



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE BIOLOGIA

LUCIEL DOS SANTOS FERNANDES

**Homozigose em população F₄ de mamoneira utilizando
marcadores microssatélites**

Cruz das Almas

2011

LUCIEL DOS SANTOS FERNANDES

**Homozigose em população F₄ de mamoneira utilizando
marcadores microssatélites**

Monografia apresentada à banca examinadora do curso de Bacharelado Ciências Biológicas como requisito para cumprimento da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II.

Cruz das Almas –BA

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

F363

Fernandes, Luciel dos Santos.

Homozigose em população F4 de mamoneira por meio de marcadores microsatélites / Luciel dos Santos Fernandes. – Cruz das Almas, BA, 2012.

40f.; il.

Orientadora: Simone Alves Silva.

Coorientadora: Edna Lôbo Machado.

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

1.Mamoneira – Melhoramento genético. 2.Marcadores genéticos. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II. Título.

CDD: 633.85

LUCIEL DOS SANTOS FERNANDES

HOMOZIGOSE EM POPULAÇÃO F₄ DE MAMONEIRA UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES

Trabalho de conclusão de curso (TCC), apresentado como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Data de aprovação: _____ de _____ de 2012

Comissão examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), de Luciel dos Santos Fernandes

Orientadora: Dr^a. Simone Alves Silva
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Campus Cruz das Almas)

Dr^a. Edna Lôbo Machado
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Campus Cruz das Almas)

Dr^a. Sônia Aparecida dos Santos
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Campus Cruz das Almas)

Dedico a minha mãe Maria da Conceição dos Santos, minhas irmãs Luciene dos Santos Fernandes, Luciele dos Santos Fernandes e minha sobrinha Celiny Fernandes de Brito, pelo seu amor carinho e atenção.

Agradecimentos

Ao grandioso Deus por permitir que esse trabalho fosse realizado.

A toda minha família, minha mãe dona Maria, meu pai Antônio, meu padrasto Roberto, minhas Irmãs Luciene, Luciele por existirem e por todo amor e carinho. E a minha amada sobrinha Celiny, por todo amor.

A minha orientadora Dr^a. Simone Alves Silva por ter dado a minha primeira oportunidade de pesquisa e pela orientação. A senhora contribuiu muito para minha formação, muito obrigado.

A minha Coorientadora Dr^a. Edna Lôbo Machado pela coorientação e por ter sido uma ótima professor e amiga desde o início. A senhora também contribuiu muito para minha formação, muito obrigado.

Aos companheiros de NBO Helison, Livia, Keyla e Camila, Ademilde, Diego, Magno Ronaldo, Bruno, Pedro, Dyane, Paulo, Laurenice, Tiago, Vanessa, Maria Selma e Elane muito obrigado pela ajuda e amizade, vocês serão sempre lembrados.

A todos os meus amigos de curso, especialmente Índira, Marilane, Emanuele, Leonardo Lobo, Rita de Cassia, Thayane, Patrícia, Kaliane, Antonio Pedro, Tassio Guedes, Emília, Mônica por tudo que fizeram por mim.

Aos meus amigos Jackson Junior, Leandro Teles, Leandro Azevedo, Daniel Invenção, Rodrigo França Rafael Pereira, Ariel Melo e Gilsimar Heliotério, pelos momentos de muita alegria e bagunça.

A minha amiga Joseane Santana pelo ombro amigo.

Aos meus amigos Alex Silva e Adriano Batista, pela longa amizade e companheirismo.

Aos técnicos da EMBRAPA, Epaminondas e Raimundo, pela atenção e apoio sempre que solicitados.

Aos técnicos Raoni e Ciro pela ajuda.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para execução dessa pesquisa, meus sinceros agradecimento.

Resumo

Os programas de melhoramento genético da mamoneira têm, dentre os objetivos, o desenvolvimento de cultivares homozigotas, com alto teor de óleo, associado à produtividade e resistência as pragas e doenças. A homozigose facilita o processo de seleção, pois, não ocorre segregação com progênies oriundas dos indivíduos selecionados, mantendo sua constituição genética, já que a maior parte dos alelos estará fixo. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi estimar o nível de homozigose de uma população F_4 de mamoneira por meio de marcadores microssatélites. Para tanto, a extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se folhas jovens e saudáveis. Foram testados 53 iniciadores SSR, e os polimórficos foram selecionadas para estimar o nível de homozigose dos 32 genótipos da população F_4 . Um total de 8 iniciadores microssatélites (15,09%), foram eficientes na detecção de bandas polimórficas. A porcentagem de homozigose entre os genótipos variou de 25 a 75%. Os genótipos NS82, NS89, NS92 e NS97 apresentaram os níveis de homozigose mais elevados (75%). Em geral, o nível de homozigose dos genótipos avaliados foi alto (52,7%). Esses valores sugerem que a homozigose na população F_4 encontra-se elevada, com boa fixação dos alelos homozigotos ao longo das gerações de autofecundações.

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

Abstract

A castor bean breeding programs objective is, to develop homozygous cultivars with high oil content, associated with productivity and resistance to pests and diseases. Homozygous facilitates selection process in advanced generations, because there is no segregation in progenies of selected individuals, maintaining their genetic constitution. Thereby, objective of this work was to estimate the level of homozygosity of a F4 population of castor using microsatellite markers. DNA extraction was performed using young and healthy leaves . Were tested 53 SSR primers and the polymorphic were selected to estimate homozygous level of 32 genotypes from F4 population. polymorphism were efficiently detected in 8 microsatellite primers (15.09%) . percentage of homozygous between genotypes varied from 25 a 75%. genotypes NS82, NS89, NS92 and NS97 showed the highest levels of homozygous (75%). Mean level of homozygous genotypes in F4 population was (52.7%). These values suggest that homozygous in F4 population is high, with good fixation of the homozygous alleles over self pollination generations .

Key- words: *Ricinus communis* L., Breeding, Selection.

Lista de tabelas

	Páginas
Tabela 1. Genótipos utilizados nas análises.	21
Tabela 2. Caracterização dos 23 pares de iniciadores microssatélites (SSR), desenvolvidos por Bajay (2009) utilizados nas reações de amplificação.	24
Tabela 3. Caracterização dos 30 pares de iniciadores microssatélites (SSR), desenvolvidos por Machado (2011), utilizados nas reações de amplificação.	26
Tabela 4. Concentrações de cloreto de magnésio (MgCl ₂) e temperaturas de anelamento utilizadas nos teste de amplificação por meio de iniciadores SSR.	28
Tabela 5. Porcentagem de homozigose entre os genótipos da população F ₄ de mamoneira a partir de marcadores microssatélites.	34
Tabela 6. Resultados dos testes do qui-quadrado (X ²) para os loci SSR na população F ₄ de mamoneira, proveniente do cruzamento entre as cultivares BRS Nordeste e Sipeal 28.	36

Lista de figuras

	Páginas
Figura 1. Quantificação do DNA Genômico de <i>Ricinus communis</i> L visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo. As duas primeiras bandas correspondem ao DNA lambda M1=100ng e M2=200ng. As amostras de 1 a 18 correspondem ao DNA genômico de 18 genótipos da população F ₄ .	23
Figura 2. Teste de amplificação utilizando os iniciadores SSR em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídeo, no qual cada duas amostras correspondem a um par de iniciadores.	31
Figura 3. Teste de amplificação utilizando os iniciadores, em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídeo, no qual cada três amostras correspondem a um par de iniciadores.	31
Figura 4. Teste de amplificação dos iniciadores microssatélites em gel de poliacrilamida a 7 % corado com nitrato de prata, sendo a primeira caneleta correspondente ao marcador de peso molecular <i>ladder</i> 50pb.	32
Figura 5. Perfil do gel de poliacrilamida a 7 % corado com nitrato de prata, mostrando a amplificação do par de iniciadores Rco2(A), Rco11 (B), Rco23 (C), Rco29 (D), com os genótipos dos indivíduos da população F ₄ de mamoneira. A primeira caneleta corresponde ao marcador de peso molecular <i>ladder</i> 50pb.	33
Figura 6. Perfil de gel de poliacrilamida a 7 % corado com nitrato de prata, mostrando a amplificação dos iniciadores RcoM2(E), RcoM11 (F), RcoM27 (G), RcoM28 (H), com os genótipos dos indivíduos da população F ₄ de mamoneira. A primeira caneleta corresponde ao marcador de peso molecular <i>ladder</i> 50pb.	34

Sumário

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. JUSTIFICATIVA	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Descrição geral da espécie <i>Ricinus communis</i> L.....	13
3.2. Aspectos socioeconômicos da mamoneira	15
3.3. O óleo de mamona: composição e possibilidade para produção de biodiesel e coprodutos.....	16
3.4. Melhoramento genético da mamoneira e homozigose.....	19
3.5. Marcadores microssatélites	21
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo geral.....	23
4.2. Objetivos específicos.....	23
5.MATERIAL E MÉTODOS.. ..	23
5.1. Material biológico.....	23
5.2. Extração de DNA.....	24
5.3. Quantificação e ajuste de concentração do DNA	25
5.4. Teste e seleção dos iniciadores microssatélites.....	26
5.5. Condições de amplificação dos iniciadores microssatélites	30
5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	31
5.7. Análise dos dados	32
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

1. Introdução

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie monotípica, pertencente a família Euforbeaceae, cuja as sementes contém um óleo rico em ácido ricinoleico (80 a 90%) (JEONG e PARK, 2009). O óleo de mamona é muito utilizado por causa de suas propriedades medicinais e lubrificantes. Industrialmente, o óleo de mamoneira é utilizada na manufatura de sabões, lubrificantes hidráulicos e de fluidos de freio, tintas, corantes, revestimentos, plásticos, ceras e polidores (DUKE, 1998). Além disso, o óleo de mamona pode ser utilizado para produção do biodiesel, o qual é cotado para substituir o diesel derivado do petróleo (BELTRÃO et al., 2007).

A mamoneira é nativa da região tropical da África, mas precisamente na região da Abissínia, porém, é cultivada em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (GOAVAERTS et al., 2000).

A mamona é ao mesmo tempo, uma espécie de autofecundação, quanto de fecundação cruzada, sendo considerada do tipo misto quanto ao seu sistema reprodutivo, pois, é uma espécie autógama, com frequência de alogamia que pode chegar a 40% (BELTRÃO et al., 2007; GOODARZI et al., 2011).

A mamoneira tem importância social e econômica para o Brasil, especialmente na região Nordeste, onde a cultura gera emprego e renda para o pequeno e médio agricultor (PASSOS, 2009). Contudo, o seu cultivo ainda é feito com sementes não melhoradas, que resultam em um alto grau de heterogeneidade e grande diversidade de tipos locais, com baixa produtividade, suscetibilidade a pragas e doenças e com baixo teor de óleo nas sementes (SANTOS et al., 2007).

As técnicas de biologia molecular, como os marcadores moleculares, permitem a identificação de variabilidade e aplicação de seleção em genótipos promissores, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento genéticos. A utilização deste tipo de técnica, possibilita realizar uma análise em nível de DNA e, identificar diretamente os genótipos sem influência do ambiente, gerando uma grande quantidade de informação. Ao mesmo tempo, a duração de programas de melhoramento pode ser reduzida, resultando em liberação mais rápida de cultivares e retorno mais acelerado do investimento aplicado (BORÉM e MIRANDA, 2009).

Dentre esses, os microssatélites são um dos marcadores mais informativos, em razão de sua elevada codominância, seu alto grau de polimorfismo,

reprodutibilidade e facilidade de interpretação, além de serem excelentes para o uso em seleção assistida, quando associados aos genes de interesse e/ou identificados as marcas individuais para cada gene (BORÉM e MIRANDA, 2009). Sendo assim, fez-se necessário estudar o comportamento dos genótipos de mamoneira em nível de DNA, visando obter cultivares mais produtivas, com porte reduzido e alto teor de óleo. Nesse sentido, a aplicação de marcadores microssatélites pode dar suporte ao programa de melhoramento genético da mamoneira, e auxiliar na identificação e seleção de genótipos superiores para caracteres adaptativos e componentes de rendimento.

2. Justificativa

A condição fundamental para execução de um programa de melhoramento genético é a existência de variabilidade genética. Na busca por variabilidade, são feitos cruzamentos que maximizam a diversidade genética e fenotípica da população. Tratam-se, portanto, de novas combinações de caracteres obtidos por meio de cruzamentos entre parentais divergentes. Nesse processo, a escolha dos parentais é muito importante para o êxito do programa de melhoramento, pois eles serão utilizados para gerar a variabilidade necessária. Assim, no melhoramento espera-se identificar e selecionar genótipos mais promissores, de modo que se obtenha novas cultivares agronomicamente superiores.

A presença de genótipos homozigotos superiores é importante para o programa de melhoramento, pois a seleção em gerações avançadas será feita em indivíduos homozigotos, sendo mais fácil prever o comportamento das progênes, uma vez que, não ocorrerá segregação dos alelos em homozigose. Dessa forma, a identificação do nível de homozigose alcançada nos pares de alelos em genótipos oriundos de população F_4 , dará um indicativo de quantos genes em heterozigose estão presentes na população em estudo e de quantas gerações de autofecundação será necessária avançar para alcançar a homozigose esperada.

Os marcadores microssatélites são importantes ferramentas que ajudam a monitorar a variabilidade genética existente na população, bem como são capazes de identificar a presença de genótipos homozigotos, uma vez que, a análise é feita ao nível de DNA, com maior rapidez e precisão e sem influência do ambiente. Sendo assim, a realização de um estudo com o intuito de estimar o nível de homozigose, em uma população avançada de mamoneira, é muito importante para o programa de melhoramento genético da mamoneira, pois, pode auxiliar mais efetivamente na seleção de genótipos homozigotos superiores.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Descrição geral da espécie *Ricinus communis* L.

A mamoneira *Ricinus communis* L ($2n= 20$) é uma espécie xerófila, heliófila, pertencente à família Euforbiácea, que possui o provável centro de origem na África, mais precisamente na Abissínia, sendo única no gênero *Ricinus* (BELTRÃO et al., 2007). No Brasil é conhecida vulgarmente por diversos nomes, entre os quais se pode citar: mamoneira, palma Christi, mamona, carrapateira, rícino, bafureira e figueira do inferno (BERTOZZO, 2009).

Essa espécie apresenta uma alta complexidade morfofisiológica, com grande variabilidade em diversas características tais como, nos portes (do anão ao arbóreo), caule e folhas de coloração verde, vermelha ou rosa, com presença ou não de cera, frutos inermes ou com espinhos, deiscentes ou indeiscentes, sementes de vários tamanhos e colorações, diferentes teores de óleo, variações no número e tipos de flores nas inflorescências e outros (SOUZA e LORENZI, 2008).

Embora a mamoneira tenha elevada plasticidade fenotípica e ampla adaptação a vários ambientes, as variações ambientais influenciam o desempenho agrônômico da cultura (SAMPAIO FILHO, 2009). A altitude tem sido um dos importantes critérios utilizados para a realização do zoneamento da mamoneira, o qual prevê que o ótimo ecológico em que a planta pode expressar seu potencial produtivo está na faixa de 300 a 1.500m de altitude, temperaturas médias variando entre 20 e 30°C, com baixa umidade relativa do ar, entre 40 a 65% para a planta expressar seu potencial produtivo (BELTRÃO e AZEVEDO, 2007).

A mamoneira é considerada do tipo misto quanto ao seu sistema reprodutivo, por se tratar de uma espécie autógama, com frequência de alogamia de até 40% (BELTRÃO, et al., 2007). Suas flores são monoicas, isto é, reúne na mesma inflorescência flores femininas na parte superior e masculinas na parte inferior, o que permite a obtenção de plantas homozigotas por meio de polinização controlada (PORTO et al., 2008).

Os racemos podem apresentar forma cônica, cilíndrica ou oval, atingindo a maturação em épocas diferentes dependendo da posição na planta (BELTRÃO; AZEVEDO, 2007). A mamoneira possui o padrão de desenvolvimento da parte aérea caracterizado pela emissão de ramos laterais, logo após o desenvolvimento da

inflorescência primária na haste principal, o qual originará o racemo primário (BERTOZZO, 2009). Os ramos laterais constituem o principal fator de produção, já que, cada ramo dará origem a um racemo, sendo que, o número de racemos, de frutos por racemo, o peso e o teor de óleo nas sementes são os componentes relacionados à produção na mamona (BAJAY, 2009).

3.2. Aspectos socioeconômicos da mamoneira

O Brasil já foi o maior produtor mundial de mamona, com destaque para a região Nordeste, onde a cultura constitui uma importante fonte de renda para os agricultores (CARVALHO, 2009), seja por processo tradicional em pequenas e médias propriedades rurais ou por meio de modernas técnicas em plantios extensivos (PASSOS et al, 2010).

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2011), o Brasil obteve uma das maiores safras de mamoneira no ano de 2011. Os principais fatores que contribuíram para o aumento significativo da produção, em comparação com o ano de 2010, foram os preços competitivos, a distribuição de insumos, o apoio técnico e aquisição do produto pela Petrobras, junto aos agricultores familiares e a sustentabilidade da demanda observada nos últimos anos. Além do mais, a área cultivada, se comparada ao ano de 2010, foi superior em 23,7% em 2011, passando para 195,1 mil hectares, enquanto que a produção aumentou 31,9% alcançando 132,7 mil toneladas, enquanto que a produtividade cresceu 6,9%, atingindo 681 kg/ha. O estado da Bahia se consolidou como o primeiro lugar no ranking da produção nacional de mamona, com 100,1 mil toneladas, e o Ceará se manteve em segundo lugar, com 18,7 mil toneladas.

A safra mundial de mamoneira em 2011 foi de 1,6 milhões de toneladas, que se comparada à safra de 2010 representa acréscimo de 1 %. Entre os principais países produtores de mamona no ano de 2011, a Índia teve crescimento de 2,5%, quando comparado com a safra de 2010 fato, que assegura sua posição de líder mundial, com uma produção de 1.152,5 (Mil t), a China em segundo lugar, com produção de 171,7 (Mil t) e o Brasil na terceira colocação, com uma produção de 132,7 mil toneladas (CONAB 2011).

A mamoneira é uma alternativa de relevante importância econômica e social para a região Nordeste, pois apresenta grande resistência ao clima adverso e

representa uma das alternativas de trabalho e renda para o agricultor, especialmente do semiárido baiano, onde a cultura consegue produzir satisfatoriamente bem, sob condições de baixa precipitação pluviométrica (BAJAY, 2009).

3.3.O óleo de mamona: composição e possibilidade para produção de biodiesel e coprodutos

O óleo de mamona ou de rícino é um líquido viscoso extraído pela prensagem das sementes da mamoneira ou por extração com solventes (PEREIRA, 2010). Acredita-se que o óleo de mamona, foi usado primeiramente como uma pomada a 4.000 anos atrás no Egito, de onde se espalhou para outras partes do mundo, incluindo Grécia e Roma, onde foi usado como um laxante 2.500 anos atrás (CHAN et al., 2010).

Existem registros descritos na literatura de uma grande quantidade de aplicações para o óleo de mamona. Na indústria ricinoquímica, o óleo de mamoneira é utilizado em rotas de síntese para fabricação de diversos produtos, com aplicação na área de cosméticos, tintas, lubrificantes de motores de alta rotação, nylon, polímeros, entre outros (CHIERICE NETO, 2007; PEREIRA, 2010).

O grande potencial industrial do óleo de mamona é devido à predominância de uma única molécula em sua composição, o ácido ricinoléico, que corresponde a 89,5% da composição do óleo de mamona, o que confere a esse óleo suas características únicas entre os outros óleos vegetais (FREIRE et al., 2007). O ácido ricinoléico é um dos poucos ácidos graxos cuja estrutura química possui três grupos funcionais altamente reativos: o grupo hidroxila no carbono 12, a insaturação no carbono 9 e o grupo carbonila no carbono 1 que juntos, permitem qualidades específicas à produção de uma infinidade de produtos industriais (CANGEMI, 2006).

Além do mais, o óleo de mamona pode ser utilizado para a produção do diesel vegetal, que substitui o óleo diesel derivado do petróleo (CHIERICE e NETO, 2007). O biodiesel é definido como um combustível renovável, biodegradável, ambientalmente correto, que consiste numa mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, como o metanol ou o etanol (BELTRÃO e LIMA, 2007).

Em termos ambientais, o biodiesel se destaca expressivamente pela redução da emissão de poluentes, quando comparado ao diesel derivado do petróleo, contribuindo para diminuir o acúmulo de gases responsáveis pelo aquecimento global (COSTA, 2006). Além disso, o biodiesel está diretamente relacionado ao fator econômica e social, visto que, a produção desse combustível promove a geração de emprego e renda para milhares de produtores das oleaginosas, como a mamona, o dendê, o girassol, a soja, entre outras (CESAR, 2009).

3.4. Melhoramento genético da mamoneira e homozigose

No Brasil, o primeiro programa de melhoramento genético da mamoneira foi iniciado em São Paulo, pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, em 1936 (FREIRE, et al., 2007). Com o objetivo de montar uma coleção de variedades e tipos locais, tanto por coleta como por importação, bem como sua caracterização e avaliação (KRUG et al, 1943 *appud* FREIRE, et al., 2007). De acordo com esse mesmo autor, ao longo dos anos, este instituto desenvolveu várias cultivares que apresentam características favoráveis ao cultivo da mamoneira, como por exemplo, alta produtividade, frutos indeiscentes, porte reduzido, ciclo vegetativo reduzido e alto teor de óleo na semente.

No estado da Bahia, o melhoramento genético da mamoneira foi iniciado na década de 60, pelo Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Leste – I IPEAL (PASSOS, 2009). Posteriormente, em 1974, as pesquisas passaram a ser conduzidas na Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia – EPABA, que depois foi transformada na Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola- EBDA (SAMPAIO FILHO, 2009).

O programa de melhoramento da mamoneira na UFRB, incluindo regiões de baixa altitude, foi iniciado no ano de 2004 pelo Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia – NBIO. Esse programa se baseia na introdução e geração da variabilidade, para posterior seleção de genótipos superiores, assistidos por marcadores moleculares, considerando os caracteres teor de óleo, peso e número de frutos por planta, florescimento, estatura de planta e resistência ao mofo cinzento.

Desde o início, as pesquisas desenvolvidas no programa de melhoramento genético da mamoneira do NBIO tiveram resultados positivos, que podem ser

observados nos trabalhos desenvolvidos. Bahia (2007), destacou a cultivar Sipeal 28 como sendo a mais produtiva em condições de sequeiro na região de Cruz das Almas. Cerqueira (2008), observou que a cultivar BRS Nordestina apresentou um alto teor de óleo, quando comparado com a cultivares Sipeal 28, Mirante 10, EBDA MPA 17 e BRS Paraguaçu. Sampaio Filho (2009), analisando as cultivares EBDA MPA 17, Sipeal 28, BRS 188 Paraguaçu, BRS 149 Nordestina, em dois anos de cultivos consecutivos em Cruz das Almas, confirmou o potencial dessas cultivares para regiões de baixa altitude. Passos (2009), realizou hibridação e observou ampla variabilidade genética entre os cruzamentos dos genótipos para vários caracteres de rendimento. Oliveira (2011) identificou grupos divergentes na população de 260 genótipos em geração $F_3:F_4$ Machado (2011), encontrou variabilidade genética entre duas famílias das populações F_2 e F_3 e seus parentais para o caráter teor de óleo na semente, utilizando marcadores morfológicos e moleculares.

A autofecundação provoca o aumento progressivo da homozigose, em razão das sucessivas gerações de acasalamento endogâmico, favorecendo a fixação de caracteres (BOREM e MIRANDA 2009). A proporção de plantas que alcançará a completa homozigose dependerá do número de pares de alelos envolvidos e do número de gerações de autofecundações realizadas. Espera-se teoricamente, que a cada geração de autofecundação, os loci heterozigotos segregarão, aumentando o número de homozigotos na população. Após sucessivas gerações de autofecundações a população resultante será constituída apenas pelos genótipos homozigotos, entretanto sempre haverá genótipos heterozigotos, em proporções muito baixas (MENDES et al., 2006). Assim, quando considera-se genes independentes, o número de autofecundações dependerá número de genes em heterozigose, que irá segregar, em uma população inicial. Sendo estes cinco genes independentes, após cinco gerações de autofecundações 85% dos indivíduos da população estarão em homozigose em todos os cinco loci. Isto é possível, considerando a sobrevivência de todos os genótipos oriundos da hibridação entre os parentais, fato este que, quando não ocorre poderá gerar distorções nos resultados, visto que os heterozigotos são favoráveis, provocando uma aproximação mais lenta da homozigose do que prevista teoricamente (ALLARD, 1971; BORÁM e MIRANDA, 2009).

Além do mais, quando não for possível avaliar a formação de genes independentes, e houver a presença de ligação gênica, há tendência de aumentar as combinações correspondentes aos parentais, com conseqüente deficiência de recombinantes (BORÉM e MIRANDA, 2009).

3.5. Marcadores microssatélites

Os marcadores moleculares representam uma ferramenta importante para pesquisar a diversidade genética existente, pois são eficientes na detecção do polimorfismo genético e permitem analisar, em curto tempo, um grande número de genótipos (MACHADO, 2011). Como resultado, pode haver redução na duração de programas de melhoramento, liberação mais rápida de cultivares e retorno mais rápido do investimento aplicado (BORÉM e MIRANDA, 2009).

O uso de marcadores moleculares na caracterização, avaliação e identificação de genes de importância agrônômica, tem permitido obter avanços consideráveis nos programas de melhoramento genético de diferentes culturas, incluindo a mamoneira (BORÉM e MIRANDA, 2009).

Muitos genes e também seqüências de DNA, estão presentes em uma, duas ou mais formas alélicas diferentes entre si, porém correspondente ao mesmo loco cromossômico, a este fenômeno dá-se o nome de polimorfismo genético (BAJAY, 2009). Considera-se que um loco é polimórfico quando a frequência de seu alelo mais comum é inferior a 99%. Isso significa que entre 100 indivíduos, pelos menos um apresentará um alelo diferente daquele presente no mesmo loco nos outros 99 indivíduos (BORÉM e MIRANDA, 2009).

Dentre os marcadores moleculares, os microssatélites ganharam importância considerável em programas de melhoramento genético devido a muitos atributos desejáveis, como sua herança codominante, isto é, permitem distinguir os genótipos homocigotos dos heterocigotos, possuem natureza multialélica, são altamente informativos, apresentam um alto grau de polimorfismo e estão distribuídos por todo o genoma eucariótico (KALIA et al., 2011).

Os marcadores microssatélites, ou seqüências simples repetidas (SSR), são compostos por seqüências de um a seis pares de base de comprimento repetidos em tandem, em que as repetições mais abundantes são os dinucleotídeos, ou seja,

repetições de dois pares de bases, podendo ser trinucleotídeo, tetra, penta, e até hexanucleotídeos, porém essa é mais rara (MAIA, 2009).

Estudos relacionados à estimação do nível de homozigose na mamoneira, utilizando marcadores microssatélites, são inéditos. Isso se deve ao fato que o número de marcadores microssatélites, desenvolvidos para mamoneira ainda é muito pouco (MACHADO, 2011). Deste modo, pesquisas envolvendo marcadores microssatélites podem contribuir para o programa de melhoramento genético da mamoneira, pois possibilitam avaliar o grau de variabilidade e homogeneidade considerando todos os pares de alelos, com maior rapidez e precisão, auxiliando mais efetivamente na seleção de genótipos superiores.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Estimar o nível de homozigose em uma população F_4 de mamoneira por meio de marcadores microssatélites, a fim de auxiliar o programa de melhoramento genético da cultura.

4.2. Objetivos específicos

- Testar e selecionar iniciadores SSR polimórficos.
- Analisar o perfil molecular dos genótipos presentes na população F_4 avançada, visando auxiliar no processo seletivo.
- Estimar o nível de homozigose por meio dos marcadores microssatélites.

5. Material e métodos

5.1. Material biológico

Um total de 34 genótipos foram utilizados (tabela 1). Sendo que 32 genótipos pertencentes a uma geração F_4 de mamoneira e os dos parentais BRS Nordestina e Sipeal 28. Todos os 34 genótipos fazem parte do programa de melhoramento genético da mamoneira, desenvolvidos pelo Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia –NBIO, coordenado pela professora Simone Alves Silva.

As sementes dos referidos genótipos foram colocadas para germinar em bacias plásticas, em areia lavada. Após 15 dias, foram coletadas folhas jovens e saudáveis para extração de DNA.

Tabela 1 Genótipos utilizados nas análises.

Identificação	Genótipo
Parental feminino	BRS Nordestina
Parental masculino	Sipeal 28
1	NS70
2	NS71
3	NS72
4	NS73
5	NS74
6	NS75
7	NS76
8	NS77
9	NS78
10	NS79
11	NS80
12	NS81
13	NS82
14	NS83
15	NS84
16	NS85
17	NS86
18	NS87
19	NS88
20	NS89
21	NS90
22	NS91
23	NS92
24	NS93
25	NS94
26	NS95
27	NS96
28	NS97
29	NS98
30	NS100
31	NS101
32	NS102

* Parentais BRS Nordestina e Sipeal 28; de 1 a 32 genótipos da população F₄ de mamoneira, provenientes do cruzamento entre as cultivares BRS Nordestina x Sipeal 28.

5.2. Extração de DNA

O DNA dos 34 genótipos foi extraído seguindo o protocolo de DNA em tecido vegetal descrito por Doyle & Doyle (1987). Para Tanto, foram coletadas folhas jovens e saudáveis, as quais foram maceradas com a utilização de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e de coloração clara. Em seguida, cerca de 30 mg do material macerado foi transferido para um tubo *ependorf* de 2mL, identificado para

cada amostra, sendo adicionado 700µl de tampão de extração (CTAB 2,0%, NaCl 1,4M, Tris HCl 0,1M pH8, 0, EDTA 20mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP 1,0% e água ultrapura q.s.p.), e homogeneizando por 5 minutos. Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria durante 45 minutos a 65 °C, sendo homogeneizados a cada 15 minutos por inversão.

Após o banho-maria, foram adicionados 700µl de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados levemente por 5 minutos e centrifugados durante 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos. Foram adicionados mais 700µl de clorofórmio: álcool isoamílico e novamente centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. Após essa etapa foi coletado o sobrenadante e transferido para novos tubos, nos quais foram adicionados 450µl de álcool isopropílico (gelado), equivalente a aproximadamente 2/3 do volume coletado.

Os tubos contendo as amostras foram homogeneizados e incubados a -20°C por 20 minutos, e depois centrifugados por 10 minutos a 12 000 rpm. O DNA isolado foi ressuscitado em 600µl de tampão TE (Tris-Hcl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), e as amostras foram colocadas na estufa a 37°C para a solubilização do DNA.

Em seguida, foram adicionados 200µl de acetato de amônio a 7,5M. Os tubos foram fechados e levemente homogeneizados por inversão, e incubados no gelo por 15 minutos. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 8000 rpm, e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foram adicionados 800µl de etanol absoluto ao sobrenadante, misturando suavemente por inversão a fim de homogeneizar. Incubando por 1 hora a -20°C, seguindo por uma centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos.

O precipitado (*pellet*) foi lavado com 500µl de etanol a 70% cerca para remover as impurezas. Os tubos foram centrifugados a 10000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ficou secando de um dia para o outro. Após essa etapa, o precipitado foi dissolvido em 100µl de tampão TE (Tris-Hcl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), acrescido de 1µ de RNase (10mg/ml) em cada tubo.

5.3. Quantificação e ajuste de concentração do DNA

Para avaliar a qualidade e concentração do DNA genômico, um total de 5 µl do DNA foi adicionado a 5 µl de solução corante (0,25% azul de bromofenol 60 % de glicerol). Logo após, o DNA genômico extraído foi aplicado em gel de agarose a

0,8%, corado com brometo de etídeo e submetido à eletroforese horizontal por aproximadamente 80 V, por 60 minutos. Após a corrida, as amostras foram visualizadas e foto-documentadas.

A quantificação do DNA foi feita por meio da análise comparativa da intensidade das bandas deste com a intensidade das bandas do DNA de concentração conhecida (DNA lambda – invitrogen). A figura 1 mostra a extração do DNA genômico da mamoneira.

Após a quantificação, as amostras tiveram as suas concentrações ajustadas para 5ng/μl através de diluições em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) a fim de padronizar as reações de PCR.

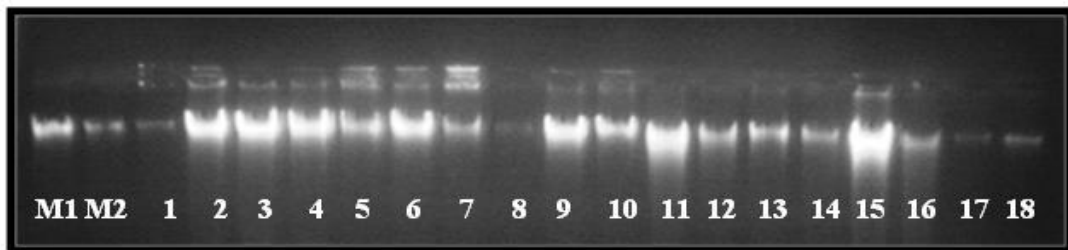


Figura 1. DNA Genômico de *Ricinus communis* L visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo. As duas primeiras bandas correspondem ao DNA lambda M1=100ng e M2=200ng. As amostras de 1 a 18 correspondem ao DNA genômico de 18 genótipos da população F₄.

5.4. Teste e seleção dos iniciadores microssatélites

Um total de 53 pares de iniciadores SSR, 23 desenvolvidos por Bajay (2009) e 30 por Machado (2011), foram testados quanto a sua eficiência na amplificação e detecção de polimorfismo. Uma descrição dos 23 iniciadores desenvolvidos por Bajay (2009) e dos 30 desenvolvidos por Machado (2011), podem ser visualizados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Caracterização dos 23 pares de iniciadores microssatélites (SSR), desenvolvidos por Bajay (2009) utilizados nas reações de amplificação.

Iniciadores	Sequência	T° C	Motivo	Amplitude alélica
Rco02	F: CTAGCTTTGGGGCACAGTC R:GGAAAATAGGTGCGTATGAAAC	60	(AC) ₁₂	210-232

Rco03	F:GATGTGAGCCCATTATGCTG R:TCAGAAATACCTCTAGGCGACA	60	(GA)11(AG)11	260-270
Rco05	F: AGCCCAGAAATTGAAAAGA R: CAAACCCAAGCAAACCTCA	62	(TG)6(GA)22(GAA)4	264-310
Rco06	F: GGGTGAAAATGAAGAGATTGG R: ATAACCCGTGAAGCATGGAC	62	(TG)11	266-310
Rco08	F: CGTGTGTCTGTGTGCATGTC R: CCTCAACCCTTTGCTGTTTC	60	(TG)10	320-336
Rco09	F: CCAACTCCCTTGTCTGCAA R: GTGAATGGCAAGCAGCAAT	62	(AC)11	170-194
Rco11	F: GCGTGACTAACTTCAAGCA R: CCCATTAGCATCGAGAAAG	60	(TC)10(GT)6	240-250
Rco 12	F: AAGACTGCACCTCCTCCTA R: TGCTGGAACAAACCCTGATA	62	(TG)8(GA)9	220-230
Rco13	F: GGTGCTTCCAGAAATTCAGTT R: GGAGGGGAAAGACAGGATTC	62	(GA)23	226-254
Rco15	F: CACGCACGTTAAAGCAAACCT R: GCGAAGAAACCAAATGGAG	60	(AG)18	250-260
Rco18	F: AGGGGGATAAGCGTGATATG R: CCGTTATGAAAAGGAAAGCA	62	(CA)17	244-256
Rco20	F: CCAAAGGAATGTGGGACTC R: TGTGGAGAGGATGAAGAGGAA	62	(TC)23	300-360
Rco22	F: ATCCGCCGACAATAGCAG R: GCAACACTCTCTTCCCTGAA	62	(AAAC)3(AC)9(TC)5	230-250
Rco23	F: CATGGATGTAGAGGGTCGAT R: CAGCCAAGCCAAAGATTTTC	62	(GA)15(AG)8	300-320
Rco26	F: TTGCTTGTCAAAGGGGAGTT R: TCATTTTGAGGGAGAAACCA	62	(CT)19	280-324
Rco29	F: GAGAAAAGAAAGGGAGAAGG R: GCCAAAAGCACACTTAATTTGA	60	(GA)7	250-260

Rco30	F: TGAAACTTTGGAGCTTGGAGA R: GGTCCCACACATTCATACACA	62	(AG)19	220-240
Rco31	F: ACAATGCGTGTGTCTGTGTG R: CCTCAACCCTTTGCTGTTTC	62	(TG)11	240-160
Rco33	F: ACATACATGCAGGGAGACCA R: TCTGCTTTAATGGCTGATCG	62	(TCT)11	237-240
Rco34	F: TCGGTTAAGGGTATGGGTTG R: CACTTCATTTTCGCAGACC	62	(GT)11	296-300
Rco35	F: GGAAGAATTGGGTTGGAAGT R: AACAAACACAGGTGCATCAT	62	(AG)16	288-298
Rco40	F: ACTGGATAAAGGGTATTTGG R: GCTTTTTGGTGACAGGTTTGA	62	(TC)5(CT)7	200-280
Rco41	F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC R: CGTTCACACTCATCAATCCA	62	(CT)17(CA)11	224-254

Tabela 3. Caracterização dos 30 pares de iniciadores microssatélites (SSR), desenvolvidos por Machado (2011), utilizados nas reações de amplificação.

Iniciadores	Sequência	Ta (° C)	Motivo	Amplitude alélica
RcoM01	F: CTAGCTTTGGGGCACAGTC R: GGAAAATAGGTGCGTATGAAAC	63	(TA)18	277
RcoM02	F: GATGTGAGCCCATTATGCTG R: TCAGAAATACCTCTAGGCGACA	64	(CT)14	185
RcoM03	F: AGCCAGAAATTGGAAAAGA R: CAAACCCAAGCAAACCTCA	62	(TA)18 (AATAAA)2	234
RcoM04	F: GGGTGAAAATGAAGAGATTGG R: ATAACCCGTGAAGCATGGAC	62	TCCTAC)2 (GGTAGG)2	274
RcoM05	F: CGTGTGTCTGTGTGCATGTC R: CCTCAACCCTTTGCTGTTTC	62	(AAAAGA)3	204
RcoM06	F: CCAACTCCCTTGTCTGCAA R: GTGAATGGCAAGCAGCAAT	64	(AAAAGA)3	204
RcoM07	F: GCGTGGACTAACTTCAAGCA R: CCCATTAGCATCGAGAAAG	63	(TTAATT)3	205
RcoM08	F: AAGACTGCACCTCCTCCTA R: TGCTGGAACAAACCCTGATA	63	(GAA)5	237
RcoM09	F: GGTGCTTCCAGAAATTCAGTT	62	(AT)8	211

RcoM10	R: GGAGGGGAAAGACAGGATTC F: CACGCACGTTAAAGCAAAC	62	(TA)15	259
RcoM11	R: GCGAAGAAACCAAATGGAG F: AGGGGGATAAGCGTGATATG	63	(CAA)6	252
RcoM12	R: CCGTTATGAAAAGGAAAGCA F: CCAAAAGGAATGTGGGACTC	62	(TAT)7(TTA)11	189
RcoM13	R: TGTGGAGAGGATGAAGAGGAA F: ATCCGCCGACAATAGCAG	62	(TAT)8	136
RcoM14	R: GCAACACTCTCTCCCTGAA F: CATGGATGTAGAGGGTTCGAT	62	(TAT)16	176
RcoM15	R: CAGCCAAGCCAAAGATTTTC F: TTGCTTGTCAAAGGGGAGTT	62	(GAA)5	176
RcoM16	R: TCATTTTGAGGGAGAAACCA F: GGAGAAAAGAAAGGGAGAAGG	62	(AAGA)7	220
RcoM17	R: GCCAAAAGCACACTTAATTTGA F: TGAAACTTTGGAGCTTGGAGA	63	(GAA)8 (GA)13	248
RcoM18	R: GGTCCCACACATTCATACACA F: ACAATGCGTGTGTCTGTGTG	60	(AATA)5	245
RcoM19	R: CCTCAACCCTTTGCTGTTTC F: ACATACATGCAGGGAGACCA	64	(CT)18	298
RcoM20	R: TCTGCTTTAATGGCTGATCG F: TCGGTTAAGGGTATGGGTTG	63	(GAA)13	128
RcoM21	R: CACTTCATTTTCGCAGACC F: GGAAGAATTGGGTTGGAAGT	63	(AAG)12	253
RcoM22	R: AACAAACACAGGTGCATCAT F: AACTGGATAAAGGGGTATTTGG	62	(ACT)5	227
RcoM23	R: GCTTTTTTGGTGACAGGTTTGA F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC	63	(AG)18	283
RcoM24	R: CGTTCACACTCATCAATCCA F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC	N	(AT)10 (TG)7	159
RcoM25	R: CGTTCACACTCATCAATCCA F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC	62	(TAT)12	232
RcoM26	R: CGTTCACACTCATCAATCCA F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC	63	(AT)7	264
RcoM27	R: CGTTCACACTCATCAATCCA F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC	63	(AG)20	287
RcoM28	R: CGTTCACACTCATCAATCCA F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC	63	GAA)6 (AGA)5 (AAG)6	215
RcoM29	R: CGTTCACACTCATCAATCCA F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC	63	(AG)19	250
RcoM30	R: CGTTCACACTCATCAATCCA F: CATGTTGTTTTTGGCAGCTC	63	CT)17(TA)25	381

Os testes dos iniciadores SSR foram realizados conforme Bajay (2009), sendo cada reação de amplificação preparada em um volume final de 25 μ L, contendo 2,5 μ L de tampão de PCR 10X (50 mM Tris-Hcl, 20 mM KCL), 1,0 μ L de dNTPs (25mM) Mix, 2,5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de cada iniciador SSR 20mM (R e F) 1 μ L de Taq DNA polimerase (5U. μ L⁻¹) e 50 ng. μ L⁻¹ de DNA genômico e água ultrapura q.s.p.

As amplificações foram conduzidas num termociclador Biocycler MJ96+/MJ96G (Biosystems), empregando-se um programa com ciclo inicial de 94°C por 1 minuto e 35 ciclos de 94°C por 1 min, e temperatura de anelamento (de acordo com a tabela 2 e 3) por 1 min. e 72°C por 1 min. e uma extensão final de 72°C por 10 min. Sendo a temperatura então reduzida a 4°C até a retirada das amostras do termociclador. Os fragmentos amplificados foram revelados em gel de agarose a 3% (p/v), submerso em tampão TBE (89 mM Tris-borato, 2mM EDTA), a 100V durante 3 horas.

O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹), visualizado com luz UV e foto-documentado por meio do Sistema Digital Kodak Science. Como padrão de peso molecular foi utilizado o ladder 50pb. Apenas os iniciadores SSRs que apresentaram polimorfismo entre os parentais (Nordestina x Sipeal) foram utilizados na genotipagem dos 32 genótipos da população F₄.

5.5. Condições de amplificação dos iniciadores microssatélites

Os iniciadores microssatélites utilizados nesse trabalho foram inicialmente testados em diferentes concentrações de cloreto de magnésio (MgCl₂) e temperatura de anelamento (Ta°), utilizando o DNA das cultivares MPA17, BRS Nordestina e Sipeal 28. Os testes foram realizados para se obter amplificação específica dos alelos com eliminação de bandas fantasmas ou inespecíficas. As diferentes concentrações utilizadas em cada teste podem ser visualizadas na tabela 4.

Tabela 4. Concentrações de cloreto de magnésio (MgCl₂) e temperaturas de anelamento utilizadas nos testes de amplificação por meio de iniciadores SSR.

Reagentes	Teste 1 (μ l)	Teste 2 (μ l)	Teste 3 (μ l)	Teste 4 (μ l)	Ta °C
DNA (5ng/ μ l)	10	5	5	5	
Água (μ l)	8,55	14,85	15	14,5	55
Tampão (10x)	2,5	2,5	2,5	2,5	58
dNTPs (2,5mM)	1	0,8	0,8	0,8	60

Iniciador F (20mM)	1	0,5	0,5	0,5	61
Iniciador R (20mM)	1	0,5	0,5	0,5	62
MgCl₂ (50mM)	0,75	0,65	0,5	1	63
Taq.polimerase (5U/μl)	0,2	0,2	0,2	0,2	64

5.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para fins de teste em gel de poliacrilamida foram feitas alterações na concentração do gel, de 4% para 7%, com o intuito de obter uma melhor separação e visualização das bandas. A poliacrilamida foi preparada em um volume final de 70 ml, contendo ureia.

Aos produtos da amplificação foram adicionados 5 μ de tampão de carregamento (95% formamida, 0,05% xylene cyanol, 0,05% azul de bromofenol, 12,5% sacarose, 10mM NaOH). Logo em seguida, as reações foram submetidas à eletroforese vertical em gel desnaturante de poliacrilamida a 7%, submerso em tampão TBE. A separação eletroforética foi de, aproximadamente, três horas a 1000 volts.

O gel desnaturante de poliacrilamida foi montado em cuba vertical para sequenciamento. Para tanto, as placas de vidro foram lavadas, enxaguadas e limpas com álcool duas vezes. Na placa maior foi aplicado 1mL de *Repel silane* (para facilitar a liberação posterior do gel) e esperou-se secar por 5 min. Na placa menor foi aplicado o *Bind silane*, que deverá ser previamente preparado em câmara de fluxo laminar, devido a sua toxicidade, e espalhado rapidamente sobre a placa e espera-se secar. A montagem das placas foi de forma que os lados em que se encontram as películas de *Repel* e *Bind* estejam voltados para dentro. As placas foram montadas por meio de ajuste dos espaçadores entre elas.

A solução de poliacrilamida a 7% foi homogeneizada e vertida entre as placas com auxílio de uma seringa com capacidade para o volume de gel a ser aplicado. Adicionou-se tampão TBE 1X a cuba (cuba vertical de eletroforese) no depósito inferior e superior. Após montagem do gel, foi realizada a pré-corrída: A pré-corrída foi interrompida quando as placas atingiram 50°C, ou quando o gel já tiver sido submetido à corrida por aproximadamente uma hora. Logo após, as amostras foram aplicadas sendo, 5 μl de cada amostra e 5 μl de *Ladder* 50pb.

O gel foi submetido a 60 W por aproximadamente, três horas. Após o término

da eletroforese, as placas foram separadas e a parte com *Bind*, no qual o gel deve estar aderido, foi colocada em uma bandeja plástica contendo a primeira solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 1%). O gel permaneceu submerso e em agitação durante 10 minutos. Após, a solução foi retirada e o gel foi lavado uma vez durante 20 segundos com água destilada. A placa, contendo o gel, foi submergida em solução fixadora número 2 (ácido nítrico 1%), durante três minutos em agitação constante. A solução foi descartada e a placa lavada duas vezes durante 20 segundos cada, com água destilada.

A coloração foi feita utilizando uma solução de nitrato de prata 0,2% por 20 minutos em agitador. O passo para revelação consiste na adição de formaldeído a solução de carbonato de sódio a 2%. O gel permaneceu em solução reveladora até a visualização das bandas. Após, colocou-se o gel em solução *stop* (ácido acético 5%), durante cinco minutos e efetuou-se uma lavagem rápida em água destilada. Depois o gel foi colocado para secar, em seguida, escaneou-se o gel em equipamento HP ScanJet N8460, a fim de utilizá-lo em uma análise futura.

5.7. Análise dos dados

Para estimar o nível de homozigose dos genótipos avaliados, procedeu-se o cálculo segundo Mendes et al. (2006):

$$P = [(2^m - 1) / 2^m]^n$$

Em que:

P - proporção de genótipos completamente homozigotos

m - número de gerações

n - número de alelos

O teste de Qui-quadrado (χ^2) a 5%, foi realizado para verificar os desvios entre os valores esperados e observados, com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2001).

6. Resultados e discussão

A amplificação de DNA por meio da técnica de PCR é atualmente uma das ferramentas mais poderosas utilizadas na biologia molecular. A especificidade da

amplificação depende principalmente das condições empregadas na execução do método (LARA, 2002).

A otimização da reação de PCR envolve ainda um grande número de fatores, que podem interferir na amplificação dos fragmentos de DNA, dentre os quais se podem citar a concentração do tampão, o equilíbrio entre o cloreto de magnésio e a concentração dos desoxinucleotídeos, a concentração dos iniciadores, a temperatura de anelamento e a quantidade do DNA e da Taq DNA polimerase (MARKOULATOS, et al., 2002). Por esse motivo, a alta sensibilidade da PCR requer um cuidado com as condições experimentais empregadas na etapa de hibridização (LARA, 2002).

A concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) nas reações de amplificação dos fragmentos por meio dos iniciadores microssatélites, foi otimizada e definida em 1,2mM, com os demais componentes da reação nas seguintes concentrações: 25 ng de DNA genômico, 0,4 mM de cada iniciador (F e R), 0,1 mM de cada dNTP, 2 U de Taq DNA polimerase e 2,5 X de tampão.

De acordo com Sebastião (2010) embora a otimização dos componentes da PCR seja um fator muito importante, a da temperatura de anelamento dos iniciadores, também representa um fator essencial para o sucesso da PCR. Temperaturas de anelamento muito baixas aumentam a probabilidade de amplificação de bandas inespecíficas, em diferentes regiões do DNA, enquanto que temperaturas mais elevadas propiciam um grande aumento da especificidade. Contudo, ocorre um sensível decréscimo no rendimento (BUSO et al,2003). Sendo assim, a temperatura ótima de anelamento localiza-se em um ponto intermediário, em que há a maximização de especificidade e rendimento. A temperatura de anelamento mais adequada é aquela que permite a visualização de bandas nítidas, de tamanho esperado e com o menor número de produtos inespecíficos(LARA, 2002).

Os pares de iniciadores Rco2, Rco3, Rco8, Rco11, Rco15, Rco29, Rco30, Rco22, Rco23, Rco26, amplificaram na temperatura de anelamento de 62° C, em gel de agarose a 4% (Figura 2).

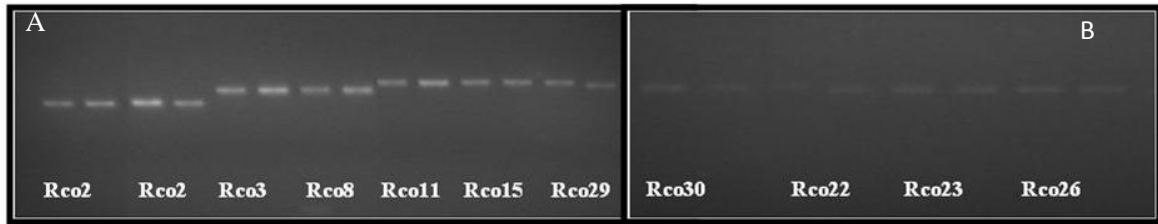


Figura 2. Teste de amplificação utilizando os iniciadores SSR em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídeo, no qual cada duas amostras correspondem a um iniciador.

Os iniciadores Rco5, Rco6, Rco9, Rco18, Rco20, Rco31, Rco33, Rco34, Rco35, Rco40 e Rco41, testados na temperatura de anelamento de 60°C (Figura 3), amplificaram múltiplas bandas inespecíficas, de pouca definição, dificultando a identificação dos fragmentos específicos amplificados.

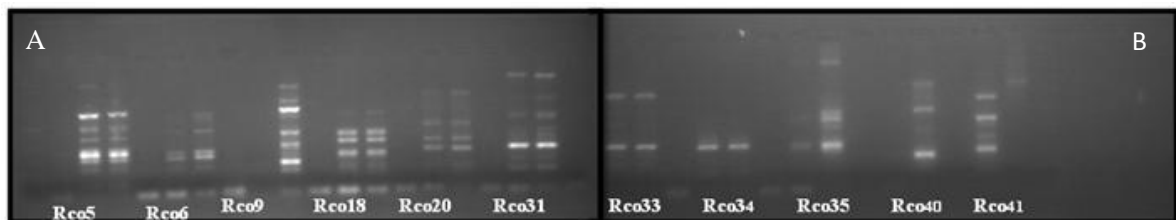


Figura 3. Teste de amplificação utilizando os iniciadores, em gel de agarose a 4% corado com brometo de etídeo, no qual cada três amostras correspondem a um iniciador.

Os pares de iniciadores microssatélites Rco5, Rco6, Rco9, Rco18, Rco20, Rco31, Rco33, Rco34, Rco35, Rco40 e Rco41, amplificaram bandas nítidas de boa definição, na temperatura de anelamento de 63°C. No entanto, os iniciadores Rco5, Rco9 e Rco20, ainda apresentaram bandas inespecíficas, sendo necessário aumentar a temperatura de anelamento dos mesmos.

O estudo permitiu a otimização de cinquenta e três iniciadores microssatélites, os quais foram utilizados na caracterização genética da população F₄ de mamoneira.

Para melhor separação dos fragmentos amplificados, os pares de iniciadores microssatélites foram visualizados em gel de poliacrilamida a 7%, corado com nitrato de prata. Observou-se que, dos 53 pares de iniciadores, 39 (73,58%) amplificaram na temperatura de anelamento de 62°C, sem a presença de bandas inespecíficas, e 7 (13,20%) dos iniciadores amplificaram bandas fantasmas nesta mesma temperatura (Figura 4).

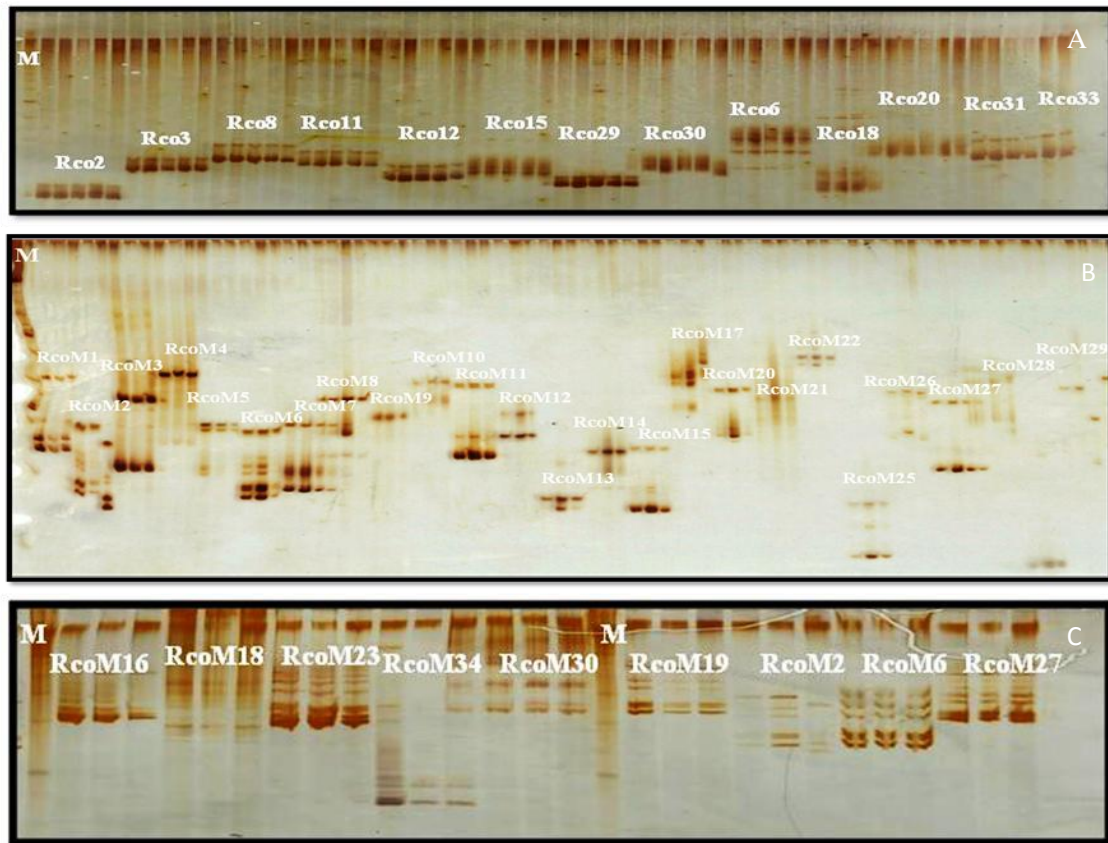


Figura 4. Teste de amplificação dos iniciadores microssatélites em gel de poliacrilamida a 7 % corado com nitrato de prata, sendo a primeira canelleta correspondente ao marcador de peso molecular *ladder* 50pb.

Um total de 8 pares de iniciadores microssatélites (15,09%), Rco2, Rco11, Rco23, Rco29, RcoM2, RcoM11, RcoM27 e RcoM28, foram eficientes na detecção de bandas polimórficas para os 32 genótipos da população F₄ de mamoneira (Figuras 5 e 6). Machado (2011) também encontrou loci polimórficos para esse iniciadores ao analisar as cultivares MAP17, BRS Nordestina e Sipeal 28. A autora utilizou trinta pares de iniciadores SSR.

Bajay (2009) utilizou 41 loci microssatélites para genotipar 120 acessos de mamoneira. Dentre os loci analisados por esse autor, 26 apresentaram polimorfismo (63,41%). A porcentagem de loci polimórficos encontrados por esse autor, difere da encontrada nessa pesquisa. Essa diferença possivelmente pode ter ocorrido em virtude do maior número de genótipos analisados pelo referido autor. Contudo, os acessos analisados por Bajay (2009), fazem parte do banco de germoplasma que é mantido com a finalidade de preservar a variabilidade genética da espécie. Enquanto que os genótipos analisadas nessa pesquisa pertencem a uma população oriunda

de cruzamentos entre duas cultivares comerciais, já manipuladas via melhoramento, e avançada por meio de sucessivas autofecundações.

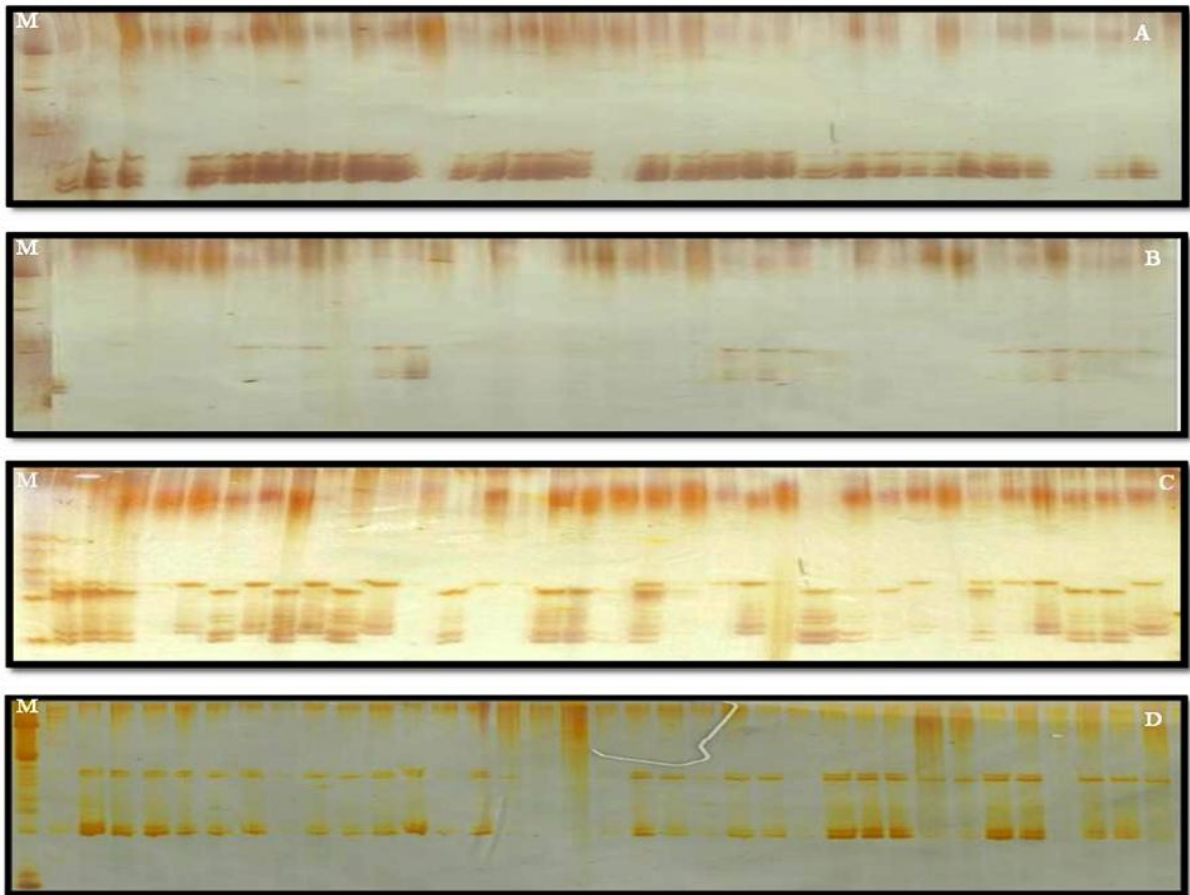
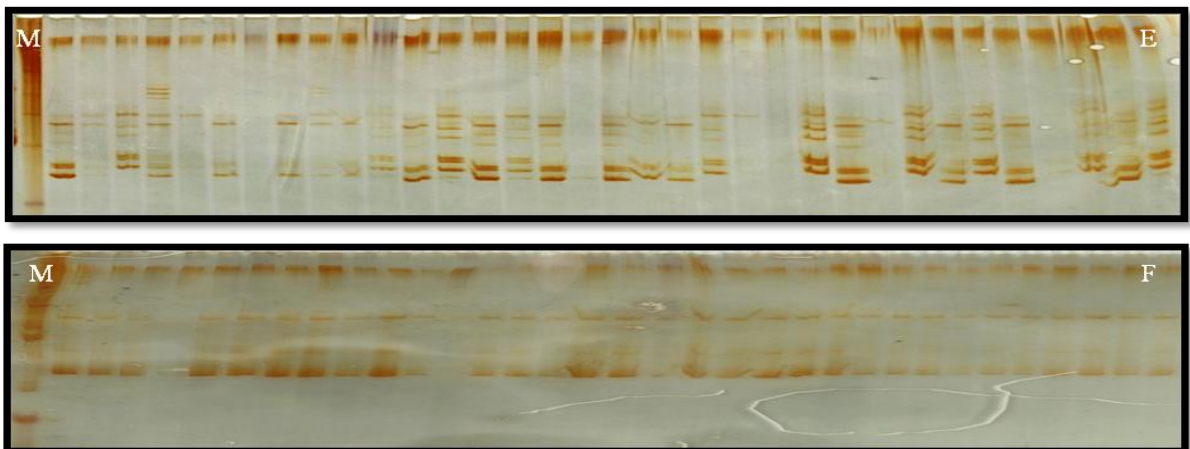


Figura 5. Perfil de gel de poliacrilamida a 7 % corado com nitrato de prata, mostrando a amplificação do iniciador Rco2 (A), Rco11 (B), Rco23 (C), Rco29 (D), com os genótipos dos indivíduos da população F₄ de mamoneira. A primeira caneleta corresponde ao marcador de peso molecular *ladder* 50pb.



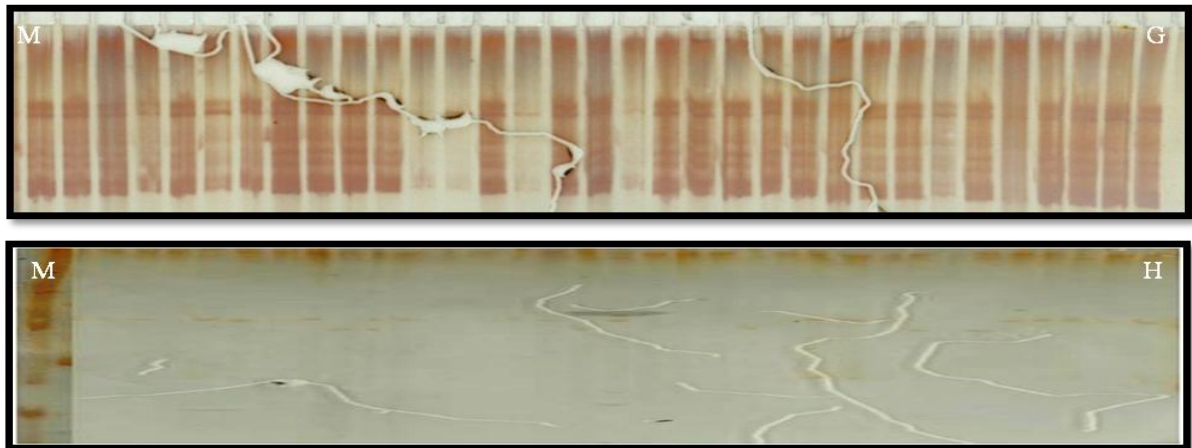


Figura 6. Perfil de gel de poliacrilamida a 7 % corado com nitrato de prata, mostrando a amplificação do iniciador RcoM2 (E), RcoM11 (F), RcoM27 (G), RcoM28 (H), com os genótipos dos indivíduos da população F₄ de mamoneira. A primeira caneleta corresponde ao marcador de peso molecular *ladder* 50pb.

A análise de homozigose dos 32 genótipos está apresentado na tabela 5. A porcentagem de homozigose entre os genótipos variou de 25 a 75%, com destaque para os genótipos NS82, NS89, NS92 e NS97, que apresentaram os maiores valores (75%), enquanto que os genótipos NS71, NS79, NS85 e NS95 apresentaram os valores mais baixos (25%).

Tabela 5. Porcentagem de homozigose entre os genótipos da população F₄ de mamoneira a partir de marcadores microssatélites.

Identificação	Genótipos	Homozigose (%)
1 -	NS71	25,0
2 -	NS79	25,0
3 -	NS85	25,0
4 -	NS95	25,0
5 -	NS81	37,5
6 -	NS86	37,5
7 -	NS70	50,0
8 -	NS73	50,0
9 -	NS75	50,0
10 -	NS76	50,0
11 -	NS77	50,0
12 -	NS78	50,0
13 -	NS83	50,0
14 -	NS84	50,0
15 -	NS87	50,0
16 -	NS90	50,0

17 -	NS93	50,0
18 -	NS96	50,0
19 -	NS100	50,0
20 -	NS72	62,5
21 -	NS74	62,5
22 -	NS80	62,5
23 -	NS88	62,5
24 -	NS91	62,5
25 -	NS94	62,5
26 -	NS98	62,5
27 -	NS101	62,5
28 -	NS102	62,5
29 -	NS82	75,0
30 -	NS89	75,0
31 -	NS92	75,0
32 -	NS97	75,0
	Média	52,7

* Parentais BRS Nordestina e Sipeal 28; de 1 a 32 genótipos da população F₄ de mamoneira, provenientes do cruzamentos entre as cultivares BRS Nordestina x Sipeal 28.

Considerando que a proporção de plantas homozigotas está em função do número de pares de alelos e o número de gerações de autofecundação em cinco gerações de autofecundações, em cinco genes independentes, 85% dos genótipos da população estarão em homozigose em todos os cinco loci (Allard, 1971; Borém e Miranda, 2009). Entretanto, para a situação em epígrafe, considerando três gerações de autofecundações, em que a proporção de homozigotos aumenta, enquanto que a de heterozigotos é reduzida, e oito loci envolvidos, esperam-se 34% dos genótipos em completa homozigose. Dessa forma, o valor médio obtido para o nível de homozigose dos genótipos foi elevado (52,7%), com rápida fixação dos alelos homozigotos e possível ganho genético na seleção, considerando mais uma geração de autofecundação.

A detecção de alelos heterozigotos com marcadores moleculares é mais sensível que a avaliação da constituição genéticas por dados fenotípicos. Sendo assim, caso considere a proporção de cinco loci independentes, após três gerações de autofecundações, seria esperado 51% dos genótipos da população em

homozigose em todos os cinco loci, que corrobora com o valor de homozigose obtido neste trabalho.

Esses resultados podem ser utilizados no processo de seleção desses genótipos, já que existe a possibilidade de obter na próxima geração de autofecundação, genótipos com alto grau de estabilidade e com nível de homozigose mais elevado.

O teste do qui-quadrado para análise dos desvios entre os valores esperadas e observadas do nível de homozigose entre os genótipos, encontra-se na tabela 6. Nesse caso, os valores calculados do qui-quadrado a 5% de probabilidade para os iniciadores RcoM27 (18,892) e RcoM11 (15, 621), apresentaram diferença significativa. As probabilidades associadas a esses valores são 7.90 e 4.05%, respectivamente. Isso indica que algum outro fator que não o acaso é o responsável pelos desvios entre os valores observados e esperados.

O valor calculado para os outros iniciadores não diferiram significativamente no teste do qui-quadrado a 5% de probabilidade. As maiores probabilidades encontradas, foram as dos iniciadores Rco23 (99.75%) e RcoM28 (91.66%), indicando uma alta probabilidade de que a diferença entre os valores observados e esperados seja devido ao acaso.

Tabela 6. Resultados dos testes do qui-quadrado (X^2) para os loci SSR na população F_4 de mamoneira, proveniente do cruzamento entre as cultivares BRS Nordestina e Sipeal 28.

Iniciador	Valor Qui-quadrado (X^2)	Probabilidade (%)	GI
RcoM27	18,892*	7.90	2
RcoM11	15,621*	4.05	2
RcoM2	3,683	15.85	2
Rco29	0,482	78.58	2
Rco 11	0,321	85.20	2
Rco 2	0,255	88.02	2
RcoM28	0,174	91.66	2
Rco 23	0,005	99.75	2

*Diferiram significativamente. GI-Graus de liberdade

A análise dos genótipos da população F_4 de mamoneira por meio dos marcadores microssatélites, mostrou que a maior parte dos alelos encontra-se em homozigose, sugerindo uma forte endogamia, que pode ser resultado de processos de autofecundações. De acordo com Bajay (2009) a ocorrência de alelos nulos

também aumenta a homozigose, já que os genótipos heterozigotos contendo o alelo nulo serão contados como homozigotos.

7. Conclusão

Houve necessidade de ajustes na temperatura de anelamento e na concentração de cloreto de magnésio na otimização da técnica de microssatélites para a mamoneira.

A homozigose na população F_4 encontra-se elevada, com boa fixação dos alelos homozigotos ao longo das gerações de autofecundações, com possibilidade de obter na próxima geração de autofecundação genotípica, bom grau de estabilidade e com nível de homozigose mais elevado, para obtenção de ganhos genéticos com a seleção.

8. Referências bibliográficas

- ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blüchner, 1971. P. 381.
- BAHIA, H. F. **Avaliação e Seleção de Genótipos De Mamoneira (*Ricinus Communis L.*)**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia . - Cruz Das Almas- BA, 2007. –p. 66.
- BAJAY, M. M. **Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites e Caracterização do Germoplasma de Mamona (*Ricinus Communis L.*)**. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo . Piracicaba- SP, 2009. - p. 96.
- BELTRÃO, N. E. de M. e AZEVEDO, D. M. P de. **Fitologia**. EMBRAPA. Brasília, 2007. - Vol. 2 : Pp. 117-137. - In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. De M. O Agronegócio Da Mamona No Brasil.
- BELTRÃO, N. E. de M. e LIMA, R. de L. S. de **Aplicação do Óleo de Mamona Como Fonte de Energia: Biodiesel**. EMBRAPA. Brasília, 2007. 2 ed. P. 395-416. In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. De M. O Agronegócio Da Mamona No Brasil.
- BERTOZZO, F. **Avaliação da Seleção Para Aumento da Porcentagem de Flores Pistiladas em Mamoneira (*Ricinus Communis L.*)**. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Agropecuárias da Unesp - Campus de Botucatu. Botucatu - SP., 2009. p. 43.
- BORÉM, A ; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Palntas**. UFV. Viçosa , 2009. - 1 : P. 438.
- BUSO, G. S. C.; CIAMPI, Ana Yamaguishi ; MORETZSHON, Marcio de Carvalho ; AMARAL, Zilneide Pedrosa de Souza ; BRONDANI, Rosana Vianello . **Marcadores microsatélites em espécies vegetais**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, Brasília, v. 30, p. 46-50, 2003
- CANGEMI, J. M. **Biodegradação de Poliuretano Derivado do Óleo de Mamona**.Tese (doutorado). / Universidade de São Paulo . - São Carlos, 2006. p. 163.
- CARVALHO, F. I. F De, MARCHI.SORO, V; SILVA, S. A. **Condução de Populações no Melhoramento Genético de Plantas**. Universitaria. Pelotas , 2009. 2 ed.
- CERQUEIRA, L. S. **Variabilidade Genética e Teor de Óleo em Mamoneira Visando ao Melhoramento para Região de Baixa Altitude**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia . - Cruz das Almas, 2008. p. 57.
- CESAR, A. da S. **Análise dos Direcionamentos de Competitividade Para a Cadeia Produtiva de Biodiesel: O Caso Da Mamona**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal De São Carlos . - São Carlos- SP, 2009. p 171.
- CHAN, A. P.; CRABTREE, J.; Zhao, Q.; LORENZI, H.; ORVIS, J.; PUIU, D.; MELAKE-BERHAN, A.; JONES, K. M.; REDMAN, J.; Chen, G.; CAHOON, E. B.;

GEDIL, M.; STANKE, M.; HAAS, B. J.; WORTMAN, J. R.; FRASER-LIGGETT, C. M.; RAVE, J.; RABINOWICZ, P. D. **Draft Genome Sequence of the Oilseed Species *Ricinus Communis***. *Nature Biotechnolog.* - Setembro De 2010. - Vol. 28 . p 9.

CHIERICE, G. O. E NETO S. C. **Aplicação Industrial Do Óleo**. EMBRAPA. Brasília , 2007. 2 ed. P. 417-447. - In: AZEVEDO, D. M P de; BELTRÃO, N. E. de M. O Agronegócio Da Mamona No Brasil.

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura mensal**. Junho de 2011. Mamona. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_07_12_10_39_08_mamona_julho2011.pdf. Acessado em: 12/01/2011.

COSTA, T. L. **Características Físicas E Físico-Químicas Do Óleo De Duas Cultivares De Mamona**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campina Grande . Campina Grande – PB, 2006. p. 113.

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

Duke, J.A. ***Ricinus communis***. 1998. From Purdue University New Crop Resource Online Program. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Ricinus_communis.html.

FREIRE, E. C; LIMA, E. F; ANDRADE, F. P. de; MILANI, M; NÓBREGA, M. B. M. **Melhoramento Genético**. - Brasília, 2007. p. 169-194. In: AZEVEDO, D. M P de; BELTRÃO, N. E. de M. O Agronegócio Da Mamona No Brasil.

FREIRE, R. M. M, SEVERINO, L. S E MACHADO, O. L. T **Ricinoquímica e Coprodutos**. EMBRAPA. Brasília, 2007. 2 ed. p. 449 - 490. In: AZEVEDO, D. M P de; BELTRÃO, N. E. de M. O Agronegócio da Mamona no Brasil.

FREIRE, R. M. M. **Cultivo Da Mamona** [Online]. EMBRAPA. 2006. – Acessado:em 12 De 01 De 2012. Disponível em: Http://Sistemasdeproducao.Cnptia.Embrapa.Br/Fonteshtml/Mamona/Cultivodamamona_2ed/Oleo.Html.

FREITAS, S. M.; FREDO, C. E. **Biodiesel à Base de Óleo de Mamona: Algumas Considerações** [Online]. - 2005. – acessado em: 12 De 01 De 2012. Disponível em: <Http://Www.lea.Sp.Gov.Br/Out/Publicacoes/Pdf/Tec3-0105b.Pdf>.

GOVAERTS R.; FRODIN D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae)**. 2000. Redwood Books Limited, Trowbridge, Wiltshire.

GOODARZI, F.; DARVISHZADEH, R.; HASSANI, A.; HASSANZAEH, A. **Study on genetic variation in Iranian castor bean (*Ricinus communis* L.) accessions using multivariate statistical techniques**. 2011. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 5(21), pp. 5254-5261.

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

KALIA, R. K.; RAI, M. K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A. K. **Microsatellite Markers: an Overview of the Recent Progress in Plants**. Euphytica. 2011. Vol. 177 . p. 309-334 . - Published Online. Springer Science+Business Media B.V.

LARA, F. J. S. **Hibridização De Ácidos Nucleicos**. Ribeirão Preto. Sociedade Brasileira de Genética , 2002. – 2 ed : p. 127.

MACHADO, E. L. **Desenvolvimento de Marcadores Microssatélites e Genotipagem de População F₄ F₂ e Cultivares Introduzidas de Mamoneira (*Ricinus Communis* L.)**. Tese (doutorado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia . - Cruz das Almas – BA, 2011.

MAIA, S. H. Z. **Diversidade Genética na Videira Itália (*Vitis vinifera* L.), Utilizando Marcadores Microssatélites**. Tese (doutorado). Universidade Estadual De Maringá. Maringá – PR, 2009.

MARKOULATOS, P., Sifakas N. E Moncany M. **Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach**. Journal of Clinical Laboratory Analysis. - 2002. Vol. 16. p. 47–51.

MENDES, A. N. G. ; BUENO, L. C. S. ; CARVALHO, S. P. . **MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS - Princípios e Precedimentos**. 2. ed. Lavras, MG: Editora UFLA, 2006. v. 1. 319 p.

OLIVEIRA, R. S. de. **Avaliação de população segregante (F₃) de mamoneira em condições do Recôncavo Baiano/Ronaldo Simão de Oliveira**_. Cruz das Almas - BA, 2011.p. 51.

PASSOS, A. R. **Estudo Genético e Agrônômico da Mamoneira em Baixas Altitudes do Recôncavo Bahia**. Tese (doutorado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz Das Almas, 2009. p. 109.

PEREIRA, P. H. L. **Estudo das Propriedades Físico-Químicas da Poliuretana Derivada do Óleo de Mamona com Potencial de Aplicação na Área Médica**. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Instituto De Química de São Carlos. São Carlos - SP, 2010.

PORTO, M.; MACÊDO, F. C. O; DANTAS, F. V; MILANI, M.**Teor de Óleo em Genótipos de Mamona Autofecundadas**. Salvador – BA, 2008. In: Anais Do III Congresso Nacional De Mamona. III Congresso Brasileiro De Mamona E Energia E Ricinoquímica.

SAMPAIO FILHO, O. M. **Análise Descritiva, Agrupamento E Análise De Trilha De Cultivares De Mamoneira em dois Anos de Cultivo em Cruz das Almas**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, 2009. p. 85.

SANTOS, R. F dos; BARROS, M. A. L; MARQUES, F. M; FIRMINO, P. T; REQUIÃO, LUIZ E. G. **Aspectos Econômicos do Agronegócio da Mamona**. EMBRAPA. Brasília, 2007. In: AZEVEDO, D. M P de; BELTRÃO, N. E. de M. O Agronegócio da Mamona no Brasil.

SEBASTIAO, I. ; MORGANTE, P. G. ; SILVEIRA, L. E. ; HIRATA, D. M. ; COFFANI-NUNES, J. V. . **Estabelecimento de Condições de Amplificação por PCR de Loci**

SSR em Pimenta *Pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010, Botucatu. XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010

SOARES, B. O Diversidade Genética de Genótipos de Pinhão-Manso por Meio de RAPD e ISSR. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual De Montes Claros. Janaúba – MG, 2010. p. 54.

SOUZA, V. C., Lorenzi, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008, 640