

VARIABILIDADE GENÉTICA DE SEMENTES DE MAMONA UTILIZADAS NA SAFRA 2006 NO ESTADO DE MINAS GERAIS

Nádia Nardely Lacerda Durães Parrella, EPAMIG/URNM, nadia@epamig.br

Maria Laene Moreira de Carvalho, DAG/UFLA, milaene@gmail.com

Rafael Augusto da Costa Parrella, EMBRAPA/CNPMS, parrella@cnpmc.embrapa.br

José Carlos Fialho de Resende, EPAMIG/URNM, jresende@epamig.br

José Batista Ribeiro da Silva Reis, EPAMIG/URNM, jbrsreis@epamig.br

RESUMO: A caracterização e avaliação de cultivares são consideradas essenciais tanto para estabelecer diferenças ou semelhanças entre acessos de germoplasma, como para estimular sua utilização para resgatar o desenvolvimento das culturas. Tradicionalmente, está sendo realizada através de descritores morfológicos, porém existe a necessidade de alternativas, como o uso de ferramentas moleculares. Esse trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular – UFLA. Foram utilizados 12 lotes de sementes de mamona de 9 municípios produtores, coletadas pela EMATER-MG. Na caracterização molecular foram testados 99 *primers* pertencentes aos kits OPA, OPE, POM, OPN e OPP com 10 pares de bases, da Operon Technologies, Inc. Apenas 25% dos lotes apresentaram germinação superior ao padrão nacional de 85% para comercialização de sementes certificadas. Dentre os *primers* testados, a maioria gerou produtos monomórficos, porém, entre os 17 *primers* utilizados para estudo de diversidade, foram gerados 88 fragmentos, dos quais 50 foram polimórficas (56,8%). Foi observada uma alta variabilidade genética entre os genótipos, mesmo se tratando de uma mesma cultivar, o que reflete a ampla variabilidade morfológica e agrônômica contida no germoplasma de mamona e às altas taxas de alogamia dessa espécie.

Palavras chave: *Ricinus communis* L.; Caracterização genética; DNA.

INTRODUÇÃO

Além da qualidade fisiológica e sanitária, a qualidade genética faz-se necessário para implantação de campos produtivos de mamona. 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 marcadores moleculares. Meneses et al. (2004) afirmam que entre acessos são comuns diferenças relativas ao conteúdo do óleo e a outras características agronômicas. Isto porque a mamona apresenta sistema reprodutivo misto, ou seja, tanto ocorre autofecundação como cruzamento natural e as taxas de alogamia variam de acordo com o porte da planta (Myczkowski, 2003).

Até os anos 60, estudos de diversidade genética eram baseados em caracteres morfológicos. Entretanto, quando comparados às características fenotípicas, os marcadores genéticos ampliaram o número de caracteres e sua abrangência sobre as espécies vegetais (Ferreira & Grattapaglia, 1998). 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.

A caracterização molecular com base na avaliação da divergência genética de mamona tem sido investigada, com alguns estudos a respeito desse assunto. Diante disso, o objetivo do trabalho foi realizar uma caracterização genética dos lotes de sementes utilizadas em Minas Gerais na implantação de campos de produção de mamona.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras – MG no período de março à outubro de 2007. Após levantamento das regiões produtoras do estado de Minas Gerais, foram detectados 51 municípios com potencial produtivo de mamona com base nos dados na produção de mamona no ano agrícola de 2006, região do estado e na produtividade. Em função do desestímulo dos produtores do estado na safra de 2007, houve considerável redução na área e número de municípios produtores de mamona o que dificultou a coleta das amostras não sendo possível obter amostras de todas as cidades selecionadas. Alguns municípios amostrados foram excluídos do estudo visando obter maior representatividade das regiões onde foi possível a coleta: Zona da Mata, Sul de Minas, Norte e Rio Doce, principais regiões produtoras. As coletas foram realizadas no período de dezembro a janeiro de 2007, ou seja, antes do período de semeadura.

Foram então utilizados 12 amostras de sementes de mamona coletadas em 9 municípios produtores pela da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais, EMATER-MG (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação das amostras de cultivares coletados nos municípios produtores de mamona no estado de Minas Gerais, Lavras – 2007.

Amostra	Município	Variedade
1	Divino	Guarany
2	Nova Resende	Guarany
3	Guapé	NI*
4	Ubaporanga	Guarany
5	Ubaporanga	IAC-80
6	Itacarambi	BRS-149 Nordestina
7	Itacarambi	Guarany
8	Manga	IAC-226
9	Manga	Guarany
10	São João das Missões	IAC-226
11	Mato Verde	IAC-226
12	São Francisco	Paraguaçu

Para a extração de DNA, utilizou-se um procedimento modificado de Rogers & Bendich (1988). Foram utilizadas cinco sementes de cada amostra, que foram trituradas por um mixer por cerca de 15 segundos. Foram utilizados 10ml do tampão de extração pré-aquecido a 65°C (0,2g de brometo de cetiltrimetil-amônio; 1 ml de Tris 1M, 0,4 ml de EDTA 0,5M, 0,82 e água pura para completar 10 ml) e 20 μ l de 2- β -mercaptoetanol. Em seguida, o macerado foi mantido em banho-maria a 65°C por 30-40 minutos, agitando-se 3 a 4 vezes. Após, foram adicionados 10ml da solução 24 clorofórmio: 1 álcool isoamil e a suspensão foi homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos na velocidade de 5.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, misturado com 30 ml da solução 6:1 álcool 95° e acetato de amônio 7,5M e mantido no freezer por cerca de uma noite. Em seguida, foi coletado o DNA e foram adicionados de 200-300 μ l de Tris 1mM e EDTA 0,1 mM, pH 8,0 (TE). A solução de álcool-acetato foi eliminada e o DNA, dissolvido em 200-300 μ l de TE. A quantificação da concentração do DNA foi realizada em fluorímetro (Hoefer Scientific), em seguida o DNA foi diluído com TE para a concentração de 10ng/ μ l, que foi usada nas análises de PCR.

Cada reação PCR foi realizada misturando-se os seguintes ingredientes com as respectivas concentrações (Nienhuis et al., 1995): 200 μ M dNTPs, 0,6 unidades de Taq DNA polimerase, 0,5 μ M de cada primer, tampão de reação (50mM Tris, 1,5mM MgCl₂, 20mM KCl, 250 μ g/ml de albumina de soro bovino, 1% de ficoll 400, 1mM de tartrazina), 20ng do DNA genômico e água pura até o volume final de 10 μ l. O dNTP corresponde a uma mistura

equitativa de ATP, GTP, CTP e TTP. Foram testados 99 *primers* pertencentes aos kits OPA, OPE, POM, OPN e OPP com 10 pares de bases, da Operon Technologies, Inc. Alamed, CA. As reações de amplificação foram realizadas num termociclador Eppendorf, e o programa utilizado foi o RAPDMARC.

Os fragmentos de DNA amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris, ácido Bórico e EDTA) e em uma corrente de 40-50V. Os fragmentos de DNA no gel foram tratados com brometo de etídeo (0,5µg/ml) por 30-50 minutos e foi retirado o excesso de corante por 15-30 minutos com água destilada, sob agitação. A visualização foi feita em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram capturadas na câmara digital KODAK EDS 290 e arquivadas através do software KODAK 1D Image©.

As análises de similaridade e de agrupamento dos genótipos foram feitas a partir dos perfis (bandas) revelados pelos géis, representados por matrizes binárias (ausência=0 e presença=1), empregando o coeficiente de Jaccard (1908) e o método da média aritmética não ponderada (UPGMA) com o auxílio do software Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers, NTSYS 2.1 (ROHLF, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Embora tenham sido realizadas reações de amplificação com 90 *primers* diferentes, diversos *primers* não produziram fragmentos e/ou os produtos de reação não permitiram uma avaliação consistente acerca da similaridade das amostras testadas. Por isso, foram desprezados 73 *primers*, restando 17, que serviram à avaliação dos genótipos. Dentre os *primers* testados, a maioria gerou produtos monomórficos, porém, entre os 17 *primers* utilizados para estudo de diversidade, foram gerados 88 fragmentos, dos quais 50 foram polimórficos (56,8%).

Em média cada iniciador produziu 5,2 fragmentos dos quais 2,9 eram polimórficos (Figura 1). Um estudo semelhante utilizando um número bem superior de iniciadores foi feito por Vidal et al. (2005) ao avaliar cinco cultivares de mamona, procedentes do IAC, da Embrapa Algodão e da Costa Rica. Os autores registraram 105 bandas polimórficas, aproximadamente 23%, de um total de 454 fragmentos produzidos em amplificações RAPD com 47 oligonucleotídeos dos kits A, E, M, N e P da Operon. Já Cunha (2006), empregando marcadores do tipo RAPD, para estudar 10 cultivares de mamona no município de Igaci, em Alagoas, obtiveram 60 bandas polimórficas, utilizando 7 iniciadores produzidos pela IDT (*Integrated DNA Technologies, Inc*), ou seja, cada primer produziu 8,6 bandas, em média.

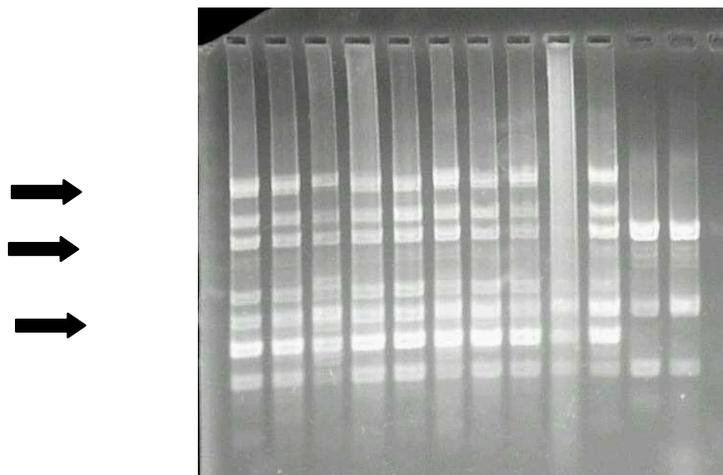


Figura 1. Produto de amplificação de RAPD de amostras de mamona 1 a 12 de acordo com a TABELA 1) com o *primer* E12. Setas indicam padrão polimórficos de amplificação, 950pb, Lavras, 2007.

Dudley (1994), concluiu que resultados obtidos com número de bandas entre 50 e 100 tendem a coincidir com os pedigrees. Colombo et al. (2000), trabalhando com divergência genética de mandioca, acrescentou que o mesmo número é suficiente para estimar relações genéticas inter e intraespecíficas. Já Cunha (2006), obteve 91 bandas polimórficas trabalhando com a caracterização molecular de acessos de mamona. Desta forma, as 50 bandas encontradas estão de acordo com os números aceitáveis para estudos de divergência genética. O número de bandas polimórficas por *primer* foi de 2,9. Em trabalhos semelhantes esse valor pode variar entre 2,34 e 2,31 por *primer* (Meneses, 2004 e Pimenta, 2007).

Ao contrário da maioria dos estudos de diversidade genética realizados, em que foram avaliadas várias cultivares diferentes, possibilitando assim inferir sobre a diversidade genética entre elas, nesse estudo foram avaliadas várias amostras de regiões produtoras de mamona no estado de Minas Gerais. Dentre essas amostras, houve cidades que enviaram uma ou duas cultivares diferentes e ainda, cidades diferentes que enviaram o que a princípio se tratava da mesma cultivar.

O dendrograma obtido a partir da similaridade dos fragmentos gerados nas reações de amplificação, cujo coeficiente Jaccard foi de 0,54 possibilitou a separação dos genótipos em 7 grupos. O primeiro e maior dos grupos, com cerca de 84% de similaridade, composto por 4 cultivares, abriga amostras de cultivares Guarani procedentes das cidades de Divino, Nova Resende, Ubaporanga e Itacarambi. No GRUPO II, separados em um nível de 80% de similaridade, estão além das amostras do Grupo I, a amostra das cidades de Manga, a cultivar IAC 226, e seguido da amostra de Ubaporanga, IAC80 compondo o GRUPO III. As amostras enviadas pelos municípios de Itacarambi (Nordestina) e São João das Missões (IAC226) além das demais do terceiro grupo forma o GRUPO IV. O GRUPO V é constituído ainda da

amostra enviada pelo município de Guapé, sendo sua constituição genética não informada. O GRUPO VI possui ainda as amostras de Mato Verde (IAC 226) e São Francisco (Paraguaçu). E o Grupo VII, com cerca de 0,40 de similaridade com os demais grupos, a amostra do município de Manga, da cultivar Guarani.

Para as cultivares BRS 149- Nordestina e a cultivar BRS 188 Paraguaçu, foi observado índices de similaridade de cerca de 0,45. Em trabalho semelhante, Cunha (2006) observou índices de similaridade entre 0,40 e 0,58 entre essas cultivares. Essas variedades apresentam características agrônômicas semelhantes, tais como período entre emergência da plântula e floração do primeiro racemo, semideiscência dos frutos, teor de óleo nas sementes e produtividade média (Cunha, 2006). As cultivares BRS 149- Nordestina e a cultivar BRS 188 Paraguaçu são provenientes de diferentes linhagens desenvolvidas pela Embrapa Algodão. O CNPA, com seus trabalhos de pesquisa com a mamoneira, iniciados em 1987, lançou para o comércio os cultivares BRS Nordestina e BRS Paraguaçu, anteriormente denominados de linhagens CNPA M. 90-120 e CNPA M. SM4, respectivamente. O primeiro foi obtido através de seleção individual com teste de progênie no cultivar local Baianita, e o segundo, obtido por seleção massal praticada no cultivar, também local, Sangue de Boi (Savy Filho, 2005). De acordo com Freire et al., (2001), o cultivar BRS Nordestina, lançado em 1998, apresenta as seguintes características: 1,90 m de altura, 50 dias para o início florescimento, 1.500 kg.ha⁻¹ de sementes, em condições de sequeiro, e 49% de óleo. Por outro lado, BRS Paraguaçu, cujo lançamento se verificou em 1999, caracteriza-se por apresentar 1,60 m de altura, 54 dias para o início do florescimento, produtividade média de sementes idêntica ao cultivar BRS Nordestina e teor de óleo na semente de 48%.

Para a cultivar Guarani, que foi enviada por cinco cidades: Divino, Nova Resende, Ubaporanga, Itacarambi e Manga, apenas entre as cidades de Divino e Nova Resende foi observado índice de similaridade de 1,0. Houve uma separação basicamente de 2 grupos distintos com acerca de 0,4 de similaridade, sendo o primeiro da amostra da cidade de Manga (Guarani) e segundo das demais cidade, compostas de várias cultivares, dentre elas várias amostras de cultivar Guarani. A cultivar Guarani, disponível para comércio desde 1974, possui frutos indeiscentes, elevada capacidade produtiva com média de 2.800 kg/ha de sementes e teor de óleo nas sementes de 47 a 48%. Resultante do cruzamento entre os cultivares Campinas e Preta, associa a característica indeiscência dos frutos do parental Campinas e a rusticidade e adaptabilidade do cultivar “Preta”, bastante cultivado em todo o país. O cultivar Campinas é indicado, porém, a grandes produtores por apresentar essa indeiscência em seus frutos, fator que favorece a realização de uma única colheita mecanizada

(Savy Filho & Banzatto, 1993; Savy Filho et al., 1999). Portanto, a cultivar enviada pelo município de Manga como sendo Guarani pode não ser realmente a cultivar indicada.

Pimenta (2006) realizou estudo de divergência genética em mamona com marcadores do tipo RAPD, verificou então que os acessos formavam seis grupos. No entanto, dentre esses acessos foram observadas grandes variações dentro de uma mesma cultivar, por exemplo, a cultivar Guarani foi representada pelos tipos: Guarani verde, Guarani normal pelada, Guarani normal, Guarani grande e Guarani pelada (GRUPO III) E Guarani repicada (GRUPO IV). Outro exemplo é o da cultivar IAC80 verde que ficou posicionada no GRUPO II e a IAC80 vermelha no GRUPO III. A cultivar IAC-80, foi obtido em 1976 através da seleção massal praticada em material local, apresenta características de porte alto, ciclo vegetativo de 240 dias, produção de 1.500 a 4.500 kg/ha de sementes, 45 a 47% de óleo nas sementes e frutos indeiscentes; (Savy Filho et al., 1999).

Quanto a cultivar IAC-226, foram avaliadas amostras de três municípios da região Norte de Minas Gerais: Manga, Mato Verde e São João das Missões. No GRUPO I, a amostra de Manga, no Grupo III a amostra de São João das Missões e no GRUPO VI a amostra de Mato Verde. Essa cultivar tem como principais características o porte alto com frutos indeiscentes, com produção variando de 1.500 a 5.000 kg.ha⁻¹ de sementes e teor de óleo de 46 a 47% (Savy Filho et al., 1999).

A variação dentro de uma mesma variedade pode gerar uma identificação confusa por parte dos produtores, extensionistas (durante as coletas) e também nos analistas de sementes. Na ocasião das coletas das amostras, essas informações não foram precisas, por falta de conhecimento principalmente dos produtores de mamona, que utilizam sementes de safras anteriores e adquiridas em estabelecimento que não oferecem certificação genética ou de outros produtores.

Outro fato que pode ter contribuído para o resultado obtido, é a questão do tipo de reprodução dessa espécie. Isto porque a mamona apresenta sistema reprodutivo misto, ou seja, tanto ocorre autofecundação como cruzamento natural e as taxas de alogamia variam de acordo com o porte da planta, podendo chegar até 30% de fecundação cruzada (Myczkowski, 2003). Essas taxas de fertilização natural dentro dos campos produtores podem ocasionar a grande divergência genética observada dentre de uma mesma variedade coletada em diferentes regiões, isso ocorre principalmente pela falta de isolamento entre os campos produtores de mamona, e até mesmo de populações locais. Além disso, os produtores reutilizam sementes de safras anteriores, que devido às taxas de alogamia, ficam a cada geração mais divergentes da cultivar de origem. Portanto, fica evidente, a necessidade de

disponibilizar sementes com qualidade física, fisiologia e sanitária aos produtores, mas também com certificação genética para que esses materiais possam expressar todo seu potencial produtivo.

CONCLUSÕES

- Dezesete oligonucleotídeos iniciadores dentre os selecionados foram capazes de gerar bandas de DNA com padrão polimórfico para os genótipos estudados, evidenciando a sensibilidade de marcadores moleculares baseados em RAPD para revelar a variabilidade genética de genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.).

- Existe alta variabilidade genética entre os genótipos, mesmo se tratando de uma mesma cultivar, o que reflete a ampla variabilidade morfológica e agrônômica contida no germoplasma de *Ricinus communis* L e às altas taxas de alogamia dessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARTER, A. Diversity within American cassava germoplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 12, n.1, p. 189-199, 2000.

CUNHA, M. A. da S.; **Análise molecular da variabilidade genética entre genótipos de *Ricinus communis* L revelada por marcadores RAPD**. 2006. 61P. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2006.

DUDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: SIMPOSIUM ANALYSIS OF MOLECULAR MARKER DATA, 1994, Oregon. **Proceedings...**Oregon: American Society for Horticultural Science/Crop Science Society American, 1994. p.3-7.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa CENARGEN, 1998. 220 p.

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

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vandoise des Sciences Natureles**, v. 44, p. 223-270, 1908.

MENESES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. S.; TAVARES, A. C.; COUTINHO, T. C.; SILVA, S. C.; MILANI, M.; VIDAL, M. S. Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética *Ricinus communis* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

- MYCZKOWSKI, M. L. **Variabilidade genética para o teor de óleo entre progênies autofecundadas de mamona (*Ricinus communis* L.) da cultivar Guarani.** 2003. 33 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2003.
- NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD marker. **Journal of American society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 9, p. 300-306, Mar. 1995.
- PIMENTA, M. R. **Estudo molecular em *Ricinus communis* L., visando a divergência genética, a inibição causada pelo extrato protéico sobre tripsina de *Erinnyis ello* L. e a prospecção de genes do tipo inibidor de tripsina .** 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extration of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 69-76, 1988.
- ROHLF, J. **NTSYSpc 2.1.** Nova Iorque: Applied Biostatistics, 2000. 1 CD-ROM. SAS Institute. **Statistical analysis system 8.02.** Cary, 2001. 1 CD-ROM
- SAVY FILHO, A. **Mamona Tecnologia Agrícola.** Campinas: EMOPI, 2005. 105 p.
- SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 385-407.
- SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N.V. Mamona. In: FURLANI, A.M.C.; VIÉGAS, G.P. (Ed.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônômico.** Campinas: IAC, 1993. p.315-353.
- VIDAL, M. S.; MILANI, M.; MENESES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. de S. **Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética *Ricinus communis* L.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 5 p.