

# UFRB

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

LEILA ANDRADE BASTOS

DISSIMILARIDADE GENÉTICA EM CINCO  
CULTIVARES DE *Ricinus communis* L ATRAVÉS DE  
MARCADORES RAPD

CRUZ DAS ALMAS – BA

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DISSIMILARIDADE GENÉTICA EM CINCO**  
**CULTIVARES DE *Ricinus communis* L ATRAVÉS DE**  
**MARCADORES RAPD**

**LEILA ANDRADE BASTOS**

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Graduação em Ciências Biológicas.

Orientadora: Edna Lobo Machado

CRUZ DAS ALMAS – BA

2010

ii

## **Biblioteca Central / Sistema de Biblioteca da UFRB**

B327 Bastos, Leila Andrade.  
Dissimilaridade genética em cinco cultivares de ricinus communis l através de marcadores RAPD/ Leila Andrade Bastos.\_ Cruz das Almas - Ba, 2010.  
40 f.; il.

Orientador: Edna Lobo Machado

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.  
Área de Concentração: Ciências Biológicas.

I. Mamona – melhoramento genético. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.  
II.Título.

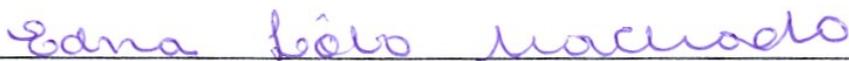
**CDD: 633.85**

Leila Andrade Bastos

ANÁLISE DE DISSIMILARIDADE GENÉTICA EM CINCO  
CULTIVARES DE *Ricinus communis* L. ATRAVÉS DE  
MARCADORES RAPD

Aprovado em: 17/12/2010

**BANCA EXAMINADORA**



---

Orientador: Profa. Me. Edna Lobo Machado

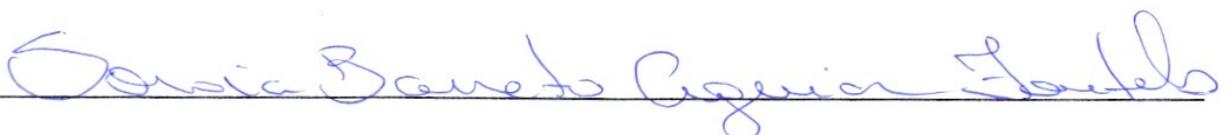
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - CCAAB



---

Membro Titular: Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB



---

Membro Titular: Dra. Soraia Barreto Aguiar Fonteles

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – CCAAB

**A Deus, aos meus pais (Lêda e Aloisio),  
aos meus irmãos (Leandro e Leonardo)  
e a minha madrinha (Maria do  
Carmo), dedico este trabalho.**

## **Agradecimentos**

*À Deus, por me conceder o fôlego da vida me sustentando em todos os momentos;*

*Aos meus pais, em especial à minha mãe, pelo amor, esforço, conforto e ensinamentos de coragem e determinação;*

*Aos meus irmãos, Leandro e Leonardo, pelo carinho e companheirismo;*

*À minha madrinha, Maria do Carmo, e todos os familiares, por estar sempre presente em minha vida, me incentivando;*

*Ao meu companheiro e amigo Ian Baraúna Mendes pela companhia, amor e apoio durante esse período;*

*À Professora Edna Lôbo Machado, pela orientação e dedicação na realização deste trabalho;*

*Ao meu amigo Agenildo, pela colaboração e responsabilidades compartilhadas durante a execução deste trabalho;*

*As companheiras Dr<sup>a</sup>. Cláudia Fortes e Aline pela contribuição neste trabalho;*

*À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade de realização do curso de Ciências Biológicas;*

*Ao Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO) pela utilização dos recursos disponíveis para o desenvolvimento deste trabalho;*

*À todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este sonho se tornasse real.*

“Meu filho, se você aceitar as minhas palavras e conservar os meus preceitos, dando ouvidos à sabedoria e inclinando o coração para o entendimento; se você invocar a inteligência e chamar o entendimento; se você procurar a sabedoria como dinheiro e a buscar como tesouro, então você entenderá o temor de Javé e alcançará o conhecimento de Deus.”

(Prov.2, 15)

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| Lista de Tabelas.....  | viii      |
| Lista de Figuras.....  | ix        |
| Lista de abreviaturas.....                                     | x         |
| Resumo.....  | xii       |
| Abstract.....  | xiv       |
| <br>   |           |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                      | <b>01</b> |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                           | <b>03</b> |
| 2.1. Mamona.....   | 03        |
| 2.1.1. Taxonomia.....  | 03        |
| 2.1.2. Origem.....   | 03        |
| 2.1.3. Descrição Botânica.....                                 | 03        |
| 2.1.4. Distribuição.....                                       | 05        |
| 2.1.5. Importância Econômica.....                              | 05        |
| 2.1.6. Melhoramento Genético.....                              | 06        |
| 2.1.7. Marcadores Moleculares.....                             | 07        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                              | <b>09</b> |
| 3.1. Local de Estudo.....                                      | 09        |
| 3.2. Coleta da Amostra .....                                   | 09        |
| 4.3. Extração de DNA.....                                      | 10        |
| 4.4. Quantificação do DNA genômico.....                        | 11        |
| 4.5. Seleção prévia de iniciadores ( <i>Primers</i> RAPD)..... | 11        |
| 4.6. Condições de RAPD-PCR e eletroforese .....                | 12        |
| 4.7. Análise dos dados.....                                    | 12        |
| <b>4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>                           | <b>13</b> |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>                                       | <b>17</b> |
| <b>6. REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS.....</b>                        | <b>18</b> |

## LISTA DE TABELAS

- 1 - Primers RAPD, total de bandas amplificadas e número de bandas polimórficas.....15
- 2 - Valores das médias de dissimilaridade genética entre os pares de cultivares, gerados pelos coeficientes de Jaccard.....16

## LISTA DE FIGURAS

- 1 – DNA Genômico de *Ricinus communis* L. visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As duas primeiras bandas são 100 e 200ng, respectivamente, de DNA lambda.....13
- 2 – Ajuste da concentração das amostras para 5ng/  $\mu$ L-1. As duas primeiras bandas são 100 e 200ng, respectivamente, de DNA lambda.....13
- 3 – Padrão de bandas obtidas por marcador RAPD em cultivares de mamoneira através dos *primers* aleatórios OPJ01-OPJ07.....14
- 4 – Padrão de bandas obtidas por marcador RAPD em cultivares de mamoneira através dos *primers* aleatórios OPJ14-OPJ20.....14
- 5 - Dendograma de agrupamento UPGMA gerado na análise dos marcadores RAPD nos genótipos de mamona, baseados no coeficiente de similaridade de Jaccard.....17

## LISTA DE ABREVIATURAS

CTAB - *Cetyltrimethylammonium bromide* ou brometo de cetil trimetil amônio;

DNA - Ácido desoxirribonucleotídico;

dNTP - Desoxirribonucleotídico trifosfatado;

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético;

NaCl - Cloreto de sódio;

Pb - Pares de base;

PopGene - *Population genetic Analysis* ou análise genética da população;

RAPD - *Random amplified polymorphic DNA* ou polimorfismo do DNA amplificado ao acaso;

Rnase - commonly abbreviated Rnase ou ribonuclease;

TAE - Tris-acetato-EDTA;

TBE - Tris Borato EDTA;

TE - Tris-EDTA;

Tris/HCl - Tris hidrocloreto.

# DISSIMILARIDADE GENÉTICA EM CINCO CULTIVARES DE *Ricinus communis* L ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD

## RESUMO

Autor(a): Leila Andrade Bastos

Orientador(a): Edna Lobo Machado

A mamoneira é uma oleaginosa de grande importância econômica. No Brasil é uma planta típica de região semi-árida, representando no Nordeste 90% da área plantada. A grande variabilidade apresentada por esta cultura é observada em características botânicas e agronômicas podendo ser avaliada, também, através de polimorfismo de DNA, com o emprego de marcadores moleculares, tais como RAPD. A técnica de marcadores de DNA, conhecida como RAPD, tem sido usada para estimar a diversidade genética aumentando a eficiência dos programas de melhoramento genético. Sendo assim, o presente estudo objetivou a utilização de marcadores RAPD para fins da avaliação da dissimilaridade genética entre cinco cultivares de mamoneira. Para tanto, DNA total foi extraído e quantificado do tecido foliar *Ricinus communis* L. Um total de vinte primers aleatórios foi usado na genotipagem das cultivares. Por se tratar de um marcador dominante, a leitura se deu por (0) ausência ou (1) presença de banda no gel de agarose 1,5%. Foi identificado um total de 202 marcadores, sendo 74 polimórficos (36,6%) e 128 monomórficos (63,4%). O primer OPD 05 gerou 18 bandas (o maior número entre os iniciadores utilizados) e o primer OPD 03, apenas 5. A dissimilaridade genética entre as cultivares foi calculada a partir do coeficiente de *Jaccard* utilizando-se o método de agrupamento UPGMA com auxílio do programa GENE. Um dendograma foi gerado a partir do Programa MEGA4. Através das análises, foi possível observar a formação de dois grandes grupos: GRUPO I formado pelas cultivares EBDA MPA 17, EBDA MPA 18, EBDA MPA 26 e EBDA MPA 31 e o GRUPO II constituído pela cultivar EBDA MPA 11. As cultivares EBDA MPA 11 e EBDA MPA 26 foram as mais divergentes. Assim, observa-se que há divergência genética entre as cultivares avaliadas. As combinações promissoras são esperadas entre as

cultivares EBDA MPA 11 e EBDA MPA 26. Os marcadores moleculares do tipo RAPD são eficientes para caracterizar a variabilidade genética existente entre genótipos de mamona.

**Palavra-chave:** *Ricinus communis* L., marcadores RAPD, divergência genética.

# GENETIC DISSIMILARITY OF FIVE CULTIVARS OF *Ricinus communis* L. USING RAPD MARKERS

## ABSTRACT

Author: Leila Andrade Bastos

Adviser: Edna Lobo Machado

Castor bean is an oilseed of great economic importance. This plant in Brazil is a typical plant from the semi-arid region, which represents 90% Northeast of the planted area. The great variability shown by this crop is seen in botanical and agronomic characteristics and can be also evaluated by DNA polymorphism, with the use of molecular markers such as RAPD. The technique of DNA markers, known as RAPD, has been used to estimate genetic diversity by increasing the efficiency in breeding programs. Thus, this study aimed to use RAPD markers for assessing the genetic dissimilarity among five cultivars of castor beans. Total DNA was extracted and quantified from *Ricinus communis* L. Leaf tissue a total of twenty random primers were used for genotyping cultivars. Since it is a dominant marker, bands were by (0) given (1) for presence a 1.5% agarose gel. We had a total of 202 markers (74 polymorphic (36.6%) and 128 monomorphic (63.4%) bands). The OPD 05 primer generated 18 bands, the largest number among the initiators used, and the primer OPD 03, only 5. The genetic distance between cultivars was calculated using the Jaccard's coefficient UPGMA clustering method and the GENE software. A dendrogram was generated by the MEGA4 Program. Chemical analysis identified the formation of two groups: using Group I, formed by cultivars EBDA MPA 17, MPA 18 EBDA, EBDA EBDA and MPA 26 MPA 31 and group II consisting of 11 cultivars EBDA MPA. Cultivars EBDA EBDA MPA MPA 11 and 26 were the most dissimilar. Thus, it is observed that there is among cultivars. Promising combinations are expected between cultivars EBDA EBDA MPA 11 and MPA 26. Molecular markers such as RAPD are effective to characterize the genetic variability among castor genotypes.

**Key word:** *Ricinus communis* L., RAPD, genetic diversity.

## DISSIMILARIDADE GENÉTICA EM CINCO CULTIVARES DE *Ricinus communis* L. ATRAVÉS DE MARCADORES RAPD

### 1. INTRODUÇÃO

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

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

A mamoneira possui elevado valor socioeconômico, seus produtos e subprodutos são utilizados na indústria ou na agricultura, além de apresentar perspectivas de uso como fonte energética sob a forma de biodiesel (COSTA et al., 2006). No sistema de produção adotado pelos agricultores quase todas as atividades empregam mão-de-obra familiar, sendo assim, a cultura é típica de propriedades pequenas (NÓBREGA, 2009). Neste contexto, a cultura da mamona deve se consolidar como o principal componente do biodiesel a ser produzido no Brasil, podendo se tornar em curto prazo, no cenário do Nordeste, um dos principais componentes do programa nacional de biodiesel. Assim, torna-se imprescindível à implementação de estratégias que possibilitem o desenvolvimento de novos genótipos, com maiores teores de óleo e ajustados às condições do Recôncavo Baiano. Isto possibilitará também a consolidação da cultura da mamona nesta região de forma a garantir, no futuro, a expansão do agronegócio dessa oleaginosa no estado da Bahia. Segundo Severino et al.

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

De acordo com Cunha et al. (2006), 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. 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. No entanto, 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, Figueiredo et al. (2004), acredita que a caracterização e avaliação das diferentes variedades disponíveis comercialmente e de populações naturais, quanto ao seu potencial de uso, são consideradas essenciais no estabelecimento de diferenças ou semelhanças, imprescindíveis para os programas de melhoramento da espécie. O presente estudo tem por finalidade a avaliação da dissimilaridade genética, através de marcadores RAPD, entre cinco cultivares de *Ricinus communis* L.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. MAMONEIRA**

#### **2.1.1. Taxonomia**

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) pertencente à família das Euforbiáceas, tribo Acalypheae, subtribo Ricininae e ao gênero *Ricinus*. (WEBSTER, 1987; 1994). Com base na variabilidade existente nessa espécie, Bayma (1958), sugeriu que o gênero seria composto por sete variedades. Em 1986, Popova e Moshkin, reuniram os tipos, além das cultivares e híbridos, em seis subespécies e 25 variedades botânicas. Savy-Filho (1999), reconheceu a existência de apenas quatro subespécies, bem como 25 variedades botânicas.

#### **2.1.2. Origem**

Existem relatos de sementes e de óleo de *R. communis* no Antigo Egito a mais de 4000 anos (MOSHKIN, 1986). Muitos pesquisadores acreditam numa origem africana para a mamoneira, enquanto outros afirmam que sua origem seria asiática (HEMERLY, 1981). A Etiópia e o leste da África são apontados como os principais centros de diversidade (MOSHKIN, 1986). No Brasil, acredita-se que a mamoneira foi introduzida durante a colonização portuguesa, por ocasião da vinda dos escravos africanos (BELTRÃO et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002), com a finalidade de utilizar seu óleo na iluminação e para lubrificação de eixos de carroça (CHIERICE e CLARO NETO, 2001).

#### **2.1.3. Descrição botânica**

De acordo com Popova & Moshkin (1986) e Mazzani (1983), a mamoneira possui grande variação no hábito de crescimento, sendo geralmente, arbustiva capaz de atingir até três metros de altura. Entretanto, esse processo depende de fatores genéticos e ambientais e viver mais de dez

anos.

O seu sistema radicular é do tipo axial, com uma raiz principal pivotante e as demais raízes laterais. Em condições de baixa umidade do solo, a raiz principal atinge uma maior penetração e as raízes secundárias assumem caráter bem desenvolvido de particular importância para as variedades resistentes à seca (MAZZANI, 1983).

O caule pode apresentar grande variação, especialmente, na coloração e presença de cera. Observa-se o crescimento do ramo principal, verticalmente, sem ramificação, até o surgimento da primeira inflorescência, o que, em alguns genótipos, segundo Baldanzi et al. (2003), ocorre somente após a formação de seis nós.

As folhas são simples, digitilobadas, denticuladas, apresentando pecíolos longos e profilaxia alternada. As principais alterações nas folhas de mamoneira são cor, serosidade, número de nervuras principais, comprimento do pecíolo, número de glândulas e na profundidade dos lóbulos (MAZZANI, 1983).

Os frutos são produzidos isoladamente, em cachos, na extremidade dos ramos (BANZATTO e ROCHA, 1965) e podem ser deiscentes ou indeiscentes, tricocas, na sua maioria com acúleos, triloculares, com sementes que variam de tamanho, formato, cor e teores de óleo (SAVY-FILHO, 1999; BELTRÃO et al., 2001).

É uma planta monóica. As flores femininas ocupam a porção superior e a masculina a porção basal da inflorescência, proporcionando dois tipos de reprodução: autofecundação e fecundação cruzada, sendo sua polinização geralmente anemófila (SAVY-FILHO, 1999; BELTRÃO et al., 2001). A quantidade de flores femininas e masculinas, bem como a produção da planta, está diretamente ligada às condições ambientais, tipos de solo e idade da planta. Quando as condições ambientais estão adequadas proporcionam o desenvolvimento de flores femininas e quando são desfavoráveis favorecem o desenvolvimento de flores masculinas (WEISS, 1983). Em condições normais, a mamoneira desenvolve adequadamente em climas quente e úmido. A temperatura ideal é de 20°C a 30°C, e a exigência hídrica no período vegetativo é de, no mínimo, 100 mm de chuva por mês (HERMELY, 1981; CARVALHO,

1988; SAVY-FILHO, 1999).

#### **2.1.4. Distribuição**

A mamoneira também conhecida no Brasil como carrapateira, enxerida e palma-crísti é uma planta xerófila e heliófila explorada comercialmente entre as latitudes 40°N e 40°S (AZEVEDO et al, 2001). Esta oleaginosa possui fácil propagação, adaptação e estabelecimento em várias regiões e pode ser encontrada como planta nativa em diferentes partes do mundo.

No final do século XIX, o Brasil foi o maior produtor mundial de mamona, atingindo cerca de 500 mil toneladas (MAMONA, 2003). Porém, durante quase toda a década de 1990 a cultura foi marginalizada devido, principalmente, aos baixos preços, ao difícil manejo das plantas (com até 3 metros de altura) e ao baixo rendimento do óleo, cerca de 24% (ALVES et al., 2004).

A monocultura no Brasil tem a maior produção no Nordeste se destacando o Estado da Bahia como principal produtor, ocupando na safra de 2004/2005 uma área de aproximadamente 160.000 hectares (CONAB, 2005). Entretanto, sua produtividade é extremamente baixa devido à exploração insustentável dos recursos naturais, do uso inapropriado das terras e da falta de tecnologias modernas aplicadas à agricultura.

#### **2.1.5. Importância econômica**

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

As folhas da mamona podem ser utilizadas como alimento na sericultura ou adicionadas à forragem, após a desintoxicação, visando o aumento da lactação em vacas (LOUREIRO, 1962). Da sua haste é possível a extração de fibra e celulose, usadas na confecção de tecidos grosseiros e papel. Sua semente esmagada compreende um dos componentes da torta de mamona, juntamente com os restos culturais da planta, sendo utilizado como

fertilizante orgânico com grande capacidade de restauração de solos desgastados, nematicida, e após tratamento para a retirada de produtos tóxicos, na alimentação animal (HERMELY, 1981; BATISTA et al., 1997; SAVY-FILHO, 1999).

Contudo, o principal produto extraído da mamona e mais importante economicamente é seu óleo, único glicerídico da natureza, também conhecido como óleo de rícino (BELTRÃO et al., 2002). Em geral as sementes da mamoneira possui um teor de óleo variando de 35 a 55% (VIEIRA et al., 1997), mas a maior parte das cultivares plantadas comercialmente no Brasil possuem teor variando de 45 a 55%, o qual apresenta grande potencial de uso, como na fabricação de tintas, vernizes, óleos secativos, solventes, nylon, lubrificantes, graxas especiais, cosméticos, ceras, próteses, dentre outros (FREIRE et al., 2006). Outra importante característica do óleo de mamona é sua solubilidade em solventes como etanol, metanol, éter, clorofórmio e no ácido acético glacial (FREIRE et al., 2001). Isso ocorre devido à presença do grupo hidroxila na ricinoleína e no carbono 12 (MAZZANI, 1983; WEISS, 1983).

Com o avanço das pesquisas sobre o biodiesel e sua importância, e com a criação do Programa Nacional do Biodiesel, a mamona surgiu como uma das principais matérias-primas, embora existam outras opções de grande importância econômica como o babaçu, o óleo de palma, a soja, o dendê, dentre outras oleaginosas. Uma das vantagens que o óleo de mamona apresenta com relação aos outros óleos utilizados para o Biodiesel e que ele não entra na cadeia alimentícia, sendo um produto estritamente industrial.

#### **2.1.6. 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) com o objetivo de desenvolver cultivares de mamoneira mais produtivas, com maiores níveis de resistência às doenças e pragas e com outras características desejáveis. No estado da Bahia, os trabalhos envolvendo melhoramento genético da mamoneira foram iniciados na década de 60 pelo Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do

Leste – IPEAL, com sede em Cruz das Almas (BELTRÃO, 2006).

O conhecimento da diversidade genética entre germoplasma, elite e adaptados, pode melhorar a eficiência na identificação de combinações parentais que gerem populações segregantes com máxima variabilidade genética para a seleção. Caracteres fenotípicos, tradicionalmente usados para estimar a diversidade genética, são de importância limitada, uma vez que podem ser influenciados pelo ambiente e estágio de desenvolvimento da planta (TATINENI et al., 1996).

A variação de diferentes combinações de alelos dentro das espécies gera a diversidade genética (FITZGERALD, 1989). Essa diversidade pode ser definida como a distância entre as populações, indivíduos ou organismos, com base em uma série de características de aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e/ou moleculares (AMARAL JUNIOR e THIEBAUT, 1999).

O melhoramento de plantas envolve diferentes técnicas e supõe a obtenção de uma nova cultivar, cujas vantagens comparativas justifiquem sua distribuição comercial, seja por sua produtividade, resistência a determinada moléstia, tolerância a acidez do solo, adaptação a determinada condição edafoclimática, qualidade do produto, dentre outras (SAVY FILHO, 2005).

Alguns fatores que influenciam o bom resultado de uma cultura numa determinada região relacionam-se ao controle dos fatores abióticos (umidade, e fertilidade do solo) e os fatores bióticos (pragas, doenças e plantas daninhas) (AZEVEDO et al., 1998). Algumas doenças e pragas podem atacar importantes regiões produtoras do país podendo causar perdas consideráveis na produção como o mofo cinzento, murcha-de-fusarium, lagarta-rosca (*Agrotis* spp e *Thalesa citrina*) e lagarta das folhas (*Spodoptera latifascia*) (LIMA et al., 2001; SOARES et al., 2001). Vários problemas inerentes ao cultivo da mamona já foram solucionados pelo melhoramento genético, tais como aumento na 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 (FREIRE et al., 2001).

### 2.1.7. Marcadores Moleculares

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a tendência do melhoramento genético de plantas é a integração de técnicas clássicas com os avanços da biotecnologia, levando-se em consideração as vantagens e limitações de cada uma delas. Nesse contexto, a tecnologia de marcadores moleculares pode contribuir significativamente para o conhecimento básico da cultura e do caráter estudado, assim como, a geração e desenvolvimentos de produtos melhorados. Além disso, a utilização de marcadores moleculares no melhoramento de plantas possibilita o acesso direto ao genótipo, permitindo a seleção de indivíduos superiores. Paiva (2003), afirma que recentemente a tecnologia de marcadores moleculares tem permitido realizar análises filogenéticas e caracterização de genomas para plantas cultivadas em diversos organismos. Segundo Borém e Caixeta (2009), a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) utiliza um único *primer*, mais curto, normalmente de dez nucleotídeos, e de seqüência arbitrária, para realizar a amplificação. Nesta etapa, duas regiões do genoma complementares ao *primer* devem estar separadas por até 4.000 pb e em orientações opostas. Com isso, são amplificados fragmentos de DNA distribuídos ao acaso no genoma, sem a necessidade do conhecimento prévio da seqüência de DNA.

Os marcadores RAPD apresentam como característica básica a dominância. Sendo assim, este tipo de marcador não permite distinguir indivíduos homozigotos dominantes de heterozigotos em uma população. A presença de determinada banda no gel pode ser devida à amplificação dos dois alelos de um loco, no caso de um indivíduo diplóide homozigoto, ou de apenas um alelo, quando a banda é originada da amplificação de um indivíduo heterozigoto. Apesar da grande maioria dos marcadores RAPD apresentarem comportamento dominante, em alguns casos, pode ocorrer amplificação de marcadores co-dominantes com o mesmo *primer*. A co-dominância neste caso resulta de inserções ou deleções de poucos pares de bases entre os dois sítios adjacentes de pareamento do *primer* (BORÉM e CAIXETA, 2009).

As grandes vantagens da técnica RAPD são a simplicidade, pois é fácil de ser executada, a rapidez na obtenção de dados, o custo relativamente reduzido, em relação a outras técnicas moleculares, e a aplicabilidade imediata

a qualquer tipo de organismo. Essa técnica também apresenta algumas desvantagens, uma das principais limitações é o baixo conteúdo de informação genética em cada loco, e a baixa reprodutibilidade dos resultados, que geralmente ocorre entre laboratórios, diminuindo a confiabilidade de outros pesquisadores nos marcadores detectados pela técnica (BORÉM E CAIXETA, 2009).

Inúmeros estudos de diversidade genética, identificação de genes de interesse, análises filogenéticas e caracterização de germoplasma foram conduzidos com sucesso pela técnica de RAPD. Entretanto, pesquisas envolvendo a utilização de marcadores moleculares visando estimar a variabilidade genética da mamona, ainda são poucos. Vidal et al. (2005), avaliaram cinco cultivares de mamoneira com a finalidade de selecionar *primers* RAPD capazes de caracterizar genótipos dessa cultura. Cunha et al. (2006), por sua vez, caracterizaram 10 cultivares de mamona no município de Igaci, em Alagoas, utilizando-se de sete *primers* RAPD. Anthonisen (2007), objetivando diferenciar 15 cultivares de mamona, fez uso de 13 *primers* RAPD.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Local de Estudo**

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

### 3.2. Coleta das Amostras

O material foliar das cinco cultivares de *Ricinus communis* L. provenientes da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), permaneceram 25 dias no campo, após o plantio, até serem coletadas para a extração de DNA.

Para as análises realizou-se coletas de folhas, jovens e saudáveis, de cinco cultivares de mamoneira: EBDA MPA11, EBDA MPA17, EBDA MPA18, EBDA MPA 26 e EBDA MPA31. Para cada cultivar utilizou-se amostra foliar de dez plantas colhidas ao acaso. O tecido foliar coletado foi identificado de acordo com sua cultivar, armazenados em papel alumínio e conservados em gelo durante o transporte para o laboratório. Este material foi desinfestado em solução de hipoclorito de sódio a 1%, enxaguado com água destilada em abundância e armazenado em biofreezer até o momento da extração de DNA.

### 3.3. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações. Para tanto, macerou-se, aproximadamente, 300mg de tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Após, transferiu-se o macerado para microtubos de 2mL e adicionou-se 700 µL da solução tampão de extração a 65°C e homogeneizou-se suavemente por inversão durante 5 minutos. Os microtubos foram encubados em banho maria a 65°C por 45 minutos, e homogeneizados a cada 15 minutos. Após, os microtubos foram retirados do banho maria e adicionou-se 700 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O material foi homogeneizado suavemente e em seguida centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Decorrido os 10 minutos foi coletado o sobrenadante e transferido para novos tubos devidamente identificados. As etapas de extração com clorofórmio: álcool isoamílico foi repetido para uma maior purificação do material. Ao sobrenadante foram adicionados 400 µL de álcool isopropílico gelado, equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado, e homogeneizado suavemente, incubado a -20°C por 20 minutos. Decorrido o tempo, o precipitado foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O DNA foi

ressuspendido 600  $\mu$ L de tampão TE (Tris-HCl 10mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) e adicionado 200  $\mu$ L de acetato de amônio a 7,5M. Os tubos foram fechados e misturados suavemente por inversão para homogeneizar a solução e incubados no gelo por 15 minutos (com cuidado para não congelar). Após os 15 minutos no gelo, foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante transferido para tubos novos de 2ml. Foi adicionado aos novos tubos que continham o sobrenadante 800  $\mu$ L de etanol absoluto e misturados suavemente por inversão, em seguida incubado por uma hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Passada uma hora de incubação à  $-20^{\circ}$  os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12.000 rpm, em seguida lavou-se o precipitado com 500  $\mu$ L de etanol 70% (v/v) e centrifugados novamente nas mesmas condições anteriores por 3 minutos. O precipitado foi secado de um dia para o outro e ressuspendido em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) mais um  $\mu$ L de RNase (10mg/ml), colocado em banho Maria a  $37^{\circ}\text{C}$  durante uma hora. As amostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4. Quantificação do DNA genômico**

Para verificação da qualidade e quantidade do DNA extraído, um total de 3 $\mu$ l do DNA foi adicionado a 5 $\mu$ l de tampão da amostra (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo e submetido à eletroforese por aproximadamente uma hora e vinte minutos a 80 vts. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa com um DNA de concentração conhecida (DNA lambda-Invitrogen). Após quantificação, a concentração das amostras foi ajustada para 5ng. $\mu$ L<sup>-1</sup> através da diluição destas em Tampão TE (Tris HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1,0mM ), a fim de realizar as reações de RAPD-PCR (Reação de polimerização em cadeia).

### **3.5. Seleção prévia de iniciadores (*Primers* RAPD)**

Foi efetuada uma triagem de *primers* com bom padrão de amplificação. Para tanto, foram selecionadas três cultivares diferentes. Os iniciadores da *Operon Technologies* foram escolhidos aleatoriamente. Desses, foram

utilizados os iniciadores que produziram padrões consistentes e foram aparentemente indicadores de polimorfismo.

### 3.6. Condições de RAPD-PCR e eletroforese

Um total de 40 *primers* arbitrários foi utilizado nas reações de RAPD-PCR com a finalidade de selecionar os *primers* mais promissores na detecção de polimorfismo em *Ricinus communis* L. para futura análise de divergência. Cada reação de amplificação foi preparada em um volume final de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão de PCR 10X (50 mM tris-HCL, 20 mM KCL), 1,0 µL de dNTP's (25mM) Mix, 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2,5 µL de *primer* aleatórios (*Operon Tecnologia*), 1 µL de Taq DNA polimerase (5U.µL<sup>-1</sup>) e 25 ng.µL<sup>-1</sup> de DNA genômico e água Mili-Q q.s.p. As amplificações foram conduzidas em um termociclador Biocycler MJ96+/MJ96G (Biosystems), empregando-se um programa com dois ciclos iniciais de 94°C por 1 minuto, 35°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 35°C e 1 minuto a 72°C com uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Sendo a temperatura então reduzida a 4°C até a retirada das amostras do termociclador. Os fragmentos amplificados foram revelados em gel de agarose 1,5% (p/v), submerso em tampão TBE (89 mM Tris-borato, 2mM EDTA), a 100V durante 3 horas. Utilizou-se padrão de peso molecular de 1Kb (Promega) para análise dos fragmentos. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>), visualizado com luz UV e fotodocumentado por meio do Sistema Digital Kodak Science.

### 3.7. Análise dos dados

Os fragmentos de DNA amplificados foram computados como presença (1) ou ausência (0) de bandas. A partir dos *loci* analisados, foi construída uma matriz binária. A similaridade genética entre as cultivares foi calculada a partir do coeficiente de *Jaccard* [ $s_{ij} = a/(a+b+c)$ ], em que: a é o número de concordâncias do tipo 1 1; b é o número de discordância do tipo 1 0; e c é o número de discordância do tipo 0 1. A partir dos dados obtidos, através dos marcadores RAPD, gerou-se uma matriz de dissimilaridade entre as cultivares,

sendo utilizado o programa GENES (Cruz, 2003). O agrupamento dos genótipos realizou-se pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Averages*) (SNEATH & SOKAL, 1973) gerando um dendrograma com auxílio do software MEGA 4 (TAMURA et al. 2007).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo Doyle e Doyle (1987), mostrou-se eficiente na extração de DNA genômico da mamoneira conseguindo-se DNA de qualidade e em grande concentração (Figuras 1 e 2). A utilização de metodologias adequadas para a obtenção do DNA de *Ricinus communis* L. é de extrema importância, pois a caracterização bioquímica foliar desta espécie apresenta diversas classes de substâncias que constituem contaminantes potenciais durante o processo.

Após verificada a quantidade e qualidade do DNA, as amostras tiveram suas concentrações ajustadas para 5ng/  $\mu\text{L}^{-1}$ , Figura 2, a fim de viabilizar as reações de amplificação.

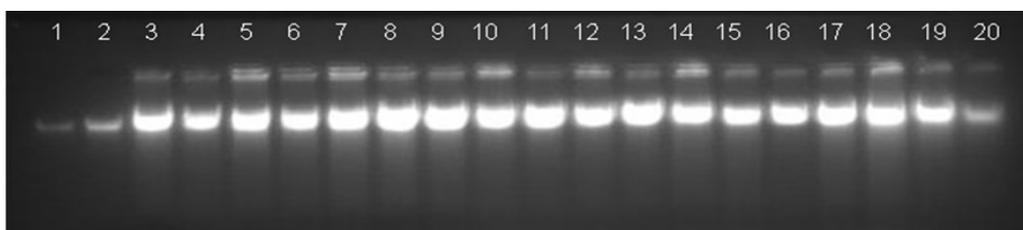


Figura 1 – DNA Genômico de *Ricinus communis* L. visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As duas primeiras bandas são 100 e 200ng, respectivamente, de DNA lambda.

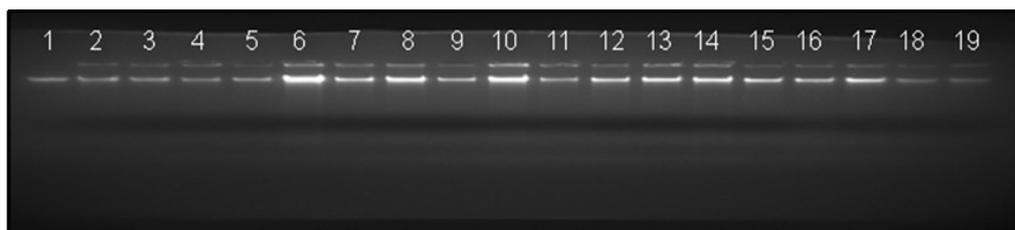


Figura 2 – Ajuste da concentração das amostras para 5ng/  $\mu\text{L}$ -1. A primeira banda é de 50ng de DNA lambda.

De um total de 40 *primers* arbitrários inicialmente testado nas reações RAPD-PCR, vinte tiveram um bom padrão de amplificação e mostraram-se promissores na detecção de polimorfismo para análise de divergência genética em mamoneira: Os vinte *primers* selecionados para genotipagem das cinco cultivares foram: OPA01; OPA02; OPAA03; OPB01; OPB07; OPB10; OPD02; OPD03; OPD05; OPD08; OPE01; OPE03; OPF02; OPF06; OPJ10; OPJ11; OPJ13; OPJ18; OPJ19; OPJ20 (Figuras 3 e 4 ).

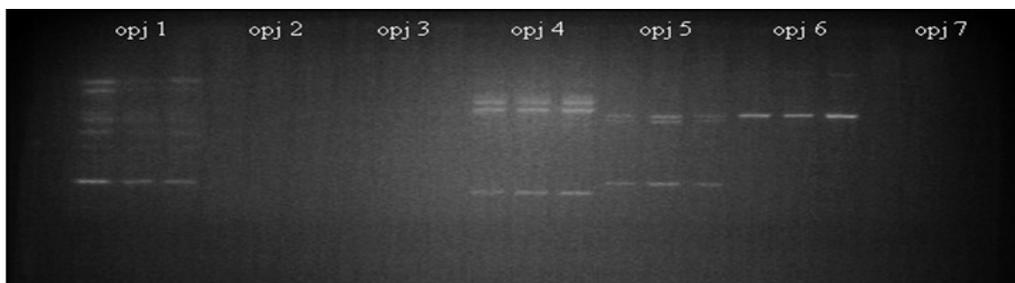


Figura 3 – Padrão de bandas obtidas por iniciadores RAPD em cultivares de mamoneira

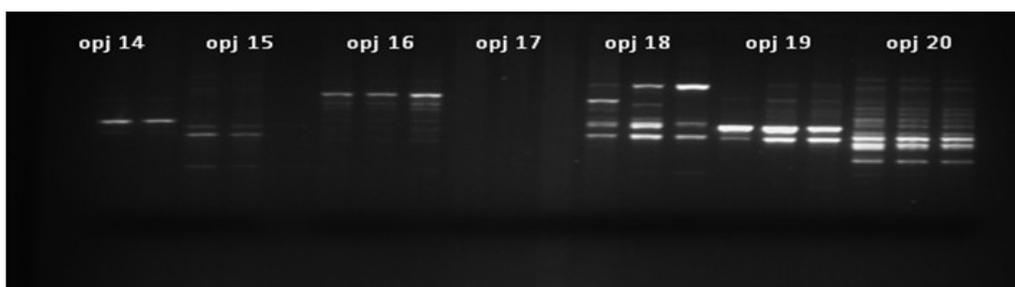


Figura 4 – Padrão de bandas obtidas por iniciadores RAPD em cultivares de mamoneira

Após a seleção dos *primers* aleatórios, realizou-se a genotipagem das cinco cultivares de mamoneira. Com a utilização dos vinte iniciadores RAPD foi possível detectar um total de 202 marcadores, sendo 74 polimórficos (aproximadamente, 36,6%) e 128 monomórficos (aproximadamente, 63,4%). Apenas os *loci* onde a leitura não foi duvidosa foram analisados. O primer OPD

05 gerou 18 bandas, o maior número entre os iniciadores utilizados, e o primer OPD 03, apenas 5 (Tabela 1). Resultado semelhante foi publicado por Cerqueira (2008), ao estudar cinco cultivares de mamoneira através 38 primers RAPD, observou que o polimorfismo foi de 22,45% de um total de 147 bandas, sendo 33 polimórficas e 114 monomórficas. Vidal et al. (2005), genotiparam cinco cultivares de mamoneira a partir da utilização de 47 primers RAPD, revelando 23,13% de polimorfismo através de 454 fragmentos, sendo a penas 105 polimórficos. No entanto, Anthonisen (2007) objetivando diferenciar 15 cultivares de mamoneira fez uso de 13 primers RAPD, encontrando 41% de polimorfismo num total de 120 bandas, sendo 49 polimórficas e 71 monomórficas. Portanto, os resultados encontrados em mamona por esses autores são semelhantes ao encontrado no presente trabalho.

Tabela 1 - *Primers* RAPD, total de bandas amplificadas e número de bandas polimórficas.

| Primer  | Total de bandas amplificadas | Número de de bandas polimórficas |
|---------|------------------------------|----------------------------------|
| OPA 01  | 10                           | 9                                |
| OPA 02  | 8                            | 7                                |
| OPAA 03 | 6                            | 2                                |
| OPB 01  | 7                            | 4                                |
| OPB 07  | 11                           | 3                                |
| OPB 10  | 10                           | 7                                |
| OPD 02  | 12                           | 2                                |
| OPD 03  | 5                            | 4                                |
| OPD 05  | 18                           | 7                                |
| OPD 08  | 10                           | 3                                |
| OPE 01  | 9                            | 1                                |
| OPE 03  | 8                            | 1                                |
| OPF 02  | 8                            | 2                                |
| OPF 06  | 13                           | 4                                |
| OPJ 10  | 11                           | 1                                |
| OPJ 11  | 9                            | 3                                |
| OPJ 13  | 6                            | 3                                |
| OPJ 18  | 13                           | 8                                |
| OPJ 19  | 13                           | 0                                |
| OPJ 20  | 15                           | 3                                |
| Total   | 202                          | 74                               |

A matriz de dissimilaridade (Tabela 2), mostra que a maior divergência encontrada foi entre as cultivares EBDA MPA11 e a EBDA MPA26 (coeficiente dissimilaridade de 0,739). As cultivares EBDA MPA18 e 17 e 26 e 18 apresentaram um menor coeficiente de dissimilaridade (0,375). A média da dissimilaridade observada foi de 0,51.

Tabela 2 - Valores das médias de dissimilaridade genética entre os pares de cultivares, gerados pelos coeficientes de Jaccard.

|            | EBDA<br>MPA11 | EBDA<br>MPA17 | EBDA<br>MPA18 | EBDA<br>MPA26 | EBDA<br>MPA31 |
|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| EBDA MPA11 | 0             | 0,682         | 0,516         | 0,739         | 0,662         |
| EBDA MPA17 |               | 0             | 0,375         | 0,500         | 0,507         |
| EBDA MPA18 |               |               | 0             | 0,375         | 0,388         |
| EBDA MPA26 |               |               |               | 0             | 0,413         |
| EBDA MPA31 |               |               |               |               | 0             |

O dendrograma obtido pelo método UPGMA encontra-se na Figura 5. No dendrograma a dissimilaridade genética média foi de 0,25 entre todas as cultivares genotipadas. Com base neste ponto de corte foram formados dois grandes grupos: GRUPO I composto pela cultivares EBDA MPA17, EBDA MPA18, EBDA MPA26 e EBDA MPA36 e GRUPO II pela cultivar EBDA MPA11. Dentre as cultivares analisadas e o número de marcadores detectados, os resultados sugerem as cultivares EBDA MPA11 e EBDA MPA26 como promissoras para hibridização em um programa de melhoramento genético da mamoneira. No entanto, para um resultado mais seguro, a cerca da variabilidade genética dessas cultivares, faz-se necessária a aplicação de um maior número de *primers* RAPD a fim de detectar um maior número de loci polimórficos. Resultado parecido com o descrito nesse trabalho foi observado por Costa et al. (2006), estimando a divergência genética entre nove cultivares de mamoneira por meio de estatísticas multivariadas com a formação de dois grupos: o grupo I formado por oito genótipos e o grupo II por apenas um genótipo. Já Cerqueira (2008), também utilizando a estatística multivariada para a análise da divergência genética entre cinco cultivares de mamoneira percebeu a formação de quatro grupos. O grupo I foi representado por dois genótipos, o grupo II, III e IV por apenas um cada.

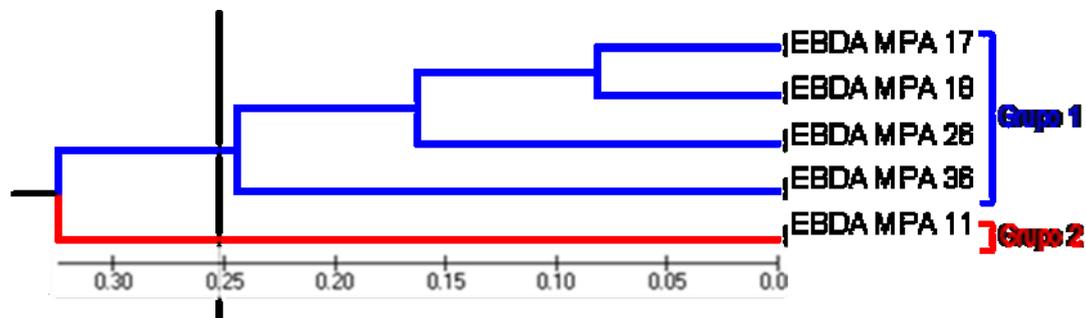


Figura 5. Agrupamento das cultivares de mamona produzido pela avaliação dos produtos da amplificação tipo RAPD.

Vale ressaltar, a importância de aplicação de um maior número de *primer* RAPD, para a identificação de mais loci polimórficos e, portanto, uma maior confiabilidade na indicação das cultivares mais dissimilares para programa de melhoramento genético da mamoneira.

## 5. CONCLUSÃO

- Há divergência genética entre as cultivares avaliadas;
- Combinações promissoras são esperadas entre as cultivares EBDA MPA 11 e EBDA MPA 26;
- Os marcadores moleculares do tipo RAPD são eficientes para caracterizar a variabilidade genética existente entre genótipos de mamona.

## 6. BIBLIOGRAFIAS

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

ALVES, M. O.; SOBRINHO, J. N.; CARVALHO, J. M. M.. **Possibilidades da mamona como fonte de matéria-prima para a produção de Biodiesel no Nordeste Brasileiro**. Documentos do ETENE – Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste. Serie documentos do ETENE No1. Banco do Nordeste do Brasil S.A.. Fortaleza, 2004.

AMARAL JUNIOR, A.T.; THIEBAUT, J. T. L.. **Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais**. Campos dos Goytacazes - Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, CCTA, 55 p., 1999.

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

AZEVEDO, D. M. P. de.; BELTRÃO, N. E. de M.; SANTOS, J. W.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. Z.; NÓBREGA, L. B. da.; VIEIRA, D. J.; PEREIRA, J. R. Efeito de populações de plantas no consórcio mamoneira/sorgo. **Revista Brasileira Oleaginosa e Fibrosa**, v. 2, p. 183-192, 1998.

AZEVEDO, D. M. P. De; BELTRÃO, N. E. De M.; SANTOS, J. W. Dos; LIMA, E. E.; BATISTA, F. A. S.; NÓBREGA, L. B. Da; PEREIRA, J. R. Efeito da população de plantas na eficiência dos consórcios algodoeiro perene milho e algodoeiro perene caupi. **Revista de Oleaginosas e Fibras**. Campina Grande, v.5, n.2, p. 319-330, 2001.

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

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

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

BAYMA, A. C. Mamona. Serviço de informação agrícola. **Produt Rur.**, p. 7-96, 1958.

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

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 d Piauí**. Campina Grande: Embrapa Algodão-CPAMN (CNPA: Documentos, 97), p. 44, 2002b.

BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, L. C.; VASCONCELOS, O. L.; VIEIRA, D. J. Fitologia. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, p 37-71, 2001.

BELTRAO, N. E. M.. **A cadeia da Mamona no Brasil, com Ênfase para o Segmento P & D: Estado da Arte**, Demandas de Pesquisa e Ações

Necessárias para o Desenvolvimento. Campina Grande: Embrapa Algodao, (Documentos), 2006.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, cap. 1, p. 27-30, 2009.

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

CATTANEO, L. F.; PEREIRA, M. G.; FILHO, G. A. S.; THIEBAUT, J. T. L. **Avaliação da divergência genética em mamoneiro com base na integração de marcadores RAPD e AFLP**, 2005.

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

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

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO. **Área total plantada de mamona no Brasil**. Disponível em: [www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br). Acesso em 17/05/2010.

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

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

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

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L.. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p. 13-15, 1987.

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

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

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

FITZGERALD, P. J. **Plant germplasm: an essential resource in our future**. In: cientific manegement of germplasma: characterization, evolution and enhancement. Italia: IBPGR Trating Courses: Lecture series 2, p.3-6, 1989.

FREIRE, E. C.; LIMA, E. F.; ANDRADE, F. P. **Melhoramento Genético**. In: O agronegócio da mamona no Brasil. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 229-252, 2001.

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

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

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

LIMA, E. F.; ARAÚJO, A. E.; BATISTA, F. A. S. **Doenças e seu controle.** In: Azevedo DMP and Lima E. F. O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 191-212, 2001.

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

**Mamona volta ao mapa da agricultura.** Circular Recopa, publicação mensal, maio/jun, 2003.

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

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

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

MOSHKIN, V. A. **Flowering and pollination.** In: MOSHKIN, V. A. Castor. New Delhi: Oxonian Press, p. 43-50, 1986.

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

PAIVA, L. B.; PEREIRA, M. G., FILHO, G. A. S.; DAHER, R. F.; PINTO, F. O.; GUIMARÃES, P. S.; OLIVEIRA, M. P. A.; VITÓRIA, A. P. **Divergência genética para genótipos de mamão (*Carica papaya* L.) com base em marcadores RAPD**, 2003.

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

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

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

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Applied Biostatistics, p. 237, 2000.

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

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

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

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

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

SOARES, J. J.; ARAÚJO, L. H. A.; BATISTA, F. A. S. **Pragas e seu controle**. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA E. F. O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 213-227. 2001.

TATINENI, V.; CANTRELL, R. G.; DAVIS, D. D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 186-192, 1996.

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

VIEIRA, R. de M.; AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. Z.; SANTOS, J. W.; DOURADO, R. M. F. **Competição de linhagens e cultivares de mamoneira no Nordeste do Brasil – 1993/96**. Embrapa-CNPA (Comunicado Técnico, 71). Campina Grande, p. 14, 1998.

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/livrorg/index.html](http://www.cpatsa.embrapa.br/catalogo/livrorg/index.html) Acesso em: 20 abr. 2010.

VIEIRA, R.M.; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S. **Diagnóstico e perspectivas da mamoneira no Brasil**. In: Reuniao tematica materias-primas oleaginosas no brasil: diagnostico, perspectivas e prioridades de pesquisa, Campina Grande. Anais... Campina Grande: Embrapa-CNPA/MAA/ABIOVE, p.139-150 (Embrapa-CNPA. Documentos, 63). 1997.

WEBSTER, G. L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Ann Miss Bot Gard**, v. 81, p. 33-144, 1994.

WEBSTER, G. L. The saga of the spurges: a review of classification and relationships in the Euphorbiales. **Bot J. Linn Soc**, v. 94, p. 3-46, 1987.

WEISS, E. A. **Castor**. In: WEISS, E. A. Oil seed crops. London: Longman, p.31-39, cap. 3, 1983.