



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-graduação em Genética e Bioquímica

Propagação *in vitro* e caracterização molecular de
cultivares de *Ricinus communis* L.

Ana Carolina Cordeiro Dias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-orientadora: Dr^a. Luciana Nogueira Londe

Uberlândia- MG
2010



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-graduação em Genética e Bioquímica

Propagação *in vitro* e caracterização molecular de cultivares de *Ricinus communis* L.

Ana Carolina Cordeiro Dias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-orientadora: Dr^a. Luciana Nogueira Londe

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica, área de concentração Genética.

**Uberlândia- MG
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- D541p Dias, Ana Carolina Cordeiro, 1985-
 Propagação in vitro e caracterização molecular de cultivares de
 Ricinus communis L. [manuscrito] / Ana Carolina Cordeiro Dias. -
 2010.
 92 f. : il.
- Orientadora: Ana Maria Bonetti.
 Co-orientador: Luciana Nogueira Londe.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
1. Mamona - Propagação in vitro - Teses. 2. Mamona como com-
 bustível - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Londe, Luciana Nogueira,
 1979- . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
 Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 633.853:631.53

Palavras-chave: mamona, micropropagação, microssatélites.



**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-graduação em Genética e Bioquímica**

Propagação *in vitro* e caracterização molecular de cultivares de *Ricinus communis* L.

Ana Carolina Cordeiro Dias

Comissão examinadora

Presidente: Dr. Ana Maria Bonetti (Orientadora)

Examinadores: Dr. Cícero Donizete Pereira

Dr. José Magno Queiroz Luz

Data da Defesa: 30/07/2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

(Ana Maria Bonetti)

Ofereço

A Deus

*Agradecendo a proteção contínua,
Que me conduziu sempre!*

Dedico

*Aos meus pais, Marina e Zílmara,
Ao meu irmão Emmanuel e meu marido Wellington
Com carinho e amor !*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Marina e Zílmara, por tudo o que sempre fizeram, pela educação, amor incondicional.

Ao meu irmão Emmanuel, por estar sempre ao meu lado, me apoiando.

Ao meu marido, Wellington, pelo amor e incentivo constantes.

Aos meus familiares, que de longe ou perto, sempre me estimularam a continuar os estudos.

À Dr. Ana Maria Bonetti, pela orientação nesse trabalho e pela confiança durante a realização do mesmo.

A Dr. Luciana Londe, pela co-orientação, apoio constante e amizade.

Aos professores Dr. Carlos Ueira e Dr. Danival Freitas pelo auxílio concedido sempre que necessário.

Aos professores doutores membros da banca examinadora, pela leitura do trabalho e pelas considerações realizadas.

Aos amigos Naiara, Renato, Mariana, Tininha, Fernando, Bel, João Felipe e Dênis, pelos momentos divertidos e pela ajuda concedida.

Aos colegas de Pós-Graduação pela bela convivência .

A todos os meus amigos, em especial a Adele, Cyntia, Fernanda, Millena, Polly e Tati que mesmos distantes se fazem presentes.

A Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em especial ao Instituto de Genética e Bioquímica, pela oportunidade de uso das suas instalações e laboratórios para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica pela ajuda prestada.

A Empresa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) por ceder o material vegetal utilizado em parte do experimento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por viabilizar a realização deste trabalho com a concessão de bolsa de estudo.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

ÍNDICE

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Lista de figuras	2
Capítulo I	2
Capítulo II	3
Capítulo III	5
Lista de tabelas	6
Capítulo II	6
Capítulo III	7
Apresentação	1
 Capítulo I – Fundamentação Teórica	
<i>Ricinus communis L.</i>	10
Taxonomia e origem	10
Características morfológicas e fisiológicas	11
Importância econômica	15
Biodiesel e meio ambiente	16
Melhoramento genético de <i>Ricinus communis L.</i>	18
Biotecnologia no melhoramento vegetal	20
Cultura de tecidos	20
Reguladores de crescimento	21
Marcadores moleculares	22
Marcadores moleculares na proteção de cultivares	23

Marcadores microssatélites	24
Referências bibliográficas	26
Capítulo II – Propagação <i>in vitro</i> de <i>Ricinus communis</i> L.	
Resumo	38
Abstract	39
Introdução	40
Material e métodos	44
Plantas matrizes de <i>Ricinus communis</i>	44
Preparação dos explantes de <i>Ricinus communis</i>	45
Assepsia dos explantes (frutos e gemas)	46
Isolamento e cultivo dos explantes	47
Diferentes concentrações de ANA e BAP na germinação de <i>Ricinus communis</i>	49
Diferentes concentrações de ANA e BAP na propagação de <i>Ricinus communis</i>	50
Análise estatística	51
Resultados e discussão	51
Efeito de diferentes concentrações de ANA e BAP na germinação de <i>Ricinus communis</i>	51
Efeito de diferentes concentrações de ANA e BAP na propagação de <i>Ricinus communis</i>	56
Referências Bibliográficas	68

Capítulo III – Marcadores microssatélites em *Ricinus communis*

Resumo	77
Abstract	78
Introdução	79
Material e métodos	82
Material vegetal	82
Extração e quantificação de DNA	83
Condições de amplificação dos locos microssatélites	85
Análise dos dados	87
<i>Ricinus communis</i>	49
Resultados e discussão	87
Conclusão geral	92
Referências Bibliográficas	93

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: *Ricinus communis* L. (A) Fruto (seta preta) e folhas (estrela) de coloração 10 vermelha. (B) Fruto (seta preta) e folhas (estrela) de coloração verde. Fonte: Dias (2010).

Figura 2: Densidade de acúleos em frutos da mamoneira. A) inerte; B) escassa; C) 11 média; D) alta. Fonte: Silva (2008).

Figura 3: Padrão de sementes de mamoneira. A) cor única; B) pontuada; C) pintada; D) 11 rajada. Fonte: Silva (2008).

Figura 4: (A) Plântula da mamoneira (seta) logo após a germinação. (B) Plântula da 12 mamoneira com início das folhas definitivas (setas). (C) Planta da mamoneira no estágio de quatro folhas, além dos cotiledonares (seta). Fonte: Beltrão (2004).

CAPÍTULO II

Figura 1: Vista da área com coordenadas geográficas, latitude 18,8797° sul e longitude 42 48,229° oeste, em Uberlândia – MG, onde foram coletados os explantes.

Figura 2: Esquema ilustrativo da mamoneira com os explantes, fruto e meristema apical 43 em evidência. A gema e o fruto encontram-se marcados (círculo). Fonte: Weiss (2008) adaptado.

Figura 3: Esquema da semente da mamoneira. A) Vista externa. B) Corte longitudinal de 46 perfil. C) Corte longitudinal frontal. O tegumento encontra-se marcado (círculo). Morandini (2008), adaptado.

Figura 4: (A) Plântula da mamoneira (seta) logo após a germinação. (B) Plântula da 49 mamoneira com início das folhas definitivas (setas). (C) Planta da mamoneira no estágio de quatro folhas, além dos cotiledonares (seta). Fonte: Beltrão (2004).

Figura 5: A) Experimento 1 - Semente de mamona, sem o tegumento, inoculada *in vitro*. 49 Seta indica hipocótilo e estrela indica radícula. B) Semente de mamona, sem o tegumento, inoculada *in vitro*. UFU. Uberlândia/MG. 2010.

Figura 6: Experimento 2 - Plântula de mamona germinada à partir de semente sem 51 tegumento. Setas indicam presença de oxidação nas extremidades da radícula e folha. UFU. Uberlândia/MG. 2010.

Figura 7: Experimento 3 – Brotação obtida sem formação de calos. Seta indica brotação. 54

UFU. Uberlândia/MG. 2010.

Figura 8: Regressão para o número médio de brotações, aos 10 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. 59
UFU - Uberlândia, MG – 2010.

Figura 9: Regressão para o número médio de brotações, aos 30 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. 59
UFU - Uberlândia, MG – 2010.

Figura 10: Experimento 4 - Brotações aos 10, 20 e 30 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. UFU - 61
Uberlândia, MG – 2010.

Figura 11: Regressão para o número médio de calos, aos 10 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. 63
UFU - Uberlândia, MG – 2010.

Figura 12: (A) Calo formado aos 20 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio 64
MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. B) Organogênese indireta, aos 20 dias, em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. A seta indica brotos formado. C) Organogênese indireta, aos 30 dias, em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. A seta indica brotos formado. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

CAPÍTULO III

Figura 1: Fotos das cultivares, da esquerda para direita, BRS 149 – Nordestina, BRS 80
Energia e Guarani. Fonte: www.embrapa.br.

Figura 2: DNA de *Ricinus communis* (seta). Gel de agarose 1%. UFU - Uberlândia, MG – 82
2010.

Figura 3: Produtos de PCR para os primers microssatélites RCo02 (230–240 pb), RCo08 85
(280–288 pb) e RCo26 (260–274pb) para as cultivares (1) BRS Energia, (2) Guarani, (3) BRS Nordestina, (4) branco e (M) marcador molecular. Gel de agarose 1%. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

Figura 4: Produtos de PCR para os primers microssatélites RCo02, RCo08 e RCo26 para 86
as cultivares BRS Energia (1), (2) Guarani, (3) BRS Nordestina e M (marcador molecular
de 50 pb). Em destaque padrão de bandas amplificadas dos primers microssatélites. Gel
de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela I: Composição do meio de cultura: MURASHIGE ; SKOOG.	46
Tabela II: Tratamentos com a combinação de fitorreguladores ANA e BAP em mgL^{-1} .	48
Tabela III: Coeficiente de variação para os dados brotação e calo, aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento dos explantes. UFU - Uberlândia, MG – 2010.	56
Tabela IV: Análise de variância para brotações aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Ricinus communis</i> sob a ação de ANA e BAP em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2010.	57
Tabela V: Análise de variância para calos aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Ricinus communis</i> sobre a ação de ANA e BAP em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2010.	62

CAPÍTULO III

Tabela I: Primers utilizados na análise de microssatélites em <i>Ricinus communis</i> L. baseado em (Bajay, 2009). UFU, Uberlândia - MG, 2010.	83
Tabela II: Testes de amplificação com diferentes temperaturas ($^{\circ}\text{C}$) e quantidade de DNA (mg). UFU, Uberlândia - MG, 2010.	84
Tabela III: Coeficiente de variação para os dados brotação e calo, aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento dos explantes. UFU - Uberlândia, MG – 2010.	56
Tabela IV: Análise de variância para brotações aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Ricinus communis</i> sob a ação de ANA e BAP em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2010.	57
Tabela V: Análise de variância para calos aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>Ricinus communis</i> sobre a ação de ANA e BAP em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2010.	62

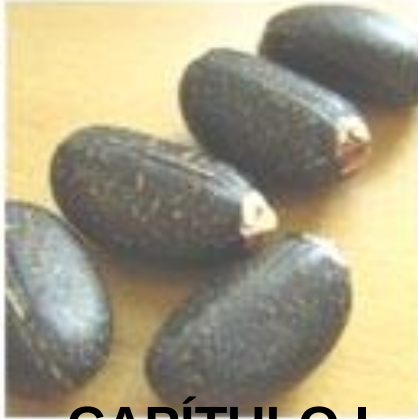
APRESENTAÇÃO

Diante da elevada demanda energética mundial, a busca por fontes combustíveis renováveis tem aumentado. Entre várias culturas com potencial para extração, a mamoneira *Ricinus communis* L., vem se destacando pelo fornecimento de matéria prima para a extração de óleo e obtenção de biodiesel, além do uso de seus derivados em vários setores da indústria. Os programas de melhoramento genético vegetal visam o desenvolvimento de novas variedades produtivas, atuando também na coleta, preservação e manejo de germoplasma, além da produção de sementes.

A cultura de tecidos vegetais tem várias aplicações práticas utilizadas amplamente na agricultura. Dentre elas podem ser destacadas a clonagem de vegetais, o melhoramento genético e a produção de mudas saudáveis. Estudos *in vitro* que permitam a análise de *Ricinus communis* L. em diferentes concentrações de hormônios vegetais podem embasar o aproveitamento dessa planta como produtora de óleo combustível.

O conhecimento da diversidade genética e a relação entre cultivares melhoradas são condições para o melhoramento das culturas. Marcadores microssatélites podem ser usados para diferenciar indivíduos geneticamente próximos, gerar bancos de dados de referência e ser apoio na proteção e multiplicação de cultivares.

Essa dissertação está dividida em três Capítulos: no **Capítulo I** é apresentado um embasamento teórico, com breve revisão sobre o tema desenvolvido; o **Capítulo II** apresenta a padronização para o cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* L. e o **Capítulo III** mostra os resultados da análise de microssatélites para a identificação de cultivares de *Ricinus communis* L.



CAPÍTULO I



Fundamentação Teórica



1. *Ricinus communis* L.

1.1. Taxonomia, origem e descrição

Ricinus communis L., popularmente conhecida como mamoneira, pertence taxonomicamente, à Divisão Magnoliophyta; Classe Magnoliopsida; Ordem Euphoriales Lendley; Família Euphorbiaceae Jussieu; Subfamília Euphorbioideae (=Crotonideae) Pax; Tribo Crotonae Pax; Gênero: *Ricinus* L (Cronquist, 1968). Segundo a classificação do *Angiosperma Phylogeny Group*-APG II (2003), a mamoneira pertence à subfamília *Acalyphoideae*, tribo *Acalypheae* e subtribo *Ricinae*.

Há divergência nos sistemas de classificação, quanto às subespécies e variedades, Bayma (1958), sugeriu que o gênero seria composto por sete variedades: (1) *R. communis* var. *communis*, (2) *R. communis* var. *sp.*, (3) *R. communis* var. *viridis*, (4) *R. communis* var. *inermis*, (5) *R. communis* var. *zanzibarensis*, (6), *R. communis* var. *sanguineus* e (7) *R. communis* var. *minor*. Popova ; Moshkin (1986) descreveram seis subespécies do gênero: (1) *R. communis* ssp. *zanzibarinus* G. Pop., (2) *R. communis* ssp. *communis*, (3) *R. communis* ssp. *indicus* G. Pop. et V. Moshk., (4) *R. communis* ssp. *ruderalis* G. Pop. et V. Moshk., (5) *R. communis* ssp. *sinencis* G. Pop. et V. Moshk., (6) *R. communis* ssp. *persicus* G. Pop., além de 25 variedades botânicas. Mais recentemente, Savy Filho (1999) reconheceu a existência de apenas quatro subespécies: (1) *R. communis* var. *zanzibarensis*, (2) *R. communis* var. *africanus*, (3) *R. communis* var. *sinencis* e (4) *R. communis* var. *persicus*, com 25 variedades botânicas.

Para Buzzetti (1999), a espécie teve origem no continente asiático, mas para Moshkin (1986), a mamoneira é originária da Etiópia e do leste da África, existindo centros secundários de diversidade. Sementes dessa espécie foram encontradas em urnas funerárias no antigo Egito, datando de mais de 4.000 anos, evidenciando sua relevância na antigüidade onde, provavelmente, lhe eram atribuídas propriedades medicinais. A introdução desta espécie no Brasil se deu durante a colonização portuguesa, por ocasião da vinda dos escravos africanos (BELTRÃO et al.2002; RODRIGUES et al.2002) com a finalidade de utilizar seu óleo na iluminação e lubrificação de eixos de carroças (CHIERICE; CLARO NETO, 2001).

1.2. Características morfológicas e fisiológicas

No Brasil, a mamoneira (*Ricinus communis* L.) (Figura 1) é encontrada crescendo espontaneamente em várias regiões, apresentando grande variação no hábito de crescimento, com diversas colorações do caule, folhas e racemos, podendo ou não possuir cera no caule e pecíolo. O fruto é uma cápsula lisa ou com estruturas semelhantes a espinhos (acúleos), deiscente, semideiscente ou indeiscente, de coloração verde ou vermelha (Figuras 1 e 2). As sementes (Figura 3) são de diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração (BELTRÃO et al.2001).



Figura 1: *Ricinus communis* L. (A) Fruto (seta preta) e folhas (estrela) de coloração vermelha. (B) Fruto (seta preta) e folhas (estrela) de coloração verde. Fonte: Dias (2010).



Figura 2: Densidade de acúleos em frutos da mamoneira. A) inerte; B) escassa; C) média; D) alta. Fonte: Silva (2008).

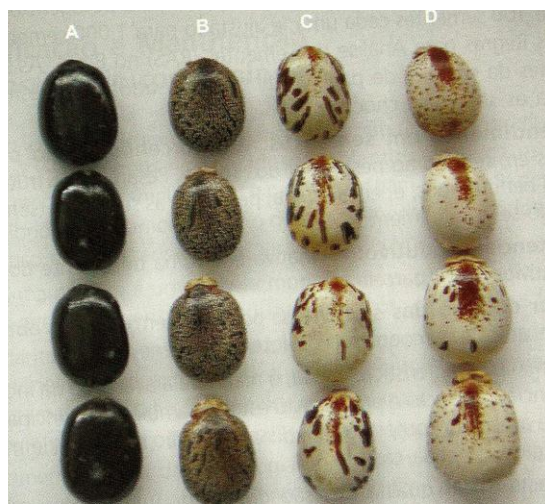


Figura 3: Padrão de sementes de mamoneira. A) cor única; B) pontuada; C) pintada; D) rajada. Fonte: Silva (2008).



Figura 4: (A) Plântula da mamoneira (seta) logo após a germinação. (B) Plântula da mamoneira com início das folhas definitivas (setas). (C) Planta da mamoneira no estágio de quatro folhas, além dos cotilédones (seta). Fonte: Beltrão (2004).

A mamoneira é uma planta de elevada complexidade morfofisiológica, apresentando crescimento dicotômico, do tipo indeterminado, além de alomérico e heregônico, com grandes variações no porte, no ciclo, sexualidade e outros aspectos e com desenvolvimento do tipo heteroblástico, com a forma juvenil diferente da forma adulta (Figura 4) (STREET; OPIK, 1974; WEISS, 1983; BELTRÃO et al.2001)

O caule é cilíndrico, fistuloso e espesso com aspecto nodoso, podendo alcançar em alguns casos, até 30 cm de diâmetro, na base. Apresenta variações na cor, presença de cera e rugosidade; os nós são bem definidos, com cicatrizes foliares proeminentes (BELTRÃO et al.2001; RODRIGUES et

al.2002). A haste principal cresce verticalmente sem ramificações, até o surgimento da primeira inflorescência. Os ramos laterais se desenvolvem a partir da axila da última folha, logo abaixo do racemo primário (TÁVORA, 1982; BELTRÃO et al.2001). Havendo disponibilidade de água e nutrientes a planta cresce continuamente numa disposição simpodial, que lhe é característica (BELTRÃO, 2003).

As folhas são alternas, apesar de as primeiras, logo acima do nó cotiledonar serem opostas. Medem geralmente de 15 a 30 cm, mas podem alcançar 40 ou até 60 centímetros no maior comprimento, possuindo de 5 a 11 lóbulos e limbo foliar arredondado com margens denteadas. Os pecíolos são longos e fistulosos com 20 a 50 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro. A coloração tanto da folha como do pecíolo acompanha, em geral a do caule, variando do verde ao roxo ou vermelho escuro com nervuras em tom mais claro (WEISS, 1971; TÁVORA, 1982; BELTRÃO et al.2001).

O sistema radicular é pivotante e fistuloso podendo atingir até 3 metros de profundidade, se não houver impedimentos físicos; as raízes laterais são bem desenvolvidas e situam-se a poucos centímetros da superfície do solo. O ambiente tem grande influência no crescimento do sistema radicular. Em condições de pouca disponibilidade hídrica ele se desenvolve a grandes profundidades, com as raízes laterais explorando um grande volume de solo. Sob irrigação ou em condições de elevada disponibilidade de umidade, o sistema radicular é menos desenvolvido e mais compacto (TÁVORA, 1982).

Apresenta metabolismo fotossintético do tipo C3, elevadas taxas de respiração e a inflorescência peculiar apresenta flores masculinas na parte inferior e femininas na parte superior, com polinização do tipo anemófila (WEISS, 1983; MOSHKIN, 1986; AZEVEDO et al.1997).

1.3. Importância econômica

A mamoneira tem aproveitamento integral. As folhas servem de alimento para o bicho-da-seda e, misturadas à forragem, aumentam a secreção láctea das vacas (EVANGELISTA et al.2008). A haste, além da celulose própria para a fabricação de papel, fornece matéria-prima para produção de tecidos grosseiros. A torta de mamona (subproduto da extração do óleo das sementes

da mamoneira), possui teor protéico elevado, porém, por ser um produto tóxico, não deve ser utilizado na alimentação animal e o processo de desintoxicação, apesar de possível, é complexo e de alto custo, tanto que as usinas de óleo preferem vender a torta como fertilizante (SANTOS et al.2007).

O óleo de mamona apresenta moléculas com propriedades flexíveis e estrutura, de certa forma, incomum entre os ácidos graxos existentes nos óleos vegetais e é o único óleo existente na natureza que é solúvel em álcool. Essas características conferem ao óleo da mamona propriedades especiais, permitindo a sua utilização em mais de 400 processos industriais tais como, produção de anticongelantes de combustível de avião e espaçonaves, revestimento de poltronas e paredes de avião (não queima com facilidade nem libera gases tóxicos), componentes de automóveis, lubrificantes, resinas, tintas, cosméticos e medicamentos. Outras aplicações, de grande valor econômico, do óleo de mamona são a fabricação do nylon e da matéria plástica, onde o seu emprego é considerado indispensável (AZEVEDO; LIMA, 2001). É utilizado pelas indústrias do plástico e siderúrgicas e na produção/fabricação de impermeabilizantes de superfície, fluidos hidráulicos, curtume, vidros à prova de bala, cabos de fibra óptica e lentes de contato (FREITAS; FREDO, 2005).

Possui excelente desempenho na fabricação de sabões, desinfetantes, corantes, germicidas, anilinas, colas e aderentes. Na biomedicina pode participar na elaboração de próteses e implantes, oferecendo fibras antitóxicas e antialérgicas. Por possuir característica de queima com poucos resíduos e de operar sob altas e baixas temperaturas sem sofrer grandes variações de viscosidade, é um excelente óleo para motores que operam sob regimes de altas rotações (SANTOS et al.2001). O óleo de mamona apresenta ainda outros co-produtos, através de processos industriais e fármacos (FREIRE, 2001).

A singularidade do óleo de mamona dá-se em virtude de sua composição com, cerca de 90%, do ácido graxo ricinoléico, que lhe confere inúmeras aplicações, inclusive como fonte alternativa de combustível na fabricação de biodiesel, o que reveste a cultura de grande importância econômica, estratégica e ambiental (FREIRE, 2001). Segundo Oliveira et al. (2008) essa espécie constitui uma boa alternativa para a produção de biodiesel no Brasil.

2. Biodiesel e meio ambiente

A tecnologia disponível e a viabilidade econômica têm sido parâmetros fundamentais para a seleção dos sistemas energéticos, com os impactos ambientais despontando de maneira muito forte como um novo condicionante à aceitação ou recusa das alternativas apresentadas.

O consumo de combustíveis fósseis, derivados do petróleo, tem um significativo impacto na qualidade do meio ambiente. A poluição do ar, as mudanças climáticas, os derramamentos de óleo e a geração de resíduos tóxicos são resultados da produção e uso desses combustíveis. A poluição do ar das grandes cidades é, provavelmente, o mais visível impacto da queima dos derivados de petróleo (SILVA, 2006).

As alterações climáticas têm sido consideradas como uma das mais importantes ameaças à sustentabilidade do meio ambiente, refletindo-se diretamente na saúde e bem-estar da humanidade e na economia global. A utilização do biodiesel no transporte rodoviário e urbano, com menor emissão de poluentes em relação ao diesel de petróleo, oferece grandes vantagens para o meio ambiente (BELTRÃO, 2004). A característica do óleo vegetal de não possuir enxofre, confere ao biodiesel completa isenção desse elemento, cujos produtos derivados são bastante agressivos ao meio ambiente, a motores e seus componentes ligados à alimentação e combustão (PARENTE, 2003).

O biodiesel, também conhecido como diesel vegetal, é um combustível obtido de fontes renováveis, tais como óleos vegetais e gorduras animais, por intermédio de processos químicos como a transesterificação, que utiliza metanol ou etanol em presença de um catalisador, para dar origem à glicerina e ao biodiesel (SILVA, 2006).

O biodiesel é um produto biodegradável, que reduz a emissão de gases tóxicos provenientes dos escapamentos dos motores, contribuindo efetivamente para o combate ao efeito estufa. Por ser semelhante ao óleo diesel mineral, pode ser utilizado puro ou misturado, em quaisquer proporções, em motores do ciclo diesel, sem a necessidade de significantes ou onerosas adaptações (PARENTE, 2003).

A mamoneira desponta, atualmente, como uma planta de excelente potencial para a produção de biodiesel e seu plantio está sendo incentivado,

principalmente, nas regiões carentes do Brasil. O governo brasileiro tornou-se um dos maiores divulgadores e promotores dessa cultura, ao sinalizar que essa deve ser a principal oleaginosa no, ainda tímido, processo de substituição do diesel brasileiro (SILVA, 2007).

A situação da mamona no âmbito do bicomcombustível é, atualmente, bastante promissora. Houve um expressivo aumento de hectares plantados, de 8 mil hectares (em 2007) para 46 mil hectares (em 2009). A expectativa para este ano é de que a mamona seja cultivada em 72 mil hectares.

Em 2005, início do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), a saca de 60 quilos de mamona era comercializada a R\$ 32,00. Em 2010, este valor é de R\$ 72,00. Valores esses refletem uma cadeia produtiva melhor organizada (LEITE, 2010).

Além dos focos econômico e energético, a mamona é uma das principais fontes de biomassa e pode participar efetivamente na reversão do processo de poluição atmosférica mundial, já que estudos indicam seu grande potencial no seqüestro de carbono, algo em torno de 10 a 20 toneladas, por ano e por hectare plantado (BELTRÃO, 2001).

Conforme a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), a mamona pode se apresentar, em curto prazo, como um dos principais componentes do Programa Nacional de Biodiesel. A estimativa é de que cerca de 40% do biodiesel produzido no Brasil nos próximos anos, sejam a partir da mamona (CIÊNCIA BIOTECNOLOGIA, 2004).

A utilização da mamona como matéria-prima para a produção de biodiesel é uma realidade para a usina da Petrobras Biocombustível. O trabalho foi desenvolvido pelo Centro de Pesquisa da Petrobras (Cenpes). O biodiesel foi obtido com uma mistura de 30% de óleo de mamona e 70% de óleo de girassol, ambos produzidos pela agricultura familiar nos programas de suprimento de oleaginosas da empresa (PETROBRAS, 2010).

3. Melhoramento genético de *Ricinus communis* L.

O cultivo de plantas oleaginosas tem sido cada vez mais difundido no mundo. Nesse sentido, o Brasil é um país privilegiado, pois devido a sua diversidade de climas e solos, apresenta plantas acumuladoras de óleo, nativas

ou exóticas, cujos frutos e/ou sementes produzem óleo para a produção de biodiesel, podendo, se tornar um grande produtor de óleos vegetais para atender aos mercados interno e externo (MELO, 2009).

Dentre as oleaginosas promissoras, destaca-se a mamoneira, cultivada comercialmente em mais de 15 países, sendo os principais produtores a Índia, a China e o Brasil (VIEIRA; LIMA, 2008). O Brasil é o terceiro produtor mundial de mamona e tem capacidade de aumentar rapidamente sua participação no mercado, pois dispõe de área para aumentar o plantio e, também, dispõe de tecnologias agrícolas apropriadas. Para atingir o nível competitivo internacional, é necessário investir na modernização de técnicas agrícolas, nas boas relações dos componentes da cadeia produtiva (agricultor – indústria) bem como em pesquisas que visam seu melhoramento (SAVY-FILHO, 1999).

O Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (PRONAF), em 2010, quer aumentar a produtividade de mamona em 21%. Para isto aliou-se à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e o ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) para produzir sementes de boa qualidade e distribuí-las aos agricultores. Além disso irá auxiliar os produtores oferecendo assistência técnica e asseguram a compra da produção. O programa tem foco no desenvolvimento e fortalecimento da cadeia produtiva de oleaginosas (CAMPOS, 2010).

Apesar da grande importância socioeconômica da cultura em todo o país, o uso de sementes não selecionadas e de baixa qualidade tem resultado no comprometimento da produtividade, elevada ocorrência de pragas e doenças e de características agrônômicas indesejáveis (FREIRE et al.2007).

As mamoneiras possuem taxa de alogamia ou fecundação cruzada de até 40% o que, por um lado, proporciona aumento da variabilidade genética e, por outro, dificulta a fixação e a manutenção de cultivares melhoradas (FREIRE et al.2001). No melhoramento genético da cultura, 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).

No Brasil, o primeiro programa de melhoramento genético da mamoneira foi iniciado em São Paulo, pelo Instituto Agrônomo de Campinas, IAC, em 1936 (SAVY FILHO, 2005). Neste ano o Instituto lançou as bases de um plano

de melhoramento, com o objetivo de desenvolver cultivares de mamoneira mais produtivas, com maiores níveis de resistência à doenças e pragas e outras características agronômicas desejáveis (FREIRE et al.2001). Diversas cultivares foram desenvolvidas pelo IAC, distintas pelo seu desempenho agrônomo, podendo-se destacar: IAC-38, Campinas, Guarani, IAC 80 e IAC 226.

A mamoneira vem sendo estudada pela Embrapa/CNPA, Centro Nacional de Pesquisa em Algodão, Campina Grande – PB, há mais de 22 anos. Essa instituição já desenvolveu cultivares, além de várias tecnologias que melhoram o sistema de produção. O fácil cultivo e boa resistência à seca fazem da mamoneira uma importante alternativa econômica para a região nordeste. A consolidação dessa cultura para um programa nacional de biodiesel passa, necessariamente, pelo sucesso na implantação de programas estaduais de incentivo ao cultivo dessa oleaginosa (OLIVEIRA, 2004).

A cultura da mamona direcionada à produção de biodiesel pode se tornar um importante instrumento de geração de renda nas regiões semi-áridas, pois dentre as outras oleaginosas, a mamona é a que apresenta as maiores potencialidades devido, primeiramente, à relativa familiaridade do agricultor com a cultura e segundo, pela sua maior resistência à seca e elevado teor de óleo (OLIVEIRA, 2004).

Para 2010/2011, a previsão é crescimento de 50% na área plantada, mas é difícil nesse momento prever o aumento no volume, porque ainda não tem um mapa de clima. A expectativa é ter 41 mil famílias participando do arranjo produtivo do programa de biodiesel, exclusivamente com mamona, de um total de 109 mil famílias que é nossa perspectiva para a safra 2010/2011. Na safra 2009/2010, foram 21 mil famílias que fecharam contratos com usinas de biodiesel só com mamona, de um total de 51 mil famílias (CAMPOS, 2010).

4. Biotecnologia no melhoramento vegetal

4.1 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos é a manutenção ou o crescimento de tecidos *in vitro*, de maneira que possa permitir a diferenciação e a preservação de sua arquitetura e/ou funções (SIVB, 2006). É considerada uma técnica importante

para a propagação de várias espécies (LANDA *et al.*2000), por via direta ou indireta, sendo que última via passa pela formação de calos, considerada uma forma potencial de propagação em massa (PIERIK, 1987; LANDA *et al.*2000). O principal obstáculo em utilizar a fase de calo está no tempo necessário para que o processo de regeneração ocorra, o que pode aumentar o risco de variação somaclonal (TAO *et al.*1997).

A cultura de células e tecidos vegetais tornou-se importante procedimento científico e tecnológico nos últimos anos sendo considerada a base de apoio dos biotecnólogos para a obtenção de cultura de células, tecidos ou órgãos vegetais (CARVALHO *et al.* 2006), além de ser a alternativa de propagação assexuada de algumas plantas (PIERIK, 1990; HARTMANN *et al.*1997).

De acordo com Pasqual *et al.* (1997), o sucesso da cultura de células, órgãos ou tecidos *in vitro* depende, em geral, da seleção do explante, das condições de temperatura e luminosidade em que a cultura é mantida e do uso de meio de cultura apropriado. Grattapaglia e Machado (1990) salientam que a variabilidade na resposta morfogênética *in vitro*, que existe não apenas entre espécies, mas também dentro de cada genótipo, leva à necessidade de se definirem protocolos diferenciados. A escolha do meio de cultura e sua concentração são fundamentais no cultivo *in vitro*, pois a quantidade e a qualidade de nutrientes e reguladores de crescimento disponíveis podem afetar consideravelmente não só o desenvolvimento como, também, a taxa de multiplicação dos explantes (NAVES, 2001).

A técnica de cultura de tecido vegetal pode assegurar o suprimento contínuo e uniforme de plantas saudáveis e homogêneas, com facilidade de multiplicação, gastos reduzidos, exigindo pouco espaço e tempo (HARAMI, 2000; NAVES, 2001).

4.1.1 Reguladores de crescimento

A adição de reguladores de crescimento ao meio de cultivo, em particular as auxinas e citocininas, estimula a formação de raízes laterais e adventícias e a formação de brotações, respectivamente (ZIV, 1991; PAEK;

HAHN, 2000) e podem inibir ou modificar o crescimento ou o desenvolvimento (TORRES, 2000).

As auxinas são muito utilizadas em trabalhos de micropropagação por promoverem o crescimento de calos, produção de raízes e regulação de morfogênese, principalmente, em associação com citocinina. Estão associadas ao crescimento e alongamento celular, enraizamento, iniciando o processo de divisão celular, formação de meristemas e manutenção da dominância apical (GEORGE, 1996). O ácido naftalenoacético (ANA) é a auxina sintética mais utilizada em meios de multiplicação, seguido do ácido indolil-3-butírico (AIB) e do ácido indolil-3-acético (AIA) (HU; WANG, 1983).

As citocininas, adicionadas ao meio de cultura na dose apropriada, têm a função de promover a formação de brotações adventícias (GEORGE, 1993) e a sua adição ao meio de cultura aumenta a taxa de multiplicação das brotações, tornando o método de micropropagação de gemas mais eficiente. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), o 6- 12 benzilaminopurina (BAP) é a citocinina que, *in vitro*, proporciona melhores resultados dentre as citocininas comercialmente disponíveis sendo a citocinina sintética mais utilizada em cultura de tecidos para induzir a formação de grande número de brotos e estimular altas taxas de multiplicação (CALDAS et al.1998).

As citocininas estão envolvidas em diferentes processos do desenvolvimento como a divisão e diferenciação celular (SKOOG; MILLER, 1957), formação de gemas caulinares e formação de cloroplastos (MOK; MOK, 2001). As citocininas promovem, ainda, o desestiolamento, a quebra da dominância apical e a interação planta-patógeno (HARBERER; KIEBER, 2002) e têm seus principais centros produtores nas raízes das plantas, porém, outros tecidos meristemáticos, como ápices caulinares, podem produzi-las (PERES, 1999).

4.2 Marcadores moleculares

Até a década de 60 os marcadores utilizados em estudos de melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, com fenótipo de fácil identificação visual, todavia, o baixo número de marcadores morfológicos diminuía a probabilidade de encontrar

associações significativas entre estes marcadores e genes de importância econômica. Ocasionalmente eram encontrados marcadores morfológicos ligados a estes genes, reduzindo a possibilidade do uso deles em programas de melhoramento (BORÉM et al.2005).

Dentre as moléculas que podem ser utilizadas como marcadores moleculares, o DNA é a que apresenta maior fonte de variação entre indivíduos (CAIXETA et al.2006). 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, virtualmente ilimitado de marcadores, potencializando sua incorporação às diferentes etapas dos programas de melhoramento genético (PEREIRA et al.2005).

Marcador molecular é característica de um sítio de heterozigose de DNA que pode ou não estar associado à variação no fenótipo, que é usado como marcação para um locus cromossômico. É herdado geneticamente e quando o locus determina alteração fenotípica, pode ser usado para diferenciar indivíduos, tecidos e organismos em condições diferentes. Fornece um número ilimitado de polimorfismos do DNA, independentes dos efeitos ambientais e do estágio fisiológico da planta e permite a identificação precoce e precisa de indivíduos com a melhor combinação de alelos favoráveis, que podem ser usados no melhoramento genético (LANZA et al.2000).

Marcadores moleculares possuem várias aplicações como, a construção de mapas de ligação em plantas, seleção assistida por marcadores moleculares, retrocruzamentos, distância genética e heterose, proteção de cultivares e pureza genética. A caracterização de uma variedade, linhagem ou híbrido, ao nível de DNA, tem se tornado uma ferramenta importante na proteção dos direitos dos detentores vegetais. Marcadores moleculares podem, também, ser utilizados para a quantificação da taxa de polinização cruzada na produção de sementes híbridas. Outra aplicação ligada diretamente à indústria de sementes híbridas é sua utilização no estabelecimento de grupos heteróticos, os quais otimizam a escolha de genitores com capacidade de combinação (MALONE; ZIMMER, 2005).

4.2.1 Marcadores moleculares na proteção de cultivares

A Lei de Proteção de Cultivares do Brasil (lei Nº 9.456, de 25 de abril de 1997) define um descritor como toda característica morfológica, fisiológica, bioquímica e/ou molecular que seja herdada geneticamente, utilizada na identificação de um cultivar. Cultivar é a variedade de qualquer gênero ou espécie vegetal superior que seja claramente distinguível de outras cultivares conhecidas por margem mínima de descritores, por sua denominação própria, que seja homogênea e estável quanto aos descritores através de gerações sucessivas e seja de espécie passível de uso pelo complexo agroflorestal, descrita em publicação especializada disponível e acessível ao público, bem como a linhagem componente de híbridos.

Tradicionalmente, os melhoristas têm utilizado para registrar e proteger uma nova variedade, apenas características morfológicas, objetivando estabelecer a distinção, uniformidade e estabilidade, o DHE referido na lei (LOMBARD et al.1999; PRIOLLI et al., 2002). A distinção de cultivares realizada por características morfológicas, apresenta como desvantagem a necessidade de um grande número de descritores que são identificados em plantas inteiras ou adultas, além disso, esses marcadores podem ser influenciados pelo ambiente (PADILHA, et al., 2002) são complexos na sua expressão (LOMBARD et al., 1999), podem ser modulados pelo efeito de um determinado patógeno, etapa de crescimento e clima (NARVÁEZ et al., 2001); influenciados por interações intra e inter-loci, resultando em dados poucos confiáveis (STAUB et al., 1996) e apresentam problemas de identificação, principalmente em plantas aparentadas e de base genética estreita (PRIOLLI et al., 2002).

Uma alternativa, que pode complementar os descritores morfológicos, são os marcadores moleculares que tem permitido indicar com precisão as variações genéticas presentes no DNA de um organismo. Os descritores de DNA, baseados no genótipo do indivíduo, têm recebido maior atenção, especialmente pelo seu potencial de distinção, uma vez que são mais abundantes que os morfológicos (UDE et al., 2002) e são ideais para distinção de genótipos morfolologicamente similares e geneticamente aparentados (BEYENE et al., 2005).

4.2.2 Marcadores microssatélites

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para detectar variações no genoma, aumentando o poder da análise genética das plantas. Com o rápido avanço das técnicas, sua simplificação e a redução dos custos, o uso de marcadores de DNA vem se tornando rotineiro nos programas de melhoramento genético de plantas, aumentando a eficiência e proporcionando maiores ganhos genéticos nas principais culturas de interesse econômico. Marcadores moleculares baseados em microssatélites têm sido desenvolvidos em várias espécies de plantas cultivadas e estão substituindo outros marcadores em estudos genéticos, principalmente devido a sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (CAIXETA et al.2006). Os marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) ou microssatélites têm sido úteis para integração de mapas genéticos e mapas físicos e tem provido os melhoristas e geneticistas com uma ferramenta eficiente para associar variação genética e fenotípica (GUPTA; VARSHNEY, 2000).

Os SSR ou microssatélites, correspondem a regiões genômicas simples intercaladas por repetições, em *tandem*, de dois a seis nucleotídeos (SENIOR et al.1996). Essas regiões são amplificadas por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando-se um par de *primers* específicos (de 20 a 30 pares de bases) complementares às seqüências que flanqueiam os microssatélites. A detecção das seqüências amplificadas é feita em gel de poliacrilamida ou agarose de alta resolução, separadas por eletroforese. A visualização das bandas no gel pode ser feita diretamente por coloração com brometo de etídio, usando tratamento com prata ou, também, por auto-radiografia, quando são utilizados *primers* marcados com radioisótopos. Cada *locus* microssatélite pode ser analisado individualmente ou mais de um em cada reação, quando os alelos de cada *locus* têm tamanhos suficientemente diferentes para migrarem em zonas separadas no gel (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LANZA et al.2000).

Os fragmentos amplificados a partir desses sítios, quase que invariavelmente, apresentam alto grau de polimorfismo, resultante da presença

de diferentes números de elementos simples repetidos, portanto, os microssatélites são *loci* altamente variáveis. São marcadores codominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados; multialélicos e de grande conteúdo informativo, uma vez que cada segmento amplificado é de tamanho diferente, representando um alelo do mesmo *locus*. Em uma população, todos os alelos de um dado *locus* podem ser detectados e discriminados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As SSRs já foram identificadas em diversos genomas vegetais, nas quais as seqüências repetidas ricas em adenina e timina são muito comuns (MALYSHEV; KARTEL, 1997), e o milho foi um dos primeiros vegetais onde se identificou as SSRs (TARAMINO; TINGLEY, 1996; SENIOR et al.1996).

A variação encontrada nos microssatélites pode ser devida tanto ao “escorregamento” da DNA polimerase durante a replicação como devido à recombinação desigual, durante a meiose, resultando em diferenças no número de cópias das seqüências de nucleotídeos. As SSRs polimórficas aumentam a possibilidade de detecção de diferenças alélicas entre espécies próximas, dentro de uma espécie ou, até mesmo, entre indivíduos em uma população (YU et al.1999).

Referências bibliográficas

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Bot. J. Linnean Soc.** 399-436p.

AZEVEDO, D. M. P. de.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. **Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Brasil.** Campina Grande: EMBRAPA – CNPA, 1997. 52p. (EMBRAPA – CNPA. Circular Técnica, 25).

AZEVEDO, D.M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil.** Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 350p.

BAYMA, A. C. **Mamona**. Serviço de Informação Agrícola, Produt Rur 7, 1958. 96 p.

BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, L. C.; MELO, F. B. **Cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) consorciada com feijão-caupi [*vigna unguiculata* (L.) Walp] para o semiárido nordestino, em especial do Piauí**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão/Embrapa – CPAMN, 2002. 44p. (CNPQ: Documentos, 97).

BELTRÃO, N. et al.. **Mamona: árvore do conhecimento e sistemas de produção para o semi-árido brasileiro**. Circular técnica 70. (Campina Grande: Embrapa, 2003).

BELTRÃO, N. et al.. **Zoneamento e época de plantio da mamoneira para o nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa algodão, 2004.

BELTRÃO, N.E.M.; SILVA, L.C.; VASCONCELOS, O.L.; AZEVEDO, D. M. P.; VIEIRA, D.J. Fitopatologia. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.37-61. 2001.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2005. 374 p.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Lei n. 11.097**, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira. Brasília, 2005. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>. Acesso em: 10 maio 2009.

BRASIL. **Resolução ANP nº. 7**, de 19 de março de 2008. Define normas e especificações do combustível biodiesel para proteger os consumidores. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/petro/legis_biodiesel.asp>. Acesso em: 2 jun. 2009.

BUZZETTI, A. R. Falta estímulo à produção de mamona. **Óleos ; grãos**, v. 8, n. 47, p. 39-45, 1999.

CAIXETA, E.T; OLIVEIRA, A.C.B; BRITO, G.G; SAKIYAMA, N.S (2006). **Tipos de marcadores moleculares**. In: Borém A, Caixeta ET (eds.). Marcadores moleculares. Editora UFV, Viçosa, p. 10-78.

CAMPOS, A. **Petrobras fortalece a produção de mamona**. Disponível em <http://www.biodieselbr.com/noticias/biodiesel/petrobras-fortalece-producao-mamona.htm>. Acesso em julho de 2010.

CARVALHO, B. C. L. **Manual do cultivo da mamona**. Salvador: EBDA, 2005. 65p.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. **Fatores inerentes à micropropagação**. Embrapa Algodão, 2006. (Documentos, 148).
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, 2001. P. 89-118.

CIÊNCIA BIOTECNOLOGIA. **Mamona será o principal componente do biodiesel**. Homepage. Disponível em <http://noticias.terra.com.br/ciencia/interna>>. Acesso em setembro 2004.

CRONQUIST, A (1968). **The evolution and classification of the flowers plants**. New York: Willian C. Steere.

EVANGELISTA, A. R.; LOPES, J.; PERÓN, A. J.; CASTRO NETO, P.; FRAGA, A. C. **Avaliação da composição química de folhas de mamona (*Ricinus communis*)**. Disponível em: www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2006/agricultura/AvaliacaoComposi%E7%E3o10.pdf>. Acesso em setembro de 2008.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília. 1998. 121-125p.

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**. Brasília: Embrapa Algodão; Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 169-194.

FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 295-333, 2001.

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

FREITAS, S. M.; NACHILUK, K. Desempenho da produção brasileira de biodiesel em 2008. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 1-4, fev. 2009.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**; Part 1 the Technology. 2.ed. Edington: Exegetics, 1993. 574p.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**; Part 2 in practice. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361p.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.) **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – SPI/EMBRAPA – CNPH, p.183-260, 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. (Eds.) **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA – CNPH, parte 2, p.99-169, 1990.

HARAMI, M. **Propagação *in vitro* de Cúrcuma (*Curcuma longa* L.) a partir de ápices caulinares.** Viçosa: UFV, 2000. 56p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.

HARBERER G.; KIEBER, J.J. Cytokinins. New insights into a classic phytormone. **Plant Physiology**, v. 128, p.354-362, 2002.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E.; DAVIES JR., F. T. **Propagación de plantas: principios y prácticas.** 5.ed. Mexico: Continental, 1997. 760p.

HU, C. Y.; WANG, P. J. Meristem, shoot tip and bud culture. *In*: EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.) **Handbook of plant cell culture: techniques for propagation and breeding.** New York: Macmillan, p.117-227, 1983.

LANDA, F.S.L. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24 (Edição Especial), p.56-63, 2000.

LANZA, M.A, GUIMARÃES, C.T; SCHUSTER, I (2000) **Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético.** Informe Agropecuário 1: 97-108.

LEITE, M. A. **No Congresso da Mamona, MDA mostra avanços da agricultura familiar no biodiesel.** Disponível em <http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/congresso-mamona-md-agricultura-familiar-cadeia-biodiesel-090610.htm>. Acesso em julho de 2010.

MALONE, G.; ZIMMER, P.D.; Marcadores Moleculares. *In*: ZIMMER,P.D.; OLIVEIRA,A.C.; MALONE,G., **Ferramentas da Biotecnologia Vegetal.** Pelotas, editora Gráfica Universitária UFPEL, 157p. 2005.

MELO, É. E. C. **Fitorremediação de arsênio:** disponibilidade do metalóide no solo e seu acúmulo em girassol e mamona. 2009. 82 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MOK, D.W.S; MOK, M.C. Cytokinin metabolism and action. **Annual review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v. 52, p.89-118, 2001.

MOSHKIN, V.A. Growth and development of the plant. In: MOSHKIN, V.A. Castor. New Delhi, Indian. **Amerind Publishing**. co. Pvt. Ltd. 1986. p. 36-42.

NAVES, V.C. **Propagação in vitro de bromélia imperial** *Alcantarea imperialis* (Carrière) Harms. Lavras: UFLA, 2001. 76p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, 2001.

OLIVEIRA, D. **Projeto de lei aponta mamona como principal componente do biodiesel brasileiro**. Embrapa Produtos Agropecuários, 2004. Disponível em:

http://www.embrapa.gov.br/noticias/banco_de_noticias/2004/setembro/bn.2004.1125.3668367.722/mosta_noticia. Acesso em fevereiro de 2008.

OLIVEIRA, N. S. **Variabilidade genética em *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) através de DAF**. 2004. 73 p. Dissertação (Mestrado em Genética) da Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2004.

PADILHA, L.; GUIMARÃES, C. T.; VIEIRA, M. G. G. C.; CRESTE, I. R. P.; PARENTONI, S. N.; PACHECO, C. A. P.; SANTOS, M. X.; GAMA, E. E. G.; PAIVA, E. Microssatélites fluorescentes na diferenciação de linhagens de milho. In: XXIV Congresso Nacional de Milho e Sorgo, Sete Alagoas, **Anais...** p.1-5, 2002.

PAEK, K. Y.; HAHN, E. J. Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot-tip cultures of *Lisianthus* [*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn]. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**. Berlin, v.36, n.2, p.128-132, 2000.

PARENTE, E. S. **Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Tecbio, 66p. 2003.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura** de tecidos vegetais: tecnologia e aplicação. Lavras: UFLA, **1997**. 159p.

PEREIRA, 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.

PERES, L.E.P.; KERBAUY, G.B. High cytokinin accumulation following root excision changes the endogenous auxin-to-cytocinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lind. (Orchidaceae). **Plant Cell Reports**, v.18, p.1002-1006, 1999.

PETROBRAS. **Biodiesel com óleo de mamona já é realidade**. Disponível em <http://www.petrobras.com.br/pt/noticias/biodiesel-com-oleo-de-mamona-ja-e-realidade>. Acesso em julho de 2010.

PIERIK, R. L. M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 1990. 326p.

PIERIK, R.L.M. ***In Vitro* Culture of Higher Plants**. Dordrecht: Martinus Nyhoff Publisher, 1987. 344p.

POPOVA, G. M.; MOSHKIN, V. A. Botanical classification. In: MOSHKIN, V. A. (Ed.). **Castor**. Amerind, New Delhi: Amerind Publishing, Co. Put. 1986. p. 315.

PRIOLLI, R.H.G.; MENDES-JUNIOR, C.T.; ARANTES, N.E.; CONTEL, E.P.B. Characterization of Brazilian soybean cultivars using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.185-193, 2002.

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

SANTOS, R. et al. Análise econômica. Melhoramento genético. In: AZEVEDO, D. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p. 17-35. 2001.

SANTOS, R.F.; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. Aspectos econômicos do agronegócio da mamona. In: AZEVEDO, D. M. P.; BELTRÃO, N. E. M. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 21-41.

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

SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. In : BOREM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viosa: Editora da Universidade Federal de Viosa, 1999. p. 398-404.

SENIOR, M.L., E.C.L. CHIN, M. LEE, J.S.C. SMITH; C.W. STUBER. 1996. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the **GENBANK database: Map construction- Crop Sci.** 36:1676–1683.

SILVA, D. H. **Boro em mamoneira**: aspectos morfológicos e fisiológicos relacionados à deficiência e toxicidade. Piracicaba: ESALQ, 2007. 103 p.

SILVA, W. S. D. **Mapeamento de variáveis mercadológicas para a produção de biodiesel a partir da mamona na região nordeste do Brasil**. 2006. 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2006.

SIVB, **Terminology Associated with Cell, Tissue and Organ Culture, Molecular Biology and Molecular Genetics**. Disponível em http://www.sivb.org/edu_terminology.asp. Acesso em agosto de 2008.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation plant tissues culture *in vitro*. **Symposia of the Society for Experimental Biology**. Cambridge, v.11, p.118-140, 1957.

STREET, H.E.; OPIK, H. **Fisiologia das angiospermas**. Crescimento e desenvolvimento. São Paulo, SP. Editora da Universidade de São Paulo. 1970. 332p.

TAO, R.; DANDEKAR, A. M.; URATSU, S. L.; VAIL, P. V.; TEBBETS, J. S. Engineering genetic resistance against insects in Japanese Persimmon using the crystal gene of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Mount Vernon, v. 122, n. 6, p. 764-771, 1997.

TÁVORA, F. J. A. **A cultura da mamona**. Fortaleza: EPACE, 1982. 111p.

TORRES, A. C. **Glossário de Biotecnologia Vegetal, Brasília: Embrapa Hortaliças**, 128p, 2000.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V. dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. G.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: Formulações de meios para a cultura de tecidos de plantas. Circular Técnica nº24. Brasília: Embrapa, p.1-20, 2001.

VIEIRA, R.M.; LIMA, E.F. Importância socio-econômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil. In QUEIRÓZ, M.A. de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Disponível em: <<http://www.cpatsa.embrapa.br>>. Acesso em: 19 abr. 2008.

WEISS, E. A. **Castor, Sesame and Safflower**. London: Leonard Hill Books, 1971.

WEISS, E.A. CASTOR. In: WEISS, E.A. **Oilseed crops**. London: Longman, 1983. p. 31-99.

YAMANE, R.S.. **Marcadores Moleculares**. Disponível em <<http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL008.htm>>. Acesso em 28 nov. 2006.

YU H. J., MOON M. S., LEE H. S. et al. Analysis of cDNA expressed during first cell division of petunia petal protoplast cultures using expressed sequence tags. **Molecules and Cell**, v. 9, p. 258-264, 1999.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (Eds.) **Micropropagation: Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, cap.4, p.45-69, 1991.

**CAPÍTULO II – PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE
RICINUS COMMUNIS L.**



Resumo

O óleo extraído das sementes de mamona possui características que permitem sua utilização em centenas de aplicações industriais. Com a criação do Programa Biodiesel Nacional a cultura da mamona tem-se destacado por apresentar grande potencial para expansão no país visando a obtenção de matéria prima para a produção de biodiesel. Entretanto, existem vários aspectos da cultura que precisam ser pesquisados para que esta expansão realmente aconteça no país. Com os objetivos de estabelecer a germinação *in vitro* de sementes de *Ricinus communis* L. e avaliar o comportamento *in vitro* de gemas apicais foi analisada a ação de concentrações de reguladores de crescimento ANA e BAP. As características avaliadas foram: brotações, contaminação, calos e oxidação. A taxa de germinação é maior em sementes sem o tegumento. As taxas de contaminação foram altas. A taxa de oxidação foi minimizada com adição de ácido ascórbico. As gemas apicais obtiveram produção de calos e brotações pela ação do hormônio BAP.

Palavras-chave: cultura de tecidos, ácido naftalenoacético, benzilaminopurina, *Ricinus communis* L.

Abstract

The oil extracted from castor bean seed has a lot of industrial applications. With the creation of the National Biodiesel Program castor bean crop has been outstanding for presenting great potential for expansion in the country seeking the raw material production for biodiesel production. However, there are several aspects of crop which need to be researched for this expansion really happens in the country. Aiming to establish the in vitro germination of seeds of *Ricinus communis* L. and evaluate the in vitro behavior of apical buds was analyzed the action of concentrations of growth regulators NAA and BAP. The characteristics evaluated were: sprout contamination, calluses and oxidation. The germination rate is higher in seeds without the husk. Contamination rates were high. The rate of oxidation was minimized with the addition of ascorbic acid. The apical buds had production of callus and shoots the action of the hormone BAP.

Keywords: tissue culture; naphthaleneacetic acid, benzylaminopurine; *Ricinus communis* L.

1. Introdução

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma importante oleaginosa no cenário econômico e social. O óleo da mamona possui inúmeras aplicações na área industrial, com perspectiva de utilização como fonte energética na produção de biocombustível.

A cultura de tecidos vegetais pode ser definida como um conjunto de técnicas para favorecer o crescimento de partes vegetais (células, tecidos e órgãos) em um ambiente estéril e controlado, em um meio de cultura com nutrientes (TAIZ; ZEIGER, 2004). Estas técnicas tem grande aplicação na área de multiplicação de plantas, conhecida como micropropagação ou propagação clonal, por produzir indivíduos geneticamente idênticos (RAVEN et al.2001) e, nos últimos anos, contribuiu efetivamente para o desenvolvimento de novas cultivares com importantes características agronômicas (resistência a pragas e doenças, precocidade, modificação do porte da planta, etc). Outro fato importante do emprego dessas técnicas foi a exploração da capacidade de indução da desdiferenciação celular, uma das mais importantes características do cultivo *in vitro* das plantas para o melhoramento não convencional, gerando novas características de grande interesse para programas de melhoramento vegetal (MALUSZYNSKI, 2001; FEHÉR et al. 2002).

De acordo com Ferreira et al. (1998), as principais aplicações da cultura de tecidos em programas de melhoramento são: a) a conservação e avaliação de germoplasma *in vitro*; b) aumento da variabilidade genética para fins de seleção (obtenção de variantes somaclonais e por engenharia genética); c) introgressão de genes de interesse para espécies-alvo (quebra de barreira de incompatibilidade genética por polinização *in vitro*, cultivo de embriões, fusão de protoplastos e haploidização por cultura de anteras); d) aceleração de programas de melhoramento (germinação de sementes *in vitro*, clonagem de genótipos para teste de capacidade de combinação, cultura de anteras e micrósporos para obtenção de haplóides, limpeza clonal).

Os meios de cultura são normalmente compostos por macro e micronutrientes em diferentes proporções, vitaminas, aminoácidos, fontes de carbono e reguladores de crescimento, além de outras substâncias como inositol, sorbitol e ágar. A composição do meio de cultura baseia-se na

demanda nutricional das plantas quanto aos nutrientes minerais, com modificações para atender às necessidades específicas *in vitro* (SLATER et al., 2003). Para complementar os compostos sintetizados pelas células, outras substâncias orgânicas são acrescentadas ao meio de cultura, visando suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais como, aminoácidos e carboidratos (DUNSTAN et al.1995).

Quanto a consistência os meios nutritivos podem ser líquidos ou sólidos; a cultura em meio líquido, normalmente, exige algum tipo de suporte ou agitação para fornecer o oxigênio necessário para a respiração do explante. Os meios sólidos ou semi-sólidos, podem ser obtidos com ágar, phyta-gel ou amido. A escolha do agente de solidificação depende da espécie da planta e das condições de cultivo (FERREIRA et al. 1998)

Dentre os componentes do meio de cultura, a água deve apresentar ótima qualidade pois a presença de impurezas podem afetar o desenvolvimento do explante *in vitro*. Para tanto deve-se destilar e deionizar a água a ser empregada no preparo do meio de cultura (SANTOS, 2003).

Um componente crucial para o meio nutritivo são os hormônios vegetais. Hormônio vegetal é um composto orgânico, não nutriente, de ocorrência natural, produzido na planta, que em baixas concentrações promove, inibe ou modifica processos morfológicos e fisiológicos do vegetal (CASTRO et al., 2005).

A escolha do fitorregulador a ser utilizado na cultura *in vitro* depende do tipo de morfogênese desejada, de seu nível endógeno no explante no momento da excisão, da capacidade do tecido sintetizar o regulador durante o período de cultura e da possível interação entre os hormônios vegetais endógenos e aqueles adicionados ao meio (SANTOS, 2003). Os principais hormônios utilizados na organogênese são as auxinas e citocininas. Outras classes de hormônios vegetais, como as giberelinas, o etileno e o ácido abscísico ou outras substâncias que não são propriamente hormônios, muitas vezes, são utilizados em processos de regeneração organogenética.

A proporção ou balanço auxina/citocinina em meio de cultura, é aceita como determinante para a resposta organogênica. Em meios com razões intermediárias de auxina/citocinina ocorre proliferação celular desorganizada, como calos (TAKAHASHI, 2002). As citocininas estimulam a divisão das

células vegetais e a formação e atividade dos meristemas apicais, enquanto as auxinas estimulam o alongamento celular de coleóptilos e segmentos caulinares, divisão celular em culturas de calos em presença de citocininas e formação de raízes adventícias em folhas ou caules excisados (TAIZ ; ZEIGER, 2004).

A organogênese é o processo pelo qual um ser vivo origina seus órgãos, no caso das plantas, caule, raízes, folhas, flores e frutos. A organogênese *in vitro* nada mais é do que tentar reproduzir esse processo artificialmente por meio da manipulação dos reguladores de crescimento em meio de cultura. SKOOG; MILLER, em 1957, demonstraram que a formação de dois órgãos *in vitro*, caules e raízes, era controlada pelas concentrações relativas entre auxina e citocinina (PERES, 2002).

A organogênese *in vitro* pode ser dividida em dois processos diferentes, a organogênese direta onde o explante já possui células meristemáticas e a organogênese indireta, quando há necessidade de desdiferenciação do explante e a formação de calo previamente ao estabelecimento das células competentes (PERES, 2002).

A obtenção de organogênese *in vitro* é um processo empírico onde são testadas para cada espécie, ou mesmo para cada variedade dentro de uma espécie, as seguintes condições: I) fonte de explante; II) composição mineral do meio de cultura (suas vitaminas e fonte de carbono) III) balanço hormonal e IV) condições ambientais (PERES, 2002).

A variabilidade existente na resposta morfogênética *in vitro*, não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie, leva à necessidade de se definirem protocolos diferenciados (GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998). Durante a micropropagação, é bastante comum ocorrerem perdas significativas de material devido à contaminação por microrganismos presentes na superfície dos explantes ou endofíticos, principalmente, fungos e bactérias (SUZIN, 2004).

Chaves et al. (2005) ratificam que um dos maiores entraves do cultivo *in vitro* está na dificuldade de obter tecidos livres de contaminação. O uso de diferentes agentes germicidas reduz a contaminação dos explantes, sendo os mais comuns, o etanol e os compostos à base de cloro tais como, hipoclorito de sódio e cálcio (GRATTAPAGLIA ; MACHADO, 1998). A concentração da

solução desinfetante, a combinação dos princípios ativos e o tempo de exposição podem variar (MONTARROYOS, 2000), sendo necessária a adequação do protocolo de desinfestação, de acordo com a espécie, cultivar e a sensibilidade do tecido a ser desinfestado (CHAVES et al.2005).

Os explantes a serem inoculados no meio de cultura podem liberar exudados que tornam o meio de cultivo escuro, como consequência da liberação de fenóis dos ferimentos ocasionados no processo de extração dos explantes (SANTOS et al.2001). Preece e Compton (1991) caracterizaram as substâncias encontradas em meio de cultura, responsáveis pela oxidação, para algumas espécies lenhosas e as identificaram como sendo fenóis, flavonóides e taninos. A oxidação é a reação do O₂ com íons metálicos (+) dos outros compostos do meio de cultivo.

Grattapaglia e Machado (1998) recomendam para controlar a oxidação as seguintes medidas: lavagem do material antes da desinfestação em água corrente, auxiliando na lixiviação de compostos fenólicos; utilização de antioxidantes: ácido ascórbico, polivinilpirrolidona (PVP), carvão ativado e incubação inicial dos explantes no escuro.

Aplicando as técnicas de cultura de tecidos em *Ricinus communis* L., os objetivos foram: a) verificar o efeito dos hormônios ANA e BAP isolados ou em combinação, na taxa de germinação de *Ricinus communis* L., a partir de cultura de sementes; b) verificar o efeito dos hormônios ANA e BAP isolados ou em combinação, na taxa de brotação e desenvolvimentos de calos em *Ricinus communis* L. a partir de cultura de ápices caulinares; c) otimizar um protocolo de micropropagação e/ ou manutenção de plantas de mamoneira, para utilização em programas de melhoramento dessa espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A seguir serão detalhados os experimentos para o estudo da regeneração de plantas de *Ricinus communis* L. por meio da germinação *in vitro* e desenvolvimento de plantas a partir da proliferação de gemas. Esses experimentos foram baseados no protocolo proposto por AIRES et al. (2007) com modificações para adaptá-lo às condições do presente estudo, conforme andamento dos experimentos. Os experimentos foram realizados no

Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

2.1. Plantas matrizes de *Ricinus communis*



Figura 1: Vista da área com coordenadas geográficas, latitude 18,8797° sul e longitude 48,229° oeste, em Uberlândia – MG, onde foram coletados os explantes.

As matrizes de *Ricinus communis*, fornecedoras dos explantes utilizados na inoculação *in vitro*, estavam em uma área de Proteção Permanente, com as seguintes coordenadas geográficas, latitude 18,8797° sul e longitude 48,229° oeste, na cidade de Uberlândia (Figura 1), sob o crescimento espontâneo. Frutos e ápices caulinares foram coletados nos meses de julho, agosto e setembro de 2009.

2.2. Preparação dos explantes de *Ricinus communis*

A figura 2 apresenta um esquema do material coletado: frutos e ápices caulinares. Os frutos coletados passaram por processo de desinfestação para a posterior retirada das sementes. Os ápices coletados foram submetidos ao processo de isolamento das gemas. As folhas maiores foram excisadas com auxílio de bisturi, sendo selecionado o ponto vegetativo (meristema apical) juntamente com os primórdios foliares com, aproximadamente, 0,1 cm². Os

explantes foram submetidos ao protocolo de desinfestação, para a obtenção de explantes axênicos.

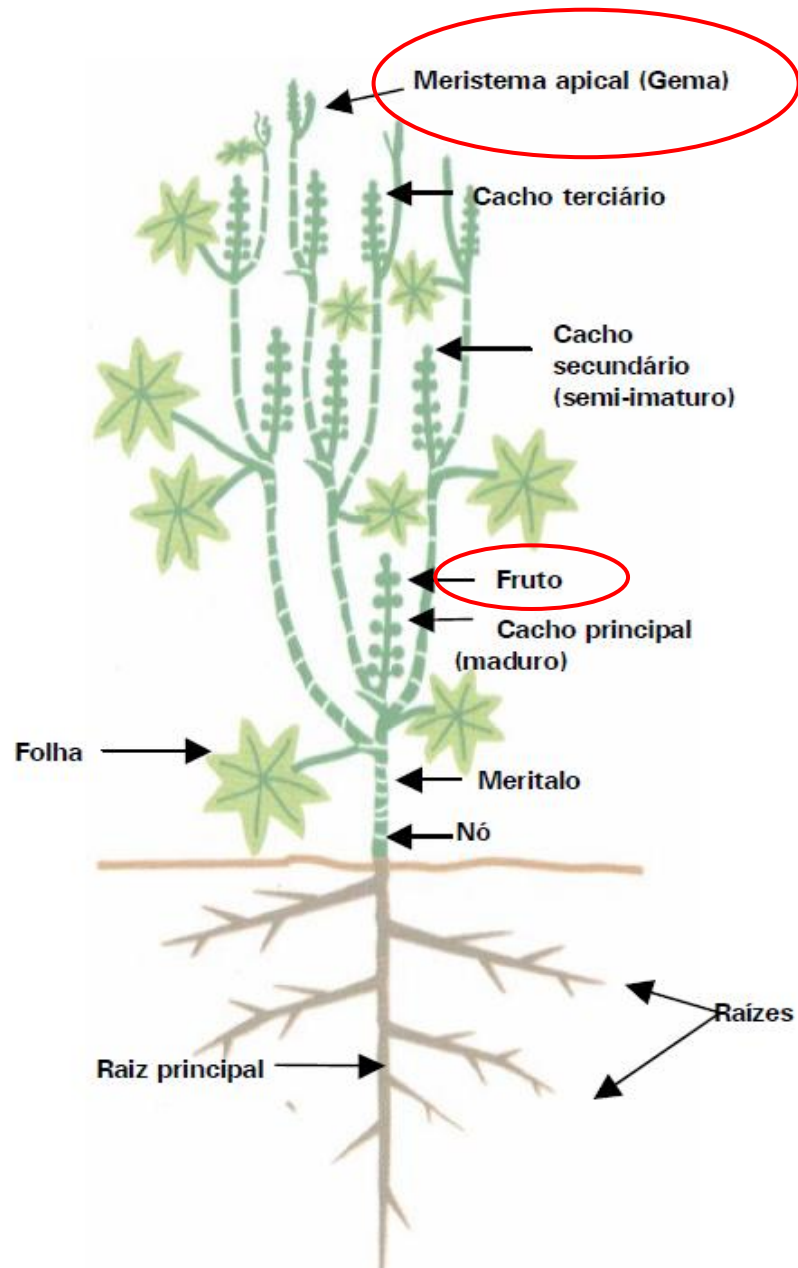


Figura 2: Esquema ilustrativo da mamoneira com os explantes, fruto e meristema apical em evidência. A gema e o fruto encontram-se marcados (círculo).
Fonte: Weiss (2008) adaptado.

2.3. Assepsia dos explantes (frutos e gemas)

Primeiramente foram lavados com água e Tween 20 por cerca de 1 minuto. Os explantes foram imersos em solução de hipoclorito de sódio comercial, acrescidos de 3 gotas de Tween 20 a cada 100ml de solução e colocados em agitador magnético, por 15 minutos. Em seguida foram enxaguados com solução de água destilada autoclavada, por três vezes e imersos em etanol 70%, por um minuto, seguido de seis lavagens em água destilada autoclavada, realizada em câmara de fluxo laminar (VECO).

2.4. Isolamento e cultivo dos explantes

Após a desinfestação, os explantes, sementes e ápices caulinares foram inoculados em tubos de ensaio contendo meio de cultura MS (MURASHIGE ; SKOOG – 1962) (Tabela I), com modificações, agar (7g/L) e pH ajustado para 6,0, antes da autoclavagem.

Os tubos e os meios foram previamente esterilizados em autoclave vertical (FANEM) à temperatura de 121°C sob a pressão de 1 atm por 20 minutos e a transferência dos explantes foi feita em câmara de fluxo laminar (VECO). Foram distribuídos 10 mL de meio em cada tubo de ensaio. Os tubos permaneceram, inicialmente, por uma semana no escuro e depois foram mantidos em sala de crescimento com temperatura $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz com intensidade luminosa de 2500 lux. Um explante em cada tubo de ensaio passou a constituir uma unidade experimental.

No total foram realizados quatro experimentos, os dois primeiros possuíam como explantes sementes de *Ricinus communis* L. e os demais gemas apicais.

Tabela I: Composição do meio de cultura: MURASHIGE ; SKOOG.

Componentes	MS (mg/L)
Macronutrientes:	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	-
KH ₂ PO ₄	170
KNO ₃	1900
K ₂ SO ₄	-
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650
(NH ₄) ₂ SO ₄	-
Micronutrientes:	
CoCl ₂ . 6H ₂ O	2,5
CuSO ₄ . 5H ₂ O	2,5
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,3
FeEDTA:	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	13,9
Na ₂ EDTA. 2H ₂ O	18,6
Orgânicos:	
Ácido nicotínico	0,5
Glicina	2,0
Mio-inositol	50
Piridoxina - HCl	0,5
Tiamina - HCl	0,5
Sacarose (g/L)	30

2.5. Diferentes concentrações de ANA e BAP na germinação de *Ricinus communis*

Visando testar a capacidade de germinação de *Ricinus communis*, foram realizados dois experimentos, EXPERIMENTO 1 (EXP 1) e EXPERIMENTO 2 (EXP 2). No EXP 1 foram inoculadas sementes inteiras (tegumento, endosperma, cotilédone e embrião) (Figura 3) e sementes sem o tegumento, em meio MS (MURASHIGE ; SKOOG – 1962) (Tabela II), acrescido de vitaminas do meio B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), agar (7g/L) e pH ajustado para

6,0 antes da autoclavagem. O experimento foi em delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC) com 30 repetições por tratamento, totalizando 60 tubos.

No experimento 2 (EXP 2), foram utilizados como explantes, sementes sem o tegumento. As condições e meio utilizado foram os mesmos do experimento anterior com o acréscimo de ácido ascórbico (800 mg). Foram testadas combinações dos hormônios ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (benzilaminopurina) na concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 1,5 mg/L e 0,0; 0,10; 0,20; 0,30 mg/L, respectivamente (Tabela II). O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (4x4), 16 tratamentos com 4 repetições, sendo 4 tubos por parcela.

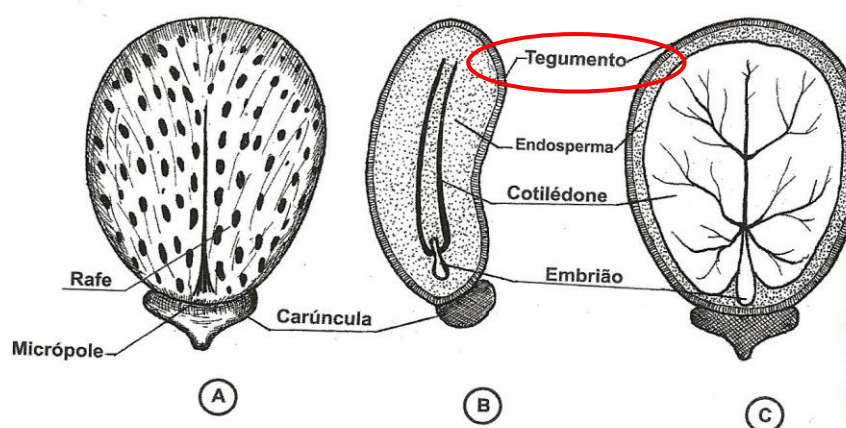


Figura 3: Esquema da semente da mamoneira. A) Vista externa. B) Corte longitudinal de perfil. C) Corte longitudinal frontal. O tegumento encontra-se marcado (círculo). Morandini (2008), adaptado.

Após 10 dias da instalação dos experimentos, foram avaliadas as características: contaminação, oxidação e germinação das sementes em porcentagem, considerando o número de explantes contaminados, oxidados e germinados em relação ao total de explantes inoculados.

Tabela II: Tratamentos com a combinação de fitorreguladores ANA e BAP em mgL^{-1} .

ANA \ BAP	0,0	0,10	0,20	0,30
	0,0	0,10	0,20	0,30
0,0	T1	T2	T3	T4
0,5	T5	T6	T7	T8
1,0	T9	T10	T11	T12
1,5	T13	T14	T15	T16

2.6. Diferentes concentrações de ANA e BAP na propagação de *Ricinus communis*

Para testar a capacidade de propagação de *Ricinus communis*, foi realizado um terceiro experimento (EXP 3), no qual utilizou-se como explante gemas apicais com a mesma composição do meio e combinações dos hormônios ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (benzilaminopurina) do experimento anterior (Tabela II). O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (4x4), 16 tratamentos com 4 repetições, sendo 4 tubos por parcela.

Um quarto experimento (EXP 4) foi realizado, da mesma forma, porém com a retirada das vitaminas do meio B5 e com o acréscimo de 3 g de carvão ativado. Após 10, 20 e 30 dias da instalação dos experimentos, foram avaliados as características contaminação e oxidação (em porcentagem) e o desenvolvimento de brotações e calos.

3. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com a utilização do programa SPSS, nos testes de Shapiro-Wilk e Levene a 5% de probabilidade, sendo transformados em raiz quadrada de $x + 0.5$, onde $x =$

média das variáveis analisadas. As concentrações dos reguladores de crescimento foram analisadas por análise de variância e regressão polinomial pelo programa SISVAR -software livre, cedido pela UFLA (FERREIRA, 2000). Os gráficos foram realizados no programa Excel.

4. Resultados e Discussão

4.1. Efeito de diferentes concentrações de ANA e BAP na germinação de *Ricinus communis*

Aos 10 dias da inoculação do EXP 1, testando as diferentes condições das sementes, sementes inteiras e sementes sem o tegumento, foi realizada a avaliação das características contaminação e oxidação constatando-se, respectivamente, valores de 20% e 50%. A taxa de germinação para as sementes inteiras, com o rompimento do tegumento, emissão da radícula e do cotilédono, foi de 3 % (Figuras 4 A e B e 5 A e B) e as sementes sem o tegumento apresentaram taxa de germinação de 15%.

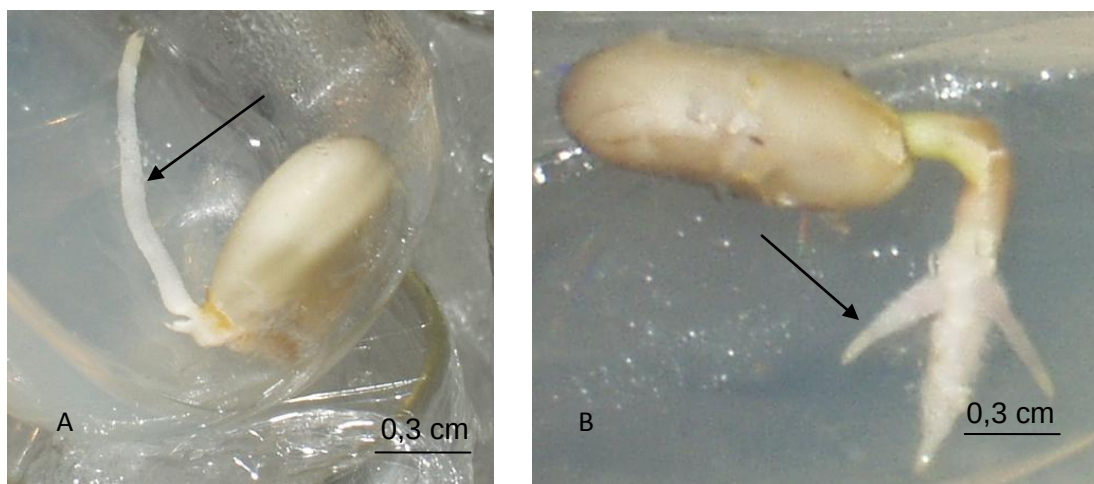


Figura 4: A e B) Experimento 1 -Semente de mamona, sem o tegumento, inoculadas *in vitro*. Setas indicam as radículas. UFU. Uberlândia/MG. 2010.

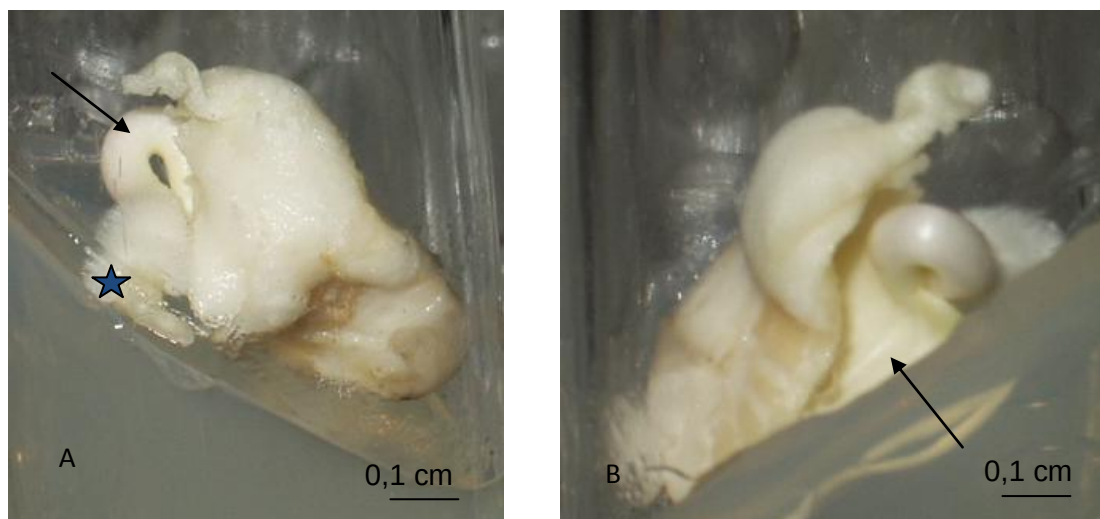


Figura 5: A) Experimento 1 - Semente de mamona, sem o tegumento, inoculada *in vitro*. Seta indica hipocótilo e estrela indica radícula. B) Semente de mamona, sem o tegumento, inoculada *in vitro*. UFU. Uberlândia/MG. 2010.

Os baixos percentuais de germinação das sementes de mamona inteiras podem ter relação com a presença do tegumento da semente, que deveria ser rompido para que a emissão da radícula e do cotilédone fosse possível. Com isso a taxa de germinação das sementes sem o tegumento foi maior que as sementes com tegumento e observou-se elevada taxa de oxidação. Esses fatores foram determinantes para o delineamento e realização do experimento 2, que possuiu como explante sementes sem o tegumento e a adição de um agente antioxidante ao meio, o ácido ascórbico.

No EXP 2, aos 10 dias, a taxa de contaminação foi de 80%. O elevado índice de contaminação pode ser explicado pela manipulação das sementes para a retirada do tegumento. Apesar da desinfestação minuciosa fungos e bactérias internos do explante podem ser expostos pela manipulação.

O uso de solução de hipoclorito de sódio (2,5%), no protocolo de desinfestação, não foi suficiente para eliminar as bactérias presentes nas sementes. Rocha et al. (2003), trabalhando com a mesma espécie, utilizou essa mesma solução, durante 20 min e observou que sementes inteiras e sementes quebradas não são indicadas para o processo de regeneração de mamoneira *in vitro*, por apresentarem alto nível de contaminação por

Aspergillus flavus sp. Nesta espécie é recomendada a utilização de eixo embrionário obtido de semente embebida ou não em água estéril.

A taxa de oxidação, de 29%, foi menor que a observada no EXP 1, demonstrando a ação benéfica do acréscimo do ácido ascórbico. Tal fato pode ser corroborado com o experimento de Melo et al.2001, no qual foi testado efeito de diferentes antioxidantes na germinação e desenvolvimento das plântulas no cultivo *in vitro* de sementes da guarirrobeira, sendo o ácido ascórbico o mais eficiente no controle da oxidação e o que proporcionou a maior porcentagem de germinação.

O uso de antioxidantes no meio de cultura evita taxas elevadas de oxidação pois, essas substâncias agem pela removendo o oxigênio de outras moléculas e, além disso, reagem com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis à oxidação (KANCHANAPOOM et al.2001).

Porém, mesmo com a redução da taxa, a oxidação ainda esteve presente. Pode-se atribuir esse fato pela ocorrência de injúria no explante no momento da retirada do tegumento ou devido ao genótipo da planta (Figura 6). Teixeira (2001) afirma que alguns gêneros de plantas são mais suscetíveis à oxidação fenólica do que outros. Os danos físicos e químicos produzidos no explante e a desinfestação podem contribuir para maximizar o problema.

A oxidação fenólica é um dos sérios problemas que dificultam o estabelecimento inicial do cultivo *in vitro*. A liberação de compostos ocorre devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes. Outra característica dos compostos fenólicos é a sua capacidade de formar complexos quelatos com metais, os quais são facilmente oxidados e formam polímeros (agregados escuros). O escurecimento de um corte é causado por essa reação (OZYIGIT et al.2007).



Figura 6: Experimento 2 - Plântula de mamona germinada à partir de semente sem tegumento. Setas indicam presença de oxidação nas extremidades da radícula e folha. UFU. Uberlândia/MG. 2010.

A taxa de germinação foi analisada em porcentagem, atingindo o valor de 10%. A baixa taxa ocorreu, provavelmente, pela barreira gerada pela elevada contaminação e a presença de compostos fenólicos abaixo e ao redor do explante pois, *in vitro* não ocorre lixiviação, como ocorreria em substrato de cultivo *ex vitro*.

A germinação da semente e a emergência das plântulas de mamona é um processo influenciado por diversos fatores como, temperatura, características físicas do substrato, umidade e disponibilidade de oxigênio. Baixas temperaturas ou falta de oxigênio tornam o processo de germinação lento, podendo demorar até 15 dias entre a inoculação e a emergência das plântulas (AZEVEDO et. al, 2001). Outro fator determinante é o vigor das sementes, que pode ter sido reduzido devido a fatores ambientais, como alta temperatura e excesso de chuvas, na região da lavoura onde elas foram coletadas.

A composição do meio de cultura (formulações salinas, carboidratos, nitrogênio, extratos naturais, balanço hormonal, pH) influencia, também, na taxa de germinação (HU; FERREIRA, 1998). Levando em consideração tal informação, mudanças na composição do meio, em cada experimento, foram realizadas, de acordo com as características apresentadas no decorrer da realização e análise dos experimentos.

Por se tratar de um componente fundamental, a adição de carboidratos ao meio tem sido considerada determinante no desenvolvimento *in vitro* dos explantes, devido à fonte de carbono e à regulação osmótica do meio de cultura (SLESÁK; PRZYWARA, 2003). A sacarose (20 a 40 g.L⁻¹), é a fonte de carbono mais utilizada na cultura de tecidos e órgãos vegetais, devido à rapidez na absorção *in vitro*, quando comparada a outras fontes de carbono (FERREIRA et al.2002). Em todos os experimentos realizados a adição de sacarose foi realizada, sendo a quantidade de 30 g.L⁻¹ um valor satisfatório.

O cultivo *in vitro* de sementes, em condições controladas quanto à disponibilidade de água, temperatura e luminosidade, pode maximizar o processo de germinação. A presença de fitoreguladores, no meio de cultura, possibilita contornar fatores que inibem a germinação, como a presença de inibidores químicos, a imaturidade de embriões e o baixo acúmulo de reservas nutritivas. O suprimento externo dessas substâncias tem a capacidade de incrementar a porcentagem de germinação ou fazer com que o processo seja mais efetivo, rápido e uniforme (HU e FERREIRA, 1998).

A cultura de sementes, em um meio de cultura com composição química conhecida, permite identificar os requerimentos essenciais para o crescimento continuado, a diferenciação e a morfogênese dos embriões (RAGHAVAN, 2003).

4.2. Efeito de diferentes concentrações de ANA e BAP na propagação de *Ricinus communis*

Aos 10, 20 e 30 dias do estabelecimento *in vitro* das gemas do EXP 3, foram analisadas as taxas de contaminação e constatou-se 48%, 62,5% e 80%, respectivamente. Essas altas taxas são consequência, provavelmente, da fonte de material vegetal, ou seja, do explante, assim como encontrado por (ZIV,

2000). Nesse experimento, os explantes vieram do campo e, conforme Medeiros (1999) os níveis de contaminação tendem a ser maiores quando as plantas matrizes, usadas como fonte de explantes, são provenientes desse ambiente. A contaminação na cultura de tecidos é um fator complexo até mesmo nas plantas submetidas a rigoroso controle fitossanitário e mantidas em viveiro protegido ou casa de vegetação, que não deixam de ser fontes potenciais de microorganismos,.

Segundo Teixeira (2001) a contaminação bacteriana e fúngica pode estar presente na superfície dos tecidos de folhas, gemas e segmentos nodais e, além desta contaminação superficial, é freqüente deparar-se com contaminações presentes no interior dos tecidos.

A taxa de oxidação também foi elevada aos 10, 20 e 30 dias e foram encontrados os valores de 0%, 15% e 35%, os quais foram menores que dos experimentos anteriores. No EXP 1 e 2, a presença das vitaminas podem ter provocado ou influenciado a oxidação, pois são substâncias que podem ser oxidadas, o que provoca a oxidação do meio e conseqüentemente do explante. Como, no EXP 3, as vitaminas não foram acrescentadas ao meio, houve a redução da taxa de oxidação..

Para a obtenção de melhores resultados, no EXP 3, foram associados o explante e a luz. O explante escolhido foi a gema da mamoneira que, após a inoculação, foi mantida no escuro, por 7 dias. Quando são utilizados tecidos jovens, a chance de obtenção de êxito na propagação é maior pois, a presença do meristema, propicia uma maior competência organogênica. A luz, como um fator ambiental mais relevante, influencia a organogênese in vitro. A atividade de enzimas no que diz respeito à biossíntese e oxidação de fenóis é aumentada pela luz e dessa forma, o escurecimento dos tecidos pode ser reduzido e até mesmo impedido, caso os explantes sejam cultivados no escuro por até 14 dias (PERES, 2002).

O efeito das diferentes combinações de reguladores de crescimento, adicionados ao meio, proporcionou a brotação dos explantes. Não ocorreu formação de calos, o que demonstrou que o processo de organogênese foi direto (Figura 7). As gemas desenvolveram brotações aos 10, 20 e 30 dias, apresentando valores de 11,6%, 15,83% e 18,3%.



Figura 7: Experimento 3 – Brotação obtida sem formação de calos. Seta indica brotação. UFU. Uberlândia/MG. 2010.

Aos 10, 20 e 30 dias do estabelecimento *in vitro* dos explantes, foram analisados a contaminação, a oxidação, comprimento das brotações e formação de calos. As taxas de contaminação foram de 19,1%, 22,6% e 28,5%, respectivamente. As taxas de oxidação foram de 23,4%, 29,3% e 31,2%.

Os dados de comprimento das brotações e formação de calos foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk), para atender ao requisito de apresentar resíduos seguindo a distribuição normal e de homogeneidade das variâncias (Levene) para verificar se as variâncias eram homogêneas. As probabilidades encontradas, em ambos os testes, foram menores que 0,05; indicando que os resíduos não seguiram distribuição normal e as variâncias eram heterogêneas. A partir disso, foi realizada a transformação de dados para raiz quadrada de $x + 0.5$, onde X = média das variáveis analisadas.

Observou-se que o coeficiente de variação, para os dados transformados, apresentou valores menores como mostra a tabela III.

Tabela III: Coeficiente de variação para os dados brotação e calo, aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento dos explantes. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (%)	DADOS BROTAÇÕES		DADOS CALOS	
	Originais	Transformados	Originais	Transformados
10 dias	74,37	6,40	103,76	15,91
20 dias	60,64	14,17	92,38	18,04
30 dias	53,64	13,99	73,60	16,43

Na análise de variância, para os dados originais, os coeficientes de variação apresentaram valores entre 53 e 104%, valores considerados estatisticamente altos, porém, comuns em cultura de tecidos (RADMANN ET AL.2003; RAMOS EA B CARNEIRO, 2007; REZENDE ET AL.2008). Após a transformação dos dados, esse coeficiente foi reduzido para valores entre 6 e 19%. Os dados transformados passaram a ser usados para a realização de todas as análises subsequentes.

Os resumos das análises de variância, para comprimento das brotações, aos 10, 20 e 30 dias, encontram-se na tabela IV.

Tabela IV: Análise de variância para brotações aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Ricinus communis* sob a ação de ANA e BAP em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

QUADRADOS MÉDIOS				
FV	GL	10 dias	20 dias	30 dias
ANA	3	0.000893 ^{ns}	0.008810 ^{ns}	0.014234 ^{ns}
BAP	3	0.016435*	0.039940 ^{ns}	0.077191*
ANAxBAP	9	0.001286 ^{ns}	0.016312 ^{ns}	0.008556 ^{ns}
Resíduo	48	0.002478	0.018614	0.020024

ns: não significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.

*: significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.

FV: fonte de variação

GL: graus de liberdade

A análise da regressão polinomial para selecionar os modelos com os melhores ajustes às curvas, foi baseada no coeficiente de determinação (R²) e no quadrado médio do resíduo (QMR) enquanto a significância das regressões foi verificada pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Para as doses de ANA e para interação entre as doses de ANA e BAP, em todas as análises realizadas, o teste de *F* a 5% de probabilidade apresentou dados não significativos, assim como as doses de BAP, aos 20 dias. As análises de regressão foram realizadas para o fator BAP aos 10 e 30 dias (Figuras 8 e 9).

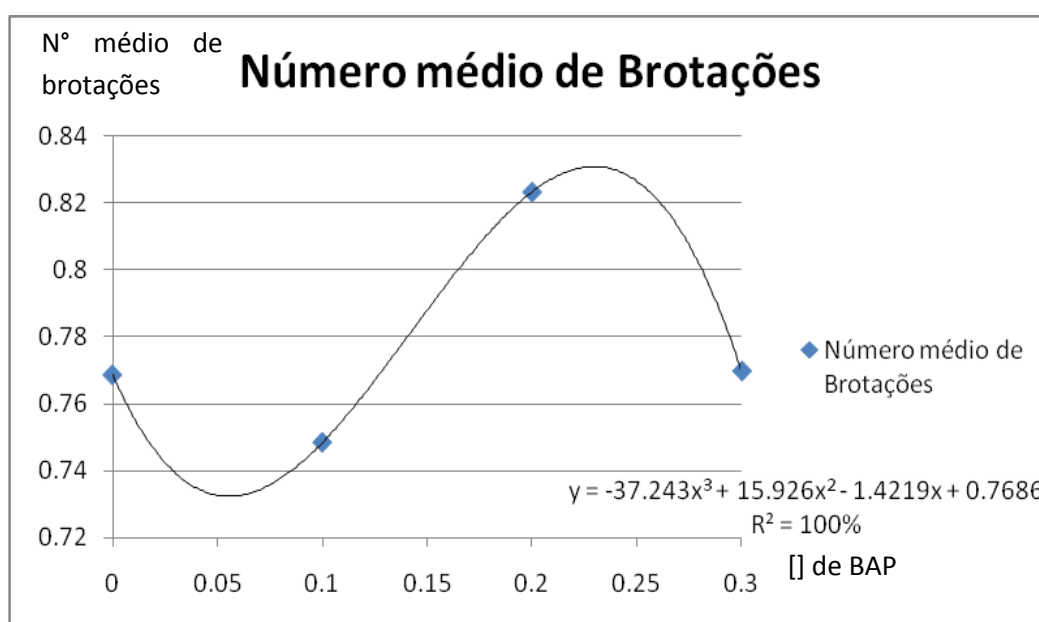


Figura 8: Regressão para o número médio de brotações, aos 10 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

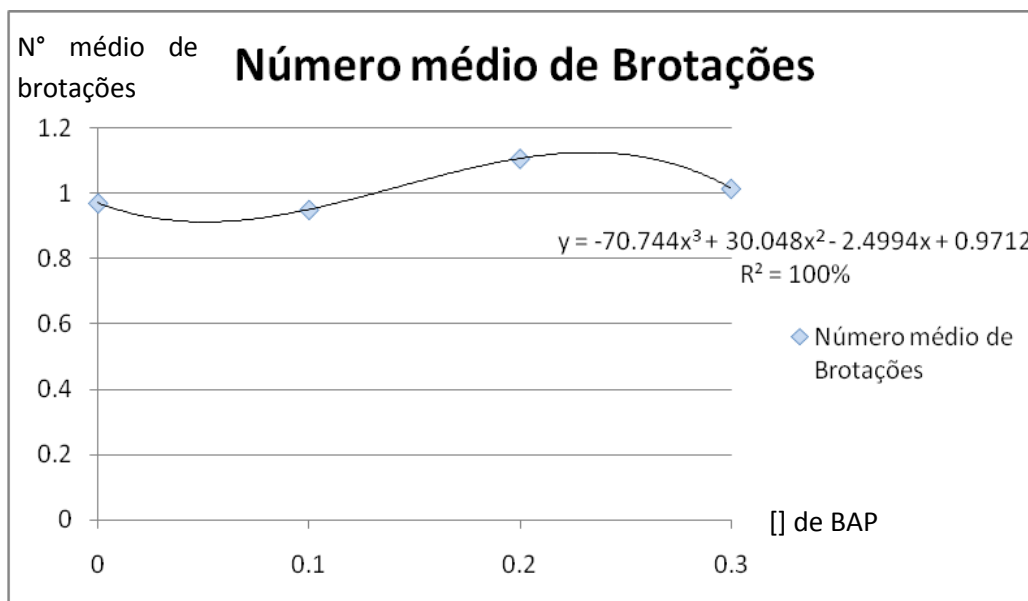


Figura 9: Regressão para o número médio de brotações, aos 30 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

De acordo com Taiz e Zeiger (2004), as citocininas participam da regulação de muitos processos do vegetal, induzindo a divisão celular em calos na presença de auxina, promovendo a formação de gemas ou raízes a partir de calos em cultura, entre outros. O tipo de citocinina, assim como sua concentração, são fatores fundamentais para o bom desempenho da multiplicação *in vitro*. A sua adição ao meio de cultura aumenta a taxa de multiplicação das brotações, tornando o método de micropropagação de gemas mais eficiente.

Segundo esses autores, a presença de auxina no meio de cultura é essencial, pois regulam o crescimento do vegetal, promovendo o desenvolvimento de nós, raízes adventícias e formação de calo. Baixos níveis de auxina são, também, necessários para o alongamento da raiz e altas concentrações atuam inibindo o crescimento desse órgão.

O hormônio BAP foi decisivo na formação dos brotos em *Ricinus communis*, mostrando a importância dos fitorreguladores no desenvolvimento dos explantes dessa espécie inoculados *in vitro*. O comprimento das brotações, nesse experimento, além das doses de BAP suplementadas ao meio MS, foram influenciadas pelo tempo de exposição dos explantes *in vitro* (Figuras 8, 9 e 10). Para os 10 dias valores entre 0,2 e 0,25 mg.L⁻¹ possibilitaram a

produção de maiores brotos, mas aos 30 dias esses valores ficaram entre 0,15 e 0,20 mg.L⁻¹.

A literatura apresenta resultados positivos na indução de brotações com a utilização do hormônio BAP. Batista et al (2001) estudando a indução de superbrotamento nas gemas cotiledonares de gergelim (*Sesamum indicum* L.), utilizaram meio MS para desenvolvimento dos explantes e os hormônios BAP, 2IP e KIN e observaram maior quantidade de brotos no meio MS suplementado com concentrações de BAP.

Na análise da expressão do potencial de organogênese em explantes da canela sassafrás (*Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer), utilizando o meio MS com BAP, foram observados maiores valores de neoformação de gemas de segmentos nodais na concentração de 4 µM desse hormônio (SILVA, et al.2001).

Erig et al.(2003), em pesquisa sobre a multiplicação *in vitro* da amoreira preta (*Rubus idaeus*), e Dzazio et al (2003), estudando a micropropagação da porta-enxerto de videira 420-A, concluíram que a maior quantidade de brotos em cada explante foi observada nos meios com a presença da citocinina BAP.

Furtado (2005) induziu o superbrotamento da cultivar de amendoim BR-1, com o meio MS suplementado com combinações de hormônios 6-benzilaminopurina (BAP), cinetina (KIN) e tiadizuram (TDZ), nas concentrações de 0,0; 0,5; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 mg.L⁻¹ de cada citocinina e obteve a formação de múltiplos brotos para as três citocininas utilizadas.

Veltcheva e Svetleva (2005), com o uso de 1µM BAP na germinação de feijão, aumentou de cinco a sete vezes o número de brotos, por explante. O uso de BAP pode não ter sido o fator determinante mas presumiram que ele aumenta a capacidade regenerativa por estimular a competência na divisão celular, induzindo a proliferação de células competentes preexistentes no tecido.

Carvalho et al. (2004) definiram um protocolo eficiente de propagação de sisal induzindo *in vitro* o superbrotamento com gemas do gênero *Agave*, obtiveram maior número de gemas para o meio MS suplementado com 2,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de ANA e/ou 5,0 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de ANA com 10% de água de coco em ambas as combinações.

Santarém e Astarita, (2003), propuseram um sistema otimizado de micropropagação via organogênese para *Hypericum perforatum*. As culturas *in vitro* foram iniciadas a partir de segmentos nodais de plantas adultas inoculadas em meio MS, suplementado com 4,5 μ M de BAP, KIN ou TDZ, individualmente ou combinados com 0,05 μ M de ANA. A maior média de brotos obtida na fase de proliferação foi de 52,6 brotos, nos explantes induzidos em presença de ANA e BAP.

O mais simples tipo de propagação *in vitro* de plantas é o estímulo ao desenvolvimento de gemas axilares. Essa técnica utiliza a rota ontogênica normal para o desenvolvimento de ramos pelos meristemas axilares. As gemas axilares sofrem tratamento com hormônios para haver a quebra da dormência e produzem brotos a partir desses ramos (PHILLIPS; HUBSTENBERGER, 1995), ocorrendo em *Ricinus communis* L. sob a ação dos hormônios ANA e BAP (Figura 10).

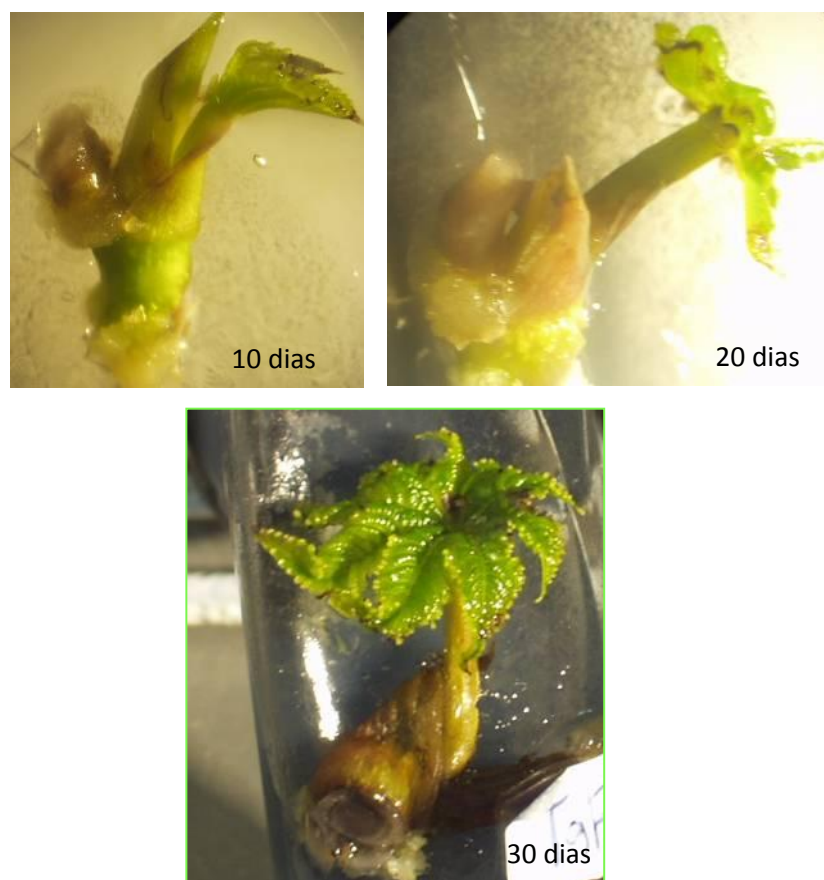


Figura 10: Experimento 4 - Brotações aos 10, 20 e 30 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

Os dados sobre a formação de calos foram analisados e o resumo das análises de variância, para comprimento formação de calos, aos 10, 20 e 30 dias, encontra na Tabela V.

Tabela V: Análise de variância para calos aos 10, 20 e 30 dias de estabelecimento *in vitro* de *Ricinus communis* sobre a ação de ANA e BAP em meio MS. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

QUADRADOS MÉDIOS				
FV	GL	10 dias	20 dias	30 dias
ANA	3	0.068620 ^{ns}	0.030643 ^{ns}	0.052804 ^{ns}
BAP	3	0.263464*	0.060397 ^{ns}	0.044929 ^{ns}
ANAxBAP	9	0.060938 ^{ns}	0.028256 ^{ns}	0.017957 ^{ns}
Resíduo	48	0.075957	0.028794	0.025273

ns: não significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.
 *: significativo, a 5% de probabilidade pelo teste F.
 FV: fonte de variação
 GL: graus de liberdade

A análise da regressão polinomial para selecionar os modelos com os melhores ajustes às curvas, para a formação de calos, foi baseada no coeficiente de determinação (R²) e no quadrado médio do resíduo (QMR), enquanto a significância das regressões foi verificada pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade. Os dados referentes as doses de BAP, aos 10 dias, apresentaram dados significativos para o teste de *F* a 5% de probabilidade, sendo os demais dados não significativos e as análises de regressão foram realizadas para o fator BAP, aos 10 (Figura 11).

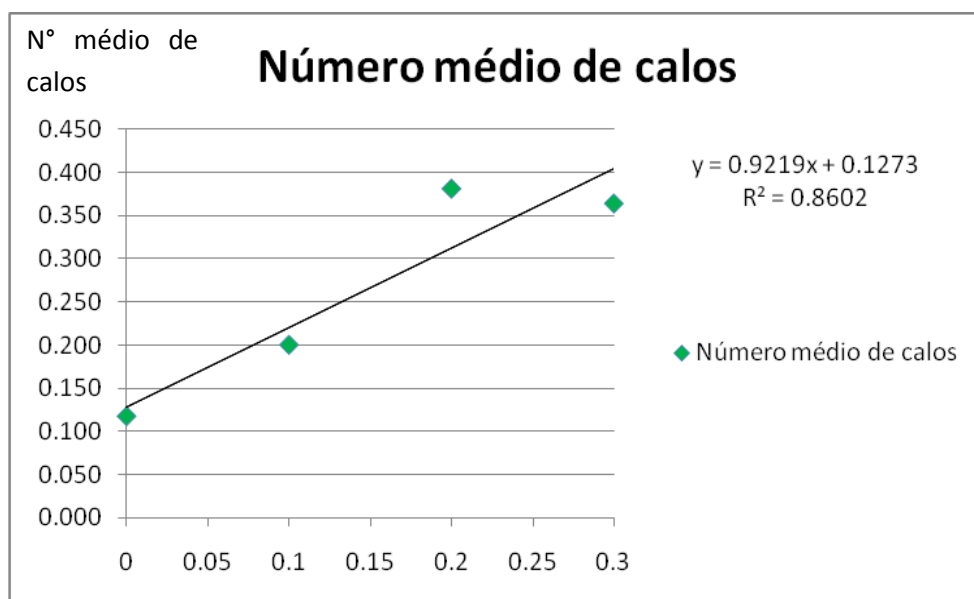


Figura 11: Regressão para o número médio de calos, aos 10 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

Os hormônios vegetais ou fitormônios são substâncias orgânicas naturais, biologicamente ativas em baixas concentrações, sintetizadas em células de divisão ativa do meristema, cuja função é transportar informações e coordenar o desenvolvimento vegetal (RAVEN; CURTIS, 1975; HINOJOSA, 2000). Nesse contexto, as citocininas são indispensáveis à formação de calos, uma vez que são responsáveis pelo início da divisão celular e pelo controle dos processos de crescimento e alongamento celular (TAIZ ; ZEIGER, 2004). As citocininas são, também, necessárias para a divisão celular das plantas com resultado positivo na indução de calo embriogênico (PASQUAL, 2001). A calogênese observada nesse experimento com *Ricinus communis* L. foi favorecida pela ação conjunta dos fitorreguladores ANA e BAP (Figuras 12 A, B e C).

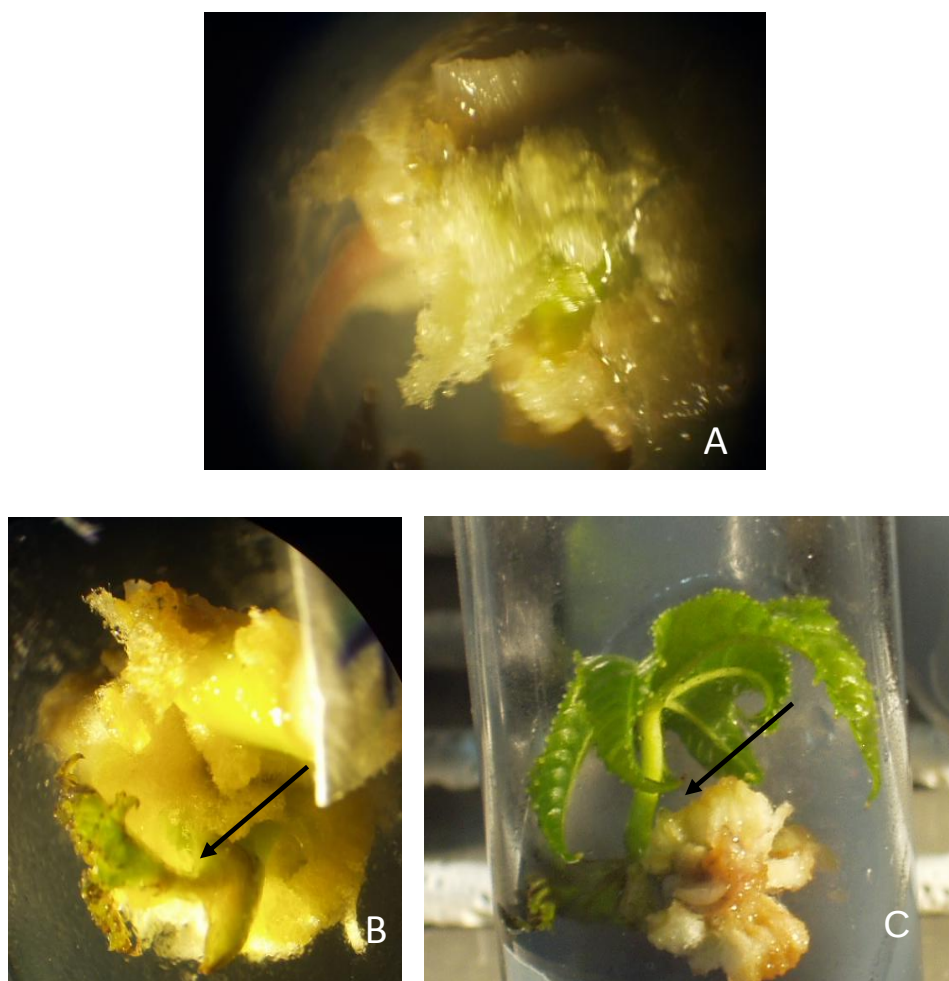


Figura 12: (A) Calo formado aos 20 dias do cultivo *in vitro* de *Ricinus communis* em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. B) Organogênese indireta, aos 20 dias, em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. A seta indica brotos formado. C) Organogênese indireta, aos 30 dias, em meio MS sob ação de diferentes concentrações de ANA e BAP. A seta indica brotos formado. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

A influência positiva da combinação auxina/citocinina também foi verificada em ensaios envolvendo calogênese em diversas cultivares de café (Santos et al., 2000). Durante o processo de formação de calos, Lima et al. (2002) concluíram que BAP promove a formação de calos maiores e mais friáveis e ANA propicia a formação de brotos. Nesse estudo o BAP foi decisivo na formação dos calos, como mostra a Figura 11.

O hormônio BAP, também foi decisivo na formação dos calos em *Ricinus communis*, mostrando a importância dos fitorreguladores no desenvolvimento

dos explantes dessa espécie inoculados *in vitro*. O comprimento esperado dos calos, sem a aplicação de BAP é de 0,1273 cm e a cada 1 mg.L⁻¹ desse hormônio aplicado há um acréscimo de 0,9219 cm no comprimento dos calos.

ARELLANO ; FUENTES (2008) relatam um protocolo de regeneração via organogênese indireta para 10 cultivares de feijão com meristema apical. O meio contendo 22,2 µM de BAP foi o que propiciou maior número de regenerações, 0,5 por calo.

A calogênese é um processo influenciado pelo tipo de explante. No caso em estudo, o explante utilizado, gema apical, possui em sua constituição tecido meristemático, sendo o recomendado por Grattapaglia e Machado (1990) pois explantes que contem maior proporção de tecido meristemático apresentam maior capacidade de expressar a totipotência e formar calos.

A formação de brotos a partir de calos pode vir a formar variantes da cultura de tecidos. Esse tipo de variação observada dentre as plantas regeneradas *in vitro*, definida como variação somaclonal. No experimento observou-se a formação de brotos por organogênese indireta aos 20 dias da inoculação do experimento (Figura 12 A, B e C).

A variação pode as quais podem comprometer a estabilidade genética dos clones ou soma clones produzidos no cultivo *in vitro*. Variações na morfologia de tecidos, variações cromossômicas, bioquímicas e moleculares têm sido evidenciadas em várias espécies de plantas (JOYCE et al.2003). Morfologias alteradas em plantas cultivadas *in vitro* têm sido explicadas por eventos de metilação diferencial em decorrência da condição de estresse *in vitro*. Porém essa mesma variação pode produzir características melhores do que a a planta que a originou, podendo até originar novas cultivares.

5. Referências

AIRES, P. S. R.; CARVALHO, J. M. F. C.; PIMENTEL, N. W.; SILVA, H. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordestina. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 7, n. 2, 2007.

ARELLANO, J.; FUENTES, S.I. Regeneration of different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) via indirect organogenesis. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.96. n.1, p.11-18, 2008.

AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Eds.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.229-256.

BATISTA, R.C.; CARVALHO, J.M.F.C.; ALMEIDA, F. de A.C.; MATA M.E.R.M.C. Micropropagação in vitro de três cultivares de gergelim. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**. v.5, n.3, p. 397-404, 2001.

BOLWELL, G.P. **Dynamic aspects of the extracellular matrix**. Int. Rev. Cytol., v. 146, p. 261-324, 1993.

CARVALHO, J.M.F.C.; CARTAXO, G.; COSTA, N. da; VIDAL, M.S. SANTOS, J.W. dos. Indução in vitro de superbrotamento em gemas de espécies do gênero *Agave*. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, n.2/3, p. 869-873, 2004.

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática. Piracicaba: **Ceres**, 650p. 2005.

CHAVES, A.C.; SCHUCH, M.W.; ERIG, A.C. Estabelecimento e multiplicação in vitro de *Physalis peruviana* L. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 29, n. 6, p. 1281-1287, 2005.

DUNSTAN, D. I.; TAUTORUS, T. E; THORPE, T. A. Somatic embryogenesis in woody plants. In: THORP, T.A. (ed.) **In vitro embryogenesis in plants**. Dordrech: Kluwer Academic, 1995. p.471-538.

DZAZIO, P.M.; BIASI, L.A.; ZANETTE, F. Micropropagação do portaenxerto de videira '420-A'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.3, dez. 2002.

ERIG, A.C.; DE ROSSI, A.; FORTES, G.R. de L. 6-Benzilanopurina e ácido indolbutírico na multiplicação in vitro de amoreira-preta (*Rubus idaeus* L.), cv. Tupy. **Ciência Rural**. [online]. v. 32, n. 5, p. 765-770, 2003.

FEHÉR, A.; PASTERNAK, T.; DUDITS, D. Activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived alfalfa cells: the role of auxin and stress. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, p.13-14, 2002.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45, 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar. 2000. p.225-258.

FERREIRA, M. das G. R. et al. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.24, n.1, p.246-248, 2002.

FRÁGUAS, C.B. Micropropagação e aspectos da anatomia foliar da figueira 'Roxo de Valinhos' em diferentes ambientes.

FURTADO, C.M. Micropropagação da cultivar BR-1 de amendoim (*Arachis hypogaea*) in vitro utilizando citocininas. 2004. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2005.

GAMBORG OL; MILLER RA; OJIMA K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research** 50: 151-158.

GRATTAPAGLIA, D. ;MACHADO, M.A. **Micropropagação**. In: Torre, AC, Caldas LS Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, EMBRAPA, CNPH, p.99-169. 1990.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 183-260.

GUERRA, M. P.; TORRES, A. C.; TEIXEIRA, J. B. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Embrapa-SPI / Embrapa-CNPH, Brasília, v.2, 1999. p.533-568.

HINOJOSA, G. F. Auxinas. In: CID, L. P. B. (Ed.). **Introdução aos hormônios vegetais**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 205p.

HU, C. Y.; FERREIRA, A. G. Cultura de embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA/SPI e EMBRAPA/CNPH, v.1, 1998. p.371-393.

JOYCE S. M., CASSELS A. C., JAIN S. M. **Stress and aberrant phenotypes in vitro culture**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 74, p. 103-121, 2003.

KANCHANAPOOM, K.; CHOURKAEW, B.; PATCHARAPISUTSIN, W. Beneficial of activated charcoal on embryo culture of oil palm (*Elaeis guineensis* Jaccq.). **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Thailand, v.23, n.3, p.317-323, 2001.

LIMA; E. C . Micropropagação, calogênese e anatomia foliar de sangra d' água (*Croton urucurana* Baill). Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 97p. 2004.

MACIEL, AL DE R. Embriogênese somática indireta em *Coffea arabica* L. Dissertação de Mestrado. Lavras, Universidade Federal de Lavras. 60p. 2001.

MALUSZYNSKI, M. Officially released mutant varieties: the FAO/IAEA Database. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.65, p.175-177, 2001.

MEDEIROS, C.P.C. **Indução *in vitro* de respostas morfogênicas em explantes nodais de cajazeira (*Spondias mombin* L.)**. 1999. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

MELO, B.; PINTO, J.E.B.P.; LUZ, J.M.Q.L.; PEIXOTO, J.R.; JULIATTI, F.C. Diferentes antioxidantes no controle da oxidação, germinação e desenvolvimento das plântulas na cultura *in vitro* de embriões da guarirrobeira (*syagrus oleracea* (mart.) Becc.). **Ciência Agrotecnologia**., Lavras, v.25, n.6, p.1301-1306, 2001.

MONTARROYOS, A.V.V. **Contaminação *in vitro***. *ABCTP Notícias*, Brasília, n. 36/37, p. 5-10, 2000.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**, v.15, p.473-479, 1962.

OZYIGIT, I.I.; KAHRAMAN, M.V.; ERCAN, O. (2007). Relation between explants age, total phenols and regeneration response of tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **African Journal Biotechnology**, v. 6, n.1, p.3-8, 2007.

PASQUAL, M. **Meios de cultura**. Lavras: FAEPE/UFLA, 127p. (Textos Acadêmicos). 2001.

PERES. E.P.L. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.44-48, 2002.

PHILLIPS, G.C.; HUBSTENBERGER, J.F. Micropropagation by Proliferation of Axillary Buds. In: GAMBORG, O.L.; PHILLIPS, G.C (eds.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture: fundamental methods*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995, 358p.

PREECE, F. E.; COMPTON, M. E. I. Problems with explant exudation in micropropagation. In: BAJAJ, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry: 17 – High-Tech and micropropagation I*. Berlin: Springer Verlag, p.168-189, 1981.

RADMANN, E. B.; GONÇALVES, E. D.; FORTES, G. R. L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro, no enraizamento "*in vitro*" de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.25, n.1, p.124-126, 2003.

RAGHAVAN, V. One hundred years of zygotic embryo culture investigations. **In Vitro Cellular and Development Biology**, Heidelberg, v.39, n.5, p.437-442, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2001.

RAVEN, P.H.; CURTIS, H. **Integración del crecimiento: fitohormônios**. In: *Biología vegetal*. Barcelona: Omega, 1975. 716p.

RAMOS, T. V.; CARNEIRO, I. F. Multiplicação "*in vitro*" de *cattleya x mesquittae* pelo método de estiolamento de segmentos caulinares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.37, n.1, p.10-15, 2007.

REZENDE, J. C.; PASQUAL, M.; CARVALHO, S. P.; PEREIRA, A. R.; VILLA, F. Influência do meio de cultura e concentração de ágar no crescimento e desenvolvimento de plântulas de café oriundas da embriogênese somática direta. **Scientia Agraria**, v.9, n.1, p.21-26, 2008.

ROCHA, C.V.; BRITO, W.A. **Cultura da mamona**. Aracajú, Série Tecnológica Agropecuária n.5. 2003. 14p.

SANTARÉM, E.R.; ASTARITA, L.V. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.15, n.1, p. 43-47, 2003.

SANTOS, E.K. dos. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L.B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: Ed UFRGS, 2003. p.. 415-444.

SANTOS, R.B; PAIVA, R.; PAIVA, P.D.O.; SANTANA, J.R. Enraizamento. In: R.B; PAIVA, R.; PAIVA (eds.). **Cultura de tecidos**. UFLA, Lavras. M.G. 9:73-79, 2001.

SANTOS; A.C.P, CORDEIRO; A.T, OTONI; W.C, ZAMBOLIM, L.; CAMPOS, M.R.C . Calogênese em *Coffea* via cultura semi-sólida. In: Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil, 1., Poços de Caldas. **Anais**, EMBRAPA/CAFÉ. p.156-159. 2000.

SILVA, J.M.O.D. da. Cultura de embriões imaturos e organogênese. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, n. 20, p. 44-48, 2001.

SKOOG, F.; MILLER, C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. **Symposium of the Society for Experimental Biology**, London, v.11, p.118-1331, 1957.

SPSS Inc. **SPSS for windows base system user's guide release 5.0**. Chicago, 1992. 672p.

SLATER, A.; SCOTT, N.; FOWLER, M. **Plant Biotechnology: the genetic manipulation of plants**. Oxford: Oxford University Press, 2003, 346p.

SLESÁK, H.; PRZYWARA, L. The effect of carbohydrate source on the development of *Brassica napus* L. immature embryos *in vitro*. **Acta Biologica Cracoviensia**, Cracow, v.45, n.2, p.183-190, 2003.

SUTTON, B. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. **Annals of Forest Science**, Les Ulis, v.59, p.657-661, 2002.

SUZIN, M. **Microrganismos e sua relação com plantas**. 2004. Monografia (Especialização em Genética e Evolução Biológica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004. 68p.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed, Porto Alegre, Artmed, 2004, 719p.

TAKAHASHI, E.K. Transferência do gene atacina A para plantas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) por biobalística. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

TEIXEIRA, J.B. **Limitações ao processo de cultivo in vitro de espécies lenhosas**. Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia, simpósios. 2001.

VELTCHEVA, M.; SVETLEVA, D. In vitro regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. **Journal Central European of Agriculture**, v.6, p.53-58, 2005.

VELTCHEVA, M.; SVETLEVA, D.; PETKOVA SP.; PERL, A. *In vitro* regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)—Problems and progress. **Scientia Horticulturae**, v.107, p. 2–10, 2005.

ZIV, M. Bioreactor Technology for Plant Micropropagation. **Horticultural Reviews**, New York, v.24, p.1-30, 2000.

**CAPÍTULO III – Marcadores microssatélites
em *Ricinus communis* L.**



Resumo

Dada a elevada demanda energética mundial faz-se necessária a busca de fontes renováveis e menos agressivas ao meio ambiente como o biodiesel. Uma alternativa viável para a produção de óleo seria o cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) por ser tradicionalmente praticada por pequenos e médios produtores, destacando-se pelo elevado apelo econômico e social. Com a retomada da produção da mamona, é preciso a produção de cultivares melhoradas, com estabilidade genética, alta qualidade e potencial produtivo. Para isso, os materiais genéticos existentes devem ser bem caracterizados para sua utilização em trabalhos de melhoramento, ou ao longo de safras, para suprir a demanda de mercado. Os programas de melhoramento convencionais são extremamente importantes na seleção de novos progenitores, entretanto o tempo gasto para desenvolver e lançar uma variedade é bastante longo. Diante deste cenário, novas metodologias, ligadas ao uso de marcadores moleculares, estão sendo cada vez mais utilizadas dentro dos programas de conservação e uso de recursos genéticos assim como na identificação, caracterização e seleção de cultivares mais promissoras. O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio de marcadores microssatélites, 3 cultivares de mamona, visando a caracterização genética. Para a caracterização molecular foram utilizados 5 iniciadores específicos (*primers*), que não permitiram a distinção genética entre os acessos a partir da análise de produtos amplificados por SSCP.

Palavras-chave: Diversidade genética; Microssatélites, *Ricinus communis*.

Abstract

Due to the high global energy requirement, the search for renewable and less environmental aggressive sources of energy as in the case of biodiesel is desirable. One alternative for the production of oil might be the use of Castor oil plant (*Ricinus communis* L.), once it is a traditional cultivated plant by small and middle size growers, with an elevated economical and social appeal. With the recently increase in production of Castor oil plant, is necessary is the production of cultivars with genetic stability, high quality and production potential. In that sense, the existing genetic materials must be well characterized for its utilization in plant breeding programs and for market supply. The conventional breeding programs are important for the selection of new parents, but the time spent to develop and launch a new variety is quite long. In this scenario, new approaches, linked to the use of molecular markers are being increasingly used in conservation programs and use of genetic resources as well as the identification, characterization and selection of promising cultivars. The aim of this study was to evaluate, using microsatellite markers, three varieties of castor beans, seeking genetic characterization. Molecular characterization were used five specific primers (primers), which did not allow distinction among the accessions from the analysis. Amplified products for SSCP.

Keywords: Genetic diversity; Microsatellites; *Ricinus communis*.

1. Introdução

Devido a seu significado econômico, as plantas há muito tempo tem sido objeto de análise genética destinada a desenvolver variedades melhoradas (GRIFFITHS et al., 2002). As técnicas de genética molecular possibilitaram a exploração dos marcadores de DNA que são úteis na identificação e caracterização molecular de indivíduos e no melhoramento genético (VIANA et. al., 2003). O uso de marcadores de DNA vem se tornando rotineiro nos programas de melhoramento genético de plantas, aumentando a eficiência e proporcionando maiores ganhos genéticos nas principais culturas de interesse econômico (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Marcadores moleculares vêm substituindo ou complementando a caracterização morfológica e agrônômica tradicional, desde que são virtualmente ilimitados, podem cobrir todo o genoma, não são influenciados pelo ambiente e, particularmente em caso de árvores frutíferas, com período juvenil longo, pode ser menor o tempo consumido para a caracterização de novos híbridos (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001). Adicionalmente, esses marcadores tem sido utilizados em estudos de divergência genética, testes de paternidade, identificação de cultivares, mapeamento genético de QTL's (Quantitative Trait Loci), entre outros (MONTALDO; MEZAHERRA, 1998; RAMALHO et. al., 2004).

Os genomas eucariotos são povoados por seqüências simples repetidas, as quais consistem em um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, regiões denominadas microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie, permitindo a seleção de iniciadores (*primers*) específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (CAIXETA, et al., 2006).

Marcadores moleculares baseados em microssatélites têm sido desenvolvidos em várias espécies de plantas cultivadas e estão substituindo rapidamente outros marcadores em vários tipos de estudos genéticos, principalmente devido a sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, pequena quantidade de DNA requerida, baixo custo, grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (BORÉM ; CAIXETA, 2006).

As diferentes repetições de microssatélites podem ser: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; e (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas adjacentes. As repetições compostas podem ser perfeitas ou imperfeitas (BORÉM; CAIXETA, 2006).

A caracterização de acessos de banco de germoplasma, linhagens ou híbridos por meio de marcadores de DNA tem sido de grande importância na proteção do direito intelectual do melhorista, sendo utilizada como prova legal em processos jurídicos, nos países em que já vigoram as leis de proteção de cultivares. Com a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares nº 9.456, de 25 de abril de 1997, o *fingerprinting* genético vem sendo utilizado na caracterização de cultivares assegurando os direitos da propriedade intelectual. O elevado nível de resolução genética e confiabilidade obtida por meio da análise com marcadores moleculares, possibilitam a discriminação entre linhagens ou variedades com base genética estreita, o que é comum entre variedades comerciais (BORÉM, 2005).

A mamoneira, *Ricinus communis* L., por ser uma oleaginosa de elevado valor socioeconômico devido a utilização de seus produtos e subprodutos na indústria e na agricultura e apresentar grande potencial de uso como fonte energética sob a forma de biodiesel (COSTA et al.2006), merece ser melhor caracterizada geneticamente.

Existe grande variabilidade em mamona, quanto ao porte; à coloração e tamanho da folhagem e do caule; ao formato, tamanho, peso e coloração da semente; a cor e ao conteúdo de óleo; e à tolerância a pragas e doenças e ao estresse ambiental (AZEVEDO, et al. 1997). Há escassez de informações sobre a variabilidade genética, em nível de DNA, de coleções de germoplasma brasileiros de *R. communis* L. e, nesse contexto, a caracterização e avaliação das diferentes variedades disponíveis comercialmente e de populações naturais, quanto ao seu potencial de uso, são essenciais no estabelecimento de propostas para os programas de melhoramento da espécie (FIGUEIREDO NETO et al.2004).

Exemplos de cultivares de *Ricinus communis* L., são a BRS 149 – Nordestina, BRS Energia e Guarani. A cultivar **BRS 149 - Nordestina** é

derivada diretamente da cultivar Baianita, possui altura média de 1,90 m, caule de coloração verde com presença de cera, racemo cônico, frutos semideiscentes e sementes de coloração preta. O período entre a emergência e a floração do primeiro racemo é, em média, de 50 dias, enquanto o peso médio de 100 sementes é de 68g, o teor de óleo de 48,9% e média de 35 frutos/cacho, chegando a produzir 5 a 7 cachos. A produtividade média é de 1.500 kg/ha nas condições de pluviosidade normal da região semi-árida do Nordeste. O ciclo da emergência até a última colheita é de 250 dias (EMBRAPA, 1998; EMBRAPA, 2010; ROCHA et al.2003; BARRETO et al.2006).

A precocidade é uma das principais características do cultivar **BRS Energia**, cujo ciclo médio é de 120 dias entre a germinação e a maturação dos últimos racemos. O aparecimento do primeiro cacho ocorre cerca de 30 dias após a germinação. A produtividade média desse cultivar é de 1.800kg/ha, sob as condições edafoclimáticas da região semi-árida do Nordeste. A altura média da planta é de 1,40m, o peso de 100 sementes situa-se em torno de 53g e o teor de óleo é de 48% (EMBRAPA, 2010).

A cultivar **Guarani** foi lançada pelo Instituto Agrônomo/Seção de Oleaginosas, Campinas, SP. Obtida do cruzamento entre a cultivar Campinas e Preta, após seleção e testes regionais de avaliação de linhagens e cultivares, destacou-se pela produtividade e adaptabilidade. Apresenta ciclo de 180 dias, porte médio, fruto indeiscente, hastes rosadas com cera e ramificação fechada (EMBRAPA, 2010).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Vegetal

Foram utilizadas 3 cultivares de *Ricinus communis* L., BRS 149 - Nordestina, BRS Energia e Guarani (Figura 1) cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizada no município de Nova Porteirinha (MG). Foram coletadas folhas jovens recém expandidas, as quais foram devidamente embaladas e acondicionadas, de modo a não perderem integridade, e enviadas, pelo correio, para o Laboratório de Genética

e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.



Figura 1: Fotos das cultivares, da esquerda para direita, BRS 149 – Nordestina, BRS Energia e Guarani. Fonte: www.embrapa.br.

2.2. Extração de DNA

O DNA das cultivares foi extraído seguindo o protocolo CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) com modificações. Foram pesados 100 mg de folhas jovens recém-expandidas, maceradas com a utilização de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, o qual foi transferido para eppendorfs de 2mL, previamente identificados para cada amostra aos quais foram adicionados 700µl de tampão de extração CTAB 2x (brometo de cetiltrimetilamonio) contendo: TRIS (tris- (hidroximetil-aminometano)) - HCl 1 M pH 8,0; NaCl 1,4 M; CTAB 2%; EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 20 mM pH 8,0 e 10 g de PVP (polivinilpirrolidona). Os tubos foram agitados e incubados em banho Maria, durante 60 minutos a 65°C. A cada 15 minutos os tubos foram invertidos lentamente, para homogeneização. Após a retirada do banho os tubos foram mantidos sobre a bancada, para atingirem a temperatura ambiente, foram adicionados 600µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e os tubos agitados levemente por 5 minutos, sendo invertidos por 20 vezes. Os tubos centrifugados, durante 10 minutos, a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos (o clorofórmio desnatura as proteínas que se precipitam pois são insolúveis, permanecendo na fase aquosa, o DNA da amostra). O

sobrenadante foi transferido para novos tubos e 1/10 de uma solução de CTAB 10%, 1,4 M NaCl foi adicionada. Os tubos foram invertidos por 5 minutos e novamente adicionado clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e realizada centrifugação por 10 minutos a 12000 rpm. A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo e acrescentado isopropanol gelado. Os tubos mantidos em freezer (-22 °C) por 4 horas e depois centrifugados a 4000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionados 100µl de etanol 70% para remover as impurezas do precipitado. Centrifugação a 4000 rpm, por 10 minutos e o etanol descartado. Depois o procedimento foi repetido utilizando 100µl de etanol 95%. O precipitado (*pellet*) foi deixado secar à temperatura ambiente por 2 horas para evaporar os resíduos de etanol e dissolvido em 100µl de tampão TE (10 mM Tris-HCL pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) acrescido de 1µl de RNase (10 mg/mL) em cada tubo. Os tubos foram armazenados à temperatura de – 22 °C, em freezer.

2.3. Quantificação do DNA

A qualidade do DNA extraído (Figura 2) foi verificada em gel de agarose com uma concentração de 1% (1g de agarose diluídas em solução tampão TBE 1X [100 mL TBE 10X (0,89M Tris base, 0,89M ácido bórico, 20mM EDTA pH 8,0) e 900 mL de água destilada] e 2µL de Brometo de Etídeo). Foram aplicados 10µL das amostras contendo mais 2µL de solução de azul de bromofenol (30mg de azul de bromofenol mais 3,12g de ficol diluídos em 30mL de água MilliQ). A separação eletroforética foi processada em a 100 V por 40 minutos.

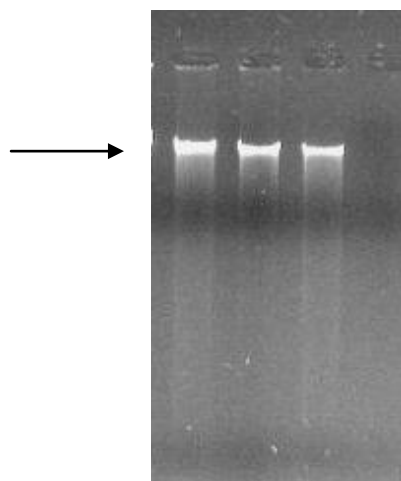


Figura 2: DNA de *Ricinus communis* (seta). Gel de agarose 1%. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

As amostras foram quantificadas em NanoDrop ND-1000. Para todas as amostras foi realizada a extração de DNA em duplicata, assegurando que a quantidade seja suficiente para todas as etapas da pesquisa. O DNA das amostras foi diluído para uma concentração final de 50 ng/μl a fim de se padronizar as reações de PCR.

2.4. Condições de amplificação dos locos microssatélites

Foram selecionados marcadores microssatélites caracterizados para *Ricinus communis* e publicados por Bajay (2009) dos 26 primers descritos foram selecionados 5, considerando as características de alta heterozigose, maior número de alelos observados e locos com motivo de repetição de dois nucleotídeos (dinucleotídeos perfeitos). As informações referentes aos motivos de repetição, o número de alelos observados e amplitude alélica estão apresentadas na Tabela I.

Tabela I: Primers utilizados na análise de microssatélites em *Ricinus communis* L. baseado em (Bajay, 2009). UFU, Uberlândia - MG, 2010.

Locos microssatélites	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)	Motivo nucleotídeos	Número de alelos	Amplitude alélica nucleotídeos
RCo02	F: CTAGCTTTGGGGCACAGTC R: AAAATAGGTGCGTATGAAAC	60	(AC)12	5	230–240
RCo08	F: GTGTGTCTGTGTGCATGTC R: CTCAACCCTTTGCTGTTTC	60	(TG)10	6	280–288
RCo13	F: GTGCTTCCAGAAATTCAGTT R: AGGGGAAAGACAGGATTC	62	(GA)23	6	226–254
RCo26	F: TGCTTGTCAAAGGGGAGTT R: CATTTTGAGGGAGAAACCA	62	(CT)19	9	260–274
RCo30	F: AAACCTTTGGAGCTTGGAGA R: TCCCACACATTCATACACA	60	(AG)19	5	220–240

Inicialmente, os primers foram testados quanto à temperatura de anelamento (45, 50, 60 e 62 °C), e concentrações de DNA (20, 30, 40, 70, 100 e 150ng) (Tabela II) e os resultados verificados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, para obter a melhor condição de amplificação dos fragmentos desejados. A reação de PCR foi processada em Termociclador (MJ Research, Inc., modelo PTC-100), nas seguintes condições: dois minutos a 94°C seguidos por 34 ciclos de um minuto a 94°C (desnaturação), 60°C ou 62°C (anelamento dependendo da SSR) e um minuto a 72°C (extensão) com extensão final por 10 minutos a 72°C. O volume final da reação de PCR (para 100 ng de DNA) foi de 20 µl com:

- 2 µl de DNA (50 ng/ µl) de cada cultivar;
- 2 µl de uma solução de *primers* contendo: [forward (10 µM) + reverse (10 µM)];
- 2 µl de dNTP's (10 mM);
- 1,6 µl de solução tampão (50mM de KCl, 10mM de TRIS-HCl – pH 8,9);
- 0,6 µl de MgCl₂ (50mM)
- 0,2 µl (1 U) de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec ou Platinum);
- 14,6 µl de água ultrapura autoclavada.

Tabela II: Testes de amplificação com diferentes temperaturas (°C) e quantidade de DNA (mg). UFU, Uberlândia - MG, 2010.

Locos	T °C	Quantidade de DNA (mg)
RCo02, RCo08, RCo13, RCo26 e RCo30	45	20,30,40,70,100 e 150
RCo02, RCo08, RCo13, RCo26 e RCo30	50	20,30,40,70,100 e 150
RCo02, RCo08, RCo13, RCo26 e RCo30	60	20,30,40,70,100 e 150
RCo13 e RCo26	62	20,30,40,70,100 e 150

Após as amplificações os produtos foram separados em gel de poliacrilamida 12%. Com 2µL dos produtos das amplificações mais 2µL de solução de azul de bromofenol em cada poço do gel preparado. Parcela de 3µL de cada amostra amplificada foi colocada em tubo de ensaio juntamente com tampão de lise (7µL). Os tubos foram submetidos à temperatura de 95 °C por um minuto, para a desnaturação do DNA, para processamento da técnica LIS – SSCP.

3. Análise dos dados

As amplificações foram verificadas pela presença de banda, em gel de agarose 1%, em comparação com marcador de peso molecular 100 bp DNA (Norgen Biotek). que acompanhou a separação eletroforética e permitiu verificar se a banda no gel correspondia ao fragmento esperado.

Para a análise estatística, foi avaliada a presença ou ausência de bandas de microssatélites nos produtos gerados pela amplificação. Cada loco de SSR foi caracterizado segundo a nitidez de suas bandas e amplitude de seus alelos. O tamanho dos alelos foi determinado pela comparação das bandas presentes no gel e com o tamanho molecular do marcador de DNA *ladder* (Norgen Biotek). As bandas amplificadas foram analisadas visualmente e construída uma matriz considerando os dados binários, onde o valor 1 (um) significa presença de banda e o valor 0 (zero) sua ausência.

4. Resultados e discussão

As reações de PCR foram realizadas com diferentes temperaturas de anelamento e diferentes concentrações de DNA (Tabela II). Os primers para microssatélites RCo02, RCo08 e RCo26 amplificaram nas temperaturas de 60 ° C, 60 ° C e 62 ° C, respectivamente; com concentração de 100 ng de DNA (Figura 3).

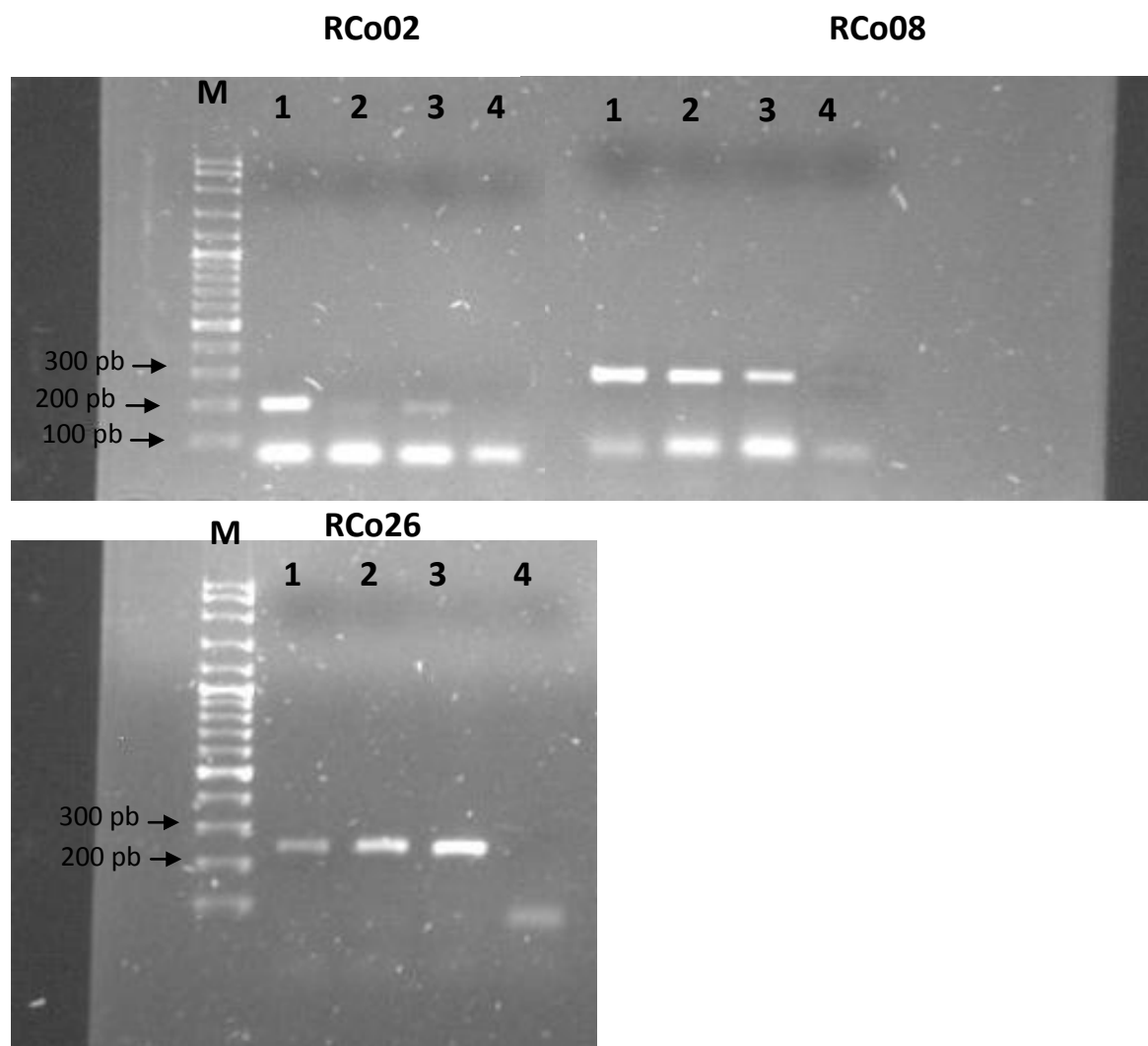


Figura 3: Produtos de PCR para os primers microssatélites RCo02 (230–240 pb), RCo08 (280–288 pb) e RCo26 (260–274pb) para as cultivares (1) BRS Energia, (2) Guarani, (3) BRS Nordestina, (4) branco e (M) marcador molecular. Gel de agarose 1%. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

Os produtos de PCR, após visualização em gel de agarose, foram separados em gel de poliacrilamida e visualizados por coloração com prata (Figura 4).

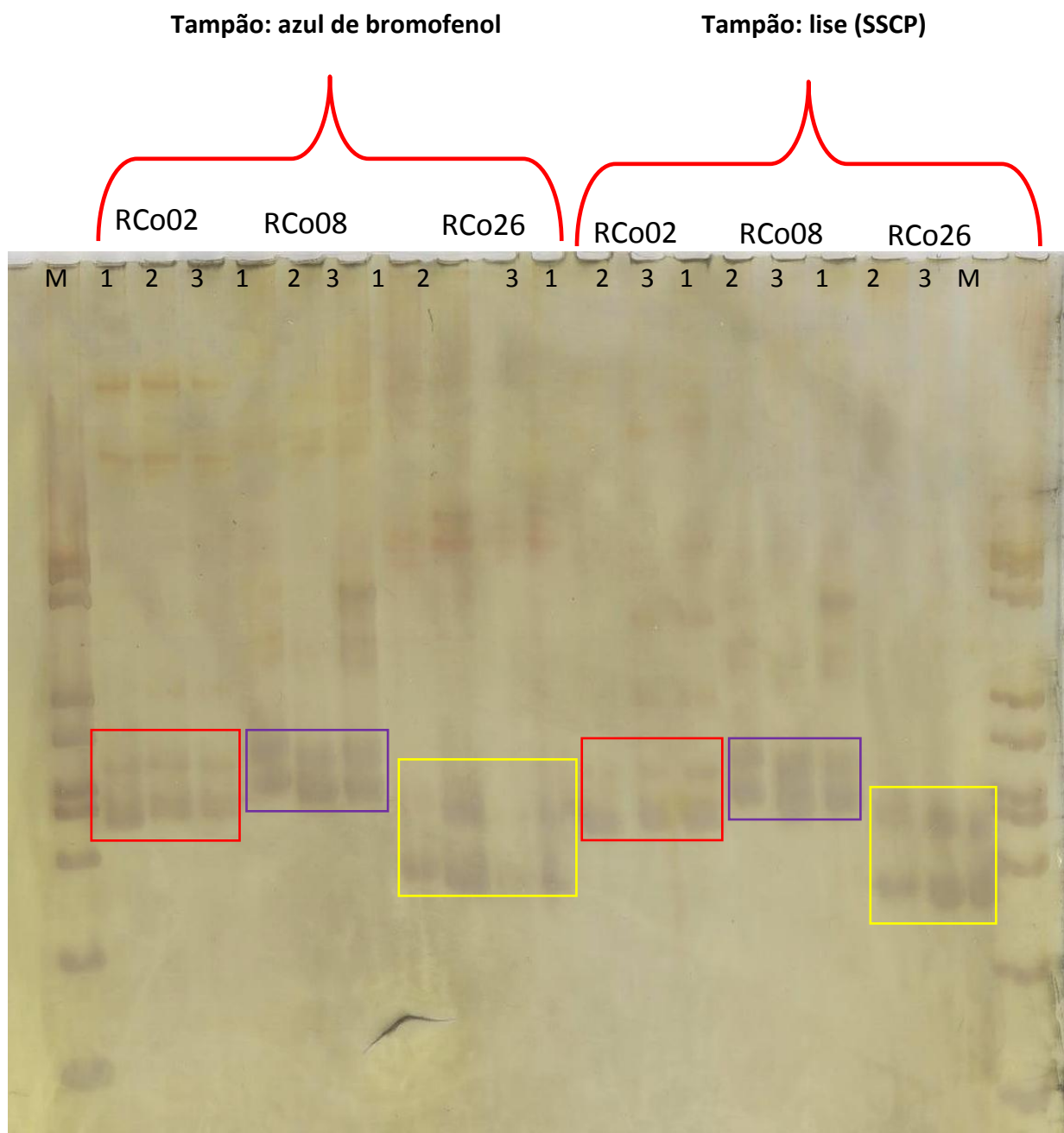


Figura 4: Produtos de PCR para os primers microssatélites RCo02, RCo08 e RCo26 para as cultivares BRS Energia (1), (2) Guarani, (3) BRS Nordestina e M (marcador molecular de 50 pb). Em destaque padrão de bandas amplificadas dos primers microssatélites. Gel de poliacrilamida 12% corado com nitrato de prata. UFU - Uberlândia, MG – 2010.

A escolha da SSR para o presente estudo, baseou-se no fato que esse tipo de marcador apresenta alto nível de polimorfismo, codominância, heterozigosidade, mostrando padrão de herança Mendeliana. Além disso, é possível ser analisado a partir de qualquer tipo de tecido em qualquer estágio de desenvolvimento, com pequena quantidade de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os primers para os microsatélites analisados, em *Ricinus communis* L., RCo02, RCo08 e RCo26, foram desenhados por Bajay (2009).

As seqüências de DNA que flanqueiam os microsatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos. Quando os microsatélites são individualmente amplificados, usando o par de *primers* complementar às seqüências únicas que os flanqueiam, eles quase que invariavelmente mostram extensivo polimorfismo para tamanho. Esta variação no tamanho dos produtos de PCR é consequência da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microsatélite (MORGANTE e OLIVIERI, 1993; McCOUCH et al.1997; CREGAN et al.1999; ASHKENAZI et al.2001).

Com *Ricinus communis* L., para os microsatélites utilizados nesse trabalho, obteve-se bandas com boa reprodutibilidade e idênticas nas cultivares BRS Energia, Guarani e BRS Nordestina. Entretanto não foi possível a identificação de diferenças moleculares entre as cultivares analisadas, apesar de Cunha (2006), relatar a possibilidade de a grande variabilidade apresentada pela mamona, observada em características botânicas e agrônômicas, ser, de forma complementar, avaliada através de polimorfismo de DNA (Figura 4).

A pequena quantidade de microsatélites analisados, 5 (cinco), com amplificação de apenas 3 (três), não permitiu distinguir, devido a ausência de bandas polimórficas, as cultivares BRS Energia, Guarani e BRS Nordestina mesmo usando os motivos AG e AC. Os motivos AG são mais abundantes no genoma de plantas do que os motivos AC, diferentemente do que ocorre no genoma de mamíferos (WEISSENBACH et al.1992) porém, há discordância, uma vez que em algumas espécies os motivos AG são mais abundantes do que os AC (BRONDANI et al.2002) e, em outras, os motivos AC são mais

freqüentes (ECHT e MAY-MARQUARDT, 1997; BRYAN et al.1997; BUTCHER et al.2000). Por isso, neste experimento foram usados ambos motivos mas os resultados não foram promissores.

Estudos moleculares são importantes na avaliação e caracterização de cultivares, permitindo a classificação comercial das variedades e a identificação de genótipos com características desejável, podendo ser essencial tanto para estabelecer diferenças ou semelhanças entre acessos de germoplasma, como para estimular sua utilização para resgatar o desenvolvimento das culturas (FIGUEIREDO NETO et al.2004). No entanto, a análise molecular para as regiões microssatélites aqui estudadas das cultivares BRS Energia, Guarani e BRS Nordestina de *Ricinus communis* L., não permitiu a identificação de diferenças entre elas, porém mostrou que a marcadores microssatélites, são ferramentas que podem ser utilizadas para a espécie pela boa amplificação e reprodutibilidade desses marcadores.

5. Conclusões Gerais

Os resultados da pesquisa com *Ricinus communis* permitem concluir que:

- Para a germinação de *Ricinus communis* recomenda-se a utilização de sementes sem o tegumento.
- A utilização de ácido ascórbico e carvão ativado reduziu a taxa de oxidação dos explantes
- As taxa de brotação de gemas apicais, aos 10 e 30 dias de inoculação dos explantes em meio MS com adição de ácido ascórbico e carvão ativado foi observada devido a ação do fator BAP aos 10 dias e 30 dias de inoculação do experimento no qual valores entre 0,15 e 0,25 mg.L⁻¹ desse hormônio possibilitaram a produção de maiores brotos.
- As taxa de formação de calos, com gemas apicais como explantes, meio MS com adição de ácido ascórbico e carvão ativado, foi observada devido a ação do fator BAP aos 10 dias de inoculação do experimento.

- O comprimento esperado dos calos, sem a aplicação de BAP é de 0,1273 cm e a cada 1 mg.L⁻¹ desse hormônio aplicado há um acréscimo de 0,9219 cm no comprimento dos calos.
- Os marcadores microssatélites RCo02, RCo08 e RCo26 foram amplificados em *Ricinus communis* L.
- Os marcadores microssatélites utilizados não permitiram a distinção por SSCP entre as cultivares BRS Energia, BRS Nordestina e Guarani.

6. Referências

ASHKENAZI, V.; CHANI, E.; LAVI, U.; LEVY, D. HILLEL, J.; VEILLEUX, E. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. **Genome**, Ottawa, v.44, p.50-62, 2001.

AZEVEDO, D. M. P. de.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. **Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA – CNPA, 1997. 52p. (EMBRAPA – CNPA. Circular Técnica, 25).

BARRETO, A.N.; AZEVEDO, D.M.P.; FERREIRA, G.B.; KOURI, J.; AMARAL, J.A.B.; AMARAL, J.G.; SOARES, J.J.; DIAS, J.M.; CARVALHO, J.M.F.C.; SEVERINO, L.S.; MILANI, M.; NÓBREGA, M.B.M.; VIDAL, M.S.; ZANOTTO, M.D.; BELTRÃO, N.E.M.; SUASSUNA, N.D.; SILVA, O.R.R.; SANTOS, R.F.; FREIRE, R.M.M.; PEREIRA, S.R.P.; QUEIROGA, V.P.; LUCENA, W.A.; CARTOXO, W.V.; COUTINHO, W.M.; BRANDÃO, Z.N. **Mamona: O produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília - DF, 2006. 248p. (Embrapa Informações Tecnológicas).

BORÉM, A. 2005. **Melhoramento de plantas**. Editora UFV – Universidade Federal de Viçosa. 4 ed, Viçosa.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.

BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; GRATTAPAGLIA, D. Towards a genus-wide reference linkage map for *Eucalyptus* based exclusively on highly informative microsatellite markers. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.267, p.338-347, 2002.

BRYAN, G.J.; COLLINS, A.J.; STEPHENSON, P.; ORRY, A.; SMITH, J.B.; GALE, M.D. Isolation and characterization of microsatellite from hexaploid bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, p.557-563, 1997.

BUTCHER, P.A.; MORAN, G.F. Genetic linkage mapping in *Acacia mangium*. 2. Development of an integrated map from two outbred pedigrees using RFLP and microsatellite loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.101, p.594-605, 2000.

CAIXETA, E.T; OLIVEIRA, A.C.B; BRITO, G.G; SAKIYAMA, N.S (2006). Tipos de marcadores moleculares. In: Borém A, Caixeta ET (eds.). **Marcadores moleculares**. Editora UFV, Viçosa, p. 10-78.

COSTA, F. X.; BELTRÃO, N. E. de M.; SEVERINO, L. S.; LIMA, V. L. A.; GUIMARÃES, M. M. B.; LUCENA, A. M. A. Resposta do efeito da compactação do solo adubado com torta de mamona nos macronutrientes das folhas da mamoneira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 2., Brasília. **Anais...** Brasília: BIPTI, 2006. 1 CDROM.

CREGAN, P.B.; BHAGWAT, A.A.; AKKAYA, M.S.; RONGWEN, J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5, p.49-61, 1994.

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

ECHT, C.S.; MAY-MARQUARDT, P. Survey of microsatellite DNA in pine. **Genome**, Ottawa, v.40, p.9-17, 1997.

EMBRAPA. **BRS 149 Nordestina.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 1998.

EMBRAPA. **Sistema de Produção da Mamona.** Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona/cultivares.htm>. Acesso em junho 2010.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética.** Brasília. 1998. 121-125p.

FIGUEIREDO NETO, A.; ALMEIDA, F.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**, Campina Grande, v.4, n.2, p.1-10, 2004.

FIGUEREDO NETO, A.; ALMEIDA, F. de A.C.; GOUVEIA, J.P.G. de; NÓBREGA, M.B.M.; CARNEIRO, R.M.; PEDROZA, J.P. Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) baseada nas características de semente. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, p.1-10, 2004.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C. M. 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus x domestica* Bork.) using microsatellites (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, 122:81-89, 2001.

GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEWONTIN, R.C. e GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794p.

McCOUCH, S.R.; CHEN, X.; PANAUD, O.; TEMNYKH, S.; XU, Y.; CHO, Y.G.; HUANG, N.; ISHII, T.; BLAIR, M. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. **Plant Molecular Biology**, Oxford, v.35, p.89-99, 1997.

MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major gene in the genetic improvement of livestock. **Journal of Biotechnology**, Holanda, v.1, n.2, p.83-84, Ago. 1998.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Gainesville, v.3, p.175-182, 1993.

MYCZKOWSKI, M. L.; ZANOTTO, M. D.; AMARAL, J. G. C. Avaliação da variabilidade genética para teor de óleo entre progênies autofecundadas de mamona (*Ricinus cummunis*) da cultivar Guarani. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2, 2003. Porto Seguro. **Anais...** Porto Seguro: SBMP, 2003. 1 CD-ROM.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na Agropecuária**. 3 ed. Lavras: Editora da Universidade de Lavras, 2004. 472p.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, J.F.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 489-493, 2003.

WEISSENBAACH, J.; GYAPAY, G.; DIB, C.; VIGNAL, A.; MORISETTE, J.; MILLASEAU, P.; VAYSSEIX, G.; LATHROP, M. A second generation linkage map of the human genome. **Nature**, London, v.359, p.794-801, 1992.