emprego de DNA íntegro.

Conclusões

O protocolo proposto mostrou-se eficiente para extração de DNA genômico total de mamona dos genótipos utilizados nesse estudo, bem como para o emprego de amplificação por PCR.

Tabela 1. Genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) utilizados no protocolo de extração de DNA genômico total.

GENÓTIPO	
1	CNPAM 2002 - 189
2	CSRN 142
3	CNPAM 2002 - 219
4	EPABA OURO
5	CNPAM 2002 - 135
6	CSRD 2
7	CNPAM 2002 - 154
8	CNPAM 2002 - 157
9	BRS 149 - NORDESTINA
10	BRS 188 - PARAGUAÇU

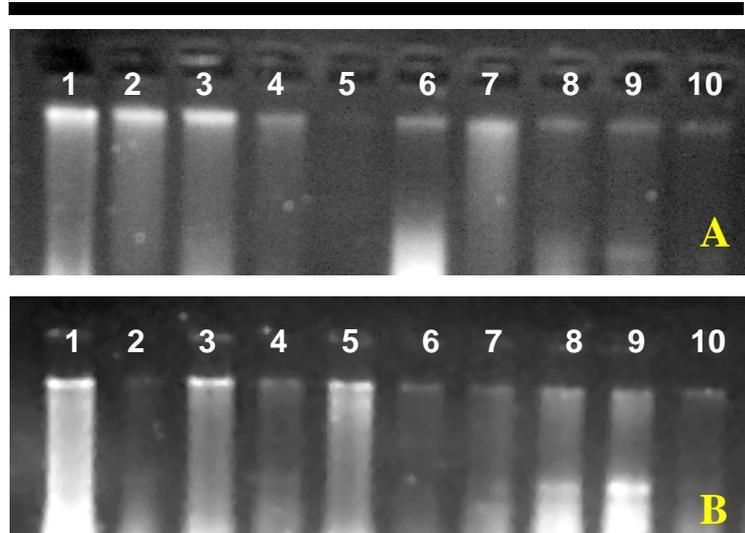


Figura 1. Análise eletroforética de DNA total proveniente de duas extrações de DNA (A e B) de tecido foliar de *R. communis* L., através do protocolo proposto. Colunas de 1 a 10 correspondem aos genótipos descritos na Tabela 1.

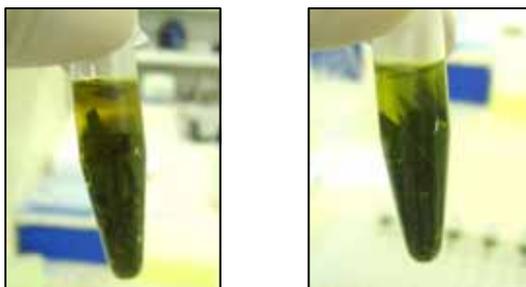


Figura 2. Amostras após etapa de incubação em banho-maria. A) Matriz viscosa e marrom caracteristicamente formada após exposição prolongada em banho-maria. B) Otimização do aspecto da amostra após redução no tempo de incubação.

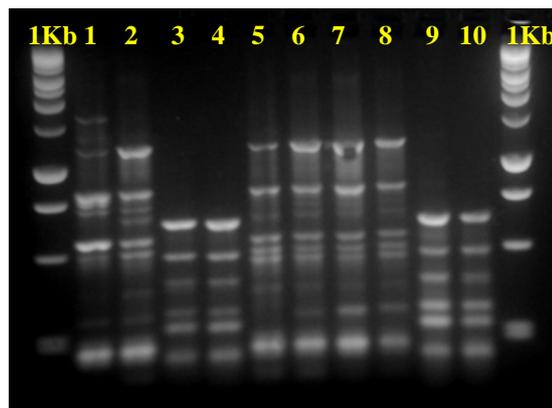


Figura 3. Perfil eletroforético RAPD dos 10 genótipos de mamona utilizando o iniciador OPA 9.

Referências Bibliográficas

- FIGUEIREDO NETO, A.. *et al.* Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus comunnis* L.) baseada nas características das sementes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.
- FONSECA, A. M. Caracterização farmacognóstica das folhas de palma-christi – *Ricinus communis* L. – Euphorbiaceae. 2001. **Bragança Paulista**, v. 65, 2001. f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Estudos Pós Graduated em Farmácia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista/SP.
- HILAL, S. H.; HAGGAG, M. Y.; REDA, M. Phytochemical study of *Ricinus communis* L. **Egypt. J. Pharm. Sci.**, v. 20, n. 14, p. 63-70, 1979.
- PARENTE, E. J. de S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Disponível em: <<http://www.tecbio.com.br/Downloads/Livro%20Biodiesel.pdf>>. Acesso em: 15/07/2005.
- RODRIGUES, R. F. de O.; OLIVEIRA, F. de; FONSECA, A. M. As folhas de palma Christi-*Ricinus communis* L. *Euphorbiaceae* Jussie. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 183-194, 2002.

Anexo 3. Trabalho encaminhado e aceito para apresentação no II Congresso Brasileiro de Mamona, a ser realizado no período de 15 a 18 de agosto de 2006 em Aracaju – SE.

VARIABILIDADE GENÉTICA DE *RICINUS COMMUNIS* L. REVELADA POR MARCADORES RAPD
Muciana Aracely da Silva Cunha, Janice Silva Sales, Thelmo de Albuquerque Moraes, Cícero Eduardo Ramalho Neto

Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, mucianacunha@hotmail.com

RESUMO - O cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) tem sido praticado no país, tradicionalmente, pelos pequenos e médios produtores, constituindo uma cultura com grande apelo social, especialmente na região Nordeste. Diante da elevada demanda energética mundial, bem como da necessidade da busca por fontes renováveis e menos agressivas ao meio ambiente, a mamoneira destaca-se como excelente alternativa. Há uma grande variabilidade em mamona, especialmente quanto ao formato, tamanho, peso e coloração da semente; a cor e ao conteúdo de óleo; e à tolerância a pragas e doenças e a estresse ambiental. Existe uma escassez de informações sobre a variabilidade genética, em nível de DNA, de coleções de germoplasma brasileiro de mamona. A caracterização e avaliação das variedades disponíveis comercialmente e de populações naturais são consideradas essenciais no estabelecimento de diferenças ou semelhanças, imprescindíveis para os programas de melhoramento da espécie. Inúmeros estudos de diversidade genética, identificação de genes de interesse, análises filogenéticas e caracterização de germoplasma foram conduzidos com sucesso utilizando a técnica de RAPD para diversas espécies vegetais. Este estudo revelou polimorfismos de DNA por meio do emprego de sete oligonucleotídeos, que se prestaram para a análise da variabilidade genética existente entre os genótipos considerados.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é considerada um arbusto silvestre, que vegeta em quase todos os países do mundo, tendo se aclimatado com facilidade no Brasil, onde se desenvolve espontaneamente, em especial no Norte e Nordeste (CRUZ, 1982). O cultivo da mamona tem sido praticado no país, tradicionalmente, pelos pequenos e médios produtores, constituindo-se numa cultura com grande apelo social. No Nordeste, por exemplo, ela é cultivada em consórcio com culturas alimentícias que, pela inclémia do clima, são de alto risco, tornando-se uma garantia de rentabilidade da área, com ingressos financeiros, pelo seu grau de adaptabilidade e rusticidade elevado (SAVY FILHO *et al.*, 1999).

A demanda energética mundial precisa ser atendida, entretanto, as fontes convencionais estão em vias de esgotamento, além de provocarem efeitos ambientais agressivos. Diante destes aspectos se tem pesquisado fontes energéticas renováveis, destacando-se a mamoneira como excelente alternativa. Nos últimos anos, devido ao fato de não existirem bons substitutos em muitas das aplicações do óleo de mamona, como também, pela sua versatilidade industrial, a demanda pelo cultivo

de mamona se expandiu bastante tanto no Brasil como em outros países industrializados (AZEVEDO *et al.*, 1997).

Os marcadores moleculares estão facilitando a realização de estudos de genética, taxonomia e evolução de plantas, proporcionando um substancial avanço no conhecimento científico. As principais implicações deste avanço se refletem no poder, precisão e rapidez na manipulação da variabilidade genética, beneficiando de várias maneiras o melhoramento de plantas.

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

Inúmeros estudos de diversidade genética, identificação de genes de interesse, análises filogenéticas e caracterização de germoplasma foram conduzidos com sucesso pela técnica de RAPD, uma tecnologia amplamente utilizada dentre os demais marcadores moleculares baseados em PCR. O uso de oligonucleotídeos iniciadores de seqüência arbitrária que não requer clonagem, seqüenciamento ou outra caracterização genética prévia do genoma em questão, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados constituem características peculiares da técnica de RAPD.

Por meio de estudos preliminares com a classe de marcadores RAPD, este trabalho teve como objetivo principal a análise do polimorfismo e da variabilidade genética existente entre os genótipos considerados.

METODOLOGIA

Material vegetal

O material vegetal utilizado no presente estudo foi cedido pela Embrapa Tabuleiros Costeiros (Unidade de Execução de Pesquisa de Rio Largo), constituindo 10 variedades de mamona (*Ricinus communis* L.), provenientes da Embrapa Algodão (Tab 1). Amostras dos genótipos foram obtidas na Estação Experimental de Igaci, localizada no município de Igaci, estado de Alagoas, em duas coletas realizadas, cada uma, nos meses de agosto e outubro de 2005. Amostras de folhas frescas foram coletadas do campo e encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular, Genômica e Proteômica (GEMPRO) pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA /

UFAL), localizado no município de Rio Largo, estado de Alagoas, para fins de extração de DNA genômico total e posteriores análises biomoleculares.

Análise RAPD

Para extração do DNA genômico total foi utilizada metodologia proposta pelos autores, composto por CTAB 2% no tampão de extração.

Onze oligonucleotídeos iniciadores (IDT[®], Integrated DNA Technologies, Inc) foram testados e, destes, sete foram adotados nas reações RAPD por produzirem padrões consistentes e revelarem bom polimorfismo. Os oligonucleotídeos empregados no estudo encontram-se descritos na Tabela 2.

Cada reação de amplificação constou de um volume total de 50 μ L, consistindo de dNTP's Mix 200 μ M, Tampão PCR 1 X (Tris-HCl 50mM, KCl 20 mM), MgCl₂ 2mM, 0,5 μ M de cada iniciador, 8U de Taq DNA polimerase (Biosystems), 20 ng de DNA genômico, água Milli Q estéril. As amplificações foram conduzidas num termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research), empregando-se um programa com etapa inicial de pré-desnaturação a 92° C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 45 segundos a 92° C, 1 minuto e 30 segundos a 40° C e 1 minuto e 30 segundos a 72° C. Após, foi realizado um ciclo adicional de extensão final de 5 minutos a 72° C.

Os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de agarose 1,5% (p/v), submerso em tampão TBE (Tris-borato 89mM, EDTA 2mM), aplicando-se 3 V/cm durante 5 horas. Foi utilizado padrão de peso molecular de 1Kb (Promega) para análise dos fragmentos. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídeo (0,5 μ g/mL), visualizado sob luz UV e fotodocumentado através do Sistema Digital Kodak Science.

RESULTADOS

Os oligonucleotídeos iniciadores testados e selecionados para a análise produziram um total de 60 bandas polimórficas. Na Figura 1 podem ser observados os padrões eletroforéticos, produzidos pelos iniciadores OPA 9 e OPA 16, dos 10 genótipos empregados nas análises RAPD. Os resultados moleculares apresentados no presente trabalho encontram-se de acordo com os aspectos morfológicos observados em campo, onde foi constatada grande variabilidade fenotípica entre e dentre os genótipos estudados, sendo necessária uma avaliação qualitativa das plantas para detecção do padrão predominante e conseqüente escolha das amostras de trabalho.

Tais resultados comprovam que a metodologia empregada, incluindo extração de DNA e termociclagem das reações de amplificação por PCR, foram eficazes no estudo da variabilidade genética de mamona. O estabelecimento e otimização de protocolos para fins de análises moleculares com mamona são de essencial importância, podendo constituir uma ferramenta relevante nos

programas de melhoramento, uma vez que há uma enorme escassez de informações em nível de DNA desta espécie.

CONCLUSÕES

Por meio do presente estudo foi possível a seleção de sete oligonucleotídeos iniciadores capazes de gerar bandas polimórficas, as quais serão posteriormente empregadas na análise fenética dos 10 diferentes genótipos avaliados.

Tabela 1. Genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) utilizados no protocolo de extração de DNA genômico total.

GENÓTIPO	
1	CNPAM 2002 - 189
2	CSRN 142
3	CNPAM 2002 - 219
4	EPABA OURO
5	CNPAM 2002 - 135
6	CSRD 2
7	CNPAM 2002 - 154
8	CNPAM 2002 - 157
9	BRS 149 - NORDESTINA
10	BRS 188 - PARAGUAÇU

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas análises RAPD.

PRIMER	SEQUÊNCIA DO INICIADOR (5'→3')
OPA 1	CAG GCC CTT C
OPA 2	TGC CGA GCT G
OPA 3	AGT CAG CCA C
OPA 4	AAT CGG GCT G
OPA 7	GAA ACG GGT G
OPA 8	GTG ACG TAG G
OPA 9	GGG TAA CGC C
OPA 10	GTG ATC GCA G
OPA 16	AGC CAG CGA A
OPA 18	AGG TGA CCG T
OPA 20	GTT GCG ATC C

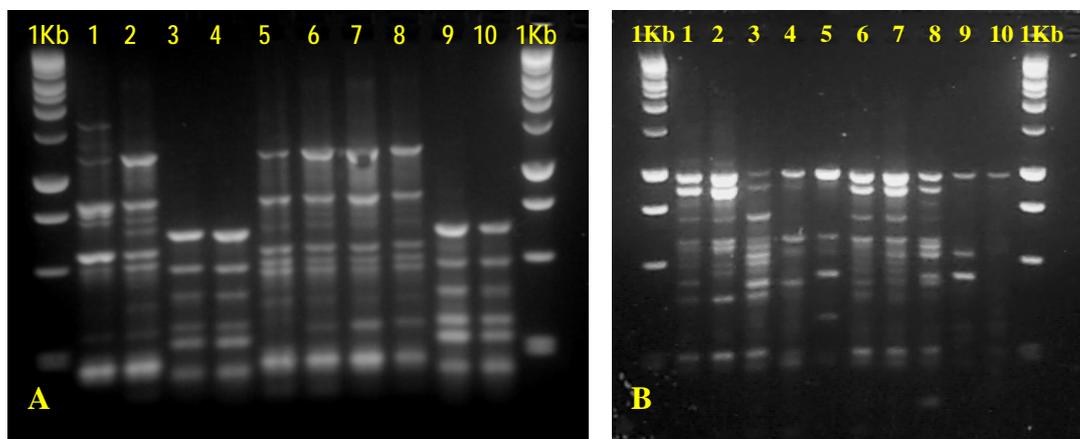


Figura 1. Perfis eletroforéticos gerados pelos iniciadores OPA 9 (A) e OPA 16 (B) dos 10 genótipos de mamona empregados no estudo de variabilidade genética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S. *Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (Ricinus communis L.) no Nordeste do Brasil*. Campina Grande, PB: MAARA/Embrapa-CNPA, (Circular técnico, 25), 1997, 52p.
- CRUZ, G.L. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Editora Civilização Brasileira S.A. 2a edição; Rio de Janeiro, RJ, 1982, 599p.
- 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 comunis* L.) baseada nas características das sementes. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 4, n. 2, 2004.
- SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N.V.; BARBOZA, M.Z. Mamona. In: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral - CATI – *Oleaginosas no Estado de São Paulo: análise e diagnóstico*. Campinas – SP: 1999. 39p., p.29-39, (CATI - Documento técnico, 107).