

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES TRAP E
DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE
Ricinus communis L.**

KARINE DA SILVA SIMÕES

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
SETEMBRO - 2017**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES TRAP E DIVERGÊNCIA
GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE *Ricinus communis* L.**

KARINE DA SILVA SIMÕES

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2011

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia).

Orientadora: Profa. Dra. Simone Alves Silva

Coorientadoras: Profa. Dra. Edna Lôbo Machado

Dra. Cássia da Silva Linge

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

SETEMBRO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S5894d	<p>Simões, Karine da Silva. Desenvolvimento de marcadores trap e divergência genética em linhagens de <i>Ricinus communis</i> L / Karine da Silva Simões. _ Cruz das Almas, BA, 2017. 126f.; il.</p> <p>Orientador: Prof^º. Dr^º. Simone Alves Silva. Co-Orientador: Prof^º. Dr^º. Edna Lobo Machado</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.</p> <p>1.Mamona. 2. Mamona – Melhoramento Genético 3. Mamona - Produção. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 633.85</p>
--------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES TRAP E DIVERGÊNCIA
GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE *Ricinus communis* L.**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
KARINE DA SILVA SIMÕES**

Realizada em 19 de Setembro de 2017

Profa. Dra. Simone Alves Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
Examinador Interno (Orientadora)

Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
Examinador Interno

Profa. Dra. Caroline Marques Castro
Embrapa Clima Temperado – Embrapa
Examinador Externo

Profa. Dra. Cláudia Fortes Ferreira
Embrapa Mandioca e Fruticultura – Embrapa
Examinador Externo

Profa. Dra. Adriana Rodrigues Passos
Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, José Benicio e Cleonice, e minha irmã Caliane por todo o apoio, dedicação e amor, sempre me encorajando nas horas difíceis e comemorando todas as conquistas; o incentivo de vocês foi fundamental para a realização desta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a vida, me ensinando a lutar sempre para que possa alcançar meus objetivos. Dando-me força, coragem, determinação e perseverança na busca por meus ideais.

Aos meus pais José Benício e Cleonice, pela vida, amor, carinho, dedicação, ensinamentos e por serem exemplos de vida.

À minha irmã Caliane pelo seu companheirismo, amor e respeito.

À minha família em especial as minhas tias e primas e a minha querida avó Maria Benedita, pelos seus valiosos conselhos, atenção e carinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB).

À CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Simone Alves Silva, pela confiança e ensinamentos na elaboração deste trabalho.

À Professora Dra. Edna Lôbo Machado, pelos ensinamentos, incentivos e pela amizade.

À Helison Brasileiro e Mauricio Silva, pelos ensinamentos e constante disponibilidade.

À Dra. Cássia da Silva Linge, pelos ensinamentos e incentivos.

À toda equipe do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO), pelo apoio, dedicação, paciência e amizade durante todo doutorado.

Ao pesquisador Dr. Eder Oliveira, por disponibilizar o termociclador para realização do meu trabalho.

Aos amigos em especial, Mariane, Ademir, Letícia, Kelly, Alana e Márcia, pela constante motivação, ajuda e amizade, sempre incentivando e torcendo por mim.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade do tempo dedicado.

Por fim, agradeço todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os meus sinceros e profundos agradecimentos.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
ARTIGO 1	
DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES TRAP PARA <i>Ricinus communis</i> L.	27
ARTIGO 2	
DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES TRAP	56
ARTIGO 3	
ANÁLISE CONJUNTA PARA O CARÁTER TEOR DE ÓLEO E MARCADORES TRAP EM LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA.....	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	116

DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES TRAP E DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE *Ricinus communis* L.

Autora: Karine da Silva Simões

Orientadora: Dra. Simone Alves Silva

RESUMO: Este trabalho teve como objetivos: 1- desenvolver iniciadores TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) referentes às vias metabólicas de síntese de ácidos graxos, ricina e resistência a patógenos; 2- Estudar a divergência genética entre 40 linhagens elites de mamoneira por meio de marcadores TRAP desenvolvidos para biossíntese de óleo e ricina; 3- Avaliar a variabilidade genética em 40 linhagens elites de *Ricinus communis* L. por meio da análise conjunta para o caráter teor de óleo na semente (TOS) e marcadores moleculares TRAP desenvolvidos para síntese de óleo. Para o desenvolvimento de iniciadores TRAP foram desenhados 56 iniciadores fixos a partir de sequências ESTs (*Expressed Sequence Tags*) depositadas em bancos de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para a validação desses marcadores, utilizou-se um total de 336 combinações entre os 56 iniciadores fixos mais seis arbitrários. Destas, 330 combinações (98%) apresentaram bom padrão de amplificação. Na avaliação da divergência genética entre as 40 linhagens elites de mamoneira, um total de 70 combinações de marcadores TRAP foi utilizado na genotipagem. Foram amplificados 580 fragmentos, sendo 335 (58,0%) polimórficos. Um total de quatro grupos foi formado, demonstrando divergência genética entre as linhagens elites melhoradas. Na análise conjunta, utilizaram-se as médias de teor de óleo na semente e 44 combinações TRAP. As médias para teor de óleo variaram entre 39,10 (UFRB 36) a 55,39 (UFRB 209), ressaltando a variabilidade genética existente entre as linhagens elites estudadas. A análise conjunta demonstrou a formação de três grupos entre as linhagens elites. Os resultados comprovaram que os marcadores TRAP desenvolvidos e otimizados são os primeiros marcadores funcionais desenvolvidos para mamoneira, permitindo a detecção de polimorfismo em regiões próximas a genes de interesse e que também foram eficientes para estudos de variabilidade genética. A análise conjunta utilizada entre TOS e marcadores TRAP confirmou a existência de variabilidade genética entre as linhagens elites. Os marcadores moleculares baseados em combinações TRAP foram eficientes na detecção da dissimilaridade genética e constituem-se em mais uma ferramenta importante e eficaz para estudos genéticos na espécie.

Palavras-chave: Ricina, teor de óleo, *Target Region Amplification Polymorphism*, variabilidade genética.

DEVELOPMENT OF TRAP MARKERS AND GENETIC DIVERGENCE IN LINES ELITES DE *Ricinus communis* L.

Author: Karine da Silva Simões

Adviser: Dra. Simone Alves Silva

ABSTRACT: The objective of this study was to develop TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) primers for the metabolic pathways of fatty acid synthesis, ricin and resistance to pathogens; 2- To study the genetic divergence among 40 elite lineages of castor bean by means of TRAP markers developed for biosynthesis of oil and ricin; 3- Evaluate the genetic variability in 40 elite lineages of *Ricinus communis* L. by means of combined analysis for oil content in the seed (TOS) and molecular TRAP markers developed for oil synthesis. For the development of TRAP primers, 56 fixed primers were designed from ESTs (*Expressed Sequence Tags*) deposited in the NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) genbank database. For the validation of these markers, a total of 336 combinations among the 56 fixed and six arbitrary primers were used. Of these, 330 combinations (98%) presented good amplification pattern. In the evaluation of the genetic divergence among the 40 elite lineages of castor bean, a total of 70 combinations of TRAP markers were used in the genotyping. 580 fragments were amplified, whereas 335 (58.0%) were polymorphic. A total of four groups were formed, demonstrating genetic divergence among the improved elite strains. In the combined analysis, the mean oil content in the seed and 44 TRAP combinations were used. The mean values for oil content ranged from 39.10 (UFRB 36) to 55.39 (UFRB 209), highlighting the genetic variability among the elite lineages studied. The combined analysis demonstrated the formation of three groups among the elite strains. Results showed that the TRAP markers developed and optimized are the first functional markers developed for castor bean, allowing the detection of polymorphism in regions close to genes of interest, were also efficient for studies of genetic variability. The joint analysis used between TOS and TRAP markers confirmed the existence of genetic variability among the elite strains. Molecular markers based on TRAP combinations were efficient in the detection of genetic dissimilarity and constitute another important and effective tool for genetic studies in the species.

Keywords: Ricin, oil content, *Target Region Amplification Polymorphism*, genetic variability

REFERENCIAL TEÓRICO

Origem da *Ricinus communis* L

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), é uma dicotiledônea pertencente à família Euphorbiaceae. É uma planta xerófila e heliófila, provavelmente originária na região da Etiópia e da África. É possível destacar algumas regiões como centro de diversidade, como Ásia, Índia e China. Acredita-se que esses centros sejam os primeiros locais de introdução de cultivo desta espécie (LIMA et al., 2008). A diversidade de um grande número de variedades desta planta, encontradas tanto no continente africano, como no asiático, dificulta o estabelecimento de uma procedência efetiva da mamona. A facilidade de propagação e de adaptação em diferentes condições climáticas, propiciou à mamona ser encontrada ou cultivada nas mais variadas regiões do mundo (CHIERICE; CLARO NETO, 2001).

No Brasil, alguns autores consideram que a mamona tenha sido introduzida durante a colonização portuguesa, por ocasião da vinda dos escravos africanos (RODRIGUES et al., 2002), com a finalidade de utilizar seu óleo na iluminação e para lubrificação de eixos de carroça (CHIERICE e CLARO NETO, 2001).

Importância Econômica

A mamoneira (*Ricinus communis* L., $2n = 2x = 20$, Euphorbiaceae), é uma importante oleaginosa não comestível predominantemente cultivada em regiões áridas e semiáridas do mundo, com amplo uso na indústria e aplicações agrícolas. Sementes de mamona contêm aproximadamente 46-55% de óleo (OGUNNIYI, 2006). A extração inicial é feita por prensagem mecânica, removendo apenas em torno de 45% do óleo presente nas sementes, e a obtenção do restante de óleo ocorre por meio de solventes como hexano (OGUNNIYI, 2006). Devido às suas propriedades químicas e físicas, o óleo de rícino serve como uma fonte renovável de matéria-prima apresentando variadas aplicações, tais como, a fabricação de detergentes, cosméticos, produtos

farmacêuticos (GOWDA et al., 2008), compostos antifúngicos e lubrificantes; próteses (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010); revestimento de tecido, tintas, vernizes, ceras, giz de cera, pomadas (FRIEDMAN et al., 2010) e produção de biodiesel (VISSER et al., 2011).

Por ser uma planta de fácil adaptabilidade a certas condições edafoclimáticas, como: baixo índice pluviométrico e tolerância à seca, há um incremento do plantio por produtores que se concentram na região semiárida do nordeste brasileiro, criando a possibilidade de desenvolvimento da economia dessa região e a capacidade de geração de empregos no campo, assim como matéria-prima para a indústria. No entanto, a produção da mamoneira pela agricultura familiar, necessita de políticas públicas governamentais, além de investimentos em pesquisas agrícolas locais e em tecnologia de manejo no intuito de viabilizar essa atividade agrícola num ambiente competitivo (PINOTTI; AMARAL, 2013).

É possível fazer a extração da fibra e da celulose a partir da haste da mamoneira. A fibra e a celulose são usadas na confecção de papel e tecidos grosseiros. Finalmente, sua semente esmagada compreende um dos componentes da torta de mamona, juntamente com os restos culturais da planta. A torta pode ser utilizada como fertilizante orgânico, com grande capacidade de restauração de solos desgastados, como nematicida, e, após tratamento para a retirada de produtos tóxicos (a proteína ricina), como alimentação animal (COSTA et al., 2004). A mamona possui, em suas sementes, uma alta concentração da proteína ricina. Esta proteína é extremamente tóxica e é considerada um dos venenos mais mortíferos se administrada por via intravenosa ou oral. A ricina é inibidora da síntese proteica por interagir com os ribossomos, ocasionando a morte celular (CHAN et al., 2010).

Referente à sua utilização para a produção de biodiesel, pesquisas vem sendo desenvolvidas com o objetivo de avaliar sua eficiência e viabilidade. Segundo Furlanetto e Santos (2014) a mamoneira tem demonstrado eficiência como matéria-prima para obtenção do biodiesel na Paraíba, porém, ainda é reduzida a adoção de inovações sustentáveis de produção de biodiesel de mamona no Brasil. Segundo Carvalho et al. (2015) os biocombustíveis possibilitam a manutenção do homem no campo e o desenvolvimento socioeconômico nas áreas urbanas, criando empregos nas indústrias que atuam

na produção de biodiesel no Brasil. A agricultura familiar pela sua característica de diversidade produtiva pode contribuir com matérias-primas na produção de biodiesel.

A perda da competitividade do Brasil no mercado Mundial de mamona (SANTOS; KOURI, 2006) é explicada pela deficiência do agricultor familiar nordestino em utilizar melhor nível tecnológico expresso em termos de uso de insumos industriais (como fertilizantes), sementes melhoradas, ou mesmo melhores sistemas de preparo do solo, plantio, colheita, beneficiamento dos frutos e armazenamento das sementes, fatos estes que podem ser sanados com o uso de tecnologias e recomendações de cultivares levadas ao agricultor em busca da revitalização desta cultura no Brasil (BELTRÃO; CARDOSO, 2004).

O Brasil foi o principal produtor mundial de mamona até 1986. Atualmente é o terceiro maior produtor, superado apenas pela Índia e China (FAO STATISTICS, 2014). A produção mundial de grãos de mamona em 2014 foi de 1,96 milhões de toneladas, sendo a Índia o maior produtor com 1,07 milhões de toneladas (FAO STATISTICS, 2014), liderando com vantagem a produção do mercado internacional de mamona e derivados. Devido à concentração do cultivo, existem somente alguns grandes exportadores do óleo de mamona que preenchem uma parcela significativa da demanda mundial.

Segundo levantamento da CONAB (2017), que faz uma comparação entre as safras de 2015/2016 e 2016/2017, o Brasil produziu 15,0 mil toneladas de mamona em uma área plantada de 29,3 mil hectares. No Nordeste, a produção foi de 12,9 mil toneladas em uma área plantada de 27,4 mil hectares. O estado da Bahia concentra 69,33% da produção nacional, produzindo 10,4 mil toneladas em uma área plantada de 21,1 mil hectares (Tabela 1). A região de Irecê, localizada no semiárido baiano, concentra um dos maiores polos; sendo a agricultura familiar o maior responsável pela produção (QUEIROGA et al. 2011).

Apesar dos bons índices observados, a produção pode aumentar significativamente com investimentos em tecnologia, com o desenvolvimento de cultivares com alto teor de óleo na semente, mais produtivas, adaptadas a diversas regiões do país, apropriadas para diferentes tecnologias de colheita e resistentes a algumas doenças, além da utilização de práticas agrícolas adequadas respeitando as características do clima, de solo e a tradição de cultivo de cada localidade (FREIRE et al., 2001).

Tabela 1. Estimativa de área, produtividade e produção de mamona. Adaptado de (CONAB, 2017).

Região/UF	Área (mil ha)		Produtividade (Kg/ha)		Produção (mil t)	
	Safra 15/16	Safra 16/17	Safra 15/16	Safra 16/17	Safra 15/16	Safra 16/17
Nordeste	31,5	27,4	461	470	14,4	12,9
PI	0,6	0,2	500	494	0,3	0,1
CE	8,3	5,2	122	434	1,0	2,3
PE	1,6	0,9	244	113	0,4	0,1
BA	21,0	21,1	610	494	12,8	10,4
Centro-Oeste	-	1,7	-	1,200	-	2,0
MT	-	1,7	-	1,200	-	2,0
Sudeste	0,3	0,2	909	443	0,3	0,1
MG	0,3	0,2	909	443	0,3	0,1
Norte/Nordeste	31,5	27,4	461	470	14,5	12,9
Centro-Sul	0,3	1,9	909	1,120	0,3	2,1
Brasil	31,8	29,3	465	512	14,8	15,0

A semente é o ponto de partida no estabelecimento de uma cultura e, conseqüentemente, de uma boa produção. A produtividade e a qualidade do produto dependem primordialmente da qualidade da semente; por ser mais produtiva e apresentar alto nível de resistência a doenças e pragas, a semente selecionada proporciona, por unidade de área plantada, maior retorno aos produtores de mamona e conduz a maior rendimento de óleo para a indústria (SEVERINO et al., 2006).

A mamoneira é afetada por vários microorganismos patogênicos, os quais contribuem significativamente para a diminuição da produção da cultura. Algumas doenças podem ser destacadas, entre elas o tombamento e a podridão (*Macrophomina phaseolina*), a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini*), a podridão de Botryodiplodia (*Botryodiplodia theobromae*) e a podridão-dos-ramos (*Lasiodiplodia theobromae*) (SEVERINO, et al., 2012).

Além destas doenças, a cultura também é afetada por manchas foliares causadas por bactéria (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Ricini*) e fungos (*Alternaria ricini* e *Cercospora ricinella*), e o mofo cinzento causado pelo fungo *Amphobotrys ricini* uma das principais doenças de importância econômica da cultura da mamoneira (ANJANI, 2012; SEVERINO et al., 2012).

O óleo da mamona

A era atual da crise energética, devido ao esgotamento contínuo de fontes convencionais de combustível e o imenso prejuízo que causam no ambiente, sendo este último um dos fatores mais agravantes, principalmente em se tratando do aquecimento global, reacendeu-se o interesse na busca de fontes alternativas de energia (ESCOBAR et al., 2009). Espécies de plantas oleaginosas vêm ganhando destaque como uma opção viável em substituição à produção convencional de gasolina e o diesel. Algumas espécies de plantas têm sido sugeridas como fonte potencial para a produção de biodiesel e o uso de óleos vegetais como matérias-primas renováveis nas indústrias químicas tem aumentado de forma significativa. A grande disponibilidade e a capacidade de produzir materiais biodegradáveis dos óleos vegetais os tornam promissores em aplicações industriais (ALAM et al., 2014).

Atualmente, a produção de biodiesel a partir de espécies de culturas oleaginosas (canola, soja e girassol) em nível comercial, é considerada um grande desafio. Muitas dessas espécies são utilizadas para consumo humano, e alterando a sua utilização para incluir na produção de biodiesel, criaria uma escassez da cadeia de abastecimento e um aumento dos preços destes alimentos e seus derivados. Neste contexto, as espécies que não competem com necessidades alimentares humanas como o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e a mamoneira (*Ricinus communis* L.) são consideradas como uma excelente alternativa na produção de biodiesel (PECINA-QUINTERO et al., 2013).

O avanço do uso do biodiesel na matriz energética tem ocorrido rapidamente, a ponto de seu preço chegar a ser competitivo com o do óleo diesel. Contudo, a insuficiente oferta de matéria-prima, aliada ao seu custo para produção, são os principais entraves para aumentar a competitividade desse biocombustível no Brasil. Assim, os desafios tecnológicos são a essência da competitividade deste setor, exigindo a aquisição de implementos agrícolas adequados, e o melhoramento constante das espécies vegetais cultivadas e de suas técnicas de manejo (MATH, 2010).

A mamoneira possui alto teor de óleo nas sementes (46-55%), e é uma importante alternativa na produção de biodiesel e óleo industriais em diversas

aplicações. O óleo da mamoneira é a única fonte comercial de ácido ricinoleico (12-hidroxi Ácido oleico) (OGUNNIYI, 2006). Cerca de 90% do óleo presente na semente da mamona é composto por este ácido (ARANSIOLA et al., 2014).

O ácido ricinoléico é um ácido graxo com propriedades singulares, por ser muito denso, possuir grande viscosidade e estabilidade. Dessa forma, seu óleo mantém suas características em uma ampla faixa de temperatura, ao contrário de outros óleos vegetais, que perdem sua viscosidade em altas temperaturas e se solidificam em baixas; razão da possibilidade de seu emprego em diversos equipamentos mediante vastas condições climáticas (RAMEZANI, et al., 2010) (Tabela 2). Além de ser o único óleo na natureza solúvel em álcool, e não necessitar de calor e do conseqüente gasto de energia, que requerem outros óleos vegetais em sua transformação para o combustível (RAMEZANI, et al., 2010).

Tabela 2. Tipos de ácidos graxos constituintes do óleo de mamona. Adaptado de (ARANSIOLA et al., 2014).

Ácido graxo	Porcentagem
Ácido Palmítico	1,10
Ácido Esteárico	3,10
Ácido Ricinoléico	89,60
Ácido Oléico	4,90
Ácido Linoléico	1,30

O biodiesel produzido a partir de óleo de rícino tem uma viscosidade elevada, tornando-se um bom aditivo devido à sua capacidade de aumentar a lubricidade do diesel derivado do petróleo (BELTRÃO et al., 2006). Adicionalmente, o seu desempenho demonstrou ser superior ao observado na gasolina e no diesel (MANDPE et al., 2005).

Um outro motivo para a utilização da mamona na produção de biodiesel, seria que esta cultura apresenta um elevado teor de óleo quando comparado a outros tipos de grãos como soja, algodão, girassol, amendoim e canola (PINOTTI; AMARAL, 2013). Entretanto, o preço no mercado internacional do óleo de mamona é muito elevado quando comparado a outros tipos de óleos. Uma possível explicação seria a grande diversidade na utilização da indústria química fina (PINOTTI; AMARAL, 2013).

O consumo mundial de óleo de mamona cresceu mais de 50% nos últimos 25 anos (Figura 2), aumentando de 400 mil toneladas em 1985 para mais de 600 mil toneladas em 2010 (SEVERINO et al., 2012).

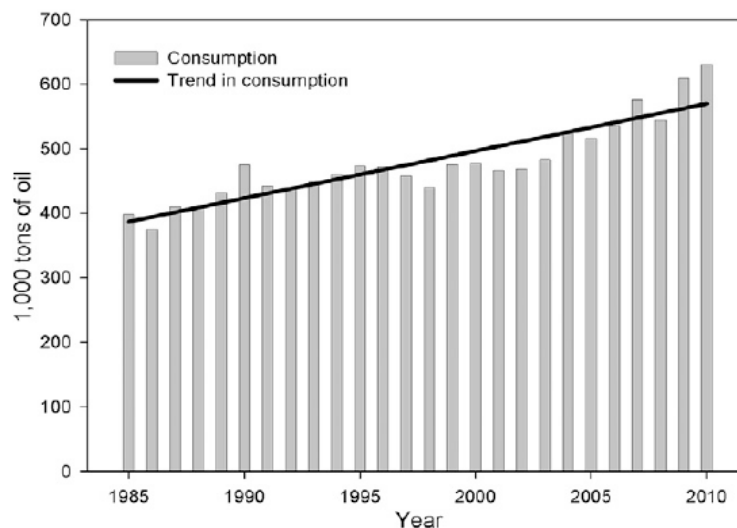


Figura 2 – Consumo Mundial de Óleo de Mamona, 1985 a 2010. Fonte: Severino et al., 2012.

Após a extração do óleo, os materiais restantes processados podem ser utilizados para diversos fins. No entanto, a utilização de subprodutos industriais é limitada pela alta concentração de ricina. A ricina penetra na célula e impede a produção de outras proteínas, levando à morte celular (GODOY et al., 2009). Entretanto, de acordo com o conhecimento das características da ricina, é possível adotar-se medidas de prevenção de intoxicação dessa substância (FONSECA, SOTO-BLANCO, 2014).

Melhoramento Genético da Mamoneira

O melhoramento de plantas é a forma mais viável e eficaz de se aumentar a produção com a adaptação da planta ao ambiente de cultivo, atendendo e proporcionando inúmeros benefícios na alimentação humana, animal, cultivo de plantas e em outras áreas de suma importância para a sociedade. O melhoramento permite o desenvolvimento de cultivares resistentes ou tolerantes

a pragas, doenças e a estresses climáticos, bem como cultivares mais produtivas e de melhor qualidade (BORÉM; MIRANDA, 2013).

A análise de divergência genética permite quantificar a variabilidade genética de uma espécie, tanto para sua conservação como forma de identificar materiais semelhantes e divergentes, como também para seu uso em programas de melhoramento, por possibilitar a seleção de indivíduos superiores em uma população melhorada, ou a recombinação de genótipos, bem como identificar quais os descritores que mais contribuem para a divergência (CRUZ; FERREIRA; PESSONI, 2011).

A certificação de variabilidade, com base na divergência genética, é uma estratégia bastante utilizada em um programa de melhoramento. Entretanto, a avaliação da divergência genética como critério de escolha de genitores nos programas de melhoramento genético da mamoneira precisa ser mais explorada (BAHIA et al., 2008). Essa quantificação da diversidade genética pode ser realizada por meio de caracteres agrônômicos, morfológicos e moleculares, entre outros (AMORIM et al., 2007).

Devido a importância econômica e social da mamoneira, é necessário conduzir estudos no intuito de avaliar a variabilidade genética, e a longo prazo, obter cultivares superiores de alta produtividade e extremamente adaptadas a diferentes condições edafoclimáticas. No melhoramento genético desta espécie, devem ser priorizadas características como: produtividade, precocidade, frutos indeiscentes e semi/deiscentes, plantas com porte médio e/ou baixo, alto teor de óleo, maior resistência às principais pragas e doenças (FREIRE et al. 2007).

O primeiro programa de melhoramento genético da mamoneira desenvolvido no País foi iniciado em São Paulo, pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em 1936, desenvolvendo várias cultivares ao longo dos anos (VIEIRA; LIMA, 2011). O objetivo do programa de melhoramento era desenvolver cultivares de mamoneiras mais produtivas, com maiores níveis de resistência às doenças e pragas e com outras características agrônômicas desejáveis. Desta forma, em 1942, a cultivar IAC 38 foi recomendada para o estado de Minas Gerais e, em 1958, indicada também como a melhor cultivar de mamona para o estado de São Paulo. No entanto, por apresentar frutos deiscentes, havia necessidade de se fazer de três a quatro colheitas por safra, onerando os custos de produção (FREIRE et al., 2007).

Na Bahia, o programa de melhoramento da mamona foi iniciado na década de 60 pelo Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Leste (IPEAL), localizado em Cruz das Almas (BELTRÃO, 2006). A partir da década de 70, passou a ser conduzido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária da Bahia – EPABA, até ser transformada no Centro de Mandioca e Fruticultura da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A partir da década de 80, o melhoramento da mamoneira no Estado passou a ser conduzido pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA, com sede no município de Itaberaba (GODOY et al., 1985).

Na década de 90, a Embrapa concentrou os trabalhos de pesquisa e experimentação da cultura da mamoneira no Centro Nacional de Pesquisas do Algodão (CNPA), localizado em Campina Grande-PB, com enfoque maior para germoplasma adaptado ao semiárido do Nordeste, desenvolvendo linhagens como a CNPA M. SM4 e CNPA M. 90-210, lançadas como cultivares, quais sejam: BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina, respectivamente (FREIRE et al., 2007).

Segundo Freire et al. (2007), a Embrapa dispõe de mais de 500 acessos em seu banco de germoplasma, que fazem parte da coleção de base da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, representando grande parte da variabilidade genética atualmente utilizada nos programas de melhoramento genético da mamoneira. O banco de germoplasma do IAC constitui-se de uma coleção de trabalho formada por aproximadamente 500 progênies e linhagens, obtidas pelas diversas hibridações entre variedades locais e introduzidas, conservadas em sua pureza e variabilidade genética ao longo dos últimos 70 anos (SAVY FILHO et al., 2007).

Outras instituições nacionais, também trabalham no melhoramento da mamoneira como a UFV (Universidade Federal de Viçosa), a ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”), o IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária), a EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), a antiga EPACE (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará) e a UFRB (Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, desde 2005).

Com o desenvolvimento do melhoramento genético da mamoneira no Brasil, foi possível obter-se melhorias na tecnologia de produção, desenvolvendo

cultivares mais produtivas, adaptadas a diversas regiões do país, apropriadas para diferentes tipos de colheita, resistentes a doenças e com alto teor de óleo (SEVERINO et al., 2006).

Vieira e Lima (1999) ressaltam que o melhoramento genético já solucionou diversos problemas inerentes à cultura da mamoneira, como por exemplo, aumento da produtividade, aumento do teor de óleo na semente, diminuição do porte da planta para facilitar a colheita, diminuição do grau de deiscência para evitar o desperdício no campo, além do aumento do nível de resistência a algumas das principais doenças que ocorrem no país.

Segundo Freire et al. (2007) o uso de sementes não selecionadas e de baixa qualidade refletem negativamente na produtividade e na ocorrência de pragas e doenças, além de proporcionar características agrônômicas indesejáveis. Apesar da difusão de cultivares melhoradas oriundas dos programas de melhoramento, a maioria das lavouras utilizam sementes provenientes dos campos dos próprios produtores.

O Nordeste brasileiro, maior região produtora de mamona do país, ainda apresenta vários problemas decorrentes, principalmente, da falta de adoção de sementes melhoradas (AZEVEDO; BELTRÃO, 2007).

Outra característica relevante é o porte da planta. Para a região Nordeste, procuram-se plantas de porte baixo e médio, pois se adaptam melhor às condições semiáridas por apresentarem sistema radicular mais profundo e mais desenvolvido, que lhes confere maior tolerância à seca. Porém, em outras regiões do país, como Sudeste, buscam-se plantas de porte baixo e anão, uma vez que facilitam práticas de colheita mecanizada e aplicação de defensivos agrícolas (FREIRE et al., 2007).

Em 2005, visando obter materiais superiores de mamoneira para regiões de baixa altitude, recôncavo e litoral da Bahia, áreas consideradas fora do zoneamento da cultura e na região semiárida da Bahia, com altitude acima de 300m, o Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia (NBIO), pertencente à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizada em Cruz das Almas, Bahia, iniciou seus trabalhos de melhoramento a partir de cruzamentos entre as cultivares Sipeal 28, BRS Nordestina, BRS Paraguaçu, Mirante 10 e EBDA MPA 17.

Como resultados de trabalhos de melhoramentos, o NBI0 produziu diversas pesquisas, inicialmente utilizando como base a introdução de cultivares (BAHIA et al., 2008; SILVA, 2008, SAMPAIO FILHO, 2009; DIAMANTINO et al., 2016), posterior processos de hibridações (PASSOS et al., 2010), por condução de população segregante e autofecundações para avanços de gerações (OLIVEIRA et al., 2013). Com otimização do método analítico gravimétrico e teor de óleo (MACHADO et al., 2014) com desenvolvimento de linhagens homozigotas na geração F6 com presença de alta variabilidade genética e ganhos genéticos com a seleção, envolvendo avaliações moleculares (SILVA et al., 2012, MACHADO ; SILVA 2013; MACHADO et al., 2013, MACHADO et al., 2016) e a seleção de linhagens elites por microssatélites (BRASILEIRO, 2014). A avaliação das linhagens elites, para resistência ao mofo cinzento (SOUSA, 2014; REIS, 2016; PRAZERES et al., 2017) e comportamento germinativo e tolerância ao alumínio (ALMEIDA, 2014, PASSOS et al., 2015), além de características morfoagronômicas, seguido de seleção de linhagens elites (SANTOS, 2013; SILVA et al., 2017a e SILVA et al., 2017b), também foram desenvolvidos.

O melhoramento da mamoneira na UFRB está direcionado para atender as regiões do Recôncavo baiano, litoral e semiárida da Bahia, visando principalmente ao alto teor de óleo na semente, porte reduzido, aumento nos caracteres de produção (peso, número, tamanho de bagas e de grãos, além do potencial produtivo) aliada à resistência/tolerância às principais doenças, a exemplo de mofo cinzento causado pelo fungo *Amphobotrys ricini* e a tolerância a ambientes de baixa precipitação pluviométrica.

Caracterização molecular

O desenvolvimento de ferramentas biotecnológicas tem facilitado a análise dos caracteres genéticos de uma espécie em condições ambientais variadas (ZHANG et al., 2010). Os marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramentas importantes em diversos estudos, permitindo avaliar, em prazo relativamente curto, um número elevado de genótipos. Os marcadores moleculares apresentam vantagens como: alto grau de polimorfismo, não sofrem

influência do ambiente, além de detectar variabilidade no genoma independente do estágio de desenvolvimento da planta (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 2008).

Atualmente, existem diversas técnicas para detecção dessas variações, o que facilita a disseminação do uso dos marcadores. O avanço das pesquisas na área da biologia molecular, o desenvolvimento de equipamentos mais automatizados e da bioinformática, têm possibilitado a geração de um número ilimitado de marcadores, potencializando sua incorporação às diferentes etapas dos programas de melhoramento genético (PERREIRA et al. 2005).

O uso dos diferentes tipos de marcadores moleculares irá depender principalmente, do objetivo da pesquisa. Existe um grande número de técnicas/marcadores que podem ser utilizados, e estes são distinguidos em dois tipos básicos, de acordo com as suas características: dominantes e co-dominantes (BERTONI et al., 2010).

Com o sequenciamento do genoma de *R. communis* L. (CHAN et al., 2010) aliado ao uso da bioinformática, é possível desenvolver novas ferramentas moleculares para a cultura da mamoneira com ampla cobertura genômica.

Avanços na área genômica resultaram no desenvolvimento de novas classes de marcadores moleculares, principalmente com base em informações de sequências expressas do genoma (*Expressed Sequence Tags* – ESTs), podendo citar o desenvolvimento de microssatélites (QIU et al. 2010; PRANAVI et al. 2011; WANG et al. 2017). Diversas sequências expressas (*Expressed Sequence Tag* – ESTs) encontram-se disponíveis em bancos de dados como NCBI *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Estas sequências estão relacionadas a diversas rotas metabólicas (NCBI, 2017) importantes para promover um melhor entendimento de características de interesse agrônômico na cultura, possibilitando o desenvolvimento de marcadores relacionados a genes candidatos. Este conhecimento permitiu desenvolver marcadores que identificam alelos específicos e/ou formas alternativas de genes, ao invés de regiões genômicas aleatórias (PFLIEGER et al., 2001). Esta abordagem abriu a perspectiva de se usar polimorfismos em genes candidatos, genes participantes de vias metabólicas que controlam características fenotípicas importantes, o que traz a vantagem de tornar o próprio gene de interesse uma marca genética.

Marcadores TRAP

A crescente disponibilidade de sequências de genes depositadas em bancos de dados, aliada às ferramentas de bioinformática, permitem a detecção de marcadores moleculares mais próximos a genes candidatos. A utilização de marcadores funcionais, baseados em genes-alvo, aumenta a probabilidade de se estabelecer correlações entre fenótipo e genótipo, pois a variabilidade observada pelos marcadores reflete diferenças fenotípicas. Hu e Vick (2003), desenvolveram a técnica TRAP (*Target Region Amplication Polymorphism*), sendo um marcador dominante, que combina a facilidade dos marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), sendo, porém altamente reproduzível, com abundante polimorfismo dos marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorfism*).

A metodologia TRAP utiliza ferramentas de bioinformática e ESTs (*Expresses Sequence Tags*) para gerar marcadores polimórficos ao redor de sequências de genes candidatos. O polimorfismo é gerado a partir da combinação de um primer fixo, desenhado a partir de uma sequência EST de interesse, e um primer arbitrário. Com isso, os *amplicons* gerados pela combinação desses primers estarão relacionados com regiões expressas e, esse diferencial, torna o TRAP uma ferramenta valiosa para estudos de diversidade genética em programas de melhoramento (AGARWAL et al., 2008).

O potencial desses marcadores para estudos de divergência genética foi confirmado em diversas culturas como cana-de-açúcar (ALWALA et al., 2006; MIRAJKAR et al., 2017), espinafre (HU et al., 2007), caqui (LUO et al., 2013), trigo (BARAKAT et al., 2013), manga (LUO et al., 2015), mandioca (CARMO et al., 2015) e guaraná (DA SILVA et al., 2016).

Análise conjunta

O estudo da divergência genética em mamoneira é de interesse para a conservação dos recursos genéticos, ampliação da base genética e aplicações práticas em programas de melhoramento. Estudos com análises de divergência genética em *Ricinus communis* L. levando em consideração a análise simultânea de dados, são praticamente escassos. Na literatura, encontram-se estudos

levando em consideração análises isoladas envolvendo os marcadores moleculares (SILVA et al., 2012; MACHADO; SILVA 2013; MACHADO et al., 2013, GÁLOVÁ et al., 2015; GOODARZI et al., 2015; MACHADO et al., 2016; THATIKUNTA et al., 2016).

Segundo Moura et al. (2010), embora a análise conjunta das variáveis quantitativas e qualitativas seja potencialmente um indicador mais completo da variabilidade existente, poucos trabalhos vem sendo conduzidos utilizando esta estratégia. Provavelmente, isso ocorre devido à falta de conhecimento das técnicas estatísticas que permitem a abordagem conjunta destes dados, assim como a tendência dos pesquisadores em considerar mais relevante aquelas variáveis diretamente relacionadas com caracteres trabalhados em programas de melhoramento (GONÇALVES et al., 2008).

Uma técnica que permite a análise simultânea de dados quantitativos e qualitativos foi proposta por Gower (1971), por meio de um algoritmo que estima a similaridade entre dois indivíduos utilizando dados com distribuições contínuas e discretas. Este método permite que valores da matriz de distância fiquem compreendidos entre 0 e 1, sendo necessária a padronização das variáveis quantitativas e qualitativas. Pesquisas recentes vêm descrevendo o uso dessa metodologia em estudos conduzidos com *Carica papaya* L. (Quintal et al., 2012); *Psidium guajava* (Nogueira et al., 2014); *Passiflora* (Machado et al., 2015); *Glycine max* (Alves et al., 2013; Silva et al., 2016); *Jatropha curcas* (Caldas et al., 2016) e *Ricinus communis* L (Silva et al., 2017b) .

No entanto, ainda não há na literatura relatos sobre o desenvolvimento de marcadores TRAP para mamoneira e sua aplicação em estudos de divergência genética. Da mesma forma, estudos envolvendo análise conjunta com marcadores moleculares e caráter teor de óleo na semente são inéditos para a espécie. Desta forma, o desenvolvimento e a otimização de marcadores TRAP visando o estudo de diversidade genética, mapeamento de QTLs e auxílio a programas de melhoramento genético desta espécie, é extremamente necessário e relevante.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivos: 1- desenvolver iniciadores TRAP para mamoneira a partir de sequências ESTs disponíveis no NCBI, bem como a otimização via PCR, visando à disponibilidade de marcadores funcionais para estudos genéticos em mamoneira; 2- Avaliar a divergência

genética em linhagens elites de *Ricinus communis* L., por meio de marcadores TRAP envolvidos na biossíntese de óleo e ricina; 3- Estudar a divergência genética entre linhagens elites de *Ricinus communis* quanto ao caráter teor de óleo na semente conjuntamente com marcadores moleculares TRAP, visando auxiliar os programas de melhoramento genético da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v.27, p. 617-631, 2008.

ALAM, M.; AKRAM, D.; SHARMIN, E.; ZAFAR, F.; AHMAD, S. Vegetable oil based eco-friendly coating materials: A review article. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 469-479, 2014.

ALMEIDA, V. de O. **Comportamento germinativo, armazenamento de sementes e tolerância ao alumínio da mamoneira**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas - BA, 79 f,2014.

ALVES, A. A.; BHERING, L. L.; ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FORMIGHIERE E. D.; CRUZ, C. D. Joint analysis of phenotypic and molecular diversity provides new insights on the genetic variability of the brazilian physic nut germplasm bank. **Genetics and Molecular Biology**, v.36, n.3, p. 371-381, 2013.

ALWALA, S.; SUMAN, A.; ARRO, J. A.; VEREMIS, J. C.; KIMBENG, C. A. *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP) for Assessing Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm Collections. **Crop Science**, v. 46, p. 448-455, 2006.

AMORIM, E. P.; RAMOS, N. P.; UNGARO, M. R. G.; KIIHL, T. A. M. Divergência genética em genótipos de girassol. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p. 1637-1644, 2007.

ANJANI, K. Castor genetic resources: A primary gene pool for exploitation. **Industrial Crops and Products**, v. 35, p.1-14, 2012.

ARANSIOLA, E. F.; OJUMU, T. V.; OYEKOLA, O. O.; MADZIMBAMUTO, T. F.; IKHU-OMOREGBE, D. I. O. A review of current technology for biodiesel production: state of the art. **Biomass and Bioenergy**, .61, p. 276-297, 2014.

BAHIA, H. F.; SILVA, S. A.; FERNANDEZ, L. G.; LEDO, C. A. S. Divergência genética entre cinco cultivares de mamoneira. **Pesquisa Pecuária Brasileira**, v.43, n.3, p. 357-362, 2008.

BARAKAT, M. N.; AI-DOSS, A. A.; ELSHAFEI, A. A.; GHAZY, A. I.; MOUSTAFA, K. Assessment of genetic diversity among wheat doubled haploid plants using TRAP markers and morpho-agronomic traits. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n.1, p.104-111, 2013.

BELTRÃO, N. E. de M.; CARDOSO, G. D. **Informações sobre os sistemas de produção utilizados na ricinocultura na região nordeste, em especial o semi-árido e outros aspectos ligados a sua cadeia**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 5 p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 213).

BELTRAO, N. E. M. **A cadeia da Mamona no Brasil, com Ênfase para o Segmento P&D: Estado da Arte**, Demandas de Pesquisa e Ações Necessárias para o Desenvolvimento. Campina Grande: Embrapa Algodao, (Documentos), 2006.

BERTONI, B. W.; SOUZA, A. V.; BIONDO, R.; FRANÇA, S. C.; TELLES, M. P. C.; PEREIRA, A. M. S. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 209-213. 2010.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: UFV, 2013. 523 p.

BRASILEIRO, H. S. **Seleção de linhagens elites de mamoneira por meio de marcadores microssatélites e caracteres teor de óleo e peso de sementes por planta**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Cruz das Almas – BA, 76f, 2014.

CARMO, C. D.; SANTOS, D. B.; ALVES, L. B.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Development of TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) as New Tool for Molecular Genetic Analysis in Cassava. **Plant Molecular Biology Reporter**, v, p.1-14, 2015.

CARVALHO, N. L.; BORTOLINI, J. G.; BARCELLOS, A. L. Biocombustíveis: uma opção para o desenvolvimento sustentável. **Revista gestão e desenvolvimento em contexto**, v. 2, n. 1, p. 32-50, 2015.

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.; RAVEL, J.; RABINOWICZ, P.D. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. **Nature Biotechnology**, v.28, p.951-956, 2010.

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

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011. 620 p.

COSTA, H. M.; RAMOS, V. D.; ABRANTES, T. A. S.; CASTRO, D. F.; VISCONTE, L. L. Y.; NUNES, R. C. R. Efeito do óleo da mamona em condições borracha natural contendo sílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.14, n.1, p. 46-50, 2004.

DA SILVA, E. F.; DE SOUZA, S. B.; DA SILVA, G. F.; SOUZA, N. R.; NASCIMENTO FILHO, F. J. HANADA, R. E. TRAP and SRAP markers to find genetic variability in complex polyploid *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Plant Gene**, v. 6, p. 43-47, 2016.

DIAMANTINO, M. S. A.; COSTA, M. A. P. C.; SOARES, T. L.; MORAIS, D. V.; SILVA, S. A.; SOUZA, E. H. Morphology and viability of castor bean genotypes pollen grains. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 38, n.1 p. 77-83, 2016.

ESCOBAR, J.C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YÁÑEZ, E. E.; CASTILO, E. F.; ALMAZAN, O. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.13, p. 1275-1287, 2009.

FAO Statistics. Production and trade. **Castor beans**. 2014. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 14 de maio. 2017.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Cenargen, 3.ed., p.220., 2008.

FONSECA, N. B. S.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade da ricina presente nas sementes de mamona Toxicity of ricin present in castor bean seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1415-1424, 2014.

FREIRE, E. C.; LIMA, E. F.; ANDRADE, F. P.; MILANI, M; NÓBREGA, M. B. M. Melhoramento Genético. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. 2.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p.169-194.

FRIEDMAN, M. H.; ANDREU, M. G.; QUINTANA, H. V.; MCKENZIE, M. *Ricinus communis*, castor bean. **Institute of Food and Agricultural Sciences**, n. 244, p. 1-3, 2010.

FURLANETTO, E. L.; SANTOS, E. D. Difusão de Inovações Sustentáveis: o caso do biodiesel de mamona no Estado da Paraíba. **Teoria e Prática em Administração**, v. 4, n. 1, p. 78-103, 2014.

GÁLOVÁ, Z.; VIVODÍK, M.; BALÁŽOVÁ, Z.; HLOZÁKOVÁ, T. K. Identification and differentiation of *Ricinus Communis* L. using SSR markers. **Potravinarstvo**, v. 9, n. 1, p. 556-561, 2015.

GONÇALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; KARASAWA, M.; SUDRÉ, C.P. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.4, p.1289-1297, 2008.

GODOY, I. J. de.; SAVY FILHO, A.; TANGO, J. S.; UNGARO, M. R. G.; MARIOTTO, P. L. **Programa Integrado de Pesquisa. Oleaginosas**. São Paulo. Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária da Secretaria de Agricultura. 33p., 1985.

GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; MACIEL, F.M.; FELIX, S.P.; BEVILAQUA, J.V.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, D.M.G. Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.44, p.317-322, 2009.

GOODRUM, J.W., GELLER, D.P. Influence of fatty acid methyl esters from hydroxylated vegetable oils on diesel fuel lubricity. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 851-855, 2005.

GOODARZI, F.; DARVISHZADEH, R.; HASSANI, A. Genetic analysis of castor (*Ricinus communis* L.) using ISSR markers. **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 3, n. 1, p. 18-34, 2015.

GOVAERTS, R., Frodin, D.G., Radcliffe-Smith, A., Royal Botanic Gardens, K., 2000. World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (With Pandaceae). Royal Botanic Gardens Kew, London.

GOWER, J.C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, Arlington, v. 27, n. 4, p. 857-874, 1971.

HU, J.; VICK, B.A. Target amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.21, p.289-294, 2003.

HU, J.; MOU, B.; VICK, B. A. Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p.1667-1674, 2007.

JEONG, G.T.; PARK, D.H. 2009. Optimization of biodiesel production from castor oil using response surface methodology. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.156, p. 1-11, 2009.

LIMA, R. L. S.; SEVERINO, L. S.; ALBUQUERQUE, R. C.; BELTRÃO, N. E. M.; SAMPAIO, L. R. Casca e torta de mamona avaliados em vasos como fertilizantes orgânicos. **Caatinga**, v. 21, n. 5, p. 102-106, 2008.

LUO, C.; ZHANG, F.; ZHANG, Q. L.; GUO, D. Y.; LUO, Z. R. Characterization and comparison of EST-SSR and TRAP markers for genetic analysis of the Japanese persimmon *Diospyros kaki*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2841-2851, 2013.

LUO, C.; WU, H. X.; YAO, Q. S.; WANG, S. B.; XU, W. T. Development of EST-SSR and TRAP markers from transcriptome sequencing data of the mango. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7914-7919, 2015.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v.48, n.11, p.1457-1463, 2013.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; SANTOS, A. S.; BASTOS, L. A.; PESTANA, C. N.; SANTOS, K. S.; FERREIRA, C. F.; DIAMANTINO, M. S. A. S. Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.3, p.342-345, 2013.

MACHADO, E. L.; SANTOS, A. de S.; SILVA, S. A.; AZEVEDO NETO, A. D. Otimização e validação do método analítico gravimétrico e teor de óleo em uma população F3 de mamoneira da UFRB. **Revista Magistra**, v. 26, p. 198-205, 2014.

MACHADO, C. F.; JESUS, F. N.; LEDO, C. A S. Divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 442-449, 2015.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; FERNANDES, L. S.; BRASILEIRO, H. S. Genetic variability and homozygosity in a F4 castor bean population by microsatellite markers, **Revista Bragantia**, p.1-7, 2016.

MANDPE, S.; KADLASKAR, S.; DEGEN, W.; KEPPELER, S. On road testing of advanced common rail diesel vehicles with biodiesel from the *Jatropha curcas* plant. **Society of Automotive Engineers**, v. 26, p. 356-364, 2005.

MATH, M.C.; KUMAR, S. P.; CHETTY, S.V.; Technologies for biodiesel production from used cooking oil A review. **Energy for Sustainable Development**, v. 14, p. 339-345, 2010.

MIRAJKAR, S. J.; RAI, A. N.; VAIDYA, E. R.; MOHARIL, M. P.; DUDHARE, M. S.; SUPRASANNA, P. TRAP and SRAP molecular marker based profiling of radiation induced mutants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Plant Gene**, v. 9, p. 64 -70, 2017.

MOURA, M.C.C.L.; GONÇALVES, L.S.A.; SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PEREIRA, T.N.S. Algoritmo de Gower na estimativa da

divergência genética em germoplasma de pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n.2, p. 155-161, 2010.

NOGUEIRA, A. M.; FERREIRA, M. F. S.; GUILHEN, J. H. S.; FERREIRA, A. Multivariate analysis in a genetic divergence study of *Psidium guajava*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 10657-10668, 2014.

OGUNNIYI, D. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1086-1091, 2006.

OLIVEIRA, R. S.; SILVA, S. A.; BRASILEIRO, B. P.; MEDEIROS, E. P.; SANTOS, E. V. A. Genetic divergence on castor bean using the ward-mlm strategy. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 564-570, 2013.

PASSOS, A. R.; SILVA, S. A.; SOUZA, C. da S.; SOUZA, C. M. M.; FERNANDES, L. dos S. Parâmetros genéticos de caracteres agronômicos em genótipos de mamoneira. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.45, n.7, p.709-714, 2010.

PASSOS; A. R.; SILVA; S. A.; HARTWIG; I.; HAWERROTH; M. C.; SANTOS; K. S.; SOUZA; C. M. M. Avaliação de cultivares de mamoneira para tolerância ao alumínio tóxico e insensibilidade ao ácido giberélico. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 27, n.1, p. 73-81, 2015.

PECINA-QUINTERO, V.; ANAYA-LÓPEZ, J. L.; NÚNEZ-COLÍN, C. A.; ZAMARRIPA-COLMENERO, A.; MONTES-GARCÍA, N.; SOLÍS-BONILLA, J. L.; AGUILAR-RANGEL, M. R. Assessing the genetic diversity of castor bean from Chiapas, México using SSR and AFLP markers. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p.134-143, 2013.

PESTANA-CALDAS, C. N.; SILVA, S. A.; MACHADO, E. L.; de Souza, D. R.; CERQUEIRA-PEREIRA, E. C.; SILVA, M. S. Genetic divergence through joint analysis of morphoagronomic and molecular characters in accessions of *Jatropha curcas*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p.1-11, 2016.

PFLIEGER, S.; LEFEBVRE, V.; CAUSSE, M. The candidate gene approach in plant genetics: a review. **Molecular Breeding**, v. 7, n. 4, p 275-291, 2001.

PRANAVI, B.; SITARAM, G.; YAMINI, K. N; DINESH, K. V. Development of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.) and their utilization for genetic purity testing of hybrids. **Genome**, v.54, p. 684-691, 2011.

PRAZERES, A. G.; SILVA, S. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, R. O.; REIS, A. S. Reação de cultivares de mamoneira com fungicidas e as características agrônômicas. **Agrotrópica**, v. 29, n.1, p. 75 - 84. 2017.

PREREIRA, M. G.; PEREIRA, T. N. S.; PIO VIANA, A. **Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético do maracujazeiro**. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina. DF: Embrapa Cerrados, 2005. P. 277-292.

QUEIROGA, V. P.; SANTOS, R. F.; QUEIROGA, D. A. N. Levantamento da produção da mamona (*Ricinus communis* L.) em uma amostra de produtores em cinco municípios do Estado da Bahia. **Revista Agroambiente**. v. 5, n. 2, p.148-157, 2011.

QIU, L.; YANG, C.; TIAN, B.; YANG J.; LIU, A. Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSR markers in castor bean (*Ricinus communis* L.). **BMC Plant Biology**, v.10, p. 1-10, 2010.

QUINTAL, S. S. R.; VIANA, A. P.; GONÇALVES, L. S. A.; PEREIRA, M. G.; AMARAL JÚNIOR, A. T. Divergência genética entre acessos de mamoeiro por meio de variáveis morfoagronômicas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 131-142, 2012.

RAMEZANI, K.; ROWSHANZAMIR, S.; EIKANI, M. H. castor oil transesterification reaction: a kinetic study and optimization of parameters. **Energy**, v. 35, n. 10, p. 4142-4148, 2010.

REIS, A. S dos. **Desempenho e discriminação de linhagens de mamoneira quanto a resistência ao mofo cinzento em dois anos de cultivo**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Cruz das Almas – BA, 67f, 2016.

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

SAMPAIO FILHO, O. M. **Análise descritiva, agrupamento e análise de trilha de cultivares de mamoneira em dois anos de cultivo em Cruz das Almas – BA**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB,Cruz das Almas - BA, 73 f, 2009.

SANTANA, I. B. B., OLIVEIRA, E. J., SOARES FILHO, W. S. RITZINGER, R.; AMORIM, E. P.; COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. et al. Variabilidade genética entre acessos de Umbu-Cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, R. F.; KOURI, J. Panorama mundial do agronegócio da mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracajú. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 1 CD-ROM.

SANTOS, L. A. **Caracterização e seleção de linhagens elites de mamoneira (*Ricinus communis* L.) por meio do desempenho morfoagronômico e molecular no Estado da Bahia**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Cruz das Almas – BA, 85 f, 2013.

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

SEVERINO, LIV S.; AULD, DICK L.; BALDANZI, MARCO; CÂNDIDO, MAGNO J. D.; CHEN, GRACE; CROSBY, WILLIAM; TAN, D; HE, XIAOHUA; LAKSHMAMMA, P.; LAVANYA, C.; MACHADO, OLGA L. T.; MIELKE, THOMAS; MILANI, MÁIRA; MILLER, TRAVIS D.; MORRIS, J. B.; MORSE, STEPHEN A.; NAVAS, ALEJANDRO A.; SOARES, DARTANHÃ J.; SOFIATTI, VALDINEI; WANG, MING L.; ZANOTTO, MAURÍCIO D.; ZIELER, HELGE. A Review on the Challenges for Increased Production of Castor. **Agronomy Journal**, v. 104, n. 4, p. 853-880, 2012.

SILVA, V. **Características fisiológicas de cultivares de mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Recôncavo baiano**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Cruz das Almas – BA, 73 f, 2008.

SILVA, S. A.; CERQUEIRA, L. S.; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E. P.; MOREIRA, R. F.C.; COSTA, M. A. P. C. Variabilidade genética em cultivares de mamona por meio de marcadores RAPD. **Revista Magistra**, v. 24, n. 4, p. 341-347, 2012.

SILVA, F. C. S.; SEDIYAMA, T.; DA SILVA, A. F.; BEZERRA, R. G.; ROSA, D. P.; FERREIRA, L. V.; CRUZ, C. D. Identification of new descriptors for differentiation of soybean genotypes by Gower algorithm. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n.11, p. 961-966, 2016.

SILVA, A. R.; SILVA, S. A.; ALMEIDA, V. DE O.; ARAÚJO, G. MELO.; LEDO, C. A. S. Correlations and track analysis for morphoagronomic descriptors in pedigree and parental lines of castor bean. **Ciência Rural**, v. 47, p. 1-7, 2017a.

SILVA, A. R.; SILVA, S. A.; SANTOS, L. A.; SOUZA, D. R.; ARAUJO, G. M.; MOREIRA, R. F. C. Genetic divergence among castor bean lines and parental strains using ward's method based on morpho-agronomic descriptors. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 3, p. 307-313, 2017b.

SOUSA, F. Q. **Prospecção fenotípica de linhagens elites de mamoneira resistentes ao mofo cinzento (*Amphobotrys ricini* (N.F. Buchw.)**

Hennebert). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Cruz das Almas – BA, 80 f, 2014.

THATIKUNTA, R.; SANKAR, A. S.; SREELAKSHMI, J.; PALLE, G.; LEELA, C.; RANI, C. V. D.; SHANKAR, V.G; LAVANYA, .; REDY, P. N.; DUDHE, M. Y. Utilization of in silico EST–SSR markers for diversity studies in castor (*Ricinus communis* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, n.4, p.535-545, 2016.

VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F. Importância sócio-econômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil. Recursos Genéticos e Melhoramento Plantas para o Nordeste Brasileiro. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/catalogo/livrorg/>>. Acessado em: 4 de junho. 2017.

VISSER, E. M.; OLIVEIRA FILHO, D.; MARTINS, M. A.; STEWARD, B. L. Bioethanol production potential from Brazilian biodiesel co-products. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 489-494, 2011.

WANG, M. L.; DZIEVIT, M.; CHEN, Z.; MORRIS, J. B.; NORRIS, J. E.; BARKLEY, N. A.; TONNIS, B.; PEDERSON, G. A.; YU, J. Genetic diversity and population structure of castor (*Ricinus communis* L.) germplasm within the U.S. collection assessed with EST-SSR markers. **Genoma**, v. 60, n. 3, p. 193-200, 2017.

ZHANG, J.; XU, B.; LI, M. Genetic diversity of populations of an endangered medicinal plant species (*Glycyrrhiza uralensis*) in different environments of North China. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 830-836, 2010.

ARTIGO 1

DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES TRAP PARA *RICINUS COMMUNIS* L.¹

¹ Artigo publicado no periódico científico Genetics and Molecular Research, v. 16, n. 2, p. 1-13, 2017, DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16029647>, em versão na língua inglesa.

Desenvolvimento de iniciadores TRAP para *Ricinus communis* L.

Autora: Karine da Silva Simões

Orientadora: Dra. Simone Alves Silva

Resumo: Objetivou-se o desenvolvimento de iniciadores TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), visando a disponibilidade de marcadores funcionais para estudos genéticos em mamoneira. Para tanto, foram desenhados oligonucleotídeos a partir de sequências ESTs, disponíveis em bancos de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), que codificam enzimas envolvidas em rotas metabólicas de síntese de ácidos graxos, síntese de ricina e resistência ao ataque de patógenos em mamoneira. Os iniciadores diretos foram desenhados com auxílio do software Primer3 e, como reversos foram utilizados seis iniciadores arbitrários. Visando a padronização das reações de amplificação, foram utilizados os seguintes critérios na seleção dos iniciadores: tamanhos entre 18 a 20 pb; percentagem de GC no intervalo de 40 a 60%; e temperatura de anelamento média entre 55 e 62°C. A qualidade do desenho dos iniciadores foi verificada por meio do aplicativo Net Primer. Foram desenhados 56 iniciadores que apresentaram percentagem média de guanina/citosina (GC) igual a 53,2%. Obteve-se um total de 336 combinações utilizando-se os 56 iniciadores fixos e seis arbitrários. Na validação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), 330 combinações (98%) apresentaram bom padrão de amplificação para o DNA genômico de mamoneira. Os tamanhos dos fragmentos amplificados variaram entre 50 a 2072 pb. Os iniciadores desenhados e validados, nesse trabalho, são pioneiros para mamoneira e representam um acréscimo significativo de marcadores moleculares para a espécie.

Palavras-chave: GenBank/NCBI, sequências ESTs, *Target Region Amplification Polymorphism*.

Development of TRAP primers *Ricinus communis* L.

Author: Karine da Silva Simões

Adviser: Dra. Simone Alves Silva

Abstract: The objective of this article was to develop TRAP (*Target region amplification polymorphism*) primers for castor bean, with the goal of making functional markers available for genetic studies about the species. To do this, oligonucleotides were designed based on ESTs, obtained from the NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) databank, which code enzymes involved in metabolic routes of fatty acid synthesis, ricin synthesis, and resistance to castor bean pathogens. The forward primers were designed with the help of the Primer3 software and, for the reverse, six arbitrary primers were used. To standardize the amplification reactions, the following criteria were used to select the primers: sizes between 18 and 20 bp, guanine/cytosine (GC) in the range of 40 to 60%, and average annealing temperature between 55° and 62°C. The design quality of the primers was verified using the Net Primer application. Fifty-six primers were designed, which had an average GC percentage of 53.2%. A total of 336 combinations were obtained using the 56 fixed and 6 arbitrary primers. Based on polymerase chain reaction, 330 combinations (98%) presented good amplification patterns for the genomic DNA of castor bean. The size of the fragments amplified varied between 50 and 2072 bp. The TRAP primers designed and validated in this study are the first for castor bean and represent a significant increase in the molecular markers for this species.

Keywords: GenBank/NCBI, *expressed sequence tag*, *Target Region Amplification Polymorphism*

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L., $2n = 2X = 20$, Euphorbiaceae) é uma oleaginosa com elevado valor socioeconômico, cujos produtos e subprodutos são utilizados na indústria ou na agricultura (Costa et al., 2006), e ainda, a cultura deve se consolidar como uma alternativa para a produção de biodiesel. Assim, torna-se imprescindível a implementação de estratégias que possibilitem o desenvolvimento de genótipos com elevados teores de óleo, mais resistentes a patógenos e baixa concentração de ricina (por fácil manejo para o agricultor) ou alta concentração de ricina para tratamentos com importância quimioterápica (Audi et al., 2005). Para o desenvolvimento e seleção de genótipos de mamoneira, com as características citadas, os marcadores moleculares funcionais tipo TRAP constituem-se em ferramentas auxiliares importantes no processo. Além disso, esses marcadores podem ser utilizados em vários estudos genéticos, a exemplo da variabilidade genética, genética de populações, mapeamento de QTLs, mapas associativos e seleção assistida.

Diferentes tipos de marcadores moleculares foram utilizados no estudo da variabilidade genética em mamoneira: polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) (Pecina-Quintero et al., 2013), polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) (Gajera et al., 2010; Silva et al., 2012; Machado et al., 2013; Vivodík et al., 2014; Lakhani et al., 2015; Vivodík et al., 2015), polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) (Foster et al., 2010), sequências simples repetidas (SSR) (Bajay et al., 2009; Bajay et al., 2011; Seo et al., 2011; Machado; Silva, 2013; Tan et al., 2013; Tan et al., 2014; Gálová et al., 2015; Machado et al., 2016), e inter repetições de sequências simples (ISSR) (Wang et al., 2013; Tomar et al., 2014; Goodarzi et al., 2015; Kallamadi et al., 2015).

A técnica TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) é apresentada como um marcador que utiliza ferramentas de bioinformática e dados de EST's (*Expressed Sequence Tags*) para gerar marcadores a partir de seqüências alvo de genes candidatos. A técnica possui como vantagens, a alta reprodutibilidade, simplicidade, o acesso a regiões relacionadas a genes e a capacidade de produzir padrão de bandas semelhantes ao da técnica de AFLP. O polimorfismo é gerado a partir da combinação de um primer fixo, desenhado

a partir de uma seqüência EST de interesse, e um primer arbitrário (Hu e Vick 2003).

Os marcadores TRAP foram inicialmente desenvolvidos para amostras de DNA em girassol (Hu e Vick, 2003). Estes marcadores já foram empregados em diversas espécies tais como alface (*Lactuca sativa* L.; Hu et al., 2005), trigo (*Triticum aestivum* L.; Liu et al., 2005), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; Miklas, et al., 2006), fava (Kwon et al., 2010), trigo duro (Al-Doss et al., 2011) e mandioca (Carmo et al., 2015). Para a mamoneira não há relatos de desenvolvimento e aplicação de marcadores TRAP, embora o sequenciamento do genoma da mamoneira (*Ricinus communis* L.) já tenha sido completado (Chan et al., 2010). Assim, faz-se necessário o desenvolvimento e a otimização de iniciadores TRAP para saturação do genoma da mamoneira visando os mais diversos estudos genéticos: variabilidade genética, associação de marcadores com características fenotípicas específicas, mapas de QTLs, genética de populações, entre outros.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou o desenho de iniciadores TRAP para mamoneira a partir de seqüências ESTs disponíveis no NCBI, bem como a otimização via PCR, visando a disponibilidade de marcadores funcionais para estudos genéticos em mamoneira.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho dos oligonucleotídeos

O desenho dos oligonucleotídeos foi realizado a partir de seqüências ESTs de mamoneira envolvidas em rotas metabólicas de síntese de ácidos graxos, síntese de ricina e resistência ao ataque de patógenos (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências ESTs utilizadas para o desenvolvimento de iniciadores TRAP para mamoneira.

Número no GenBank	Gene/processo	Processo biológico	Iniciador
Ricina			
RCOM_0792550	Super família RIP	Inativa ribossomos	TRAPRC-01
RCOM_1110780	Super família RIP	Inativa ribossomos	TRAPRC-02
RCOM_1110790	Super família RIP	Inativa ribossomos	TRAPRC-03
RCOM_1180980	Super família Ricina	Tipo de ricina-beta-trefoil	TRAPRC-04
RCOM_1960510	Super família Ricina	Tipo de ricina-beta-trefoil	TRAPRC-05
RCOM_2105270	Super família Ricina	Tipo de ricina-beta-trefoil	TRAPRC-06
RCOM_2159810	Super família RIP	Inativa ribossomos	TRAPRC-07
RCOM_2159910	Super família RIP	Inativa ribossomos	TRAPRC-08
RCOM_2160120	Super família RIP	Inativa ribossomos	TRAPRC-09
RCOM_2160860	Super família RIP	Inativa ribossomos	TRAPRC-10
RCOM_2160530	Super família RIP	Inativa ribossomos	TRAPRC-11
Teor de óleo			
RCOM_0040840	Super família LPLAT	Biossíntese Glycerophospholipids	TRAPRC-12
RCOM_0138550	Super família Ferritina	Desnaturação ácidos graxos	TRAPRC-13
RCOM_0251360	Super família Ferritina	Desnaturação ácidos graxos	TRAPRC-14

Tabela 1. Cont...

Número no GenBank	Gene/processo	Processo biológico	Iniciador
Teor de óleo			
RCOM_0612610	Super família PLN	Desnaturação ácidos graxo Omega-6	TRAPRC-15
RCOM_0724080	Super família PLN2250	Fosfatase do lipídeo fosfato	TRAPRC-16
RCOM_0853360	Super família LPLAT	Biossíntese Glycerophospholipids	TRAPRC-17
RCOM_0893800	Sub-familia PLA2	Biossíntese fosfolipase	TRAPRC-18
RCOM_0900600	Super família PAP2	Codifica proteína	TRAPRC-19
RCOM_0925410	Super família PLN	Biossíntese thioesterase acyl-ACP	TRAPRC-20
RCOM_1076810	Super família Ferritina	Desnaturação ácidos graxos	TRAPRC-21
RCOM_1081890	Super família PLN	Desidrogenase xanthoxin	TRAPRC-22
RCOM_1403260	Super família RVT	Transcriptase reversa	TRAPRC-23
RCOM_1431520	Super família PLN	Síntese acetil CoA	TRAPRC-24
RCOM_1464650	Super família PLN	Síntese etanolamina phosphotransferase	TRAPRC-25
RCOM_1502140	Super família Oleosina	Síntese da oleosina	TRAPRC-26
RCOM_1593790	Super família LPLAT	Síntese Glycerophospholipids	TRAPRC-27
RCOM_1712710	Super família FABZ	Síntese proteína ACP	TRAPRC-28

Tabela 1. Cont..

Número no GenBank	Gene/processo	Processo biológico	Iniciador
Teor de óleo			
RCOM_0024370	Resistência proteína RPM1	Codifica proteína RPM1	TRAPRC-29
RCOM_0464860	Resistência Proteína RPP8	Codifica proteína RPP8	TRAPRC-30
RCOM_0534550	Resistência proteína RGA2	Codifica proteína RGA2	TRAPRC-31
RCOM_0585390	Resistência proteína RPH8	Codifica proteína RPH8A	TRAPRC-32
RCOM_0585520	Resistência proteína RGA2	Codifica proteína RGA2	TRAPRC-33
RCOM_0645130	Resistência proteína quinase	Codifica proteína quinase	TRAPRC-34
RCOM_0687360	Resistência proteína LRRK2	Codifica proteína LRRK2	TRAPRC-35
RCOM_0739250	Resistência proteína 4	Codifica proteína 4	TRAPRC-36
RCOM_0739360	Resistência proteína 23	Codifica proteína 23	TRAPRC-37
RCOM_0742650	Resistência proteína RPM1	Codifica proteína RPM1	TRAPRC-38
RCOM_0820400	Resistência doença RPP8	Codifica proteína RPP8	TRAPRC-39
RCOM_0898300	Resistência proteína RPS5	Codifica proteína RPS5	TRAPRC-40
RCOM_0900670	Resistência proteína RGA2	Codifica proteína RGA2	TRAPRC-41
RCOM_1045150	Resistência proteína TM	Codifica proteína TMV	TRAPRC-42

Tabela 1. Cont..

Número no GenBank	Gene/processo	Processo biológico	Iniciador
Resistência a patógeno			
RCOM_1122050	Resistência proteína RGA3	Codifica proteína RGA3	TRAPRC-43
RCOM_1184850	Resistência proteína RPP13	Codifica proteína RPP13	TRAPRC-44
RCOM_1195490	Resistência proteína RPH8A	Codifica proteína RPH8A	TRAPRC-45
RCOM_1292200	Resistência proteína RGA2	Codifica proteína RGA2	TRAPRC-46
RCOM_1329890	Resistência proteína TMV	Codifica proteína TMV	TRAPRC-47
RCOM_1330160	Resistência proteína TMV	Codifica proteína TMV	TRAPRC-48
RCOM_1397630	Resistência proteína RGA3	Codifica proteína RGA3	TRAPRC-49
RCOM_1452690	Resistência proteína RGA3	Codifica proteína RGA3	TRAPRC-50
RCOM_1481570	Resistência proteína 206	Codifica proteína 206	TRAPRC-51
RCOM_1487620	Resistência proteína RGA3	Codifica proteína RGA3	TRAPRC-52
RCOM_1508820	Resistência proteína RGA3	Codifica proteína RGA3	TRAPRC-53
RCOM_1579060	Resistência proteína RGA3	Codifica proteína RGA3	TRAPRC-54
RCOM_1680500	Resistência proteína RGA3	Codifica proteína RGA3	TRAPRC-55
RCOM_1689520	Resistência proteína 206	Codifica proteína 206	TRAPRC-56

As sequências ESTs de mamoneira foram obtidas em banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, 2016). Os iniciadores diretos foram desenhados com auxílio do software Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000). Os iniciadores diretos são específicos e fixos. Como reverso, foram utilizados seis iniciadores arbitrários conforme Li e Quiros (2001) adaptados por Hu e Vick (2003) (Tabela 2). Os iniciadores arbitrários compreendem três nucleotídeos seletivos na extremidade 3', quatro nucleotídeos ricos em sequências AT (corresponde a regiões de íntrons) ou GC (corresponde a regiões de éxons) na região central e 11 nucleotídeos aleatórios na extremidade 5'.

Tabela 2. Iniciadores arbitrários utilizados na validação de marcadores TRAP - *Target Region Amplification Polymorphism* em mamoneira.

Nome	Sequência de nucleotídeo (3'– 5')
Arb1	GACTGCGTACGAATTGAC
Arb2	GACTGCGTACGAATTTGA
Arb3	GACTGCGTACGAATTGCA
Arb4	GACTGCGTACGAATTAATT
Arb5	GACTGCGTACGAATTTGCC
Arb6	GACTGCGTACGAATTGACC

Para fins de padronização das reações da PCR, utilizaram-se os seguintes critérios na seleção dos iniciadores: tamanhos dos iniciadores entre 18 a 20 pb; percentagem de GC no intervalo de 40 a 60%; e temperatura de anelamento média entre 55 e 62°C.

A qualidade do desenho dos iniciadores foi verificada por meio do aplicativo Net Primer (Premier Biosoft, 2015). Os desenhos mais adequados livres de grampos, dímeros e sequências palíndromas, foram selecionados para síntese dos iniciadores. A síntese foi realizada na escala de 25 nmol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para a amplificação do DNA genômico da mamoneira.

Material vegetal e Extração de DNA

DNA genômico foi extraído de folhas jovens e saudáveis de três linhagens elites de mamoneira desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - NBIO/UFRB, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Antes da extração, as folhas foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 20%, enxaguadas com água destilada em abundância e armazenadas em ultra-freezer a -80°C .

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). Para tanto, foram macerados aproximadamente 300 mg de tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, transferiu-se o macerado para microtubos de 2 mL e adicionaram-se 700 μL do tampão de extração (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP 1,0% e água ultra-pura q.s.p.) a 65°C . As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Decorrido o tempo, adicionaram-se 700 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) as amostras. O material foi homogeneizado suavemente e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm (em centrífuga *micro high speed refrigerated centrifuge VS-15000c. FNII*). Logo após, coletou-se o sobrenadante.

Para uma maior purificação do material, as etapas de extração com clorofórmio: álcool-isoamílico foram repetidas. Ao sobrenadante foram adicionados 400 μL de álcool isopropílico gelado, o que equivale a aproximadamente 2/3 do volume coletado.

As amostras foram incubadas a -20°C por 20 minutos e depois centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi ressuspenso em 600 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), adicionados 200 μL de acetato de amônio a 7,5 M e a solução incubada no gelo por 15 minutos.

Decorrido esse tempo, centrifugou-se as amostras por 15 minutos a 12.000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante e adicionaram-se 800 μL de etanol absoluto. As amostras foram incubadas por uma hora a -20°C , centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% (v/v), centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm e seco a temperatura

ambiente. O precipitado foi ressuspenso em tampão TE contendo 1 μL de RNase (10 mg/mL) e as amostras incubadas em banho-maria a 37°C durante uma hora. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da utilização.

Quantificação do DNA genômico

Para a avaliação da qualidade e quantidade do DNA extraído, um total de 3 μL do DNA foi adicionado a 5 μL de solução corante (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹) e submetido à eletroforese por aproximadamente uma hora e vinte minutos a 80 vts. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa com um DNA de concentração conhecida, DNA lambda (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A fim de realizar as reações de amplificação, diluíram-se as amostras em tampão TE para ajuste de sua concentração em 5 ng/ μL ⁻¹.

Otimização das reações da PCR para os iniciadores TRAP

As reações de amplificação foram otimizadas em volume final de 15 μL contendo tampão de 1X (50 mM tris-HCL, 20 mM KCL), 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil); 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, Brasil); 0,2 uM dos iniciadores (IDT) e 10 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em esquema *touch-up* de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 2 min; 5 ciclos a 94 °C por 45 s, 35 °C por 45 s e 72° C por 1 min; seguidos por 30 ciclos a 94 °C por 45 s, 40°C por 45 s, 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 7min (Carmo et al., 2015) em termociclador modelo Veriti® 96-well (Applied Biosystems).

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 4%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹). Os produtos amplificados foram visualizados por meio de transluminador e fotodocumentados em um sistema digital *Kodak Science*. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação visual com Ladder 100 pb (Invitrogen, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das combinações TRAP

Um total de 56 iniciadores TRAP foi desenvolvido para mamoneira e denominados pelas iniciais TRAPRC, seguidos por números (Tabela 3). Esses iniciadores TRAP apresentaram uma porcentagem média de GC igual a 53,10% (Tabela 3). Este resultado foi próximo ao encontrado por Bajay (2009), onde obteve uma porcentagem de 47,56% em 41 pares de iniciadores SSR para mamoneira e Machado e Silva (2013) que obtiveram uma porcentagem média de GC igual a 47,29% em 30 pares de iniciadores SSR, também para mamoneira.

Tabela 3. Caracterização de iniciadores fixos, TRAPs, desenvolvidos para mamoneira

Iniciador	Sequência (5'– 3')	%GC	Ta
TRAPRC-01	CCACATCCAGCACCTTTTG	52.63	40°C
TRAPRC-02	TGTGGAGCGTTGAGGATTC	52.63	40°C
TRAPRC-03	TGCTCGCAGGCAAAGATAC	52.63	40°C
TRAPRC-04	TGTCCCATATTTGCCAACG	47.37	40°C
TRAPRC-05	TGACGACTGCTCCTTCCAC	57.89	40°C
TRAPRC-06	GACGACTGCTCCTTCCACA	57.89	40°C
TRAPRC-07	TACGCACTATGGGCTCAGG	57.89	40°C
TRAPRC-08	CCCTGATGTCGCTGCTAAA	52.63	40°C
TRAPRC-09	AACCGCAAGTGGTCAAACA	47.37	40°C
TRAPRC-10	CGGGTGGCATCAGTTACAG	57.89	40°C
TRAPRC-11	GGCGGATGCTATCTGTGAA	52.63	40°C
TRAPRC-12	GACACCTTTGTTGCCATCG	52.63	40°C
TRAPRC-13	ATCCCCAACAAGCACAACA	47.37	40°C
TRAPRC-14	TTTCCTTGCTGCCTCTGTG	52.63	40°C
TRAPRC-15	CCGTGATTCTGGTGGTGAG	57.89	40°C
TRAPRC-16	TTACAACCTGCGGCATCTCC	52.63	40°C
TRAPRC-17	TCCATCCCTTTCCATCCTC	52.63	40°C
TRAPRC-18	TGGCATTGCTTCCTTTGA	42.11	40°C
TRAPRC-19	AATGCCAGCACCTACACCA	52.63	40°C
TRAPRC-20	TTATCTTGGGAGGGGCTTG	52.63	40°C
TRAPRC-21	ATCCTTCCAGGCAATCCAC	52.63	40°C
TRAPRC-22	CACTCGCCTGTTCAGCACT	57.89	40°C
TRAPRC-23	AGCAAGCCGCACCTAAGAT	52.63	40°C
TRAPRC-24	GTCCAAGCAAAGCCACCT	52.63	40°C
TRAPRC-25	CCACCAATCCAACGCATAG	52.63	40°C
TRAPRC-26	TTCATCTCCCTTGCTTCC	52.63	40°C
TRAPRC-27	CGAAATCCTCCTGCTCCTC	52.63	40°C

Tabela 3.

Cont...

Iniciador	Sequência (5'– 3')	%GC	Ta
TRAPRC-28	GCCACCATCTTCACCACAG	57.89	40°C
TRAPRC-29	ACAGCGTTCAGCAGTCACC	57.89	40°C
TRAPRC-30	CTTCTCAGTTGCCCGTTCA	52.63	40°C
TRAPRC-31	CCACCAATGAACCAACTGC	52.63	40°C
TRAPRC-32	TGCCGACTTCTCCTTTCCT	52.63	40°C
TRAPRC-33	CAGTCACAATCGCCAAAGG	52.63	40°C
TRAPRC-34	TGGGCATTTTCTTGGTTGA	42.11	40°C
TRAPRC-35	CCTCATCATCGTTGCTGCT	52.63	40°C
TRAPRC-36	TCCCTCCAACAACAGCAAG	52.63	40°C
TRAPRC-37	GCTCACGCACTGGACTCAT	57.89	40°C
TRAPRC-38	CAAACCTCTGCCATCCA	52.63	40°C
TRAPRC-39	GCACCCGAAATCTTCCACT	52.63	40°C
TRAPRC-40	CCACTCAACACCGTTCCAC	57.89	40°C
TRAPRC-41	AGGATGTTGTCGCTACCA	52.63	40°C
TRAPRC-42	TTTGGGCAACAAGCAAGAG	47.37	40°C
TRAPRC-43	ATGCCAAGAACCCCAAGAC	52.63	40°C
TRAPRC-44	CGTCCACCCACACTTTCAC	57.89	40°C
TRAPRC-45	TTCGCTGGATGGATAGTCG	52.63	40°C
TRAPRC-46	CCAGTCACCGTTTGTGCT	52.63	40°C
TRAPRC-47	CGCCTCTGACAAATCTGGA	52.63	40°C
TRAPRC-48	GGCTAAGGCTTCCAACACTGC	57.89	40°C
TRAPRC-49	TCCTGTCCAATGCTGAACC	52.63	40°C
TRAPRC-50	ATTCCACCCTCCAGTTTGC	52.63	40°C
TRAPRC-51	CCACCGAGAGAGCATACCA	57.89	40°C
TRAPRC-52	GTGGCAAATGCTCACAGGT	52.63	40°C
TRAPRC-53	TACAACTTCGGGTGGTGGGA	52.63	40°C
TRAPRC-54	ATCCTTTTCCGTCGCAGTC	52.63	40°C
TRAPRC-55	TGATGGAAACCCTTGTGGA	47.37	40°C
TRAPRC-56	CTTGTGCCCTACCAACTGC	57.89	40°C

Ta= Temperatura de anelamento

Com os 56 primers fixos desenvolvidos foi possível realizar 336 combinações usando seis primers arbitrários, sendo que, 330 combinações (98%) apresentaram um bom padrão de amplificação nas três linhagens analisadas (Figura 1). Uma porcentagem menor de combinações de primers fixos e arbitrários foi obtida por Carmo et al. (2015) no desenvolvimento de marcadores TRAP para a cultura da mandioca. Os autores realizaram 396 combinações, destas 253 combinações (64%) tiveram um bom padrão de amplificação.

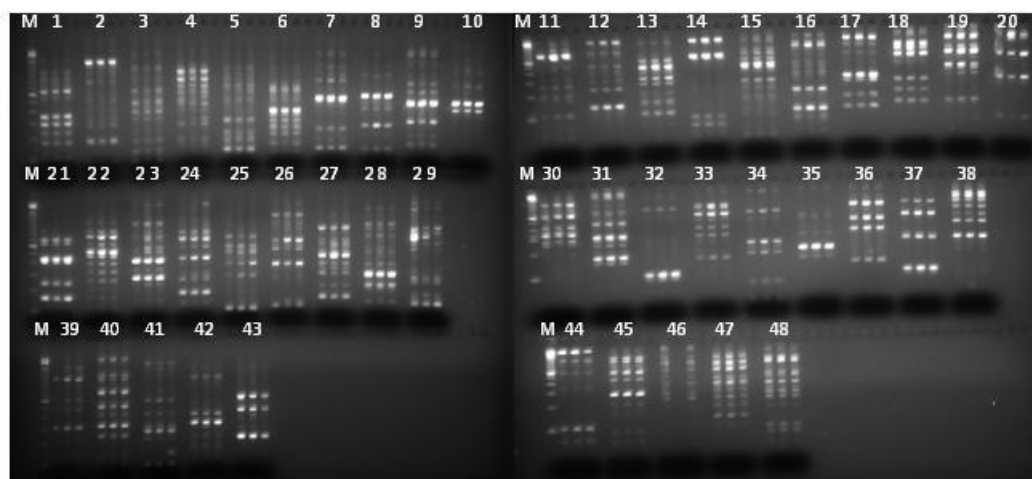


Figura 1: Perfil eletroforético, em gel de agarose 4%, obtido a partir da amplificação do DNA genômico de três linhagens de *Ricinus communis* L por meio de iniciadores TRAP. Em M: marcador de peso molecular 100 pb. e as combinações: 1- TRAPC22+ARB1, 2- TRAPC22+ARB2, 3- TRAPC22+ARB3, 4- TRAPC22+ARB4, 5- TRAPC22+ARB5, 6- TRAPC22+ARB6, 7- TRAPC23+ARB1, 8- TRAPC23+ARB2, 9- TRAPC23+ARB3, 10- TRAPC23+ARB4, 11- TRAPC23+ARB5, 12- TRAPC23+ARB6, 13- TRAPC24+ARB1, 14- TRAPC24+ARB2, 15- TRAPC24+ARB3, 16- TRAPC24+ARB4, 17- TRAPC24+ARB5, 18- TRAPC24+ARB6, 19- TRAPC25+ARB1, 20- TRAPC25+ARB2, 21- TRAPC25+ARB3, 22- TRAPC25+ARB4, 23- TRAPC25+ARB5, 24- TRAPC25+ARB6. 25- TRAPC46+ARB1, 26- TRAPC46+ARB2, 27- TRAPC46+ARB3, 28- TRAPC46+ARB4, 29- TRAPC46+ARB5, 30- TRAPC46+ARB6, 31- TRAPC47+ARB1, 32- TRAPC47+ARB2, 33- TRAPC47+ARB3, 34- TRAPC47+ARB4, 35- TRAPC47+ARB5, 36- TRAPC47+ARB6, 37- TRAPC48+ARB1, 38- TRAPC48+ARB2, 39- TRAPC48+ARB3, 40- TRAPC48+ARB4, 41- TRAPC48+ARB5, 42- TRAPC48+ARB6, 43- TRAPC49+ARB1, 44- TRAPC49+ARB2, 45- TRAPC49+ARB3, 46- TRAPC49+ARB4, 47- TRAPC49+ARB5, 48- TRAPC49+ARB6.

Diferentes porcentagens de combinações com primer fixos e arbitrários foram obtidas para marcadores TRAP em diferentes culturas. Luo et al. (2015) desenvolveram 91 combinações de iniciadores TRAP (13 fixos e 7 arbitrários) para mangueira, sendo que 72,5% das combinações foram considerados consistentes. Já Kumar et al. (2014) em 262 combinações TRAP obtiveram 42% combinações que foram consideradas válidas. Porcentagem semelhante de combinações de primers fixos e arbitrários TRAP (49%) foi obtida por Zhang et al. (2012) para uma espécie ornamental *Paeonia suffruticosa*.

No presente estudo, o número de locos amplificados, por meio das 330 combinações de iniciadores, variou de 2 (TRAP5+ARB1; TRAP5 +ARB3;

TRAP6+ARB3;TRAP14+ARB3;TRAP17+ARB4;TRAP20+ARB2;TRAP30+ARB1 ;TRAP30+ARB2;TRAP34+ARB3) a 15 (TRAP22+ARB6), com média de 1,22 locos por combinação (Tabela 4).

Os tamanhos dos produtos amplificados variaram de 50 a 2072 pb. As combinações TRAP46+ARB4; TRAP46+ARB5; TRAP46+ARB6; TRAP49+ARB1; TRAP49+ARB2; TRAP51+ARB6 e TRAP52+ARB1 amplificaram fragmentos com 50 pb; os demais amplificaram fragmentos acima desse valor (Tabela 4).

Tabela 4. Números de locos amplificados por meio de combinações TRAP (iniciadores fixos e arbitrários).

Primers	Número de locos	Tamanho dos locos pb	Primers	Número de locos	Tamanho dos locos pb
TRAP1+ARB1	9	97-110	TRAP9+ARB1	3	100-700
TRAP1+ARB2	12	100-720	TRAP9+ARB2	5	160-2000
TRAP1+ARB3	6	96-800	TRAP9+ARB3	5	205-1300
TRAP1+ARB4	6	91-500	TRAP9+ARB4	4	590-2000
TRAP1+ARB5	12	95-1500	TRAP9+ARB5	4	205-1400
TRAP1+ARB6	13	90-1100	TRAP9+ARB6	5	220-1400
TRAP2+ARB1	9	113-2072	TRAP10+ARB1	8	113-1900
TRAP2+ARB2	6	180-955	TRAP10+ARB2	6	86-1780
TRAP2+ARB3	10	90-1180	TRAP10+ARB3	10	86-1530
TRAP2+ARB4	9	190-1675	TRAP10+ARB4	5	87-2072
TRAP2+ARB5	9	177-1500	TRAP10+ARB5	8	87-2000
TRAP2+ARB6	8	113-1200	TRAP10+ARB6	6	88-1100
TRAP3+ARB1	6	115-2000	TRAP11+ARB1	6	87-1800
TRAP3+ARB2	12	105-1660	TRAP11+ARB2	9	87-2025
TRAP3+ARB3	12	90-1700	TRAP11+ARB3	8	87-1060
TRAP3+ARB4	7	120-1100	TRAP11+ARB4	7	92-1400
TRAP3+ARB5	9	100-1600	TRAP11+ARB5	9	110-950
TRAP3+ARB6	9	90-2072	TRAP11+ARB6	7	110-930
TRAP4+ARB1	7	120-1800	TRAP12+ARB1	6	212-2045
TRAP4+ARB2	5	90-1400	TRAP12+ARB2	7	97-1700
TRAP4+ARB3	8	102-1400	TRAP12+ARB3	4	86-2000
TRAP4+ARB4	8	120-1500	TRAP12+ARB4	4	107-15000
TRAP4+ARB5	4	300-1100	TRAP12+ARB5	9	87-1420
TRAP4+ARB6	9	200-1500	TRAP12+ARB6	9	87-1200
TRAP5+ARB1	2	280-2000	TRAP13+ARB1	-	-
TRAP5+ARB2	3	130-1200	TRAP13+ARB2	-	-
TRAP5+ARB3	2	150-600	TRAP13+ARB3	-	-
TRAP5+ARB4	6	130-1200	TRAP13+ARB4	-	-
TRAP5+ARB5	6	250-1700	TRAP13+ARB5	-	-
TRAP5+ARB6	7	120-2000	TRAP13+ARB6	-	-
TRAP6+ARB1	4	100-1100	TRAP14+ARB1	4	95-1000
TRAP6+ARB2	4	190-1460	TRAP14+ARB2	7	164-770
TRAP6+ARB3	2	86-1300	TRAP14+ARB3	2	100-770
TRAP6+ARB4	4	240-800	TRAP14+ARB4	3	90-1330
TRAP6+ARB5	4	200-1200	TRAP14+ARB5	4	97-780
TRAP6+ARB6	6	240-1050	TRAP14+ARB6	8	110-830
TRAP7+ARB1	5	210-1150	TRAP15+ARB1	10	90-1360
TRAP7+ARB2	5	280-2072	TRAP15+ARB2	7	105-1660
TRAP7+ARB3	6	94-1900	TRAP15+ARB3	10	90-2045
TRAP7+ARB4	4	450-1900	TRAP15+ARB4	9	107-2000
TRAP7+ARB5	5	115-1500	TRAP15+ARB5	13	90-1600
TRAP7+ARB6	7	90-1060	TRAP15+ARB6	6	90-900
TRAP8+ARB1	3	80-1300	TRAP16+ARB1	8	100-865
TRAP8+ARB2	6	80-1470	TRAP16+ARB2	9	95-954
TRAP8+ARB3	8	85-1340	TRAP16+ARB3	8	90-1640
TRAP8+ARB4	4	200-1540	TRAP16+ARB4	8	110-1585
TRAP8+ARB5	7	120-1760	TRAP16+ARB5	6	95-1430
TRAP8+ARB6	7	100-1290	TRAP16+ARB6	6	95-2072

Tabela 4. Cont...

Primers	Número de locos	Tamanho dos locos pb	Primers	Número de locos	Tamanho dos locos pb
TRAP17+ARB1	8	105-1650	TRAP25+ARB1	11	103-2000
TRAP17+ARB2	7	120-1370	TRAP25+ARB2	8	100-1400
TRAP17+ARB3	5	190-1590	TRAP25+ARB3	10	104-1530
TRAP17+ARB4	2	195-1690	TRAP25+ARB4	8	105-1600
TRAP17+ARB5	7	95-1730	TRAP25+ARB5	8	108-1300
TRAP17+ARB6	6	92-1480	TRAP25+ARB6	8	220-590
TRAP18+ARB1	5	230-1350	TRAP26+ARB1	4	106-830
TRAP18+ARB2	7	107-1300	TRAP26+ARB2	7	100-1600
TRAP18+ARB3	6	92-750	TRAP26+ARB3	9	108-1550
TRAP18+ARB4	4	400-2000	TRAP26+ARB4	7	207-1500
TRAP18+ARB5	7	113-900	TRAP26+ARB5	8	123-1700
TRAP18+ARB6	7	117-864	TRAP26+ARB6	6	106-952
TRAP19+ARB1	11	117-1800	TRAP27+ARB1	12	112-1300
TRAP19+ARB2	8	110-1630	TRAP27+ARB2	10	122-1250
TRAP19+ARB3	8	86-1500	TRAP27+ARB3	10	107-1430
TRAP19+ARB4	8	86-1330	TRAP27+ARB4	6	120-1400
TRAP19+ARB5	9	91-1530	TRAP27+ARB5	6	106-820
TRAP19+ARB6	12	91-1775	TRAP27+ARB6	6	112-900
TRAP20+ARB1	7	95-1400	TRAP28+ARB1	8	108-1340
TRAP20+ARB2	2	325-620	TRAP28+ARB2	8	123-1360
TRAP20+ARB3	6	93-600	TRAP28+ARB3	9	118-1600
TRAP20+ARB4	4	206-1800	TRAP28+ARB4	10	117-1600
TRAP20+ARB5	7	103-1100	TRAP28+ARB5	10	95-2072
TRAP20+ARB6	3	170-545	TRAP28+ARB6	8	114-1500
TRAP21+ARB1	8	174-1150	TRAP29+ARB1	7	100-1500
TRAP21+ARB2	7	110-990	TRAP29+ARB2	6	110-1260
TRAP21+ARB3	6	120-1360	TRAP29+ARB3	4	107-1300
TRAP21+ARB4	6	200-1445	TRAP29+ARB4	7	116-1200
TRAP21+ARB5	9	120-1200	TRAP29+ARB5	7	107-1370
TRAP21+ARB6	8	114-815	TRAP29+ARB6	8	109-1100
TRAP22+ARB1	10	95-1540	TRAP30+ARB1	2	320-500
TRAP22+ARB2	14	95-1430	TRAP30+ARB2	2	216-1400
TRAP22+ARB3	14	103-1630	TRAP30+ARB3	10	110-1400
TRAP22+ARB4	13	120-1900	TRAP30+ARB4	10	120-1530
TRAP22+ARB5	12	108-2072	TRAP30+ARB5	9	120-1700
TRAP22+ARB6	15	107-1600	TRAP30+ARB6	10	114-1800
TRAP23+ARB1	11	110-1550	TRAP31+ARB1	9	106-1300
TRAP23+ARB2	9	110-1560	TRAP31+ARB2	11	110-1300
TRAP23+ARB3	10	114-1700	TRAP31+ARB3	10	107-1020
TRAP23+ARB4	6	300-1290	TRAP31+ARB4	8	112-1470
TRAP23+ARB5	7	113-785	TRAP31+ARB5	8	108-1440
TRAP23+ARB6	10	105-1270	TRAP31+ARB6	8	108-980
TRAP24+ARB1	12	108-1560	TRAP32+ARB1	8	105-1500
TRAP24+ARB2	13	104-1830	TRAP32+ARB2	11	109-1600
TRAP24+ARB3	7	102-760	TRAP32+ARB3	7	105-1560
TRAP24+ARB4	10	104-1420	TRAP32+ARB4	8	109-1700
TRAP24+ARB5	10	110-1360	TRAP32+ARB5	9	113-1400
TRAP24+ARB6	10	107-1740	TRAP32+ARB6	9	103-1000

Tabela 4. Cont..

Primers	Número de locos	Tamanho dos locos pb	Primers	Número de locos	Tamanho dos locos pb
TRAP33+ARB1	8	230-1500	TRAP41+ARB1	9	130-1700
TRAP33+ARB2	8	110-1850	TRAP41+ARB2	5	300-1400
TRAP33+ARB3	7	105-1560	TRAP41+ARB3	4	180-800
TRAP33+ARB4	5	110-1560	TRAP41+ARB4	4	120-1500
TRAP33+ARB5	9	108-1400	TRAP41+ARB5	8	170-1400
TRAP33+ARB6	5	112-1570	TRAP41+ARB6	9	110-1800
TRAP34+ARB1	7	200-1400	TRAP42+ARB1	5	200-1500
TRAP34+ARB2	7	100-1100	TRAP42+ARB2	8	180-1400
TRAP34+ARB3	2	150-500	TRAP42+ARB3	9	110-1400
TRAP34+ARB4	4	200-400	TRAP42+ARB4	8	280-1400
TRAP34+ARB5	6	110-1400	TRAP42+ARB5	7	70-1500
TRAP34+ARB6	8	150-1100	TRAP42+ARB6	6	120-700
TRAP35+ARB1	8	90-1800	TRAP43+ARB1	7	230-1300
TRAP35+ARB2	10	130-1600	TRAP43+ARB2	7	120-1300
TRAP35+ARB3	9	120-800	TRAP43+ARB3	3	120-1300
TRAP35+ARB4	7	180-1500	TRAP43+ARB4	4	180-1400
TRAP35+ARB5	6	100-780	TRAP43+ARB5	5	180-2072
TRAP35+ARB6	6	60-450	TRAP43+ARB6	4	170-1000
TRAP36+ARB1	7	170-1500	TRAP44+ARB1	7	180-1500
TRAP36+ARB2	8	120-2072	TRAP44+ARB2	6	70-1000
TRAP36+ARB3	7	120-1200	TRAP44+ARB3	9	110-1400
TRAP36+ARB4	6	480-1800	TRAP44+ARB4	4	270-1800
TRAP36+ARB5	8	130-800	TRAP44+ARB5	10	90-1500
TRAP36+ARB6	9	170-1600	TRAP44+ARB6	9	130-1500
TRAP37+ARB1	8	140-1400	TRAP45+ARB1	6	300-2072
TRAP37+ARB2	9	110-1600	TRAP45+ARB2	7	180-1800
TRAP37+ARB3	6	100-600	TRAP45+ARB3	8	180-2072
TRAP37+ARB4	6	200-1500	TRAP45+ARB4	5	280-900
TRAP37+ARB5	7	140-1500	TRAP45+ARB5	7	150-1400
TRAP37+ARB6	11	140-2000	TRAP45+ARB6	5	300-1000
TRAP38+ARB1	5	200-850	TRAP46+ARB1	10	60-2000
TRAP38+ARB2	5	200-1000	TRAP46+ARB2	8	100-1900
TRAP38+ARB3	8	180-1500	TRAP46+ARB3	9	80-1800
TRAP38+ARB4	8	130-800	TRAP46+ARB4	4	50-1400
TRAP38+ARB5	7	120-1200	TRAP46+ARB5	13	50-2000
TRAP38+ARB6	7	130-1400	TRAP46+ARB6	10	50-2000
TRAP39+ARB1	7	180-1400	TRAP47+ARB1	7	110-1400
TRAP39+ARB2	9	160-2072	TRAP47+ARB2	8	120-1600
TRAP39+ARB3	9	170-1600	TRAP47+ARB3	4	130-1500
TRAP39+ARB4	5	180-1100	TRAP47+ARB4	7	80-1500
TRAP39+ARB5	10	150-1200	TRAP47+ARB5	9	200-900
TRAP39+ARB6	3	160-1300	TRAP47+ARB6	7	170-2000
TRAP40+ARB1	8	130-1000	TRAP48+ARB1	6	100-1100
TRAP40+ARB2	5	90-1600	TRAP48+ARB2	8	180-800
TRAP40+ARB3	5	300-1400	TRAP48+ARB3	6	80-2000
TRAP40+ARB4	7	210-700	TRAP48+ARB4	7	150-1500
TRAP40+ARB5	8	280-1700	TRAP48+ARB5	6	180-1600
TRAP40+ARB6	10	90-2000	TRAP48+ARB6	5	110-1000

Tabela 4. Cont..

Primers	Número de locos	Tamanho dos locos pb	Primers	Número de locos	Tamanho dos locos pb
TRAP49+ARB1	6	50-2072	TRAP53+ARB1	9	180-1900
TRAP49+ARB2	7	50-1500	TRAP53+ARB2	6	380-2000
TRAP49+ARB3	7	200-2072	TRAP53+ARB3	8	160-1100
TRAP49+ARB4	8	110-1200	TRAP53+ARB4	7	200-2000
TRAP49+ARB5	9	100-1000	TRAP53+ARB5	8	120-1900
TRAP49+ARB6	10	80-1900	TRAP53+ARB6	10	90-1800
TRAP50+ARB1	8	100-2072	TRAP54+ARB1	3	180-1400
TRAP50+ARB2	7	80-1400	TRAP54+ARB2	6	180-1300
TRAP50+ARB3	7	180-1400	TRAP54+ARB3	6	120-1000
TRAP50+ARB4	8	60-1500	TRAP54+ARB4	8	140-1400
TRAP50+ARB5	7	120-1400	TRAP54+ARB5	7	200-1000
TRAP50+ARB6	7	130-2072	TRAP54+ARB6	7	110-1600
TRAP51+ARB1	10	180-1800	TRAP55+ARB1	6	140-600
TRAP51+ARB2	8	130-1700	TRAP55+ARB2	8	120-800
TRAP51+ARB3	6	90-1900	TRAP55+ARB3	6	100-1800
TRAP51+ARB4	8	110-2000	TRAP55+ARB4	7	100-2000
TRAP51+ARB5	9	90-2000	TRAP55+ARB5	10	90-1400
TRAP51+ARB6	9	50-2000	TRAP55+ARB6	9	130-2000
TRAP52+ARB1	7	50-2000	TRAP56+ARB1	8	90-1000
TRAP52+ARB2	8	70-2072	TRAP56+ARB2	8	130-1200
TRAP52+ARB3	7	70-1400	TRAP56+ARB3	11	90-1600
TRAP52+ARB4	6	60-2072	TRAP56+ARB4	8	90-1500
TRAP52+ARB5	5	60-1400	TRAP56+ARB5	11	120-2000
TRAP52+ARB6	5	70-1900	TRAP56+ARB6	9	160-1300

Resultados diferentes foram obtidos para cana-de-açúcar: uma média de 33 fragmentos amplificados por meio de 18 combinações TRAP, com variação de tamanho entre 100 a 700 pb (Alwala et al., 2006) e média de 58 fragmentos com 16 combinações TRAP, e com variação de tamanho entre 60 a 550 pb (Suman et al., 2012). Também, Kwon et al. (2010) utilizaram 12 combinações de iniciadores TRAP, para feijão fava, e identificaram uma variação de 7 a 37 fragmentos, com tamanhos entre 100-850pb.

De modo geral, os iniciadores Arb5 e Arb6, em combinação com os iniciadores fixos, foram os que possibilitaram amplificação de um maior número de locos, com média de 8,0 e 7,9 locos por combinação, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Iniciadores arbitrários que possibilitaram a amplificação de um maior número de locos em combinação com iniciadores fixos

Iniciador arbitrário	Nº de bandas	
	Total	Média
Arb 1	398	7,1
Arb 2	423	7,6
Arb 3	407	7,2
Arb 4	364	6,5
Arb 5	446	8,0
Arb 6	441	7,9

A eficiência de marcadores TRAP foi relatada por Liu et al. (2005). Segundo esses autores, marcadores TRAP são muito eficientes para a geração rápida de marcadores espalhados por todo o genoma de um organismo e permite que grupos de ligação sejam determinados, e muitas lacunas preenchidas. Os marcadores TRAP também mostraram a mesma capacidade que os microssatélites para atribuir grupos de ligação aos cromossomos.

Ao avaliar o iniciador Arb1 foi possível observar que 5 das combinações que foram analisadas, não apresentaram nenhum produto de amplificação, e para os iniciadores Arb2, Arb3, Arb4, Arb5 e Arb6, o número de combinações que não foram amplificadas foram: 3, 1, 3, 1 e 2, respectivamente. A ausência de amplificação pode estar relacionada a existência de grandes diferenças genéticas no sítio alvo de amplificação da fonte original utilizada no sequenciamento em relação aos genótipos avaliados

CONCLUSÕES

Os marcadores TRAP desenvolvidos e otimizados, nesse trabalho, são os primeiros marcadores funcionais desenvolvidos para mamoneira. Esses marcadores constituem mais uma importante ferramenta em estudos de variabilidade genética, genética de populações e nas mais diversas etapas de programas de melhoramento genético da mamoneira. Além de todas as vantagens mencionadas, os marcadores TRAP permitem a detecção de polimorfismo em regiões próximas a genes de interesse em mamoneira, o que os torna vantajosos em estudos para identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) ou em estudos de mapeamento associativo, no sentido de acelerar o processo de seleção assistida por marcadores (SAM).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI-DOSS, A. A.; ELSHAFEI, A. A.; MOUSTAFA, K. A.; SALEH, M.; BARAKAT, M. N. Comparative analysis of diversity based on morphoagronomic traits and molecular markers in durum wheat under heat stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 19, p. 3671-3681, 2011.

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

ALWALA, S.; SUMAN, A.; ARRO, J. A.; VEREMIS, J. C.; KIMBENG, C. A. *Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) for Assessing Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm Collections*. **Crop Science**, v. 46, p. 448-455, 2006.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. **Journal of the American Medical Association**, v.294, p.2342-2351, 2005.

BAJAY, M. M.; PINHEIRO, J. B.; NOBREGA, M. B. M.; ZUCCHI, M. I. Development and characterization of microsatellite markers for castor (*Ricinus communis* L.), an important oleaginous species for biodiesel production. **Conservation Genetic Resource**, v. 1, p.237-239, 2009.

BAJAY, M. M.; ZUCCHI, M. I.; Kiihl, T. A. M.; BATISTA, C. E. A.; MONTEIRO, M. PINHEIRO, J. B. Development of a novel set of microsatellite markers for castor bean, *Ricinus communis* (euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, p.87-89, 2011.

BARAKAT, M. N.; AI-DOSS, A. A.; ELSHAFEI, A. A.; GHAZY, A. I.; MOUSTAFA, K. Assessment of genetic diversity among wheat doubled haploid plants using TRAP markers and morpho-agronomic traits. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n.1, p.104-111, 2013.

CARMO, C. D.; SANTOS, D. B.; ALVES, L. B.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Development of TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) as New Tool for Molecular Genetic Analysis in Cassava. **Plant Molecular Biology Reporter**, v, p.1-14, 2015.

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.; RAVEL, J.; RABINOWICZ, P.D. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. **Nature Biotechnology**, v.28, p.951-956, 2010.

COSTA, M. N.; PEREIRA, W. E.; BRUNO, R.L. A.; FREIRE, E. C.; NÓBREGA, M. B. M.; MILANI, M.; OLIVEIRA, A. P. Divergência genética entre acessos e cultivares de mamoneira por meio de estatística multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.4, n. 11, p.1617-1622, 2006.

CRESTE, S.; ACCORONI, K. A. G.; PINTO, L. R.; VENCOVSKY, R.; GIMENES, M. A.; XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A. Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphisms in sucrose metabolism and drought tolerance genes. **Euphytica**, v.172, p.435-446, 2010.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus** , v.12, p.13-15, 1990.

FOSTER, J. T.; ALLAN, G. J.; CHAN, A. P.; RABINOWICZ, P. D.; RAVEL, J.; JACKSON, P. J.; KEIM, P. Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 13-18, 2010.

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.

GÁLOVÁ, Z.; VIVODÍK, M.; BALÁŽOVÁ, Z.; HLOZÁKOVÁ, T. K. Identification and differentiation of *Ricinus communis* L. using SSR markers. **Potravinárstvo Scientific Journal for Food Industry**, v. 9, n. 1, p. 556-561, 2015.

GOODARZI, F.; DARVISHZADEH, R.; HASSANI, A. Genetic analysis of castor (*Ricinus communis* L.) using ISSR markers. **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 3, n. 1, p. 18-34, 2015.

HU, J.; VICK, B.A. *Target region amplification polymorphism*: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.2 p. 289-294, 2003.

HU, J.; OCHOA, O. E.; TRUCO, M. J.; VICK, B. A. Application of the TRAP technique to lettuce (*Lactuca sativa* L.) genotyping. **Euphytica**, v. 144, p. 225-235, 2005.

HU, J. Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the Arabidopsis-type telomere sequence repeat-derived markers. **Chromosome Research**, v.14, p.535-548, 2006.

HU, J.; MOU, B.; VICK, B. A. Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germplasm accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, p.1667-1674, 2007.

KALLAMADI, P. R.; NADIGATLA, V. P. R. G. R.; MULPURI, S. Molecular diversity in castor (*Ricinus communis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 271-281, 2015.

KUMAR, Y.; KWON, S. J.; COYNE, C. J.; HU, J.; GRUSAK, M. A.; KISHA, T. J.; MCGEE, R. J.; SARKER, A. *Target region amplification polymorphism* (TRAP) for assessing genetic diversity and marker-trait associations in chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.61, p.965-977, 2014.

KWON, S.; HU, J.; COYNE, C. J. Genetic diversity and relationship among faba bean (*Vicia faba* L.) germplasm entries as revealed by TRAP markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v.8, n.3, p. 204-213, 2010.

LAKHANI, H. N.; PATEL, S. V.; BODAR, N. P.; GOLAKIYA, B. A. RAPD analysis of genetic diversity of castor bean (*Ricinus communis* L.). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p.696-703, 2015.

LI, G.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. **Theoretical Applied Genetics**, v.103, p.455-461, 2001.

LIU, Z. H.; ANDERSON, J. A.; HU, J.; FRIESEN, T. L.; RASMUSSEN, J. B.; FARIS, J. D. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci **Theoretical Applied Genetics**, v. 111, p. 782-794, 2005.

LUO, C.; ZHANG, F.; ZHANG, Q. L.; GUO, D. Y.; LUO, Z. R. Characterization and comparison of EST-SSR and TRAP markers for genetic analysis of the Japanese persimmon *Diospyros kaki*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2841-2851, 2013.

LUO, C.; WU, H. X.; YAO, Q. S.; WANG, S. B.; XU, W. T. Development of EST-SSR and TRAP markers from transcriptome sequencing data of the mango. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 7914-7919, 2015.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.11, p.1457-1463, 2013.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; SANTOS, A. S.; BASTOS, L. A.; PESTANA, C. N.; SANTOS, K. S.; FERREIRA, C. F.; DIAMANTINO, M. S. A. S. Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.3, p.342-345, 2013.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; FERNANDES, L. S.; BRASILEIRO, H. S. Genetic variability and homozygosity in a F4 castor bean population by microsatellite markers, **Revista Bragantia**, p.1-7, 2016.

MIKLAS, P. N.; HU, J.; GRUNWALD, N. J.; LARSEN, K. M. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, v. 46, p. 910-916, 2006.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. NCBI shotgun assembly sequences: Genome (WGS) and Transcriptome (TSA). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/?val=AASG02>>. Accessed on: 1 Jan. 2015.

PECINA-QUINTERO, V.; ANAYA-LÓPEZ, J. L.; NÚÑEZ-COLÍN, C. A.; ZAMARRIPA-COLMENERO, A.; MONTES-GARCÍA, N.; SOLÍS-BONILLA, J. L.; AGUILAR-RANGEL, M. R. Assessing the genetic diversity of castor bean from Chiapas, México using SSR and AFLP markers. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p.134-143, 2013.

PREMIER BIOSOFT. **NetPrimer**. Available at: <<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>>. Accessed on: 1 Jan. 2015.

ROZEN, S.; H.J. SKALETISKY. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (ed.) **Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology**. P Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

SILVA, S. A.; CERQUEIRA, L. S.; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E. P.; MOREIRA, R. F.C.; COSTA, M. A. P. C. Variabilidade genética em cultivares de mamona por meio de marcadores RAPD. **Revista Magistra**, v. 24, n. 4, p. 341-347, 2012.

SEO, K. I.; LEE, G. A.; MA, K. H.; HYUM, D. Y.; PARK, Y. J.; JUG, J. W.; LEE, S. Y.; GWAG, J. G.; KIM, C. K.; LEE, M, C. Isolation and characterization of 28 polymorphic SSR loci from Castor Bean (*Ricinus communis* L.). **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 97-103, 2011.

SUMAN, A.; ALI, K.; ARRO, J.; PARCO, A. S.; KIMBERG, C. A.; BAISAKH, N. Molecular Diversity Among Members of the Saccharum Complex Assessed Using TRAP Markers Based on Lignin-Related Genes. **Bioenergy Research**, v.5, p.197-205, 2012.

TAN, M.; YAN, M.; WANG, L.; YAN, X.; FU, CH.; WANG, L. Replication of pistillate plants of *Ricinus communis* L. and investigation of the sex stability and genetic variation of the somaclones. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 50-57, 2013.

TAN, M.; WU, K.; WANG, L.; YAN, M.; ZHAO, Z.; XU, J. ZEN, Y.; ZHANG X.; F. XUE, J.; WANG, L.; YAN, X.; Developing and characterising *Ricinus communis* SSR markers by data mining of whole-genome sequences. **Molecular Breeding**, v.34, p.893-904, 2014.

TOMAR, R. S.; PARAKHIA, M. V.; KAVANI, R. H.; DOBARIYA, K. L.; THAKKAR, J. R.; RATHOD, V. M.; DHINGANI, R. M.; GOLAKIYA, B. A. Characterization of castor (*Ricinus communis* L.) genotypes using different markers. **Research Journal of Biotechnology**, v.9, n. 2, p.6-13, 2014.

VIVODÍK, M.; BALÁŽOVÁ, Ž.; GÁLOVÁ, Z. RAPD analysis of the genetic diversity of castor bean. **International journal of biological, veterinary, agricultural and food engineering**, v.8, n. 7, p. 583-586, 2014.

VIVODÍK, M.; BALÁŽOVÁ, Z.; GÁLOVÁ, Z.; HLOZÁKOVÁ, T. K. Evaluation of molecular diversity of new castor lines (*Ricinus communis* L.) using random amplified polymorphic DNA markers. **Horticultural Biotechnology Research**, v. 1, n.1, p. 1-4, 2015.

WANG, C.; LI, G. R.; ZHANG, Z. Y.; PENG, M.; SHANG, Y. S.; LUO, R.; CHEN, Y. S. Genetic diversity of castor bean (*Ricinus communis* L.) in Northeast China revealed by ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 301-307, 2013.

YUE, B.; VICK, B. A.; CAI, X.; HU, J. Genetic mapping for the Rf1 (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. **Plant Breeding**, v. 129, p. 24-28, 2010.

ZHANG, J. J.; SHU, Q. Y.; LIU, Z. A.; REN, H. X.; WANG, L. S.; KEYSER, E. Two EST-derived marker systems for cultivar identification in tree peony. **Plant Cell Reports**, v. 31, p.299-310, 2012.

ARTIGO 2

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA POR MEIO DE MARCADORES TRAP²

² Artigo publicado no periódico científico Genetics and Molecular Research, v. 16, n. 3, p. 1-12, 2017, DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039776>, em versão na língua inglesa.

Divergência genética em linhagens elites de mamoneira por meio de marcadores TRAP

Resumo: A mamoneira é uma planta tropical de grande interesse comercial, além de ser fonte potencial para biodiesel. O desenvolvimento de cultivares geneticamente melhoradas, com alto teor de óleo na semente e baixa toxicidade por ricina, torna-se crucial para o aumento da produtividade dessa cultura. Neste contexto, desenvolvimento de linhagens elites de mamoneira e o estudo sobre a divergência genética, por meio de marcadores funcionais tipo TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*), são passos fundamentais para avanços no melhoramento genético da espécie. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a divergência genética entre 40 linhagens elites de *Ricinus communis* L., pertencentes ao programa de melhoramento genético do NBIO-UFRB, por meio de marcadores TRAP envolvidos na biossíntese de óleo e ricina. Para tanto, DNA total foi extraído e quantificado do tecido foliar de mamoneira. Um total de 70 combinações TRAP (iniciadores fixos e arbitrários) foi usado na genotipagem das 40 linhagens elites. Foram amplificados 580 fragmentos, sendo 335 polimórficos (58,0%). A dissimilaridade genética entre as linhagens foi calculada a partir do índice de dissimilaridade de Jaccard, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA. O dendrograma gerou um total de quatro grupos, mostrando que há divergência genética entre as linhagens elites melhoradas, favorável à seleção. Os marcadores moleculares do tipo TRAP mostraram-se eficientes na caracterização da variabilidade genética existente entre as linhagens, e por se tratarem de marcadores funcionais, envolvidos na biossíntese de óleo e ricina, são promissores para estudos de associação entre marcador e gene candidato.

Palavras-chave: Biossíntese de óleo, ricina, *Ricinus communis* L.

Genetic divergence in elite castor bean lineages based on TRAP markers

Abstract: Castor bean (*Ricinus communis* L.) is a tropical plant of great commercial interest and a potential source of biodiesel. The development of genetically improved cultivars with high amounts of oil in the seeds and low ricin toxicity is crucial to increase the productivity of this crop. The use of TRAP (*target region amplification polymorphism*) markers to develop elite lineages and study genetic divergence is fundamental to advance the genetic improvement of this species. The goal of this study was to evaluate the genetic divergence among 40 elite lineages of *R. communis*, which belong to the NBIO-UFRB Genetic Improvement Program, using TRAP markers involved in the biosynthesis of oil and ricin. Total DNA was extracted and quantified from the leaf tissue of the castor bean plants, and 70 TRAP combinations (fixed and arbitrary primers) were used to genotype the 40 lineages. Of the 580 fragments amplified, 335 were polymorphic (58%). The genetic dissimilarity among the lineages was calculated by the Jaccard dissimilarity index using the UPGMA grouping method. A dendrogram was generated, and four groups formed, showing divergence among the elite lineages that favors selection. The TRAP molecular markers were efficient at characterizing the genetic variability among the lineages and, because TRAP markers are functional markers involved in the biosynthesis of oil and ricin, they are important when studying the association between a marker and a candidate gene.

Keywords: Oil biosynthesis; ricin; *Ricinus communis* L.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L., $2n = 2x = 20$, Euphorbiaceae) é uma importante oleaginosa não comestível, predominantemente cultivada nas regiões áridas e semiáridas do mundo, com amplo uso na indústria e aplicações agrícolas.

As sementes de mamona contêm cerca de 35-55% de óleo, sendo o padrão comercial adotado de 44%. A percentagem de óleo nas sementes varia bastante, dependendo do ambiente de cultivo e da cultivar avaliada (COSTA; RAMOS, 2004). O ácido graxo hidroxilado ricinoleico constitui cerca de 80-90% dos ácidos graxos totais, o que confere propriedades químicas e físicas únicas ao óleo da mamona (óleo de rícino). O óleo de rícino serve como uma fonte renovável de matéria-prima para variadas aplicações industriais, tais como, na fabricação de tintas, lubrificantes, cosméticos, drogas farmacêuticas, a fabricação de corantes, anilinas, desinfetantes, germicidas, óleos lubrificantes de baixa temperatura, colas e aderentes, base para fungicidas e inseticidas, tintas de impressão e vernizes, além de nylon e matéria plástica. Além disso, em um passado recente, a sua utilização vem sendo explorada com grande destaque para a produção de biodiesel (MUTLU; MEIER, 2010).

A mamona possui em suas sementes uma alta concentração da proteína ricina. Esta é extremamente tóxica e é considerada um dos venenos mais mortíferos se administrada por via intravenosa ou oral. A ricina é uma proteína inibidora da síntese proteica por interagir com os ribossomos (CHAN et al., 2010). A torta de mamona contém uma proteína tóxica, a ricina (AUDI et al., 2005), que ainda é limitante para sua utilização na alimentação animal.

Com o objetivo de aumentar a produtividade da mamoneira, teor de óleo na semente (principal produto) e menor toxicidade por ricina, fazem-se necessários em programa de melhoramento genético da espécie, o desenvolvimento de linhagens elites, que atendam as necessidades do mercado e do agricultor. Assim, uma vez desenvolvidas essas linhagens, surgiu-se o interesse de analisar a divergência genética entre elas. A divergência genética entre genótipos de qualquer espécie pode ser avaliada por meio de marcadores moleculares, a exemplo de marcadores TRAP.

Marcadores TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) são marcadores funcionais que permitem combinações de iniciadores fixos e específicos com arbitrários (HU; VICK, 2003). Apresentam alto nível de polimorfismo, que faz deste marcador uma opção promissora na genotipagem de germoplasma e na identificação de genes relacionados a características agrônomicas desejáveis, de forma a otimizar os ganhos genéticos nos programas de melhoramento, tornando-se uma ferramenta valiosa para estudos de divergência genética (AGARWAL et al., 2008).

Diferentes tipos de marcadores moleculares vêm sendo utilizados para estimar o grau de divergência genética entre genótipos de mamoneira, a exemplo dos AFLP e SSR (PECINA-QUINTERO et al, 2013; MACHADO; SILVA, 2013; TAN et al., 2013; TAN et al., 2014; GÁLOVÁ et al., 2015; MACHADO et al., 2016) e RAPD e ISSR (SILVA et al., 2012; MACHADO et al., 2013; VIVODÍK et al., 2014; LAKHANI et al., 2015; VIVODÍK et al., 2015; TOMAR et al., 2014; GOODARZI et al., 2015; KALLAMADI et al., 2015). No entanto, estudos com marcadores funcionais do tipo TRAP avaliando a divergência genética em mamoneira ainda são inéditos.

A integridade e eficiência dos marcadores TRAP ligada à resistência a doenças têm sido relatados em outras culturas, como o feijão comum (MIKLAS et al., 2006). Outras aplicações foram empregadas com a utilização dos marcadores: mapas em trigo (LIU et al., 2005) e girassol (CHEN et al., 2006); caracterização de germoplasma no espinafre (HU et al., 2007) e na cana-de-açúcar (ALWALA et al. 2006; SUMAN et al. 2012); polimorfismo em mandioca (CARMO et al. 2015); desenho e otimização em mamoneira (SIMÕES et al., 2017).

O presente estudo objetivou avaliar a divergência genética entre 40 linhagens elites de *Ricinus communis* L., pertencentes ao programa de melhoramento genético do NBIO-UFRB, por meio de marcadores TRAP envolvidos na biossíntese de óleo e ricina.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Foram utilizadas 40 linhagens elites de mamoneira desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - NBIO/UFRB, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. As linhagens foram obtidas de cruzamentos entre os parentais: BRS Nordestina, Sipeal, EBDA MPA-17, Mirante e Paraguaçu. O método de melhoramento utilizado para condução das populações foi o SSD (Single Seed Descent) até a geração avançada F6, constituindo nessa geração alto grau de homozigose. Esse método proporcionou a seleção individual de plantas pertencentes à população avançada, com formação de linhagens elites.

O município de Cruz das Almas está localizado a 12° 40' 19" latitude sul, 39° 06' 23" de longitude oeste de Greenwich e com altitude média de 220 m. O clima é do tipo subúmido, com pluviosidade média anual de 1170 mm, com variações entre 900 e 1300 mm, sendo os meses de março a agosto os mais chuvosos e de setembro a fevereiro os mais secos. A temperatura média anual é de 24,1°C (ALMEIDA, 1999).

O método de melhoramento utilizado para condução das populações foi o SSD (*Single Seed Descent*) até a geração avançada F6, constituindo nessa geração alto grau de homozigose. Esse método proporcionou a seleção individual de plantas pertencentes à população avançada (F6). De um total de 240 linhagens, 40 foram selecionadas. Esta seleção levou em consideração os caracteres morfológicos, baseada em indivíduos que apresentaram as melhores médias para número e peso de fruto por planta, número e peso de sementes por planta, estatura e florescimento, com maior índice para seleção o teor de óleo na semente.

As linhagens foram denominadas: UFRB5, UFRB6, UFRB28, UFRB29, UFRB36, UFRB43, UFRB45, UFRB55, UFRB65, UFRB67, UFRB117, UFRB118, UFRB119, UFRB121, UFRB128, UFRB129, UFRB144, UFRB176, UFRB181, UFRB183, UFRB186, UFRB195, UFRB198, UFRB205, UFRB209, UFRB214, UFRB223, UFRB229, UFRB230, UFRB231, UFRB232, UFRB235,

UFRB237, UFRB240, UFRB249, UFRB250, UFRB252, UFRB256, UFRB259, UFRB265.

Extração de DNA

Antes da extração, as folhas de mamoneira foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 20%, enxaguadas com água destilada em abundância e armazenadas em ultra-freezer a -80°C.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). Para tanto, foram macerados aproximadamente 300 mg de tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, transferiu-se o macerado para microtubos de 2 mL e adicionaram-se 700 µL do tampão de extração (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP 1,0% e água ultra-pura q.s.p.) a 65°C. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo homogeneizadas a cada 15 minutos. Decorrido o tempo, adicionaram-se 700 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) as amostras. O material foi homogeneizado suavemente e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm (em centrífuga *micro high speed refrigerated centrifuge VS-15000c. FNII*). Logo após, coletou-se o sobrenadante.

Para uma maior purificação do material, as etapas de extração com clorofórmio: álcool-isoamílico foram repetidas. Ao sobrenadante foram adicionados 400 µL de álcool isopropílico gelado, o que equivale a aproximadamente 2/3 do volume coletado.

As amostras foram incubadas a -20°C por 20 minutos e depois centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi ressuspenso em 600 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), adicionados 200 µL de acetato de amônio a 7,5 M e a solução foi incubada no gelo por 15 minutos.

Decorrido esse tempo, centrifugou-se as amostras por 15 minutos a 12.000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante e adicionaram-se 800 µL de etanol absoluto. As amostras foram incubadas por uma hora a -20°C, centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v), centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm e seco a temperatura

ambiente. O precipitado foi ressuspenso em tampão TE contendo 1 μL de RNase (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C durante uma hora. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da utilização.

Quantificação do DNA genômico

Para a avaliação da qualidade e quantidade do DNA extraído, um total de 3 μL do DNA foi adicionado a 5 μL de solução corante (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹) e submetido à eletroforese por aproximadamente uma hora e vinte minutos a 80 vts. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa com um DNA de concentração conhecida, DNA lambda (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A fim de realizar as reações de amplificação, diluíram-se as amostras em tampão TE para ajuste de sua concentração em 5 ng/ μL ⁻¹.

Amplificação do DNA genômico com marcadores TRAP

Para a amplificação, foram utilizados vinte e oito iniciadores fixos (Tabela 1) combinados com seis iniciadores arbitrários (Tabela 2), totalizando 168 combinações. Destas, 70 combinações foram selecionadas por apresentar bom padrão de amplificação, com bandas nítidas.

Os iniciadores fixos utilizados foram desenvolvidos para as rotas metabólicas de síntese de ácidos graxos e síntese de ricina para cultura da mamoneira.

Tabela 1. Caracterização de iniciadores fixos (TRAPs) utilizados na genotipagem de 40 linhagens de mamoneira

Iniciador	Sequência (5'– 3')	%GC	Número no GenBank	Gene/processo
Rota metabólica da Ricina				
TRAP1	CCACATCCAGCACCTTTTG	52.63	RCOM_0792550	Super família RIP
TRAP2	TGTGGAGCGTTGAGGATTC	52.63	RCOM_1110780	Super família RIP
TRAP3	TGCTCGCAGGCAAAGATAC	52.63	RCOM_1110790	Super família RIP
TRAP4	TGTCCCATATTTGCCAACG	47.37	RCOM_1180980	Super família Ricina
TRAP5	TGACGACTGCTCCTTCCAC	57.89	RCOM_1960510	Super família Ricina
TRAP6	GACGACTGCTCCTTCCACA	57.89	RCOM_2105270	Super família Ricina
TRAP7	TACGCACTATGGGCTCAGG	57.89	RCOM_2159810	Super família RIP
TRAP8	CCCTGATGTCGCTGCTAAA	52.63	RCOM_2159910	Super família RIP
TRAP9	AACCGCAAGTGGTCAAACA	47.37	RCOM_2160120	Super família RIP
TRAP10	CGGGTGGCATCAGTTACAG	57.89	RCOM_2160860	Super família RIP
TRAP11	GGCGGATGCTATCTGTGAA	52.63	RCOM_2160530	Super família RIP

Tabela 1. Cont...

Iniciador	Sequência (5'– 3')	%GC	Número no GenBank	Gene/processo
Rota metabólica da síntese dos ácidos graxos				
TRAP12	GACACCTTTGTTGCCATCG	52.63	RCOM_0040840	Super família LPLAT
TRAP13	ATCCCCAACAAGCACAACA	47.37	RCOM_0138550	Super família Ferritina
TRAP14	TTTCCTTGCTGCCTCTGTG	52.63	RCOM_0251360	Super família Ferritina
TRAP15	CCGTGATTCTGGTGGTGAG	57.89	RCOM_0612610	Super família PLN
TRAP16	TTACAACCTGCGGCATCTCC	52.63	RCOM_0724080	Super família PLN 2250
TRAP17	TCCATCCCTTTCCATCCTC	52.63	RCOM_0853360	Super família LPLAT
TRAP18	TGGCATTGCTTCCTTTGA	42.11	RCOM_0893800	SubfamíliaPLA2
TRAP19	AATGCCAGCACCTACACCA	52.63	RCOM_0900600	Super família PAP2
TRAP20	TTATCTTGGGAGGGGCTTG	52.63	RCOM_0925410	Super família PLN
TRAP21	ATCCTTCCAGGCAATCCAC	52.63	RCOM_1076810	Super família Ferritina
TRAP22	CACTCGCCTGTTCAGCACT	57.89	RCOM_1081890	Super família PLN

Tabela 1. Cont...

Iniciador	Sequência (5'– 3')	%GC	Número no GenBank	Gene/processo
Rota metabólica da síntese dos ácidos graxos				
TRAP23	AGCAAGCCGCACCTAAGAT	52.63	RCOM_1403260	Super família RVT
TRAP24	GTCCAAGCAAAAGCCACCT	52.63	RCOM_1431520	Super família PLN
TRAP25	CCACCAATCCAACGCATAG	52.63	RCOM_1464650	Super família PLN
TRAP26	TTCATCTCCCTTGCCTTCC	52.63	RCOM_1502140	Super família Oleosina
TRAP27	CGAAATCCTCCTGCTCCTC	52.63	RCOM_1593790	Super família LPLAT
TRAP28	GCCACCATCTTCACCACAG	57.89	RCOM_1712710	Super família FABZ

Para o desenho dos iniciadores fixos e diretos, sequências ESTs foram obtidas em banco de dados do NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e desenhados com auxílio do software Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000). Como reverso, foram utilizados seis iniciadores arbitrários, conforme Li e Quiros (2001) adaptados por Hu e Vick (2003). Os iniciadores arbitrários compreendem três nucleotídeos seletivos na extremidade 3', quatro nucleotídeos ricos em sequências AT (corresponde a regiões de íntrons) ou GC (corresponde a regiões de éxons) na região central e 11 nucleotídeos aleatórios na extremidade 5'.

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 15 µL contendo tampão de 1X (50 mM tris-HCL, 20 mM KCL), 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil); 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, Brasil); 0,2 uM dos iniciadores (IDT) e 10 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em esquema *touch-up* de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 2 min; 5 ciclos a 94 °C por 45 s, 35 °C por 45 s

e 72° C por 1 min; seguidos por 30 ciclos a 94 °C por 45 s, 40°C por 45 s, 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 7min (Carmo et al., 2015) em termociclador modelo Veriti® 96-well (Applied Biosystems).

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 4%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹). Os produtos amplificados foram visualizados por meio de transluminador e fotodocumentados em um sistema digital *Kodak Science*. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação visual com Ladder 100 pb (Invitrogen, Brasil).

Tabela 2. Iniciadores arbitrários utilizados na genotipagem de 40 linhagens de mamoneira

Nome	Sequência de nucleotídeo (3'– 5')
Arb1	GACTGCGTACGAATTGAC
Arb2	GACTGCGTACGAATTTGA
Arb3	GACTGCGTACGAATTGCA
Arb4	GACTGCGTACGAATTAATT
Arb5	GACTGCGTACGAATTTGCC
Arb6	GACTGCGTACGAATTGACC

Análise dos dados

Por se tratar de um marcador dominante, os dados foram computados como ausência (0) e presença (1) de bandas. A diversidade genética das linhagens foi determinada por meio da matriz de dissimilaridade genética usando o índice de Jaccard (1908) gerada pelo programa GENES (CRUZ, 2013). O índice de Jaccard é formulado da seguinte maneira:

$$IAB = A / (A + B + C) \text{ onde:}$$

A = mesma banda para ambos os indivíduos;

B = presença da banda no indivíduo 1 e ausência no indivíduo 2;

C = ausência da banda no indivíduo 1 e presença no indivíduo 2.

A análise de agrupamento hierárquico foi realizada por meio do método *Unweighted Pair-Group Method Averages* (UPGMA) (SNEATH ; SOKAL 1973). Todos os resultados foram obtidos por meio dos recursos computacionais dos programas: R® 2.6.2 (<http://www.r-project.org>), STATISTICA, versão 7.1 e Genes (CRUZ, 2013), respectivamente.

O dendrograma foi construído usando-se o software MEGA 5 (TAMURA et al. 2011) e o número de grupos foi definido utilizando o pacote NbClust do R (CHARRAD et al., 2014) por meio do critério pseudo- t^2 e as análises foram realizadas por meio dos programas estatísticos R (R CORE TEAM, 2017). O PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) foi calculado com o auxílio do SOFTWARE GENALEX 6.1 (PEAKALL; SMOUSE ; 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 70 combinações de iniciadores TRAP avaliadas, 64 (91%) apresentaram um bom padrão de amplificação para as quarenta linhagens de mamoneira genotipadas (Tabela 3). Foi obtido um total de 581 fragmentos, sendo 335 (58%) polimórficos. O número total de fragmentos variou entre 1 a 15, sendo que os fragmentos polimórficos variaram de 1 a 10 (variação de 11 a 100,00% de bandas polimórficas) e o intervalo de tamanho molecular de 50 e 2000 pb. A média de combinação de iniciador foi 1,23 (Tabela 3). A Figura 1 mostra a amplificação do DNA das linhagens elites de mamoneira por meio dos marcadores TRAP.

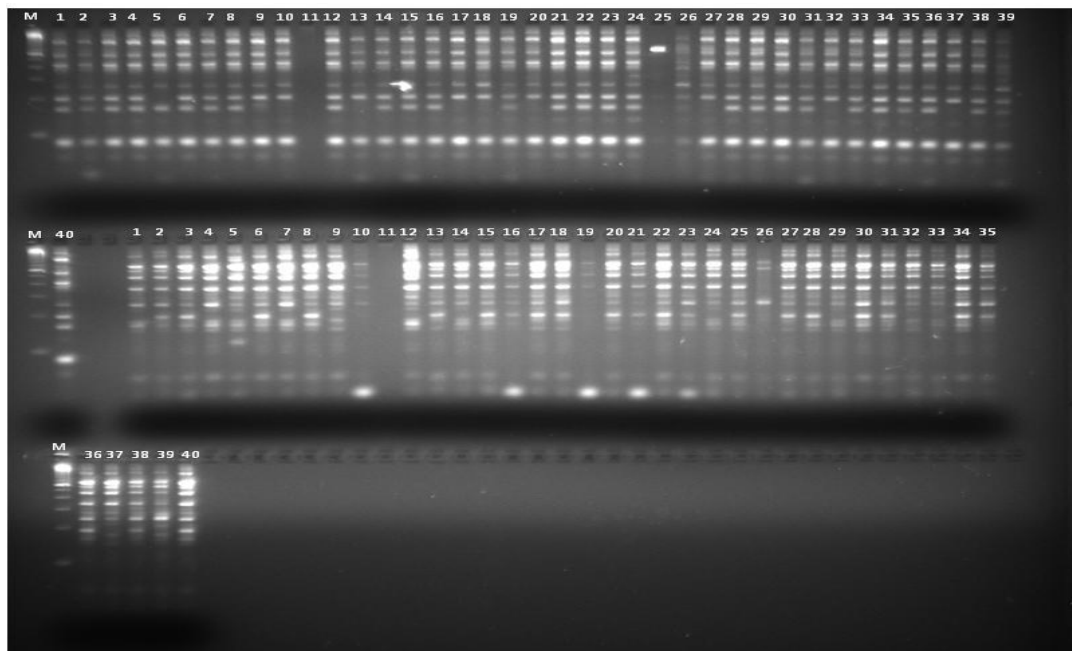


Figura 1: Perfil eletroforético, em gel de agarose 4%, obtido a partir da amplificação do DNA genômico de quarenta linhagens elites de *Ricinus communis* L (1-40) por meio de iniciadores TRAP. Em M: marcador de peso molecular 100 pb. e as combinações: 1- TRAPC12+ARB5; 2- TRAPC12+ARB6;

Tabela 3. Combinações de iniciadores *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP selecionadas para a análise do polimorfismo em 40 linhagens de mamoneira.

Combinações	Nº de fragmentos		%Poli	PIC
	Total	Poli		
Trap1 x Arb1	9	3	33	0,03
Trap1 x Arb5	12	3	25	0,30
Trap1 x Arb6	13	3	23	0,08
Trap2 x Arb1	9	1	11	0,21
Trap2 x Arb3	10	4	40	0,30
Trap2 x Arb4	9	4	44	0,37
Trap2 x Arb6	8	4	50	0,37
Trap3 x Arb4	7	5	71	0,17
Trap4 x Arb6	9	5	55	0,10
Trap5 x Arb6	7	1	14	0,38
Trap6 x Arb2	7	5	71	0,20
Trap6 x Arb6	6	6	100	0,30
Trap7 x Arb1	5	3	60	0,15
Trap7 x Arb2	5	3	60	0,26
Trap7 x Arb3	6	3	50	0,27
Trap8 x Arb2	6	4	66	0,16
Trap8 x Arb5	7	5	71	0,20
Trap9 x Arb4	4	4	100	0,24
Trap9 x Arb6	9	7	77	0,16
Trap10 x Arb3	10	4	40	0,16
Trap10 x Arb4	5	5	100	0,26
Trap10 x Arb5	8	8	100	0,23
Trap10 x Arb6	6	5	83	0,29
Trap11 x Arb2	9	2	22	0,09
Trap11 x Arb3	8	5	62	0,11
Trap11 x Arb6	7	3	43	0,28
Trap12 x Arb2	7	4	57	0,09
Trap12 x Arb3	8	3	38	0,30

Tabela 3. cont...

Combinações	Nº de fragmentos		%Poli	PIC
	Total	Poli		
Trap12 x Arb5	9	6	67	0,22
Trap12 x Arb6	11	10	91	0,24
Trap13 x Arb1	8	5	63	0,33
Trap13 x Arb2	9	7	78	0,31
Trap13 x Arb3	12	5	42	0,31
Trap13 x Arb4	10	5	50	0,24
Trap13 x Arb5	12	6	50	0,23
Trap13 x Arb6	8	3	38	0,23
Trap14 x Arb1	4	3	75	0,33
Trap14 x Arb4	3	3	100	0,21
Trap14 x Arb6	8	5	63	0,27
Trap15 x Arb2	7	6	86	0,27
Trap15 x Arb5	13	4	31	0,18
Trap16 x Arb2	9	4	44	0,14
Trap16 x Arb3	8	3	38	0,28
Trap16 x Arb4	8	4	50	0,22
Trap17 x Arb2	7	2	29	0,24
Trap17 x Arb6	6	5	83	0,32
Trap18 x Arb2	7	3	43	0,25
Trap18 x Arb3	6	4	67	0,27
Trap19 x Arb3	9	8	89	0,21
Trap19 x Arb5	9	3	33	0,29
Trap20 x Arb1	7	4	57	0,25
Trap20 x Arb3	6	6	100	0,25
Trap20 x Arb4	4	2	50	0,26
Trap21 x Arb2	7	6	86	0,22
Trap21 x Arb5	9	7	78	0,29
Trap22 x Arb1	10	7	70	0,33
Trap22 x Arb6	15	5	33	0,31

Tabela 3. cont.

Combinações	Nº de fragmentos		%Poli	PIC
	Total	Poli		
Trap23 x Arb2	6	4	67	0,24
Trap23 x Arb3	10	5	50	0,20
Trap24 x Arb1	12	4	33	0,33
Trap24 x Arb5	10	5	50	0,27
Trap25 x Arb1	11	5	45	0,18
Trap25 x Arb4	8	8	100	0,29
Trap26 x Arb2	7	6	86	0,27
Trap26 x Arb4	7	3	43	0,32
Trap27 x Arb1	12	6	50	0,32
Trap27 x Arb2	10	9	90	0,20
Trap27 x Arb3	10	8	80	0,33
Trap28 x Arb2	11	9	82	0,31
Trap28 x Arb4	10	10	100	0,28
Médias	8,3	4,8		0,24

Poli= Polimorfismo; PIC= Conteúdo de informação de polimorfismo

Trabalhos com marcadores TRAP foram realizados para outras culturas: guaraná, número total de bandas polimórficas variando entre 12 a 33 com polimorfismo de 79% e tamanho de fragmentos entre 100 e 800 pb (Da SILVA et al., 2016); *Dendrobium*, genotipada com 13 marcadores TRAP com obtenção de 510 fragmentos, sendo 500 polimórficos, 97,8% de polimorfismo (FENG et al., 2015); Caquizeiro, foi genotipado com 36 combinações de iniciadores TRAP com amplificação de 2184 fragmentos, dos quais 2072 fragmentos foram polimórficos, 94,87%, de polimorfismo (LUO et al., 2013); cana - de - açúcar, 21 combinações TRAP (para síntese de sacarose) permitiram a amplificação de 340 fragmentos polimórficos, com média de 16,2 fragmentos, e 9 combinações TRAP para tolerância a seca, resultando em 155 fragmentos polimórficos, com um média de 17,2 fragmentos por combinação de iniciadores (CRESTE et al., 2010).

Estes trabalhos corroboram os resultados obtidos para mamoneira, pois mostraram que marcadores TRAPs são altamente polimórficos e apropriados para o estudo de divergência genética e, também, para outras aplicações, a exemplo de mapas associativos e QTLs. Vale ressaltar que os marcadores TRAP para mamoneira, desenvolvidos neste trabalho, são inéditos.

Variações nas sequências de DNA conduzem ao polimorfismo, onde maior polimorfismo é indicativo de maior diversidade genética. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,03 (combinação Trap1 x Arb1) a 0,33 (combinação Trap5 x Arb6), com média de 0,24 (Tabela 3).

Considerando que marcadores TRAP são dominantes, o máximo valor de PIC observável é de 0,50, portanto, quanto mais próximo deste valor, maior o poder discriminatório do iniciador. Assim, 35 combinações TRAP apresentaram PIC acima de 0,25 (Tabela 3), com maior poder de discriminação dentre as linhagens avaliadas.

Os valores de PIC encontrados em mamoneira são comparáveis aos observados pela técnica TRAP para mandioca. Em mandioca foi encontrada uma variação de PIC entre 0,03 a 0,38, com média de 0,23 em 31 combinações TRAP (CARMO et al., 2015). Em outras culturas foram encontrados PICs com médias maiores: guaraná, variação de PIC 0,29 a 0,36, média de 0,33, para 5 combinações TRAP, (Da SILVA et al. 2016) e girassol, PIC de 0,02-0,50, e média de 0,39, para 12 combinações TRAP (YUE et al. 2009).

Também, foi observado que a variação dos valores de PIC para os marcadores TRAP varia em função do iniciador arbitrário. De modo geral, os iniciadores Arb2 e Arb6 apresentaram o maior número de fragmentos por marcador, com média de 14,25 e 16,14, respectivamente, e número médio de fragmentos polimórficos, 4,93 (Arb2) e 8,86 (Arb6) (Tabela 4). Por outro lado, o Arb4 apresentou a maior percentagem de polimorfismo (70,67%). Isto se deve ao fato de que, embora este iniciador apresente menor número de fragmentos, a maior parte deles foram polimórficos.

Tabela 4. Polimorfismo e número total de fragmentos relacionando os iniciadores arbitrários com 70 combinações *Target Region Amplification Polymorphism* - TRAP.

Iniciador arbitrário	Nº de fragmentos		Fragmentos Polimórficos		
	Total	Média	Total	Média	%
Arb 1	87	15,90	41	4,10	47,12
Arb 2	117	14,25	74	4,93	63,24
Arb 3	99	15,23	58	4,83	58,60
Arb 4	75	12,50	53	8,83	70,67
Arb 5	89	17,80	47	9,40	52,80
Arb 6	113	16,14	62	8,86	54,87

A distância genética, calculada pelo número de discordância existente entre as linhagens, observado pela dissimilaridade genética das 40 linhagens, baseado na caracterização molecular, variou entre 0,20 e 0,98, com média de 0,66, entre, as linhagens elites avaliadas. A alta média referente a distância genética (0,66) revela dissimilaridade genética significativa entre as linhagens elites avaliadas, dado importante para a tomada de decisões dentro do programa de melhoramento genético da espécie.

As linhagens mais similares geneticamente foram UFRB45 e UFRB55 (distância genética de 0,20) e as mais dissimilares foram as linhagens UFRB214 e UFRB252 (distância genética de 0,98). Também, destacaram-se por apresentar maiores valores de distância genética as linhagens UFRB5 e UFRB214 (0,97), UFRB121 e UFRB 214 (0,96) e UFRB214 e UFRB240 (0,96).

De acordo com o dendrograma obtido foi possível a separação das 40 linhagens elites de mamoneira em quatro grupos (Figura 2). As linhagens foram agrupadas com a seguinte distribuição: Grupo 1: UFRB45, UFRB55, UFRB43, UFRB65, UFRB29, UFRB231, UFRB240, UFRB198, UFRB186, UFRB195, UFRB144, UFRB36, UFRB250, UFRB121, UFRB118, UFRB67, UFRB128, UFRB129, UFRB265, UFRB28, UFRB223, UFRB229, UFRB230, UFRB205,

UFRB209, UFRB117, UFRB235, UFRB119, UFRB181, UFRB176, UFRB183, UFRB252, UFRB232, UFRB237, UFRB249; Grupo 2: UFRB5, UFRB6; Grupo 3: UFRB256, UFRB259 e Grupo 4: UFRB214.

O grupo 1 representa 87,5% das 40 linhagens avaliadas e os grupos 2 e 3 com total de 10%. O grupo 4 se destaca por apresentar uma única linhagem, a UFRB 214, o que corresponde a 2,5% do total das linhagens avaliadas. Esses resultados mostram que há dissimilaridade genética entre as linhagens elites de mamoneira, com destaque para a linhagem UFRB 214 que apresentou maior dissimilaridade com relação as demais, fato importante para o programa de melhoramento genético da espécie, uma vez que todos os genótipos constituem gerações avançadas de autofecundação e com alto grau de homozigose.

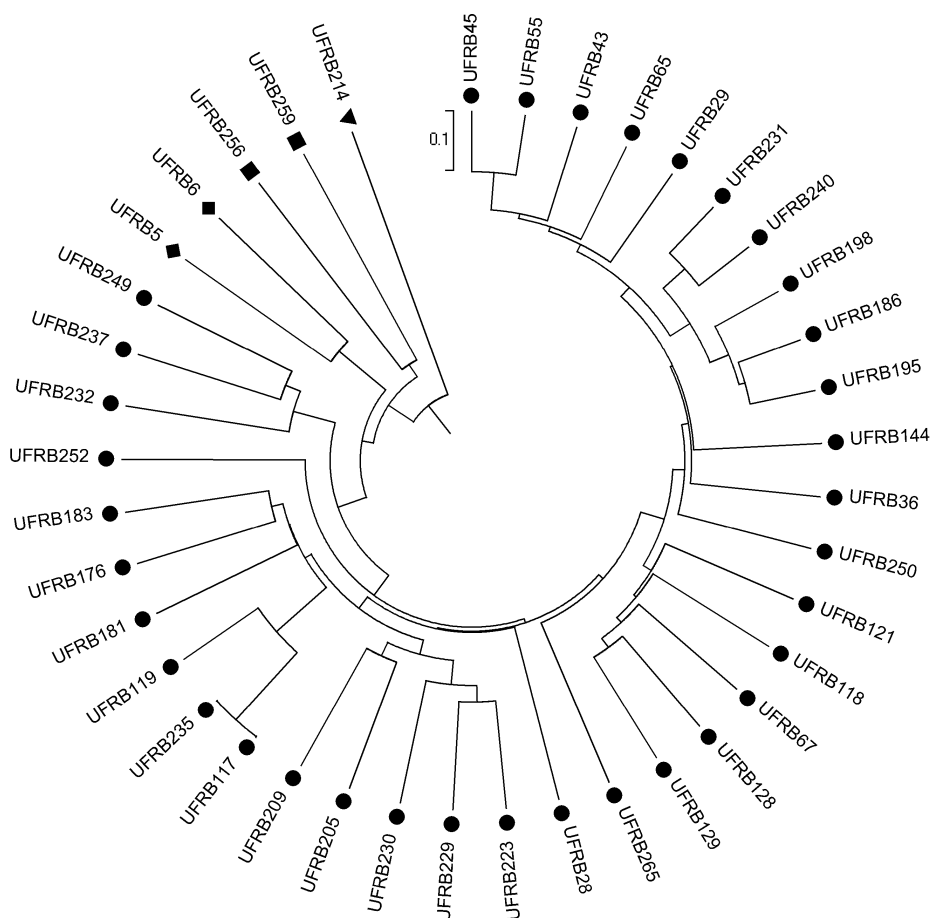


Figura 2. Dissimilaridade genética entre 40 linhagens elites do banco ativo de germoplasma - BAG de mamoneira. • grupo 1; ♦ grupo 2; ■ grupo 3 e ▲ grupo 4. Dendrograma provenientes de 70 combinações de marcadores TRAP utilizando-se o índice de Jaccard.

Estudos de divergência genética em acessos e cultivares de mamoneira por meio de marcadores moleculares vem sendo realizados. Não obstante, trabalhos com população melhorada, avançada (6 gerações de autofecundação) e em alto grau de homozigose (linhagens elites) e a utilização de marcadores TRAP, ainda são inéditos.

Trabalhos de divergência genética em cultivares de mamoneira com a utilização de marcadores RAPD foram realizados por: Machado et al. (2013), em que genotiparam 15 cultivares e obtiveram a formação de cinco grupos distintos; Silva et al. (2012), estudando 5 cultivares e observaram a separação em 2 grupos distintos; Lakhani et al. (2015) avaliaram 13 acessos de mamoneira, e assim como os autores anteriores, chegaram a identificação de dois grupos; da mesma forma, Vivodík et al. (2015) conseguiram a formação de 2 grupos entre 32 genótipos de mamoneira.

Outro tipo de marcador dominante, ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), foi utilizado no estudo de divergência genética de mamoneira: Goodarzi et al. (2015) obtiveram a formação de 4 grupos entre 12 acessos; Wang et al. (2013), avaliaram 39 genótipos e separaram em 4 grupos.

Também, marcadores codominantes SSR (*Simple Sequence Repeats*) foram utilizados na avaliação da divergência genética em mamoneira: Machado et al. (2016), estudaram 32 genótipos melhorados (F4) e verificaram a formação de 5 grupos distintos; Gálová et al. (2015), em 60 acessos, observou a formação de 6 grupos. Tan et al. (2013) com 53 clones, também, obtiveram 6 grupos distintos.

A formação do número de grupos, obtidos neste trabalho, quando comparado aos referenciados acima, mostra a eficiência na detecção da variabilidade genética de mamoneira por meio dos marcadores TRAP analisados. Também, vale ressaltar, que a metodologia de melhoramento e a condução da população autofecundada possibilitaram a obtenção de linhagens divergentes com formação de 4 grupos distintos.

CONCLUSÕES

Os marcadores TRAP são eficientes para estudos de variabilidade genética em mamoneira e constituem-se em mais uma ferramenta importante para estudos genéticos na espécie;

Por se tratarem de marcadores funcionais (TRAP), envolvidos na biossíntese de óleo e ricina, são promissores para estudos de associação entre marcador e gene candidato;

As linhagens elites em estudo, desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético da UFRB, apresentam divergência genética entre si, com destaque para a linhagem 214, resultado favorável para o sucesso do programa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 617-631, 2008.

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

ALWALA, S.; SUMAN, A.; ARRO, J. A.; VEREMIS, J. C.; KIMBENG, A. *Target Region Amplification Polymorphism (TRAP) for Assessing Genetic Diversity in Sugarcane Germplasm Collections*. **Crop Science**, v. 46, p. 448-455, 2006.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. **Journal of the American Medical Association**, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

CARMO, C. D.; SANTOS, D. B.; ALVES, L. B.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Development of TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) as New Tool for Molecular Genetic Analysis in Cassava. **Plant Molecular Biology Reporter**, v, p.1-14, 2015.

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.; RAVEL, J.; RABINOWICZ, P.D. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. **Nature Biotechnology**, v.28, p.951-956, 2010.

CHARRAD, M.; GHAZZALI, N.; BOITEAU, V.; NIKNAFS, A. NbClust: An R package for determining the relevant number of clusters in a data set. **Journal of Statistical Software**. v, 61, n. 6, p. 1-36, 2014.

CHEN, J.; HU, J.; VICK, B. A.; JAN, C. C. Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, p. 122-127, 2006.

COSTA, H. M.; RAMOS, V. D. Efeito do Óleo de Mamona em Composições de Borracha Natural Contendo Sílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, n 1, p. 46-50, 2004.

CRESTE, S.; ACCORONI, K. A. G.; PINTO, L. R.; VENCOVSKY, R.; GIMENES, M. A.; XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A. Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphisms in sucrose metabolism and drought tolerance genes. **Euphytica**, v.172, p.435-446, 2010.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy**. v.35, p. 271-276, 2013.

DA SILVA, E. F.; DE SOUSA, S. B.; DA SILVA, G. F.; SOUSA, N. R.; NASCIMENTO FILHO, F. J.; HANADA, R. E. TRAP and SRAP markers to find genetic variability in complex polyploid *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Plant Gene**, v. 6, p. 43-47, 2016.

DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

FENG, S.; HE, R.; YANG, S.; CHEN, Z.; JIANG, M.; LU, J.; WANG, H. Start codon targeted (SCoT) and *target region amplification polymorphism* (TRAP) for evaluating the genetic relationship of *Dendrobium* species. **Gene**, v. 567, p. 182-188, 2015.

GÁLOVÁ, Z.; VIVODÍK, M.; BALÁŽOVÁ, Z.; HLOZÁKOVÁ, T. K. Identification and differentiation of *Ricinus communis* L. using SSR markers. **Potravinárstvo Scientific Journal for Food Industry**, v. 9, n. 1, p. 556-561, 2015.

GOODARZI, F.; DARVISHZADEH, R.; HASSANI, A. Genetic analysis of castor (*Ricinus communis* L.) using ISSR markers. **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 3, n. 1, p. 18-34, 2015.

HU, J.; VICK, B.A. *Target region amplification polymorphism*: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.2 p. 289-294, 2003.

HU, J.; MOU, B.; VICK, B. A. Genetic diversity of 38 spinach (*Spinacia oleracea* L.) germoplasma accessions and 10 commercial hybrids assessed by TRAP markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.54, p.1667-1674, 2007.

KALLAMADI, P. R.; NADIGATLA, V. P. R. G. R.; MULPURI, S. Molecular diversity in castor (*Ricinus communis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 271-281, 2015.

LAKHANI, H. N.; PATEL, S. V.; BODAR, N. P.; GOLAKIYA, B. A. RAPD analysis of genetic diversity of castor bean (*Ricinus communis* L.). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 1, p.696-703, 2015.

LI, G.; QUIROS, C.F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. **Theoretical Applied Genetics**, v.103, p.455-461, 2001.

LIU, Z. H.; ANDERSON, J. A.; HU, J.; FRIESEN, T. L.; RASMUSSEN, J. B.; FARIS, J. D. A wheat intervarietal genetic linkage map based on microsatellite and target region amplified polymorphism markers and its utility for detecting quantitative trait loci **Theoretical Applied Genetics**, v. 111, p. 782-794, 2005.

LUO, C.; ZHANG, F.; ZHANG, Q. L.; GUO, D. Y.; LUO, Z. R. Characterization and comparison of EST-SSR and TRAP markers for genetic analysis of the Japanese persimmon *Diospyros kaki*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2841-2851, 2013.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A. Desenho e validação de iniciadores microssatélites SSR para mamoneira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.11, p.1457-1463, 2013.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; SANTOS, A. S.; BASTOS, L. A.; PESTANA, C. N.; SANTOS, K. S.; FERREIRA, C. F.; DIAMANTINO, M. S. A. S. Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.3, p.342-345, 2013.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; FERNANDES, L. S.; BRASILEIRO, H. S. Genetic variability and homozygosity in a F4 castor bean population by microsatellite markers, **Revista Bragantia**, v. 75, n. 3, p.307-313, 2016.

MIKLAS, P. N.; HU, J.; GRUNWALD, N. J.; LARSEN, K. M. Potential application of TRAP (Targeted Region Amplified Polymorphism) markers for mapping and tagging disease resistance traits in common bean. **Crop Science**, v. 46, p. 910-916, 2006.

MUTLU, H.; MEIER, M.A.R. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.112, p. 10-30, 2010.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

PECINA-QUINTERO, V.; ANAYA-LÓPEZ, J. L.; NÚÑEZ-COLÍN, C. A.; ZAMARRIPA-COLMENERO, A.; MONTES-GARCÍA, N.; SOLÍS-BONILLA, J. L.; AGUILAR-RANGEL, M. R. Assessing the genetic diversity of castor bean from Chiapas, México using SSR and AFLP markers. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p.134-143, 2013.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>, 2017.

ROZEN, S.; H.J. SKALETSKY. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (ed.) **Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology**. P Humana Press, Totowa, NJ, p. 365-386, 2000.

SILVA, S. A.; CERQUEIRA, L. S.; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E. P.; MOREIRA, R. F.C.; COSTA, M. A. P. C. Variabilidade genética em cultivares de mamona por meio de marcadores RAPD. **Revista Magistra**, v. 24, n. 4, p. 341-347,2012.

SIMÕES, K. S.; SILVA, S. A.; MACHADO, E. L.; BRASILEIRO, H. S. Development of TRAP primers for *Ricinus communis* L. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-13, 2017.

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

SUMAN, A.; ALI, K.; ARRO, J.; PARCO, A. S.; KIMBERG, C. A.; BAISAKH, N. Molecular Diversity Among Members of the Saccharum Complex Assessed Using TRAP Markers Based on Lignin-Related Genes. **Bioenergy Research**, v.5, p.197-205, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, M.; YAN, M.; WANG, L.; YAN, X.; FU, CH.; WANG, L. Replication of pistillate plants of *Ricinus communis* L. and investigation of the sex stability and genetic variation of the somaclones. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 50-57, 2013.

TAN, M.; WU, K.; WANG, L.; YAN, M.; ZHAO, Z.; XU, J. ZEN, Y.; ZHANG X.; F. XUE, J.; WANG, L.; YAN, X.; Developing and characterising *Ricinus communis* SSR markers by data mining of whole-genome sequences. **Molecular Breeding**, v.34, p.893-904, 2014.

TOMAR, R. S.; PARAKHIA, M. V.; KAVANI, R. H.; DOBARIYA, K. L.; THAKKAR, J. R.; RATHOD, V. M.; DHINGANI, R. M.; GOLAKIYA, B. A. Characterization of castor (*Ricinus communis* L.) genotypes using different markers. **Research Journal of Biotechnology**, v.9, n. 2, p.6-13, 2014.

VIVODÍK, M.; BALÁŽOVÁ, Ž.; GÁLOVÁ, Z. RAPD analysis of the genetic diversity of castor bean. **International journal of biological, veterinary, agricultural and food engineering**, v.8, n. 7, p. 583-586, 2014.

VIVODÍK, M.; BALÁŽOVÁ, Z.; GÁLOVÁ, Z.; HLOZÁKOVÁ, T. K. Evaluation of molecular diversity of new castor lines (*Ricinus communis* L.) using random amplified polymorphic DNA markers. **Horticultural Biotechnology Research**, v. 1, n.1, p. 1-4, 2015.

WANG, C.; LI, G. R.; ZHANG, Z. Y.; PENG, M.; SHANG, Y. S.; LUO, R.; CHEN, Y. S. Genetic diversity of castor bean (*Ricinus communis* L.) in Northeast China revealed by ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 301-307, 2013.

YUE, B.; CAI, X.; VICK, B. A.; HU, J. Genetic Diversity and Relationships among 177 Public Sunflower Inbred Lines Assessed by TRAP Markers. **Crop Science**, v. 49, p.1242- 1249, 2009.

ARTIGO 3

ANÁLISE CONJUNTA PARA O CARÁTER TEOR DE ÓLEO E MARCADORES TRAP EM LINHAGENS ELITES DE MAMONEIRA³

³ Artigo a ser ajustado e submetido ao Comitê Editorial do periódico Acta Scientiarum. Agronomy.

Análise conjunta para o caráter teor de óleo e marcadores TRAP em linhagens elites de mamoneira

Resumo: A demanda por óleo vegetal de qualidade vem aumentando significativamente por apresentar grande aplicabilidade no setor cosmético e industrial, principalmente com o advento do biodiesel. A mamoneira produz um óleo não comestível, com propriedades químicas únicas, que o torna interessante para produção de cosméticos, lubrificantes de aeronaves e produção de biodiesel, entre outros. Assim, programas de melhoramento genético visando o aumento do teor de óleo na semente da mamoneira são de suma importância para atender as exigências desse mercado. Diante do exposto, este trabalho objetivou o estudo da divergência genética entre linhagens elites de mamoneira por meio da análise conjunta do caráter teor de óleo e marcadores moleculares TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*). Para tanto, foram usadas as médias para teor de óleo nas sementes de 40 linhagens elites de mamoneira, desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético do N BIO-UFRB, conjuntamente com a genotipagem dessa população por meio de 44 combinações de iniciadores TRAP (iniciadores fixos e arbitrários). A dissimilaridade genética entre as linhagens foi calculada a partir do índice de dissimilaridade de Gower, utilizando-se o método de agrupamento UPGMA. As médias para o teor de óleo variam entre 39,10 (UFRB 36) a 55,39 (UFRB 209), mostrando que há variabilidade genética nas linhagens avaliadas. As 44 combinações TRAP possibilitaram a obtenção de 380 fragmentos, sendo 230 (61%) polimórficos. A análise conjunta possibilitou a formação de três grupos, mostrando que existe divergência genética nas linhagens elites avaliadas. Portanto, a análise conjunta do caráter teor de óleo na semente e marcadores TRAP é eficiente para avaliar a dissimilaridade genética em linhagens de mamoneira, demonstrando potencial para o programa de melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: Biodiesel, divergência genética, *Ricinus communis* L., algoritmo de Gower.

Joint analysis for the character of oil content and TRAP markers in elite castor bean lineages

Abstract: The demand for vegetable oil with quality has increased significantly due to its great applicability in the cosmetic and industrial sector, mainly with the advent of biodiesel. Castor oil produces non edible oil with unique chemical properties, which makes it interesting for cosmetic and aircraft lubricant and biodiesel production, among others. Thus, breeding programs aimed at increasing the oil content in the castor bean seeds are of paramount importance to meet the requirements and demands of this market. Therefore, this work aimed to study the genetic divergence between castor bean lineages by means of combined analysis of the oil content characteristic and molecular markers TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*). The mean values for oil content in the seeds of 40 castor bean seedlings developed by the genetic breeding program of the NBIO-UFRB were used together with the genotyping of this population by means of 44 combinations of TRAP primers (fixed and arbitrary primers). The genetic dissimilarity between the lines was calculated using the Gower algorithm and the UPGMA grouping method. The averages for the oil content varied from 39.10 (UFRB 36) to 55.39 (UFRB 209), showing that there is genetic variability in the evaluated lineages. The 44 TRAP combinations generated 380 fragments, whereas 230 (61%) were polymorphic. The joint analysis allowed the formation of three groups, showing that there is genetic divergence to be explored in the elite lineages evaluated. Therefore, the joint analysis of the oil content characteristic in the seed and TRAP markers is efficient to evaluate the genetic divergence in castor bean lineages, demonstrating potential use in the genetic breeding program of the species.

Keywords: Biodiesel, genetic divergence, *Ricinus communis* L., gower algorithm.

INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.), pertencente à família Euphorbiaceae apresenta ampla distribuição geográfica. A espécie ocorre de forma frequente nas diversas regiões do Brasil por suas características xerófilas e heliófilas, além de boa adaptação às distintas condições de solo e manejo. É uma oleaginosa passível de exploração no semiárido brasileiro, o que gera a possibilidade de ocupação e renda para agricultores familiares da região (CAVALCANTI et al., 2005).

Por ser uma oleaginosa, o principal produto extraído da mamona é o óleo de suas sementes, considerado nobre e de grande versatilidade industrial. A distinção do óleo da mamona se deve à sua composição, com grande quantidade de ácido ricinoléico, em média cerca de 90% (TORRES, 2006). Essas características peculiares conferem ao óleo qualidades especiais, tais como: único glicerídeo natural que é solúvel em álcool e é o mais denso e mais viscoso de todos os óleos vegetais e animais, tendo viscosidade dez vezes maior que o óleo de girassol e outros óleos vegetais (BELTRÃO, 2003).

Também, a mamoneira apresenta grande variabilidade genética, facilmente observada em características botânicas e agronômicas (BAHIA et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2013, SILVA et al., 2017). No entanto, essas características, principalmente as quantitativas, sofrem influência ambiental e epistática. Assim, a variabilidade genética da mamoneira deve ser avaliada, também, por meio do polimorfismo do DNA, descartando qualquer influência ambiental sob o genoma.

O programa de melhoramento genético da mamoneira NBIO-UFRB, através de hibridações controladas e geração de populações autofecundadas, têm desenvolvido linhagens elites com objetivo de lançar novas cultivares para atender a demanda do mercado. Como parte do processo, essas linhagens elites, nesse estudo, foram avaliadas quanto ao teor de óleo na semente e a variabilidade genética em nível de DNA por meio de marcadores moleculares.

Os marcadores moleculares são ferramentas fundamentais em diversos estudos. Além de possibilitar a caracterização de germoplasma, podem também ser utilizados como ferramenta para estudos de divergência genética entre

indivíduos, dentro e entre populações ou espécies relacionadas, possibilitando avaliação de um número elevado de genótipo em curto prazo, e apresentam um alto grau de polimorfismo, além de não sofrerem influência ambiental (SOUZA et al., 2008). A eficácia dos diferentes marcadores é confirmada com a vasta utilização dessas técnicas em estudos de conservação genética e no melhoramento de plantas (SOUZA, 2015).

O marcador TRAP é baseado na combinação de um iniciador fixo, uma sequência desenhada a partir de *Expressed Sequence Tags* (ESTs) e um primer arbitrário. O primer fixo se recobre a uma dada região expressa do genoma durante a reação de PCR e o polimorfismo gerado pela combinação dos dois iniciadores estarão associados a um gene específico (HU ; VICK, 2003). O marcador TRAP amplifica diferentes regiões, possui a vantagem de ser uma técnica simples, além de fornecer alto rendimento e reprodutibilidade (POCZAI et al., 2013).

Os marcadores TRAP foram inicialmente desenvolvidos para amostras de DNA de girassol (HU; VICK, 2003) e vêm sendo empregados em diversas outras espécies tais como alface (*Lactuca sativa* L.; HU et al., 2005), trigo (*Triticum aestivum* L.; LIU et al., 2005), feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.; MIKLAS, et al., 2006), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.; Carmo et al., 2015) guaraná (*Paullinia cupana*.; DA SILVA et al., 2016), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.; MIRAJKAR et al., 2017), para análises de *Quantitative Trait Locus* (QTLs), ligados a teor de óleo em *Brassica napus* L. (JIN et al., 2007), e desenvolvidos para mamoneira, por Simões et al. (2017a).

Características morfoagronômicas e marcadores moleculares podem ser utilizados conjuntamente para estudo de variabilidade genética. A análise conjunta de variáveis quantitativas e qualitativas é um potencial indicador mais completo da variabilidade existente entre as espécies, porém poucos trabalhos têm utilizado esta estratégia. Provavelmente, isso ocorre devido à falta de conhecimento das técnicas estatísticas que permitem essa abordagem, à carência de softwares livres que analisem esses dados conjuntamente, bem como pela tendência dos pesquisadores em dar mais importância àquelas variáveis diretamente relacionadas com caracteres trabalhados em programas de melhoramento (GONÇALVES et al., 2008).

A técnica que permite a análise simultânea de dados quantitativos e qualitativos foi proposta por Gower (1971). Esse método permite que valores da matriz de distância fiquem compreendidos entre 0 e 1, independentemente do número de variáveis, como uma base de dados para a padronização (CROSSA; FRANCO, 2004), o que facilita a construção de um dendrograma (MASON et al., 2005). Alguns trabalhos utilizando esta abordagem são relatados em estudos feitos com *Capsicum* (MOURA et al., 2010); *Pineapple* sp. L. (Merr) (MACHADO et al., 2011); *Carica papaya* (RAMOS et al., 2012); *P. guajava* (NOGUEIRA et al., 2014); *Passiflora* (MACHADO et al., 2015); *Jatropha curcas* (PESTANA-CALDAS et al., 2016) e com *Ricinus communis* L. (SILVA et al., 2017).

Análise conjunta para o teor de óleo na semente e marcadores TRAP em linhagens elite de mamoneira, ainda são inéditos. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou estudar a divergência genética entre linhagens elites de *Ricinus communis* L. quanto ao caráter teor de óleo na semente conjuntamente com marcadores moleculares TRAP, visando auxiliar o programa de melhoramento genético da espécie do NBIO-UFRB.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

40 linhagens elites foram desenvolvidas pelo programa de melhoramento genético do Núcleo de Melhoramento Genético e Biotecnologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - NBIO/UFRB, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. As linhagens foram obtidas a partir de cruzamentos entre os parentais: BRS Nordestina, Sipeal, EBDA MPA-17, Mirante e Paraguaçu.

O município de Cruz das Almas está localizado a 12° 40' 19" latitude sul, 39° 06' 23" de longitude oeste de Greenwich e com altitude média de 220 m. O clima é do tipo subúmido, com pluviosidade média anual de 1170 mm, com variações entre 900 e 1300 mm, sendo os meses de março a agosto os mais chuvosos e de setembro a fevereiro os mais secos. A temperatura média anual é de 24,1°C (ALMEIDA, 1999).

O método de melhoramento utilizado para condução das populações foi o SSD (*Single Seed Descent*) até a geração avançada F6, constituindo nessa geração alto grau de homozigose. Esse método proporcionou a seleção individual de plantas pertencentes à população avançada (F6). De um total de 240 linhagens, 40 foram selecionadas (Tabela 1). Esta seleção levou em consideração os caracteres morfológicos, baseada em indivíduos que apresentaram as melhores médias para número e peso de fruto por planta, número e peso de sementes por planta, estatura e florescimento, com maior índice para seleção o teor de óleo na semente.

Tabela 1. Relação das 40 linhagens elites de mamoneira utilizados para a análise do polimorfismo dos marcadores *Target Region Amplification Polymorphism* – TRAP.

Linhagem	Genealogia
UFRB5	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB6	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB28	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB29	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB36	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB43	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB45	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB55	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB65	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB67	Nordestina BRS149 / EBDA MPA 17
UFRB117	Paraguaçu BRS188 / EBDA MPA 17
UFRB118	Paraguaçu BRS188 / EBDA MPA 17
UFRB119	Paraguaçu BRS188 / EBDA MPA 17
UFRB121	Paraguaçu BRS188 / EBDA MPA 17
UFRB128	Paraguaçu BRS188 / EBDA MPA 17
UFRB129	Paraguaçu BRS188 / EBDA MPA 17
UFRB144	Paraguaçu BRS188 / Sipeal 28
UFRB176	EBDA MPA 17 / Mirante 10

Tabela 1. Cont...

Linhagem	Genealogia
UFRB181	EBDA MPA 17 / Mirante 10
UFRB183	EBDA MPA 17 / Mirante 10
UFRB186	EBDA MPA 17 / Mirante 10
UFRB195	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB198	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB205	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB209	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB214	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB223	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB229	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB230	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB231	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB232	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB235	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB237	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB240	EBDA MPA 17 / Sipeal 28
UFRB249	Mirante 10 / Sipeal 28
UFRB250	Mirante 10 / Sipeal 28
UFRB252	Mirante 10 / Sipeal 28
UFRB256	Mirante 10 / Sipeal 28
UFRB259	Mirante 10 / Sipeal 28
UFRB265	Mirante 10 / Sipeal 28

O experimento foi desenvolvido em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições, sendo a parcela representado por uma planta, instalado em área experimental do NBIO/UFRB, na cidade de Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

A área para a instalação do experimento foi devidamente preparada, com realização de aração e gradagem. A partir da análise de solo, foi realizada a correção de acidez e, posteriormente a adubação na cova de plantio, com a

dosagem de 20 kg.ha⁻¹ de N, 80 kg.ha⁻¹ de P e 40 kg.ha⁻¹ de K. O plantio foi feito por meio de semeadura direta no campo, utilizando três sementes por cova, com posterior desbaste. O espaçamento utilizado foi de 3 m entre fileiras e 1 m entre plantas. Aproximadamente, 30 dias após o plantio, foi realizado o desbaste manual, deixando-se uma planta, a mais vigorosa, por cova.

Quantificação do teor de óleo nas sementes

A quantificação do teor de óleo na semente em porcentagem (TOS) foi realizada no Laboratório Avançado de Tecnologia Química da Embrapa Algodão, localizado em Campina Grande - PB. Para tanto, foi utilizada a técnica de Ressonância Magnética Nuclear – RMN, sendo um método não destrutivo, em instrumento MQA Oxford 7005 (American Oil Chemists' Society, 2000) com um eletroímã de 0,47 T. Para otimizar o método da Ressonância Magnética Nuclear – RMN, as amostras permaneceram por 24 horas em um ambiente controlado com temperatura a 20° C. O resultado dos espectros foi obtido por meio de uma sonda com um tubo de acrílico em formato cilíndrico, onde as sementes foram alocadas e após 18 segundos os teores de óleo foram lidos no computador acoplado ao aparelho.

Extração de DNA

Antes da extração, as folhas de mamoneira foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 20%, enxaguadas com água destilada em abundância e armazenadas em ultra-freezer a -80°C.

A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1990). Para tanto, foram macerados aproximadamente 300 mg de tecido vegetal em almofariz na presença de nitrogênio líquido. Em seguida, transferiu-se o macerado para microtubos de 2 mL e adicionaram-se 700 µL do tampão de extração (CTAB 2,0%, NaCl 1,4 M, Tris HCl 0,1 M pH 8,0, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,4%, PVP 1,0% e água ultra-pura q.s.p.) a 65°C. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 45 minutos, sendo

homogeneizadas a cada 15 minutos. Decorrido o tempo, adicionaram-se 700 μL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) as amostras. O material foi homogeneizado suavemente e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm (em centrífuga *micro high speed refrigerated centrifuge VS-15000c. FNII*). Logo após, coletou-se o sobrenadante.

Para uma maior purificação do material, as etapas de extração com clorofórmio: álcool-isoamílico foram repetidas. Ao sobrenadante foram adicionados 400 μL de álcool isopropílico gelado, o que equivale a aproximadamente 2/3 do volume coletado.

As amostras foram incubadas a -20°C por 20 minutos e depois centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. O precipitado foi ressuscitado em 600 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM), adicionados 200 μL de acetato de amônio a 7,5 M e a solução foi incubada no gelo por 15 minutos.

Decorrido esse tempo, centrifugou-se as amostras por 15 minutos a 12.000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante e adicionaram-se 800 μL de etanol absoluto. As amostras foram incubadas por uma hora a -20°C , centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm. Em seguida, o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol 70% (v/v), centrifugados por 5 minutos a 12.000 rpm e seco a temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em tampão TE contendo 1 μL de RNAse (10 mg/mL) e as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C durante uma hora. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento da utilização.

Quantificação do DNA genômico

Para a avaliação da qualidade e quantidade do DNA extraído, um total de 3 μL do DNA foi adicionado a 5 μL de solução corante (30% de glicerol e 0,25% de azul de bromofenol). Em seguida, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) e submetido à eletroforese por aproximadamente uma hora e vinte minutos a 80 vts. A quantidade de DNA foi avaliada por análise comparativa com um DNA de concentração conhecida, DNA lambda (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A fim de

realizar as reações de amplificação, diluíram-se as amostras em tampão TE para ajuste de sua concentração em 5 ng/ μL^{-1} .

Amplificação do DNA genômico com iniciadores TRAP

Foram utilizados dezessete marcadores fixos (Tabela 2) combinados com seis marcadores arbitrários (Tabela 3) resultando em 102 combinações. Destas, foram selecionadas 44 combinações com melhor padrão de amplificação. Os iniciadores fixos foram desenvolvidos para as rotas metabólicas de síntese de ácidos graxos para cultura da mamoneira.

Tabela 2. Caracterização de iniciadores fixos (TRAPs) utilizados na genotipagem de 40 linhagens elites de mamoneira

Iniciador	Sequência (5'– 3')	%GC	Número no GenBank	Gene/processo
Rota metabólica da síntese dos ácidos graxos				
TRAP12	GACACCTTTGTTGCCATCG	52.63	RCOM_0040840	Super família LPLAT
TRAP13	ATCCCCAACAAGCACAACA	47.37	RCOM_0138550	Super família Ferritina
TRAP14	TTTCCTTGCTGCCTCTGTG	52.63	RCOM_0251360	Super família Ferritina
TRAP15	CCGTGATTCTGGTGGTGAG	57.89	RCOM_0612610	Super família PLN
TRAP16	TTACAACCTGCGGCATCTCC	52.63	RCOM_0724080	Super família PLN 2250
TRAP17	TCCATCCCTTTCCATCCTC	52.63	RCOM_0853360	Super família LPLAT
TRAP18	TGGCATTGCTTCCTTTGA	42.11	RCOM_0893800	SubfamíliaPLA2
TRAP19	AATGCCAGCACCTACACCA	52.63	RCOM_0900600	Super família PAP2

Tabela 2. Cont...

Iniciador	Sequência (5'– 3')	%GC	Número no GenBank	Gene/processo
Rota metabólica da síntese dos ácidos graxos				
TRAP20	TTATCTTGGGAGGGGCTTG	52.63	RCOM_0925410	Super família PLN
TRAP21	ATCCTTCCAGGCAATCCAC	52.63	RCOM_1076810	Super família Ferritina
TRAP22	CACTCGCCTGTTTCAGCACT	57.89	RCOM_1081890	Super família PLN
TRAP23	AGCAAGCCGCACCTAAGAT	52.63	RCOM_1403260	Super família RVT
TRAP24	GTCCAAGCAAAAGCCACCT	52.63	RCOM_1431520	Super família PLN
TRAP25	CCACCAATCCAACGCATAG	52.63	RCOM_1464650	Super família PLN
TRAP26	TTCATCTCCCTTGCCTTCC	52.63	RCOM_1502140	Super família Oleosina
TRAP27	CGAAATCCTCCTGCTCCTC	52.63	RCOM_1593790	Super família LPLAT
TRAP28	GCCACCATCTTCACCACAG	57.89	RCOM_1712710	Super família FABZ

Tabela 3. Iniciadores arbitrários utilizados na genotipagem de 40 linhagens elites de mamoneira

Nome	Sequência de nucleotídeo (3'– 5')
Arb1	GACTGCGTACGAATTGAC
Arb2	GACTGCGTACGAATTTGA
Arb3	GACTGCGTACGAATTGCA
Arb4	GACTGCGTACGAATTAATT
Arb5	GACTGCGTACGAATTTGCC
Arb6	GACTGCGTACGAATTGACC

Para o desenho dos iniciadores fixos e diretos, sequências ESTs foram obtidas em banco de dados do NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e desenhados com auxílio do software

Primer3 (ROZEN e SKALETSKY, 2000). Como reverso, foram utilizados seis iniciadores arbitrários conforme Li e Quiros (2001) adaptados por Hu e Vick (2003). Os iniciadores arbitrários compreendem três nucleotídeos seletivos na extremidade 3', quatro nucleotídeos ricos em sequências AT (corresponde a regiões de íntrons) ou GC (corresponde a regiões de éxons) na região central e 11 nucleotídeos aleatórios na extremidade 5'.

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 15 µL contendo tampão de 1X (50 mM tris-HCL, 20 mM KCL), 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Brasil); 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (Invitrogen, Brasil); 0,2 uM dos iniciadores (IDT) e 10 ng de DNA.

As amplificações foram realizadas em esquema *touch-up* de acordo com o seguinte programa: 94 °C por 2 min; 5 ciclos a 94 °C por 45 s, 35 °C por 45 s e 72° C por 1 min; seguidos por 30 ciclos a 94 °C por 45 s, 40°C por 45 s, 72 °C por 1 min e extensão final de 72 °C por 7min (Carmo et al., 2015) em termociclador modelo Veriti® 96-well (Applied Biosystems).

A eletroforese foi realizada em gel de agarose 4%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg.mL⁻¹). Os produtos amplificados foram visualizados por meio de transluminador e fotodocumentados em um sistema digital *Kodak Science*. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação visual com Ladder 100 pb (Invitrogen, Brasil).

Análise dos dados

As porcentagens do teor de óleo na semente das 40 linhagens elites de mamoneira foram submetidas ao teste F e ao teste de médias de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

A dissimilaridade genética foi estimada por meio da genotipagem das linhagens elites, por meio de marcadores TRAP, conjuntamente com as médias para o caráter teor de óleo na semente (TOS). Para a genotipagem, os dados foram computados como ausência (0) e presença (1) de bandas nos géis fotografados, por se tratar de um marcador dominante (TRAP).

Na determinação da dissimilaridade entre as linhagens elites foi utilizado o algoritmo de Gower (1971). Os agrupamentos hierárquicos das linhagens elites

foram obtidos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method With Arithmetic Averages*). Todos os resultados foram obtidos por meio dos recursos computacionais dos programas: R® 2.6.2 (<http://www.r-project.org>), STATISTICA, versão 7.1 e Genes (CRUZ, 2008) respectivamente.

O dendrograma foi construído usando-se o software MEGA 5 (TAMURA et al. 2011) e o número de grupos foi definido utilizando o pacote NbClust do R (CHARRAD et al., 2013) por meio do critério pseudo-t² e as análises foram realizadas por meio dos programas estatísticos R (R CORE TEAM, 2017). O PIC (conteúdo de informação de polimorfismo) foi calculado com o auxílio do SOFTWARE GENALEX 6.1 (PEAKALL ; SMOUSE ; 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste F foi significativo para TOS ($p < 0,01$), mostrando que, pelo menos uma dentre as demais linhagens, diferiu estatisticamente. Este resultado mostra que há variabilidade para TOS entre as linhagens estudadas.

As médias para TOS e o agrupamento de linhagens elites estão representados na Tabela 4. As médias para TOS variaram entre 39,10 (UFRB 36) provenientes entre os cruzamentos Nordesteina BRS149 x EBDA MPA 17 a 55,39 (UFRB 209) provenientes dos cruzamentos EBDA MPA 17 X Sipeal 28 para as linhagens estudadas, com formação de dez grupos distintos (Tabela 4), mostrando que há variabilidade para o caráter estudado. Para TOS, destacaram-se as linhagens UFRB 209, UFRB 214 e UFRB 256 sendo as duas primeiras linhagens provenientes dos cruzamentos EBDA MPA 17 X Sipeal 28 e a última linhagem resultante da hibridação de Mirante 10 X Sipeal 28 (grupo a, Tabela 4) por apresentarem as maiores médias, 55,39, 55,13. 55,07, respectivamente. Vale ressaltar que as maiores médias obtidas nesse estudo, foram superiores ao padrão comercial (48%) descrito por Nobre et al. (2012) e também por outros autores: com 48% (Severino et al.,2006), 52,72% (Omari et al.,2015) e 53,73% (Tomar et al.,2014).

As menores médias para TOS (39,50% e 39,10%; Tabela 4) foram próximas ao valor de 39,43% encontrado por Yusuf et al. (2015) e superiores ao encontrado por Imasuen et al. (2014) que foi de 30,06%.

As altas médias e ampla variação de TOS entre as linhagens elites, obtidas nesse trabalho, apontam variabilidade genética para o programa de melhoramento da mamoneira do NBIO-UFRB.

Tabela 4. Médias para o caráter Teor de Óleo na semente (TOS) em linhagens elites de mamoneira.

UFRB 209	55,39 a
UFRB 214	55,13 a
UFRB 256	55,07 a
UFRB 5	54,43 b
UFRB 249	54,37 b
UFRB 176	54,18 b
UFRB 129	54,18 b
UFRB 232	53,92 b
UFRB 55	53,77 b
UFRB 128	53,49 c
UFRB 240	53,17 c
UFRB 183	53,12 c
UFRB 265	53,07 c
UFRB 121	52,89 c
UFRB 198	52,89 c
UFRB 195	52,70 d
UFRB 6	52,52 d

Tabela 4. Cont...

UFRB 229	52,50 d
UFRB 186	52,43 d
UFRB 45	52,43 d
UFRB 223	52,42 d
UFRB 118	52,40 d
UFRB 119	52,33 d
UFRB 181	52,32 d
UFRB 29	52,00 e
UFRB 43	51,90 e
UFRB 67	51,69 e
UFRB 205	51,63 e
UFRB 65	51,57 e
UFRB 259	51,50 e
UFRB 230	51,20 f
UFRB 237	51,12 f
UFRB 231	50,82 f
UFRB 117	50,79 f
UFRB 235	50,76 f
UFRB 250	48,29 g
UFRB 252	47,29 h
UFRB 144	40,10 i
UFRB 28	39,50 j
UFRB 36	39,10 j
CV (%)	1,02
Média Geral	51,51

As médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

As 44 combinações de iniciadores TRAP utilizadas na genotipagem das 40 linhagens elites de mamoneira geraram um total de 380 fragmentos, sendo 230 polimórficos (61%). A variação do número de fragmentos polimórficos gerados por combinação foi de 2 (combinação Trap17 X Arb2) a 10 (Trap28 X Arb4), com média de 5,2 (Tabela 5). A média de 5,2 fragmentos polimórficos por combinação de iniciadores, encontrado nesse estudo, foi próximo a 4,8 derivados de 70 combinações em mamoneira (Simões et al., 2017b), superior a 3,04 derivados de 27 combinações de indicadores TRAP em cana-de-açúcar (Mirajkar et al., 2017) e inferior a 13,30 derivados de 12 combinações TRAP também em cana de açúcar (CRESTE et al., 2010).

Os fragmentos apresentaram amplitude de tamanho que variou entre 50 a 2000 pb. Esse resultado confirma a mesma amplitude dos fragmentos encontradas em estudos com o marcador TRAP para mamoneira por Simões et al. (2017b). Para o marcador dominante RAPD em mamoneira foi encontrado variação em tamanho dos fragmentos de 100 a 1200 pb e 200 a 3800 pb (Vivodík et al., 2015; Gajera et al., 2010, respectivamente).

A porcentagem de polimorfismo variou de 100% para as combinações Trap14 x Arb4, Trap20 x Arb3, Trap25 x Arb4 e Trap28 x Arb4 a 29% para Trap17 x Arb2 (Tabela 5). Esses resultados mostram que os marcadores TRAP são eficientes na detecção de polimorfismo em mamoneira.

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,09 para a combinação Trap12 x Arb2 a 0,33 para as combinações Trap13 x Arb1; Trap14 x Arb1; Trap22 x Arb1; Trap24 x Arb1 e Trap27 x Arb3, com média de 0,26 (Tabela 5). Considerando que marcadores TRAP são dominantes, o máximo valor de PIC observável é 0,50. Portanto, quanto mais próximo deste valor, maior o poder discriminatório do iniciador. Assim, 23 das combinações TRAP (52%) apresentaram PIC acima de 0,26, sendo classificados como os marcadores com maior poder de discriminação entre os genótipos avaliados (Tabela 5). Em estudos desenvolvidos com mamoneira, o PIC apresentou uma variação de 0,03 a 0,33, com valor médio de 0,24 com 70 combinações dos iniciadores TRAP (SIMÕES et al., 2017b).

Os valores de PIC encontrados em mamoneira são comparáveis aos observados pela técnica TRAP para mandioca. Em mandioca foi encontrada

uma variação de PIC entre 0,03 a 0,38, com média de 0,23 em 31 combinações TRAP (CARMO et al., 2015). Em cana-de-açúcar houve uma variação do PIC de 0,0 a 0,22 com média 0,11 em 27 combinações TRAP (MIRAJKAR et al., 2017). Em estudos desenvolvidos com guaraná, o PIC apresentou uma variação de 0,29 a 0,36, com valor médio de 0,33 com 5 combinações dos iniciadores TRAP (Da SILVA et al., 2016).

Tabela 5. Combinações de iniciadores *Target Region Amplification Polymorphism* – TRAP

Combinações	Nº de fragmentos		%Poli	PIC
	Total	Poli		
Trap12 x Arb2	7	4	57	0,09
Trap12 x Arb3	8	3	38	0,30
Trap12 x Arb5	9	6	67	0,22
Trap12 x Arb6	11	10	91	0,24
Trap13 x Arb1	8	5	63	0,33
Trap13 x Arb2	9	7	78	0,31
Trap13 x Arb3	12	5	42	0,31
Trap13 x Arb4	10	5	50	0,24
Trap13 x Arb5	12	6	50	0,23
Trap13 x Arb6	8	3	38	0,23
Trap14 x Arb1	4	3	75	0,33
Trap14 x Arb4	3	3	100	0,21
Trap14 x Arb6	8	5	63	0,27
Trap15 x Arb2	7	6	86	0,27
Trap15 x Arb5	13	4	31	0,18
Trap16 x Arb2	9	4	44	0,14
Trap16 x Arb3	8	3	38	0,28
Trap16 x Arb4	8	4	50	0,22
Trap17 x Arb2	7	2	29	0,24
Trap17 x Arb6	6	5	83	0,32

Tabela 5. Cont...

Combinações	Nº de fragmentos		%Poli	PIC
	Total	Poli		
Trap18 x Arb2	7	3	43	0,25
Trap18 x Arb3	6	4	67	0,27
Trap19 x Arb3	9	8	89	0,21
Trap19 x Arb5	9	3	33	0,29
Trap20 x Arb1	7	4	57	0,25
Trap20 x Arb3	6	6	100	0,25
Trap20 x Arb4	4	2	50	0,26
Trap21 x Arb2	7	6	86	0,22
Trap21 x Arb5	9	7	78	0,29
Trap22 x Arb1	10	7	70	0,33
Trap22 x Arb6	15	5	33	0,31
Trap23 x Arb2	6	4	67	0,24
Trap23 x Arb3	10	5	50	0,20
Trap24 x Arb1	12	4	33	0,33
Trap24 x Arb5	10	5	50	0,27
Trap25 x Arb1	11	5	45	0,18
Trap25 x Arb4	8	8	100	0,29
Trap26 x Arb2	7	6	86	0,27
Trap26 x Arb4	7	3	43	0,32
Trap27 x Arb1	12	6	50	0,32
Trap27 x Arb2	10	9	90	0,20
Trap27 x Arb3	10	8	80	0,33
Trap28 x Arb2	11	9	82	0,31
Trap28 x Arb4	10	10	100	0,28
Médias	8,6	5,2		0,26

Poli= Polimorfismo; PIC= Conteúdo de informação de polimorfismo

É possível destacar que estudos com marcadores TRAP em outras culturas foram eficientes na detecção do polimorfismo: Mirajkar et al. (2017) ao utilizarem 27 combinações de marcadores TRAP em cana-de-açúcar obtiveram

133 fragmentos dos quais 82 (61,65%) foram polimórficos. Ao desenvolverem estudos, também, com cana-de-açúcar Suman et al. (2012) utilizaram 16 combinações de marcadores TRAP e conseguiram detectar alto nível de polimorfismo, com 946 fragmentos, sendo que 939 (99%) foram polimórficos. Utilizando 40 diferentes combinações de iniciadores TRAP em trigo, Barakat et al. (2013) conseguiram observar um total de 242 fragmentos sendo que desses 200 fragmentos (82, 64%) foram polimórficos. Ao estudarem 30 combinações de marcadores TRAP em arroz, Kundur et al. (2015) conseguiram detectar 703 fragmentos, dos quais 654 (93%) foram polimórficos. Da Silva et al. (2016) em um estudo com guaraná utilizando 5 combinações de iniciadores TRAP identificaram 136 fragmentos, sendo que 108 fragmentos (79%) foram polimórficos.

Allan et al. (2008) observaram baixos níveis de polimorfismo, por meio de marcadores AFLP, para mamoneira. Ao contrário desse resultado, Pecina-Quintero et al. (2013) observaram que 50% dos marcadores AFLP estudados foram polimórficos, detectando altos níveis de divergência genética (71%) para mamoneira, corroborando os resultados encontrados por Gajera et al. (2010) com marcadores RAPD e polimorfismo de 80,2%. Estes resultados devem-se, em parte, a uma seleção de iniciadores com a capacidade de amplificar fragmentos polimórficos.

A partir da avaliação conjunta para TOS e marcadores TRAP obteve-se uma variação de distância genética de 0,19 a 0,97, com média de 0,47, entre as linhagens elites estudadas. As linhagens elites mais similares geneticamente foram UFRB231 e UFRB240 (distância genética de 0,19). Vale ressaltar que as linhagens UFRB231 e UFRB240 foram provenientes dos mesmos cruzamentos (EBDA MPA 17 X Sipeal 28), mostrando alto grau de parentesco. No entanto, essas linhagens apresentam diferentes valores percentuais para teor de óleo: UFRB231 com 50,82 (grupo f) e UFRB240 com 53,17 (grupo c).

As linhagens mais dissimilares foram UFRB117 com relação as linhagens UFRB29, UFRB45, UFRB128, UFRB230 e UFRB240 (distância genética de 0,97). Importante observar que as linhagens mais distantes geneticamente foram obtidas do cruzamento entre diferentes parentais (Paraguaçu BRS188 X EBDA MPA 17, Nordeste BRS149 X EBDA MPA 17 e EBDA MPA 17 X Sipeal 28).

Estes resultados mostram que há variabilidade genética entre as linhagens elites e também alta dissimilaridade genética, fator importante para o melhoramento genético da espécie.

As linhagens UFRB117 X UFRB29, UFRB45, UFRB128, UFRB230 e UFRB240 apresentaram valores percentuais para o caractere TOS de 50,79 (grupo f), 52,00 (grupo e), 52,43 (grupo d), 53,49 (grupo c), 51,20 (grupo f) e 53,17 (grupo c), respectivamente. As médias de TOS podem ser observadas na Tabela 4. As demais linhagens ficaram distribuídas em grupos intermediários.

Goodarzi et al. (2015), ao avaliarem a divergência genética entre 12 genótipos de mamoneira, por meio do marcador dominante ISSR, obtiveram distância genética mínima de 0,20 e máxima de 0,56, resultado inferior ao encontrado nesse trabalho. Ao contrário, Kallamadi et al. (2015) observaram uma variação na distância genética de 0,47 a 0,91 entre 31 acessos de mamoneira por meio de marcadores RAPD e ISSR. Também, altos valores de distância genética foram observados por: Kanti et al. (2014), variação de 0,65 a 0,90 entre 51 acessos de mamoneira por meio de 35 marcadores SSR; Gajera et al. (2010), variação de 0,53 a 0,91 entre 22 genótipos de mamoneira com marcadores RAPD; Thatikunta et al. (2016), variação entre 0,24 a 0,83 entre 27 acessos de mamoneira com marcadores SSR.

O dendrograma mostra a formação de 3 grupos distintos: **G1**= UFRB235, UFRB237, UFRB230, UFRB223, UFRB229, UFRB232, UFRB249, UFRB176, UFRB183, UFRB205, UFRB252, UFRB67, UFRB181, UFRB118, UFRB121, UFRB129, UFRB119, UFRB128, UFRB28, UFRB209, UFRB265, UFRB5, UFRB6, UFRB256 e UFRB259; **G2**= UFRB65, UFRB144, UFRB36, UFRB250, UFRB45, UFRB55, UFRB29, UFRB43, UFRB231, UFRB240, UFRB186, UFRB195 e UFRB198; **G3**= UFRB117 e UFRB214. Deste modo, o grupo 1 representa 63% das linhagens elites, grupo 2 (33%) e grupo 3 (5%, Figura 2). Vale ressaltar que apesar da formação de apenas 3 grupos, houve valores altos de distância genética de 0,97, com média de 0,47. Também, é possível observar a formação de vários subgrupos (Figura 2).

O grupo 1 foi o mais numeroso, sendo dividido em onze subgrupos. Um total de 92% das linhagens elites do grupo 1 foram provenientes de cruzamentos envolvendo o parental EBDA MPA 17. O grupo 2 foi dividido em seis subgrupos,

sendo que 54% das linhagens elites agrupadas foram provenientes de cruzamentos entre os parentais Nordeste BRS149 X EBDA MPA 17. Já o grupo 3 teve apenas um subgrupo formado por linhagens elites provenientes de cruzamentos com o parental EBDA MPA 17.

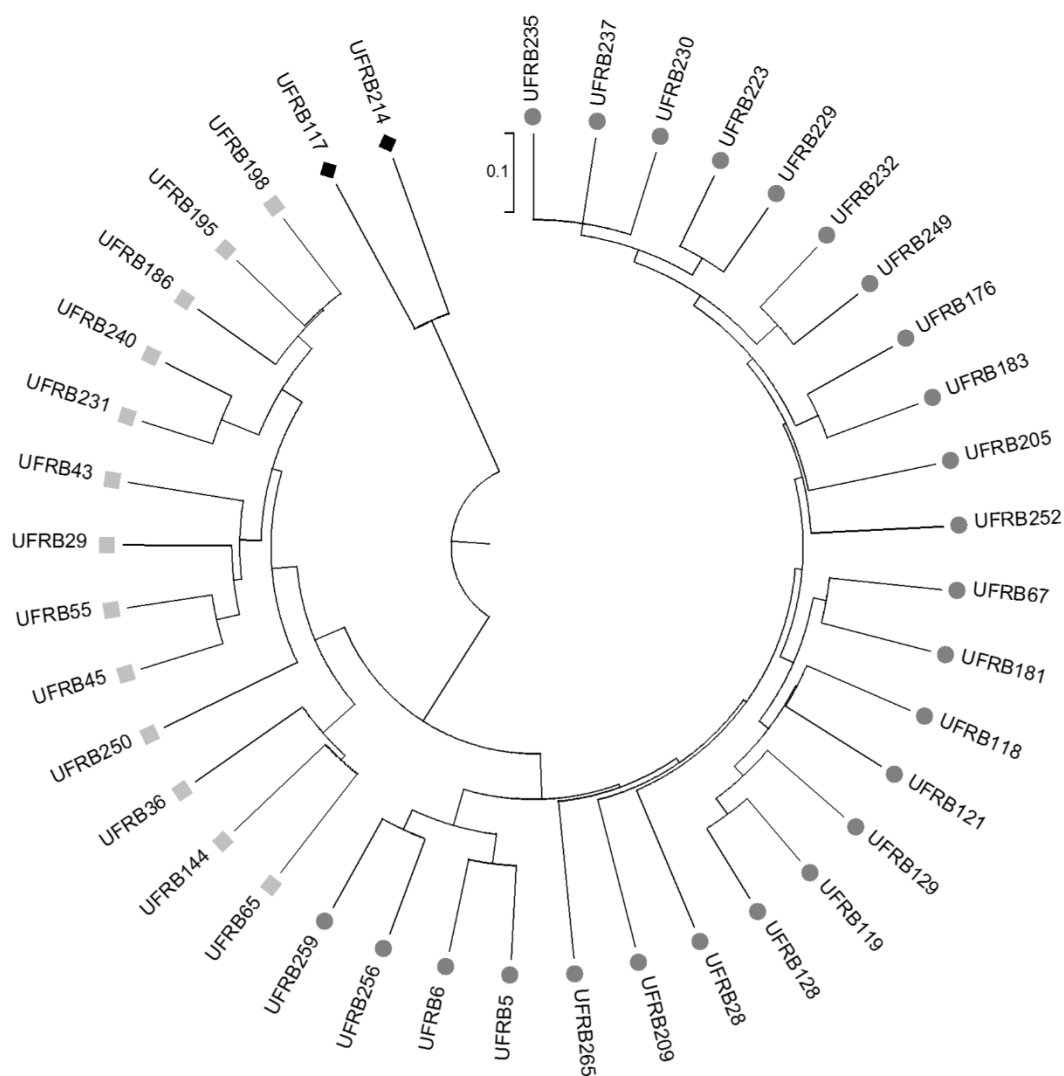


Figura 2. Dissimilaridade genética entre 40 linhagens elites do banco ativo de germoplasma - BAG de mamoneira. • grupo 1; ■ grupo 2 e ♦ grupo 3. Dendrograma provenientes de 44 combinações de marcadores TRAP utilizando-se o índice de Gower.

Estes resultados corroboram os trabalhos de Kanti et al. (2014) e Gajera et al. (2015) que obtiveram a formação de 3 grupos. Kanti et al (2014) avaliaram 51 genótipos de mamoneira por meio de 35 iniciadores SSR e Gajera et al. (2010) 22 genótipos com marcadores RAPD e ISSR. Já Goodarzi et al. (2015) chegaram a 4 grupos em 12 acessos de mamoneira por meio de marcadores ISSR e Thatikunta et al. (2016) apenas dois grupos em 27 acessos de mamoneira por meio de marcadores SSR. Neste último, o grupo 1 foi responsável pelo agrupamento de 96,3% dos acessos analisados.

É importante observar que as linhagens que apresentam maiores médias de TOS, UFRB 209, 214 e 256 (Tabela 4), na análise conjunta foram agrupadas separadamente. A UFRB 214 pertence ao grupo 3 enquanto as linhagens 209 e 256 ao grupo 1 (Figura 2), mostrando dissimilaridade genética. As linhagens UFRB 209 e UFRB 214 foram provenientes de cruzamentos com os mesmos parentais EBDA MPA 17 X Sipeal 28, enquanto a linhagem UFRB 256 foi proveniente de cruzamentos entre os parentais Mirante 10 X Sipeal 28. Essa observação se estende às demais linhagens que apresentaram valores iguais de TOS, mas ficaram separadas na análise conjunta (Figura 2). Este resultado é favorável ao programa genético da mamoneira, pois essas linhagens apesar de apresentarem médias de TOS semelhantes, são divergentes quando em avaliação conjunta aos marcadores moleculares e quanto sua constituição genética, podendo futuramente serem lançadas como cultivares distintas.

A grande maioria das pesquisas, em geral, utiliza-se de descritores qualitativos e quantitativos separadamente, uma vez que estes últimos são analisados apenas por estatística descritiva. Isso pode segmentar as inferências e conclusões sobre a divergência genética, limitando muitas vezes, sua utilização posterior, por exemplo, em programas de melhoramento genético. A análise conjunta de dados de natureza qualitativa e quantitativa através do algoritmo de Gower, pode propiciar melhor compreensão das características consideradas e, principalmente, conclusões mais criteriosas e eficazes do ponto de vista estatístico sobre o relacionamento genético.

CONCLUSÕES

Os marcadores TRAP, recém desenvolvidos com base para o teor de óleo na semente, mostram-se polimórficos e apropriados para estudos de variabilidade genética em mamoneira;

A análise conjunta utilizando as médias de TOS e marcadores TRAP é eficiente na detecção de variabilidade genética entre as linhagens elites;

Existe divergência genética entre as linhagens elites com potencial de serem aproveitadas em programa de melhoramento genético da mamoneira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, G.; WILLIAMS, A.; RABINOWICZ, P.D.; CHAN, A.P.; RAVEL, J.; KEIM, P. Worldwide genotyping of castor bean germplasm (*Ricinus communis* L.) using AFLPs and SSRs. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, p.365-378, 2008.

BAHIA, H. F.; SILVA, S. A.; FERNANDEZ, L. G.; LEDO, C. A. S. Divergência genética entre cinco cultivares de mamoneira. **Pesquisa Pecuária Brasileira**, v.43, n.3, p. 357-362, 2008.

BARAKAT, M. N.; AI-DOSS, A. A.; ELSHAFEI, A. A.; GHAZY, A. I.; MOUSTAFA, K. Assessment of genetic diversity among wheat doubled haploid plants using TRAP markers and morpho-agronomic traits. **Australian Journal of Crop Science**, v. 7, n.1, p.104 -111, 2013.

BELTRÃO, N. E. de M. **Informações sobre o Biodiesel, em especial feito com o óleo de mamona**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, Dezembro 2003, 3p. (Comunicado Técnico 177).

CARMO, C. D.; SANTOS, D. B.; ALVES, L. B.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Development of TRAP (*Target Region Amplification Polymorphism*) as New Tool for Molecular Genetic Analysis in Cassava. **Plant Molecular Biology Reporter**, v, p.1-14, 2015.

CAVALCANTI, M. L. F.; FERNANDES, P. D.; GHEYI, H. R.; BARROS JÚNIOR, G.; SOARES, F. A. L.; SIQUEIRA, E. da C. Índices ecofisiológicos da mamoneira sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, p.66-70, 2005.

CÉSAR, A. D.; BATALHA, M. O. Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality. **Energy Policy**, v. 38, p. 4031-4039, 2010.

CHARRAD, M.; GHAZZALI, N.; BOITEAU, V.; NIKNAFS, A. (2011) NbClust: An examination of indices for determining the number of clusters. R package version 1.4. Disponível em: <http://cran.r-project.org/web/packages/NbClust/index.html>.

CRESTE, S.; SANSOLI, D. M.; TARDIANI, A. C. S.; SILVA, D. N.; GONÇALVES, F. K.; FAVERO, T. M.; MEDEIROS, C. N. F.; FESTUCCI, C. S.; CARLINI-GARCIA, L. A.; LANDELL, M. G. A.; PINTO, L. R. Comparison of AFLP, TRAP and SSRs in the estimation of genetic relationships in sugarcane. **Sugar Tech**, v. 12, n. 2, p.150-154, 2010.

CROSSA, J.; FRANCO, J. Statistical methods for classifying genotypes. **Euphytica**, v. 137, p. 19-37, 2004.

DA SILVA, E. F.; DE SOUZA, S. B.; DA SILVA, G. F.; SOUZA, N. R.; NASCIMENTO FILHO, F. J. HANADA, R. E. TRAP and SRAP markers to find genetic variability in complex polyploid *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Plant Gene**, v. 6, p. 43-47, 2016.

DOMINGOS, C. A.; PEREIRA, D. D.; CARDOSO, L. S.; TEODORO, R. A.; CASTRO, V. A. Biodiesel – Proposta de um Combustível Alternativo. **Revista Brasileira de Gestão e Engenharia**, v. 5, p. 134-178, 2012.

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

FREIRE, M. M.; SOUSA, R. L.; SALDANHA, L. Avaliação da Qualidade do Óleo de Mamona de Diferentes Genótipos. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA. **Anais**. Campina Grande, 2006.

FREITAS, S. M. de.; FREDO, C.E. Biodiesel a base de óleo de mamona: algumas considerações. **Revista Informações Econômicas**, v.35, n. 1, p. 37-42, 2005.

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.

GONÇALVES, L. S. A.; RODRIGUES, R.; AMARAL JUNIOR, A. T.; KARASAWA, M.; SUDRÉ, C. P. Comparison of multivariate statistical algorithms to cluster tomato heirloom accessions. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1289-1297, 2008.

GOODARZI, F.; DARVISHZADEH, R.; HASSANI, A. Genetic analysis of castor (*Ricinus communis* L.) using ISSR markers. **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 3, n. 1, p. 18-34, 2015.

GOWER, J.C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v. 27, n. 4, p. 857-874, 1971.

HU, J.; VICK, B.A. Target amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.21, p.289-294, 2003.

IMASUEN, A.; INEGBEDION, F.; ERHABOR, C.; OSUIDE, M. Isolation and characterization of Castor Seed oil and its utilization potential in the production of polyurethane foam. **Walailak Journal of Science and Technology**, v. 11, n.5, p. 421-427, 2014.

KALLAMADI, P. R.; NADIGATLA, V. P. R. G. R.; MULPURI, S. Molecular diversity in castor (*Ricinus communis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 271-281, 2015.

KANTI, M.; ANJANI, K.; VENKATRAMYA, K. Molecular Diversity in Castor Germplasm Collection Originated from North-Eastern Hill Province of India. **International Journal Research for Scientific Innovations**, v.1, p. 1-6, 2014.

KUNDUR, P. J.; PATIL, P. G.; HARISH, B. G.; RAMESH, C. K.; SHAHIDHAR, H. E. Molecular characterization of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes using *target region amplification polymorphism* (TRAP) markers in relation to grain iron content. **International Journal of Agronomy and Agricultural Research**, v. 7, n. 1, p. 125-133, 2015.

LAURENTIN, H. Data analysis for molecular Characterization of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 56, p. 277-292, 2009.

MACHADO, C. de F.; SOUZA, F. V. D.; LEDO, C. A. da S.; CABRAL, J. R. S. Cluster analysis using quantitative, qualitative and molecular traits for the study of the genetic diversity in pineapple genotypes. **Acta Horticulturae**, v. 902, p. 159-162, 2011.

MACHADO, E. L.; SILVA, S. A.; SANTOS, A. S.; BASTOS, L. A.; PESTANA, C. N.; SANTOS, K. S.; FERREIRA, C. F.; DIAMANTINO, M. S. A. S. Dissimilaridade

genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.3, p.342-345, 2013.

MACHADO, C. F.; JESUS, F. N.; LEDO, C. A S. Divergência genética de acessos de maracujá utilizando descritores quantitativos e qualitativos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 442-449, 2015.

MASON, N. W. H.; MOUILLOT, D.; LEE, W. G.; WILSON, J. B. Functional richness, functional evenness and functional divergence: the primary components of functional diversity. **Oikos**, v.111, p.112-118, 2005.

MEENA, K.; ANJANI, K.; VENKATRAMYA K. Molecular Diversity in Castor Germplasm Collection Originated from North-Eastern Hill Province of India. **International Journal of Research and Scientific Innovation**, v 1, n. 6, p. 1-6, 2014.

MIRAJKAR, S. J.; RAI, A. N.; VAIDYA, E. R.; MOHARIL, M. P.; DUDHARE, M. S.; SUPRASANNA, P. TRAP and SRAP molecular marker based profiling of radiation induced mutants of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Plant Gene**, v. 9, p. 64 -70, 2017.

MOURA, M. C.C. L., GONÇALVES, L. S. A., SUDRÉ, C. P., RODRIGUES, R., AMARAL JÚNIOR, A. T., PEREIRA, T. N. S. Algoritmo de Gower na estimativa da divergência genética em germoplasma de pimenta. **Horticultura Brasileira**, n 2, v.28, 2010.

NOBRE, R. G.; LIMA, G. S.; GHEYI, H. R.; MEDEIROS, E. P.; SOARES, L. A. A.; ALVES, A. N. Teor de óleo e produtividade da mamoneira de acordo com a adubação nitrogenada e irrigação com água salina. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.47, n.7, p.991-999, 2012.

NOGUEIRA, A. M.; FERREIRA, M. F. S.; GUILHEN, J. H. S.; FERREIRA, A. Multivariate analysis in a genetic divergence study of *Psidium guajava*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 10657-10668, 2014.

OMARI, A.; MGANI, Q. A.; MUBOFU, E. B. Fatty Acid Profile and Physico-Chemical Parameters of Castor Oils in Tanzania. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 154-163, 2015.

OLIVEIRA, R. S.; SILVA, S. A.; BRASILEIRO, B. P.; MEDEIROS, E. P.; SANTOS, E. V. A. Genetic divergence on castor bean using the ward-mlm strategy. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 44, p. 564-570, 2013.

PECINA-QUINTERO, V.; ANAYA-LÓPEZ, J. L.; NÚÑEZ-COLÍN, C. A.; ZAMARRIPA-COLMENERO, A.; MONTES-GARCÍA, N.; SOLÍS-BONILLA, J. L.; AGUILAR-RANGEL, M. R. Assessing the genetic diversity of castor bean from Chiapas, México using SSR and AFLP markers. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p.134-143, 2013.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.

PESTANA-CALDAS, C. N.; SILVA, S. A.; MACHADO, E. L.; de Souza, D. R.; CERQUEIRA-PEREIRA, E. C.; SILVA, M. S. Genetic divergence through joint analysis of morphoagronomic and molecular characters in accessions of *Jatropha curcas*. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p.1-11, 2016.

POCZAI, P.; VARGA, I.; LAOS, M.; CSEH, A.; BELL, N.; VALKONEN, J.P.; HYVONEN, J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. **Plant Methods**, v. 9, n. 6, p. 1-31, 2013.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>, 2017.

RAMOS, H. C. C.; PEREIRA, M. G.; GONÇALVES, L. S. A.; BERILLI, A. P. C. G.; PINTO, F. O.; RIBEIRO, E. H. Multivariate analysis to determine the genetic distance among backcross papaya (*Carica papaya*) progenies. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 1280-1295, 2012.

ROCHA, R. J.; LIMA, J. E. S.; GOMES, S. R.; IHA, K.; ROCCO, J. A. F. F. Síntese de poliuretanos modificados por óleo de mamona empregados em materiais energéticos. **Química Nova**, v. 36, n. 6, p. 793-799, 2013.

SALIHU, B. Z.; GANA, A. K.; APUYOR, B. O. Castor Oil Plant (*Ricinus communis* L.): Botany, Ecology and Uses. **International Journal of Science and Research**, v.3, n. 5, p.1333-1341, 2014.

SEVERINO, L. S.; FERREIRA, G. B.; MORAES, C. R. de A.; GONDIM, T. M. de S.; CARDOSO, G. D.; VIRIATO, J. R.; BELTRÃO, N. E. de M. Produtividade e crescimento da mamoneira em resposta à adubação orgânica e mineral. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.879-882, 2006.

SILVA, A. R.; SILVA, S. A.; SANTOS, L. A.; SOUZA, D. R.; ARAUJO, G. M.; MOREIRA, R. F. C. Genetic divergence among castor bean lines and parental strains using ward's method based on morpho-agronomic descriptors. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 39, n. 3, p. 307-313, 2017.

SIMÕES, K. S.; SILVA, S. A.; MACHADO, E. L.; BRASILEIRO, H. S. Development of TRAP primers for *Ricinus communis* L. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-13, 2017a.

SIMÕES, K. S.; SILVA, S. A.; MACHADO, E. L.; SILVA, M. S. Genetic divergence in elite castor bean lineages based on TRAP markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-12, 2017b.

STATISTICA. **Statistica for Windows v. 6.0: Computer Program Manual**. Editora StatSoft Inc. Tulsa, UK (CD-Rom), 2002.

SOUZA, G. A. de.; CARVALHO, M. R. O.; MARTINS, E. R.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.7, p.843-49, 2008.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.3, p.495-503, 2015.

SUMAN, A.; ALI, K.; ARRO, J.; PARCO, A. S.; KIMBERG, C. A.; BAISAKH, N. Molecular Diversity Among Members of the Saccharum Complex Assessed Using TRAP Markers Based on Lignin-Related Genes. **Bioenergy Research**, v.5, p.197-205, 2012.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p. 2731-2739, 2011.

THATIKUNTA, R.; SANKAR, A. S.; SREELAKSHMI, J.; PALLE, G.; LEELA, C.; RANI, C. V. D.; SHANKAR, V. G; LAVANYA, .; REDY, P. N.; DUDHE, M. Y. Utilization of in silico EST–SSR markers for diversity studies in castor (*Ricinus communis* L.). **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 22, n.4, p.535-545, 2016.

TOMAR, R. S.; PARAKHIA, M. V.; KAVANI, R. H.; DOBARIYA, K. L. THKKAR, J. R.; RATHOD, V. M.; DHINGANI, R. M.; GOLAKIYA, B. A. Characterization of castor (*Ricinus communis* L.) genotypes using different markers. **Research Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 2, p. 6 -13, 2014.

TORRES, E. A.; CHIRINOS, H. D.; ALVES, C. T.; SANTOS, D. C.; CAMELIER, L. A.. Biodiesel: o combustível para o novo século. **Bahia Análise e Dados**, v. 16, n. 1, p. 89-95, 2006.

VIVODÍK, M.; BALÁŽOVÁ, Z.; GÁLOVÁ, Z.; HLOZÁKOVÁ, T. K. Evaluation of molecular diversity of new castor lines (*Ricinus communis* L.) using random amplified polymorphic DNA markers. **Horticultural Biotechnology Research**, v. 1, n.1, p. 1-4, 2015.

YUSUF, A. K.; MAMA, P. P.; AHMD, A. S AGUNW, U. Extraction and characterization of castor seed oil from wild *Ricinus communis* Linn. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 4, n.5, p. 1392 - 1404, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mamoneira é uma planta que possui alta diversidade genética e tem como principal produto comercial o óleo, que é extraído diretamente de suas sementes. O óleo da mamona possui qualidades especiais e pode ser utilizado em diversos procedimentos indústrias, além de ser empregado na produção de Biodiesel, como alternativa para produção de combustível renovável e por ser uma planta cultivada especialmente por agricultores familiares no semiárido nordestino. Assim, torna-se indispensável o desenvolvimento de novas cultivares, com maiores teores de óleo e ajustados às condições do Recôncavo e Semiárido Baiano. Isto possibilitará também a consolidação da cultura da mamona, nessas regiões de forma a garantir a maior valorização dessa oleaginosa no estado da Bahia.

A caracterização molecular otimiza as atividades de melhoramento, principalmente quando se utilizam marcadores funcionais ou com polimorfismo baseado em regiões gênicas. A praticidade no desenvolvimento dos iniciadores, os níveis de polimorfismo observados, tornam a técnica TRAP uma poderosa ferramenta para análises moleculares em mamoneira. Além disso, o polimorfismo dos marcadores TRAP foi considerável com fácil implementação e com baixo custo em comparação a outros tipos de marcadores.

Os marcadores desenvolvidos e otimizados, nesse trabalho, são os primeiros marcadores funcionais TRAP desenvolvidos para mamoneira. Esses marcadores constituem mais uma importante ferramenta em estudos de variabilidade genética, genética de populações e nas mais diversas etapas de programas de melhoramento genético da mamoneira. Além de todas as vantagens mencionadas, os marcadores TRAP permitem a detecção de polimorfismo em regiões próximas a genes de interesse em mamoneira, o que o torna vantajoso em estudos para identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) ou em estudos de mapeamento associativo, no sentido de acelerar o processo de seleção assistida por marcadores (SAM).

Os marcadores moleculares baseados em combinações TRAP foram eficientes na detecção da dissimilaridade genética, sendo eficientes para estudos de variabilidade genética em mamoneira e constituem-se em mais uma

ferramenta importante para estudos genéticos na espécie, representando um acréscimo significativo no número de marcadores moleculares para a mamoneira.

Os marcadores TRAP recém-desenvolvidos com base para o teor de óleo fornece uma ferramenta eficaz para o mapeamento genético. A análise conjunta dos marcadores moleculares TRAP com o caráter teor de óleo na semente foi eficiente para avaliar a diversidade genética entre linhagens de mamoneira. E, por se tratarem de marcadores funcionais, envolvidos na biossíntese de óleo e ricina, são promissores para estudos de associação entre marcador e gene candidato.