

Notas Científicas

Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD

Edna Lôbo Machado⁽¹⁾, Simone Alves Silva⁽¹⁾, Agenildo de Sousa Santos⁽¹⁾, Leila Andrade Bastos⁽¹⁾, Camila Nogueira Pestana⁽¹⁾, Keylla Souza dos Santos⁽²⁾, Cláudia Fortes Ferreira⁽²⁾ e Maria Selma Alves Silva Diamantino⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia, Rua Rui Barbosa, nº 710, Centro, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. E-mail: ednalobo@ufrb.edu.br, simonealves22@gmail.com, agenildossantos@hotmail.com, leilaa.bastos@hotmail.com, cammilabio@yahoo.com.br ⁽²⁾Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Rua Embrapa, s/nº, CEP 44380-000 Cruz das Almas, BA. E-mail: keylinha_08@hotmail.com, claudiaf@cnpmf.embrapa.br, mariaselmasd@hotmail.com

Resumo – O objetivo deste trabalho foi identificar cultivares geneticamente divergentes de mamoneira (*Ricinus communis*) com uso de marcadores RAPD. Um total de 58 iniciadores RAPD foi usado na genotipagem de 15 cultivares. A dissimilaridade genética entre as cultivares foi calculada a partir do índice de Jaccard, tendo-se utilizado o método da média aritmética não ponderada (UPGMA). Foram identificados 552 fragmentos, sendo 311 polimórficos (56,3%). As cultivares foram agrupadas em cinco grupos, evidência de que há divergência genética entre elas. Os marcadores moleculares do tipo RAPD são eficientes no estudo da dissimilaridade em mamoneira.

Termos para indexação: *Ricinus communis*, marcadores de DNA, melhoramento genético.

Genetic dissimilarity between castor bean cultivars using RAPD markers

Abstract – The objective of this work was to identify genetically different cultivars of castor bean (*Ricinus communis*) using RAPD markers. A total of 58 RAPD primers were used to genotype 15 cultivars. The genetic dissimilarity between cultivars was calculated by Jaccard's index, using the unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA). Five hundred and fifty-two fragments were identified, of which 311 were polymorphic (56.3%). The cultivars were clustered in five groups, evidence that there is genetic difference among them. RAPD markers are efficient in the study of genetic dissimilarity in castor bean.

Index terms: *Ricinus communis*, DNA markers, plant breeding.

A implementação de estratégias que possibilitem o desenvolvimento de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.), com maiores teores de óleo e ajustadas às diferentes condições ambientais, é imprescindível para que a cultura da mamona se consolide como importante componente do programa nacional de produção de biodiesel.

A adaptação de genótipos de mamoneira a baixas latitudes é uma das principais demandas que os programas de melhoramento genético têm buscado atender. Essa adaptação permitirá o cultivo em diversos municípios que hoje não exploram a cultura pelo risco de obtenção de baixas produtividades (Severino et al., 2006).

A grande variabilidade apresentada pela mamona é comumente observada em características botânicas e

agronômicas, mas também pode ser avaliada por meio de polimorfismo de DNA, com o emprego de técnicas como a do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD).

Os marcadores moleculares permitem avaliar, em curto prazo, um número elevado de genótipos. Além disso, os marcadores não sofrem influência ambiental, pleiotrópica ou epistática, como ocorre com os marcadores morfológicos que, por apresentarem essa limitação, normalmente não permitem identificar diferenças entre genótipos muito próximos. Trabalhos que relatam a eficiência dos marcadores RAPD na identificação de polimorfismo, em mamoneira, foram publicados por Gajera et al. (2010) e Li et al. (2011). No entanto, a análise da diversidade genética da mamoneira por meio de marcadores RAPD ainda carece de estudos.

A análise da dissimilaridade genética dentro de uma população é fundamental para programas de melhoramento genético. Essa dissimilaridade permite a indicação de cruzamentos entre genitores geneticamente divergentes, o que viabiliza a produção de híbridos com maior efeito heterótico.

O objetivo deste trabalho foi identificar cultivares geneticamente divergentes de mamoneira com uso de marcadores RAPD.

Foram utilizadas 15 cultivares de mamoneira: EBDA MPA 11, EBDA MPA 17, EBDA MPA 18, EBDA MPA 26, EBDA MPA 31, EBDA MPA 34, EBDA MPA 35, EBDA MPA 36, EBDA MPA 37, EBDA MPA 38, EBDA MPA 39, EBDA MPA 40, EBDA MPA 41, EBDA MPA 42 e EBDA MPA 43, disponibilizadas pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA).

O DNA genômico foi extraído de folhas jovens e saudáveis. Para cada cultivar, utilizou-se amostra foliar de dez plantas, o que totalizou 150 amostras. A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990).

Para realizar as reações de amplificação, a concentração das amostras foi ajustada para 5 ng μL^{-1} . Para cada cultivar, foi feito um “pool” de DNA, constituído de uma mistura de DNA de amostras de dez folhas da mesma cultivar.

Para a seleção de iniciadores com bom padrão de amplificação, realizou-se uma triagem com DNA genômico dos genótipos EBDAMPA 11, EBDAMPA 26 e EBDA MPA 38. Um total de 82 oligonucleotídeos da série Operon Technologies Inc. (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) foi utilizado nessa triagem inicial. Apenas os oligonucleotídeos que produziram padrões consistentes foram selecionados para a etapa de amplificação.

Cada reação de amplificação foi preparada em volume final de 25 μL , que continha: 2,5 mmol L^{-1} de tampão 10X (50 mmol L^{-1} de Tris-HCl, 20 mmol L^{-1} de KCl), 0,25 mmol L^{-1} de dNTPs mix, 2,5 mmol L^{-1} de MgCl_2 , 1,8 mmol L^{-1} de iniciadores aleatórios (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA), 0,2 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP), 5 ng de DNA genômico e água ultra-pura q.s.p. As amostras foram amplificadas em termociclador Biocycler MJ96+/MJ96G (Applied Biosystems do Brasil Ltda., São Paulo, SP), com um ciclo inicial de 94°C por 1 min e 40 ciclos de: 94°C por

30 s, 35°C por 30 s e 72°C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 7 min a 72°C.

A eletroforese foi conduzida em gel de 1,5% agarose (p/v) corado com 0,5 mg mL^{-1} de brometo de etídeo em tampão TBE 1X (89 mmol L^{-1} de Tris-borato, 2 mmol L^{-1} de EDTA) por aproximadamente 3 horas. Como padrão de peso molecular, utilizou-se o “1 kb ladder” (Promega, Madison, WI, EUA). Os fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados por meio do Sistema Digital Kodak Science.

Pelo fato de o RAPD ser um marcador dominante, os dados foram computados como ausência (0) e presença (1) de bandas. A diversidade genética das cultivares foi determinada por meio da matriz de dissimilaridade genética, gerada pelo programa Genes (Cruz & Carneiro, 2003), tendo-se utilizado o índice de Jaccard (1908).

O dendrograma foi construído com o método da média aritmética não ponderada (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973), por meio do programa Statistica (StatSoft, 2002). A correlação cofenética entre a matriz de distância e a matriz de agrupamento foi calculada por meio do programa Genes (Cruz & Carneiro, 2003), e o ponto de fusão foi definido de acordo com os critérios propostos por Mingoti (2005).

Um total de 58 iniciadores foi selecionado para a genotipagem das 15 cultivares avaliadas. Desses, 49 foram polimórficos (84,48%) e geraram 552 fragmentos, dos quais 311 polimórficos (56,3%). Os iniciadores polimórficos foram: OPA-1, OPA-2, OPA-3, OPA-4, OPB-1, OPB-4, OPB-7, OPB-10, OPD-3, OPD-5, OPD-8, OPE-1, OPE, OPE-14, OPF-1, OPF-3, OPF-6, OPF-13, OPI-2, OPI-10, OPI-15, OPI-16, OPJ-1, OPJ-4, OPJ-5, OPJ-10, OPJ-11, OPJ-13, OPJ-16, OPJ-18, OPJ-19, OPJ-20, OPM-1, OPM-2, OPM-3, OPM-4, OPM-5, OPM-13, OPM-14, OPM-16, OPN-5, OPN-7, OPN-8, OPQ-1, OPQ-4, OPQ-10, OPQ-14, OPQ-17 e OPQ-18. Em média, cada iniciador polimórfico produziu 11,3 fragmentos, dos quais 6,3 polimórficos. Resultados semelhantes foram obtidos por Gajera et al. (2010), que relataram 205 fragmentos polimórficos – média de 6,83 por iniciador –, em estudo com 22 genótipos de mamoneira e 30 iniciadores RAPD polimórficos.

O dendrograma possibilitou a separação das cultivares em cinco grupos, evidência de que há dissimilaridade genética entre elas (Figura 1). As

cultivares foram agrupadas com a seguinte distribuição: grupo 1, EBDA MPA 11; grupo 2, EBDA MPA 17; grupo 3, EBDA MPA 18, EBDA MPA 26, EBDA MPA 43, EBDA MPA 38, EBDA MPA 39, EBDA MPA 40, EBDA MPA 41 e EBDA MPA 42; grupo 4, EBDA MPA 36 e EBDA MPA 37; e grupo 5, EBDA MPA 31, EBDA MPA 34 e EBDA MPA 35.

A detecção de dissimilaridade genética entre as cultivares é importante para a tomada de decisão na escolha de genitores a serem cruzados dentro do programa de melhoramento genético da espécie. A correlação cofenética obtida foi de 0,74, considerada alta e adequada. Segundo Vaz Patto et al. (2004), $r > 0,56$ é considerada ideal, pois indica haver boa concordância entre a matriz de dissimilaridade e a de agrupamento.

As maiores distâncias genéticas (0,28) foram observadas entre as cultivares: EBDA MPA 11 e EBDA MPA 34, EBDA MPA 35 e EBDA MPA 36; e EBDA MPA 35 e EBDA MPA 42 (Tabela 1). A princípio, esses cruzamentos seriam os mais promissores para futuras hibridações dentro de um programa de melhoramento genético da mamoneira. Contudo, esses resultados devem ser complementados com avaliações fenotípicas das cultivares. De acordo com Falconer (1989), para a seleção de genitores, deve-se aliar o bom desempenho destes com a divergência genética entre eles.

Os resultados obtidos no presente trabalho são indicativos de que é possível avaliar a dissimilaridade genética em genótipos de mamona por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD.

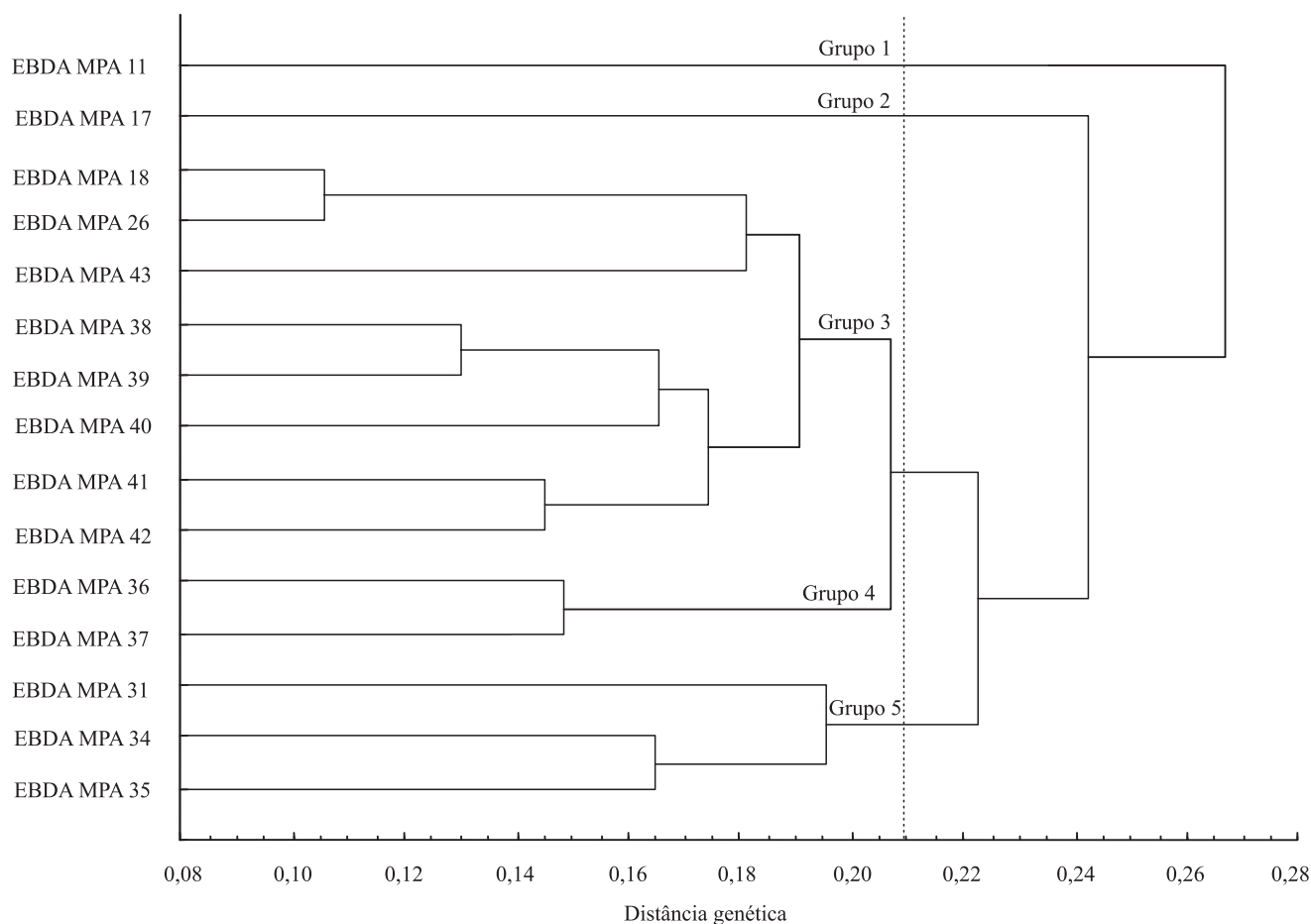


Figura 1. Dendrograma de 15 cultivares de mamoneira obtido pelo método da média aritmética não ponderada (UPGMA), a partir do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard.

Tabela 1. Matriz de dissimilaridade genética de 15 cultivares de mamoneira obtida a partir do coeficiente de dissimilaridade de Jaccard.

Cultivares	EBDA MPA 11	EBDA MPA 17	EBDA MPA 18	EBDA MPA 26	EBDA MPA 31	EBDA MPA 34	EBDA MPA 35	EBDA MPA 36	EBDA MPA 37	EBDA MPA 38	EBDA MPA 39	EBDA MPA 40	EBDA MPA 41	EBDA MPA 42
EBDA MPA 17	0,2733													
EBDA MPA 18	0,1912	0,1920												
EBDA MPA 26	0,2315	0,1891	0,1058											
EBDA MPA 31	0,2696	0,2354	0,1941	0,1856										
EBDA MPA 34	0,2764	0,2644	0,1983	0,1496	0,2058									
EBDA MPA 35	0,2843	0,2228	0,2188	0,1798	0,1846	0,1646								
EBDA MPA 36	0,2773	0,2644	0,1908	0,1816	0,2150	0,1782	0,1960							
EBDA MPA 37	0,2550	0,2745	0,1926	0,1892	0,2283	0,2052	0,2103	0,1485						
EBDA MPA 38	0,2532	0,2538	0,1847	0,1894	0,2422	0,2122	0,2201	0,1663	0,1374					
EBDA MPA 39	0,2187	0,2217	0,1886	0,1881	0,2540	0,2403	0,2304	0,2141	0,2032	0,1304				
EBDA MPA 40	0,2361	0,1735	0,2195	0,2125	0,2687	0,2328	0,2469	0,2403	0,2336	0,1758	0,1548			
EBDA MPA 41	0,2242	0,2544	0,1648	0,1781	0,2597	0,2510	0,2524	0,2063	0,1920	0,1514	0,1563	0,1535		
EBDA MPA 42	0,2251	0,2563	0,1757	0,2098	0,2400	0,2721	0,2770	0,1921	0,2087	0,1678	0,1939	0,2086	0,1452	
EBDA MPA 43	0,2254	0,2303	0,1748	0,1871	0,2522	0,2495	0,2535	0,2331	0,2301	0,2026	0,1849	0,2045	0,1798	0,1804

Referências

- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003. 585p.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.
- FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. 3rd ed. London: Longman, 1989. 438p.
- GAJERA, B.B.; KUMAR, N.; SINGH, A.S.; PUNVAR, B.S.; RAVIKIRAN, R.; SUBHASH, N.; JADEJA, G.C. Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers. **Industrial Crops and Products**, v.32, p.491-498, 2010. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.06.021.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, v.44, p.223-270, 1908.
- LI, F.J.; WANG C.L.; HE, D.; LIU, Y.Q.; CHEN, M.H.; WANG, Y.R.; LI, F.J.; YANG, Z.H.; CHEN, G. Evaluation of genetic diversity in Castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD markers. **Advanced Materials Research**, v.343-344, p.981-987, 2011. DOI: 10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.981.
- MINGOTI, S.A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: UFMG, 2005. 295p.
- 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**, v.37, p.188-194, 2006.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973. 573p.
- STATSOFT. **Statistica for windows: computer program manual**. Version 6.0. Tulsa: StatSoft, 2002.
- VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, v.137, p.63-67, 2004. DOI: 10.1023/B:EUPH.0000040503.48448.97.

Recebido em 6 de outubro de 2012 e aprovado em 1 de março de 2013