



**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DA
QUALIDADE DE SEMENTES DE MAMONA**

NÁDIA NARDELY LACERDA DURÃES PARRELLA

2009

NÁDIA NARDELY LACERDA DURÃES PARRELLA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DA QUALIDADE DE SEMENTES
DE MAMONA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Tecnologia e Produção de Sementes, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora
Prof^ª. Maria Laene Moreira de Carvalho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos
da Biblioteca Central da UFLA**

Parrella, Nádya Nardely Lacerda Durães.

Caracterização genética e da qualidade de sementes de mamona /
Nádya Nardely Lacerda Durães Parrella. – Lavras : UFLA, 2009.
86 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.
Orientador: Maria Laene Moreira de Carvalho.
Bibliografia.

1. Semente. 2. Mamona. 3. Cultivar. 4. Variabilidade genética.
5. Qualidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.521
633.85

NÁDIA NARDELY LACERDA DURÃES PARRELLA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E DA QUALIDADE DE SEMENTES
DE MAMONA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de concentração em Tecnologia e Produção de Sementes, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 29 de maio de 2009.

| | |
|--|--------------|
| Dr ^a . Luciane Vilela Rezende | UFLA |
| Dr. Renato Mendes Guimarães | UFLA |
| Dr ^a . Stella Donizete Veiga Franco da Rosa | EMBRAPA CAFÉ |
| Dr. Antonio Rodrigues Vieira | EPAMIG |

Dr^a. Maria Laene Moreira de Carvalho
(Orientador)
UFLA

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

*Ao meu amor, Rafael, companheiro fiel em todos os momentos.
e ao meu querido filho, Arthur Augusto a quem
amo tanto!*

DEDICO

*Aos amados pais Luzinete e Sebastião.
Às queridas, avó Erestina e irmã Nayara.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido saúde e força para concluir este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade concedida.

A CAPES, pela bolsa de estudos.

À professora Dr^a. Maria Laene, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade, dedicação, compreensão e amizade.

Aos membros da banca, Prof. Renato, Prof^a. Luciane, e aos Pesquisadores Stella e Antônio Rodrigues, pelas valiosas sugestões.

Ao professor Dr. João Bosco, pela liberação do Laboratório de Genética Molecular.

Ao Lamartine e a Melina gostaria de dizer que “valeu” pela grande ajuda nas análises moleculares.

Ao senhor Marco Antonio Canestri, Gerente da Regional da EMATER em Lavras, pelo auxílio na coleta das amostras de sementes de mamona em Minas Gerais.

Aos demais professores do curso de Fitotecnia da UFLA, pela convivência e amizade.

A minha vida, Rafael, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis, e pelo amor e carinho dedicados, Te Amo!

A minha vidinha, Arthur. Amo você filho!

Aos meus pais, Luzinete e Sebastião, pelo amor, educação e incentivo na minha profissão. Vocês são tudo para mim!

A minha doce avó Erestina, “Te adoro!”

A minha irmã Nayara, agradeço por tudo e que possa ter servido de incentivo!

A senhor Gerado e dona Graça, pela amizade e carinho.

A todos da família, tios e primos, que de alguma forma foram importantes para o término desse curso.

Aos colegas do LAS, pela ajuda na condução dos experimentos e pela amizade.

Aos colegas da pós-graduação, pelo convívio e amizade.

Aos funcionários do departamento de agricultura e em especial do setor de sementes, pela amizade.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|---------------|
| RESUMO..... | i |
| ABSTRACT..... | iii |
| CAPÍTULO 1..... | 01 |
| 1 Introdução..... | 02 |
| 2 Referencial teórico geral..... | 05 |
| 2.1 Descrição e importância econômica da mamoneira..... | 05 |
| 2.2 Variabilidade genética no melhoramento da mamona..... | 08 |
| 2.3 Extração do DNA genômico..... | 14 |
| 2.4 Métodos para avaliação do potencial fisiológico e sanitário..... | 18 |
| 2.5 Degradação do material genético nas sementes..... | 23 |
| 3 Referências bibliográficas..... | 26 |
| CAPÍTULO 2: Extração do DNA Genômico de Sementes de Mamona (<i>Ricinus communis</i> L.) antes e após armazenamento..... | 36 |
| 1 Resumo..... | 37 |
| 2 Abstract..... | 38 |
| 3 Introdução..... | 39 |
| 4 Material e métodos..... | 40 |
| 4.1 Material Vegetal..... | 40 |
| 4.2 Extração de DNA..... | 41 |
| 5 Resultados e discussões..... | 43 |
| 6 Conclusões..... | 48 |
| 7 Referências bibliográficas..... | 49 |
| CAPÍTULO 3: Caracterização genética, fisiológica e sanitária de sementes de mamona utilizadas na safra 2006 no estado de minas gerais... | 52 |
| 1 Resumo..... | 53 |
| 2 Abstract..... | 54 |
| 3 Introdução..... | 55 |
| 4 Material e métodos..... | 58 |
| 5 Resultados e discussões..... | 64 |
| 5.1 Caracterização das amostras..... | 64 |
| 5.2 Caracterização Molecular..... | 71 |
| 6 Conclusões..... | 78 |
| 7 Referências bibliográficas..... | 79 |
| ANEXOS..... | 84 |

RESUMO

PARRELLA, Nádya Nardely Lacerda Durães. **Caracterização genética e da qualidade de sementes de mamona.** 2009. 86 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

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, inclusive na região Sudeste. Com a retomada da produção da mamona, a semente se tornou um insumo extremamente escasso e um dos grandes desafios atuais da pesquisa agrícola é 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. Atualmente, as análises moleculares na área de produção e tecnologia de sementes são realizadas, principalmente, a partir de amostras de plântulas, sendo necessária a germinação das sementes, implicando em tempo adicional para a avaliação. Diante disso, um dos objetivos do presente trabalho foi o de verificar a viabilidade da extração do DNA genômico diretamente de sementes de mamona. As análises foram realizadas nos Laboratórios de Análise de Sementes e Laboratório de Genética Molecular – UFLA. Foram utilizados cinco cultivares comerciais de mamona e as extrações foram efetuadas a partir de dois tipos de material vegetal: semente e plântulas. Para verificação da viabilidade do DNA após o período de armazenamento, também foram utilizados dois estágios de armazenamento, ou seja, sementes recém colhidas e sementes armazenadas em condições de câmara fria por um período de 2 anos. Para a extração de DNA, foi utilizado um procedimento modificado de Rogers & Bendich (1988). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído de três repetições, sendo cada uma composta por extração de uma amostra de cinco sementes ou das plântulas num esquema fatorial 5x2x2 (cultivares; sementes e plântulas e material vegetal armazenado ou não). Foi possível obter material genético de qualidade diretamente de sementes de mamona em quantidades viáveis para utilização em estudos moleculares sendo que as concentrações de DNA de mamona foram variáveis em relação aos genótipos, ao tipo de material utilizado para extração e também em relação ao período de armazenamento das sementes. Para caracterização molecular das sementes coletadas nas regiões produtoras e verificação da qualidade de sementes de mamona utilizadas no estado de Minas Gerais na safra de 2006 e, foram utilizados 12 lotes de sementes

de mamona de municípios produtores, coletadas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais, EMATER-MG. Pelos testes de avaliação da qualidade de sementes, foi possível detectar variação no potencial fisiológico dos lotes, sendo que 75% deles apresentam germinação abaixo do padrão nacional, além de elevada infestação de microorganismos. Quanto à caracterização molecular, foi utilizado marcador molecular do tipo RAPD, sendo testados 99 oligonucleotídeos, porém apenas 17 foram capazes de gerar bandas de DNA com padrão polimórfico para as amostras avaliadas. Foi revelada alta variabilidade genética entre os genótipos, mesmo se tratando de uma mesma cultivar, o que refletiu a ampla variabilidade morfológica e agrônômica contida no germoplasma da mamona e as altas taxas de alogamia dessa espécie.

Palavras-chaves: Variabilidade genética, qualidade de sementes e cultivares.

Orientadora: Maria Laene Moreira de Carvalho – UFLA

ABSTRACT

PARRELLA, Nádia Nardely Lacerda Durães. **Genetic characterization and quality of castor seeds.** 2009. 86 p. Thesis (Doctorate degree program in Agronomy) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*.

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 including the Southeast region, Brazil. With the recently increase in production of Castor oil plant, plant seeds had become one extremely rare input and one of the biggest challenges for agricultural research 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. Nowadays, molecular analysis in the area of seed production and technology are made, principally, from seedlings samples, thus implying additional time consumption for seed germination before evaluation. Under such circumstances, one of the objectives of the present work was to verify the viability for genomic DNA extraction directly from Castor oil plant seeds. The analyses were performed at the Seed Analysis and Molecular Genetic Laboratories – UFLA, Brazil. Five Castor oil plant commercial cultivars were used and DNA was extracted from two types of vegetal material: seeds and seedlings. In order to verify DNA viability after storage period, two storage stages were also used: fresh harvested seeds and seeds stored in cooling chamber during a period of two years. DNA was extracted according a modified methodology from Rogers & Bendich (1988). The statistical analysis was made in a completely random design with three replicates, each replicate constituted by the DNA extracted from five seeds or seedlings in a 5x2x2 (cultivars: seeds and seedlings: material stored or not), factorial scheme. Genetic material of good quality was obtained directly from Castor oil plant seeds in sufficient quantities for its utilization in molecular studies. Castor oil plant DNA concentrations were variable according to the genotypes, vegetal material used for extraction and time of seed storage. For molecular characterization of seeds collected in the producing regions and the qualitative evaluation of Castor oil plant seeds used during 2006 harvest in the State of Minas Gerais, Brazil, 12 seed lots sampled in producing counties by the Technical Assistance and Rural Extension Enterprise from Minas Gerais State, EMATER-MG, were used. According seed's quality tests performed, there was difference among seed lots physiological potential, with 75 % having germination averages below the

National mean, besides an elevated infestation by microorganisms. In regard to the molecular characterization, a molecular marker RAPD was used, with 99 oligonucleotides tested. Only 17 were able to show DNA bands with polymorphic pattern among the samples evaluated. High genetic variability was found among genotypes, even when using the same cultivar, verifying the elevated morphological and agronomical variability contained in the Castor oil plant germplasm and the high rates of allogamy of this species.

Keys words: Genetic variability, quality of seeds and cultivars.

Adviser: Maria Laene Moreira de Carvalho – UFLA

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis* L.) pode ser encontrada como planta nativa em diferentes partes do mundo, devido à sua fácil propagação, adaptação e estabelecimento. Dentre as matérias primas utilizadas na produção de biodiesel, a mamona se destaca como uma das principais fontes no Brasil, uma vez que, de acordo com Holanda (2004), em estudos multidisciplinares sobre o agronegócio, essa oleaginosa foi considerada a cultura de sequeiro mais rentável em certas áreas semiáridas. Além disso, seu óleo é mais denso e viscoso que os provenientes de outras plantas, como dendê, babaçu, girassol, algodão, entre outras; possui alto rendimento e substitui plenamente os óleos derivados do petróleo; sendo ainda o único na natureza solúvel em álcool; com inúmeras aplicações na indústria como, plásticos, fibras sintéticas, tintas e esmaltes, lubrificantes entre outros. A fabricação do óleo gera subprodutos como a glicerina para fabricação de fármacos, casca para adubos e polpa para ração animal (Vieira et al., 1997; EMBRAPA, 2004).

Um dos grandes desafios para a produção do óleo de mamona para o suprimento da demanda de combustíveis alternativos ao petróleo é a produção de sementes de qualidade e em quantidade suficiente. A escassa utilização de sementes selecionadas no cultivo tradicional da mamona é a principal causa da baixa produtividade e da suscetibilidade às doenças, entre outros problemas agronômicos associados à cultura da oleaginosa (Anthonisen, 2007).

Vários problemas inerentes a cultura da mamona já vem sendo solucionados pelo melhoramento genético, tais como aumento da produtividade e teor de óleo da semente; diminuição do porte da planta e do grau de deiscência do fruto; aumento do nível de resistências de algumas das principais doenças que ocorrem no país (Vieira & Lima, 2006). Porém, o emprego de sementes produzidas ou coletadas pelos próprios agricultores predomina em grande parte

da área de cultivo no país, ocasionando variedades locais com características agrônômicas indesejáveis (Cunha, 2006).

Entretanto, além da qualidade fisiológica e sanitária, a qualidade genética faz-se necessário para implantação de campos produtivos de mamona. A grande variabilidade apresentada pela mamona é observada em características botânicas e agrônômicas, podendo ser avaliada através de polimorfismo de DNA, com o emprego de técnicas tais como marcadores moleculares. Os marcadores moleculares representam ferramentas importantes em diversos estudos, permitindo avaliar, em curto prazo, um número elevado de genótipos, um alto grau de polimorfismo, além de não sofrerem influência ambiental, pleiotrópica ou epistática como ocorre com marcadores morfológicos que apresentam relativa limitação, especialmente com cultivares proximamente relacionadas.

Para a aplicação das técnicas moleculares, se faz necessário a obtenção de metodologias adequadas para o isolamento de DNA de mamona, uma vez que a caracterização bioquímica foliar desta espécie determina a presença de diversas classes de substâncias que constituem contaminantes potenciais durante o processo. Diversos métodos para extração de DNA genômico de plantas estão disponíveis, embora cada espécie e, ainda cada tecido, necessitem de ajustes peculiares. Atualmente, as análises envolvendo marcadores moleculares na área de produção e tecnologias de sementes são realizadas, principalmente, a partir de amostras de plântulas, sendo necessária a germinação das sementes, implicando em tempo adicional para a avaliação.

O objetivo desse trabalho foi verificar a viabilidade da extração do DNA genômico diretamente de sementes de mamona, conhecendo o comportamento do material genético durante o armazenamento dessas sementes e realizar a caracterização molecular dos genótipos além de um diagnóstico sobre a

qualidade fisiológica e sanitária dos lotes de sementes utilizadas em Minas Gerais na implantação de campos de produção de mamona.

2 REFERENCIAL TEÓRICO GERAL

2.1 Descrição e importância econômica da mamoneira

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma euforbiácea rústica, heliófila, resistente à seca, disseminada por diversas regiões do mundo. O interesse pelo cultivo desta oleaginosa se deve às diversas possibilidades de uso do óleo extraído das sementes e à sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais (Silva et al., 2004).

A mamoneira é bastante complexa em relação à fisiologia e morfologia. É uma planta C3 que possui metabolismo fotossintético reduzido em relação a uma planta C4, apresentando elevadas taxas de fotorrespiração. O porte das plantas pode variar desde 80 cm até 8 m de altura, com ramificações caulinares do tipo simpodial, raízes fistulosas e vários tipos de expressão da sexualidade. É considerada uma planta autógama, podendo apresentar até 30% de alogamia. Em geral apresenta as flores masculinas na parte inferior e feminina na parte superior do racemo floral, caracterizando-as como planta monoica, com polinização do tipo anemófila (Souza, 2007). O hábito e crescimento, cor de folhagem e caule, tamanho de semente e conteúdo de óleo também variam bastante nesta espécie. Suas características mais marcantes são a facilidade de adaptação e a velocidade de propagação sob diferentes condições climáticas (Brasil, 1985).

De acordo com Moshkin (1986), a biologia floral da mamoneira possui diversos tipos de expressão de sexualidade: fêmea estável (flores femininas em todos os racemos), fêmea instável (racemo central pistilado e os demais, parciais ou totalmente monóicos), plantas com tendência para fêmea (apresentam um pequeno número de flores masculinas), plantas com poucas flores masculinas ocorrendo em todas as partes do racemo, plantas só com flores masculinas e plantas monóicas (normais). Existem ainda, plantas hermafroditas e, em alguns casos, ocorre a reversão sexual, que se deve a vários fatores tais como manejo da

cultura, ambiente e genética da planta. Portanto, fica evidente que a existência de inúmeras variedades de mamona pode ser justificada pelo fato de a espécie ser politépica, ou seja, subespécies são geradas em função de diferenças de origens morfológica, genética e ecológica.

Quanto aos frutos, a mamoneira apresenta cápsulas do tipo tricoca, com grande variação de tamanho, coloração e presença ou não de espinhos, sendo composto por três lojas, cada uma com um óvulo que quando fecundado, produz uma semente, originando então, três sementes por fruto (Souza, 2007).

A semente é composta de tegumento, rafe, micrópila, carúncula, endosperma, cotilédones e eixo embrionário. Também uma grande variação na cor, forma, tamanho, peso, proporção do tegumento, presença ou ausência de carúncula e maior e menor aderência do tegumento ao endosperma da semente (Mazzani, 1983). Segundo Moshkin (1986), o peso de 100 sementes varia de 10 a 100g, ou seja, 0,1 a 1g por semente, o comprimento varia de 0,8 a 3 cm e a largura de 0,6 a 1,5 cm, e a espessura varia de 0,4 a 1 cm.

Embora as taxas de crescimento da área colhida, produção e rendimento médio da cultura no Brasil tenham sido negativas em diversas safras e os anos 90 tenham representado um período de decadência, o cenário que se estabeleceu com a criação do Probiodiesel, em 2002, é de crescimento da cultura. Além disso, é possível perceber que, nesse mesmo ano, embora a área colhida tenha sofrido redução de 172 para 122 mil hectares, que representa aproximadamente 29%, o rendimento médio da cultura apresentou um incremento de aproximadamente 7%, passando de 582 para 621kg/ha. A área plantada na safra 2007/2008 segundo levantamento da CONAB foi ampliada em mais de 50% nos últimos cinco anos, superando 162,7 mil hectares, com rendimento próximo a 758kg/ha e, apesar da oscilação dos preços de mercado, as elevadas cotações da baga da mamona se mantém em cerca de R\$ 60,00/saca de 60 kg. Para a safra de 2008/2009, foi estimado um aumento de cerca de 1% da área plantada e 5,4% na

produtividade, além de 18,2% a mais na produção que na safra anterior era de 123,4 mil toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2009).

Durante os anos 80, o Proalcool direcionou o interesse dos pesquisadores à cana-de-açúcar, entretanto, desde 2002, com a criação do Pro Biodiesel, Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel, a atenção sobre a biomassa como fonte alternativa de energia voltou a ser ampliada para diferentes espécies (Parente et al., 2003). A mamoneira tem no seu óleo o principal apelo comercial, afinal trata-se de um bem renovável e de baixo custo de produção (Macêdo, 2003). De acordo com Guerreiro et al. (2002 citado por Anthonisen, 2007), além de alternativa na geração de energia, o óleo de mamona e seus derivados têm importância em diversos setores produtivos, como têxtil, celulose e papel, tintas e vernizes, lubrificantes, plásticos, farmacêutico e de cosméticos. Segundo Macêdo (2004), a amêndoa representa 75% em peso da baga e contém entre 43% e 49% de óleo. Na extração do óleo pelo processo industrial utiliza-se a prensagem das sementes a frio ou a quente, para obter óleo tipo padrão límpido, com, no máximo, 1% de acidez e 0,5% de impurezas e umidade, depois de refinado (Baliza et al., 2004).

Para atender à demanda de biodiesel do Brasil, a produção e rendimento da cultura precisam ser incrementados. A produtividade da mamoneira, em kg.ha⁻¹, apresenta faixas variáveis, sendo a média nacional em torno de 600 a 900. As variações das produtividades são devidas a diferenças dos genótipos, modelos de produção adotados e manejo. Segundo Smiderle (2006), já foram conseguidos rendimentos de até 6.705 kg.ha⁻¹, evidenciando o potencial de aumento da produtividade desta cultura.

O estado de Minas Gerais também vem se destacando na produção de mamona, visto que apresenta a maior área plantada da região Sudeste. Na safra de 2007/2008, teve uma área plantada de 5,6 mil ha dos 6,8 mil ha de toda a região Sudeste, isto é, quase 83%. A produção em Minas Gerais alcançou 8.400

toneladas em 2008, sendo a produtividade média de 1505 Kg/ha (CONAB, 2009). Dentre as regiões, a que possui a maior área plantada é o Norte de Minas com 1588 ha, porém a maior produtividade é encontrada no Centro-Oeste, 2480 Kg/ha e a maior produção encontra-se na Zona da Mata, com 1755 toneladas (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais – Emater, 2006). O cultivo da mamona tem sido estimulado no Norte de Minas Gerais, principalmente devido a algumas condições favoráveis, tais como a garantia de comercialização com boa margem de lucro pelas unidades fabris de Montes Claros, Itacarambi e São Francisco. No entanto, como acontece em outras regiões do país, a ricinicultura apresenta um acervo de informações tecnológicas bastante reduzido (Freire et al., 2001). Um dos entraves para a expansão da cultura da mamoneira no país é a produção insuficiente de sementes de qualidade necessárias para a implantação de campos produtivos (Pimenta, 2006).

2.2 Variabilidade genética no melhoramento da mamona

Vários problemas inerentes a cultura da mamona já foram solucionados pelo melhoramento genético, tais como aumento da produtividade e teor de óleo da semente; diminuição do porte da planta e do grau de deiscência do fruto; aumento do nível de resistências a algumas das principais doenças que ocorrem no país (Vieira & Lima, 2006). Porém, o emprego de sementes produzidas ou coletadas pelos próprios agricultores predomina em grande parte da área de cultivo no país, ocasionando variedades locais com características agrônômicas indesejáveis (Cunha, 2006).

O melhoramento da mamona visa solucionar problemas existentes e tem como principais objetivos: aumento da produtividade, precocidade, porte da planta, grau de deiscência dos frutos, resistência as principais pragas e doenças e principalmente aumento de teor de óleo nas sementes. Entretanto, outras

características vêm sendo consideradas num programa de melhoramento de mamona para compor os atributos de cultivares e híbridos como: coloração da haste, tolerância a seca, espinhos e racemo, etc (Savy Filho, 1999).

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). Naquele ano a seção de genética daquele Instituto lançou as bases de um plano de melhoramento, com o objetivo de desenvolver cultivares de mamoneira mais produtivas, com maiores níveis de resistência a doenças e pragas e outras características agronômicas desejáveis (Freire et al., 2001). Diversas cultivares foram desenvolvidas pelo IAC, distintas pela seu desempenho agrônomo, podendo-se destacar: IAC-38, Campinas, Guarani, IAC 80 e IAC 226. Outro programa de melhoramento que vem se destacando também é o da Embrapa/CNPA, Centro nacional de Pesquisa em Algodão, Campina Grande – PB, como desenvolvimento de tecnologia de produção com foco principal nas características ecológicas do semi-árido nordestino. Há duas cultivares comerciais disponíveis: a BRS 149 Nordestina e A BRS 188 Paraguaçu (Cunha, 2006). Porém, outras instituições de pesquisa, bem como algumas empresas de processamento de óleo e derivados, também se encontram envolvidas no aperfeiçoamento de tecnologias de produção de mamona.

Uma das bases do melhoramento genético é a existência de variabilidade, ou seja, diversidade, para seleção de indivíduos superiores nas várias características de interesse. Pode-se definir diversidade genética como a amplitude da variação existente para uma determinada espécie (Allard, 1971). Uma vez que o germoplasma brasileiro é composto por populações locais, a variabilidade genética funde-se naturalmente com o conceito de conjunto gênico. A variabilidade genética estrutura-se sob várias formas, como polimorfismo, séries alélicas, poligenes dentre outras, e a ocorrência de diferenças entre

indivíduos é devida às diferenças existentes nela. Já a diversidade genética, de forma bastante simples, pode ser definida como a distância genética existente entre populações, indivíduos ou organismos, com base numa série de características, que podem ser morfoagronômicas, fisiológicas, bioquímicas, polimorfismo de DNA, dentre outras (Amaral Júnior & Thiébaud, 1999).

A grande variabilidade apresentada pela mamona é observada em características botânicas e agronômicas, podendo, de forma complementar ser avaliada através de polimorfismo de DNA (Cunha, 2006). Meneses et al. (2004) afirmam que entre acessos são comuns diferenças relativas ao conteúdo do óleo e a outras características agronômicas. Isto porque a mamona apresenta sistema reprodutivo misto, ou seja, tanto ocorre autofecundação como cruzamento natural e as taxas de alogamia variam de acordo com o porte da planta (Myczkowski, 2003).

Até os anos 60, estes estudos eram baseados em caracteres morfológicos. Entretanto, quando comparados às características fenotípicas, os marcadores genéticos ampliaram o número de caracteres e sua abrangência sobre as espécies vegetais (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os programas de melhoramento de plantas têm papel fundamental no desenvolvimento de novas cultivares com desempenho agrônômico superior. Para isso é necessário a seleção de genitores com base na variabilidade genética, sendo esta determinada pelos efeitos genéticos e ambientais (Bered et al., 2000). O cruzamento de genitores superiores tem como objetivo, quase sempre a maximização da distância genética com a finalidade de recombinar genes ou complexos gênicos em novas combinações gênicas favoráveis (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Segundo Moreira et al. (1994), a análise da diversidade genética, que consiste na diferenciação do DNA dos componentes de uma população, pode ser obtida em estudos de germoplasma. Murphy (1999) destaca que tem sido fundamental ao sucesso dos programas de melhoramento genético, o uso de

técnicas como o desenvolvimento de mapas moleculares. Para tanto, marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação da Polimerase em Cadeia), podem produzir detalhadas descrições genéticas das mais variadas espécies de forma mais rápida e com menor investimento. De acordo com Milach (1998), uma importante derivação desta técnica é a amplificação ao acaso de fragmentos de DNA (RAPD, *Random Amplified Polymorphism DNA*) que utiliza *primers* de sequência curta e arbitrária. A difusão desta tecnologia na análise genética e no melhoramento de plantas foi rápida auxiliando na avaliação da diversidade genética, no mapeamento genético e na seleção assistida de indivíduos e/ou populações (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A caracterização molecular em associação com a avaliação da divergência genética de mamona tem sido pobremente investigada, porém, já existem alguns estudos a respeito desse assunto. Cunha (2006) utilizou com êxito marcador do tipo RAPD e verificou uma alta diversidade genética do germoplasma de mamona avaliado, o que segundo a autora, refletiu a ampla variabilidade morfológica e agrônômica existente. Segundo Pimenta (2006), os marcadores RAPD permitem uma análise de variabilidade genética rápida e de custo relativamente reduzido, tornando-se bastante acessível, sendo possível verificar uma grande divergência genética entre as variedades avaliadas. Há também muitos relatos do emprego com êxitos do uso de marcadores do tipo RAPD em espécies da família Euphorbiaceae, como a mandioca (*Manihot esculenta*) (Carvalho & Schaal, 2001; Costa et al., 2003), seringueira (*Hevea brasilienses*) (Venkatachalan et al., 2004) e com o buriti (Faleiro et al., 2005), parentes mais próximos da mamona.

A técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) (Welsh & McClelland, 1990; Willian et al., 1990), é uma variação do protocolo PCR, que utiliza apenas um único *primer* com 10 nucleotídeos de comprimento e sequência arbitrária, que se anela em regiões do genoma e sintetiza múltiplos

produtos de amplificação, detectando polimorfismo na ausência de informação específica na seqüência de nucleotídeos de DNA molde (Willian et al., 1990). Portanto, um passo importante para utilização dessa técnica e a escolha dos *primers* a serem utilizados que devem se basear na seguinte ordem: revelar diferenças, produzir bandas bem definidas e favorecer um padrão reproduzível (Loxdale et al., 1996).

O polimorfismo é evidenciado quando há presença ou ausência de bandas após a amplificação e eletroforese em gel. Normalmente, o padrão de reprodução de bandas produzidas por essa técnica é dominante. No caso de indivíduos heterozigotos, a banda também será observada, impossibilitando a distinção de um dos homozigotos do heterzigoto (Carlson et al., 1991).

Em estudos de divergência genética, é necessário o estabelecimento de uma medida (coeficiente) de similaridade entre dois indivíduos, sendo este o ponto de partida para várias técnicas de análise multivariada, que permite melhor visualização dos relacionamentos entre os mesmos (Krzanowski, 1999).

Existem vários métodos que utilizam a dissimilaridade ou distância entre indivíduos de populações para formação de grupos (Wier, 1990). Dentre os diversos coeficientes de similaridade, os mais simples relacionam-se com variáveis dicotômicas, nas quais cada variável tem apenas dois valores. Marcadores do tipo RAPD são binários e incluídos nesse tipo de variável. As quatro possíveis observações de comparação entre dois genótipos são classificadas na presença (1) e ausência (0), como diversos coeficientes têm sido propostos, a escolha do mais apropriado está diretamente relacionada com as suas propriedades. Aspectos como a natureza dos dados e o tipo de análise a ser implantada são igualmente fundamentais para auxiliar na escolha. Assim, alguns dados quantitativos podem ser melhor investigados quando convertidos em dados binários, de modo a reunir todos os valores abaixo e acima de um nível de

interesse. O método de análise também pode limitar a escolha do coeficiente (Alfenas, 1998).

No que se trata de métodos de agrupamento, existe uma enorme diversidade de métodos. Segundo Cruz & Regazzi (1994), os métodos de agrupamento mais utilizados têm sido o método do vizinho mais próximo, o método do vizinho mais distante e o método das medidas das distâncias. No entanto, o princípio geral de todos os métodos de agrupamento tem sido o de maximizar a similaridade dentro dos grupos e a dissimilaridade entre eles (Pimenta, 2006).

O método do vizinho mais próximo também é conhecido como método da ligação simples ou *single linkage*. Inicia-se pela identificação dos itens com menor distância relativa entre si, processada na matriz de distância $n \times n$. Esse par de itens é fundido e gera o primeiro grupo. A seguir, são calculadas as distâncias dos $n-2$ itens restantes, com relação a cada um dos dois itens do primeiro grupo, sendo identificada a menor distância para a matriz de distância reduzida $(n-1) \times (n-1)$. A redução da dimensão da matriz ocorre em virtude de o primeiro grupo formado ser inserido nela como um único item. Nessa sequência, o item identificado como o mais próximo do primeiro grupo é fundido a ele para formar um grupo de três itens. O processo se repete até a formação de um único agrupamento. Já o método do vizinho mais distante é a antítese do vizinho mais próximo, pois opera com o par mais distante dos itens (Cunha, 2006).

O método das medidas das distâncias, o critério utilizado para a formação dos grupos é a medida das distâncias entre pares de itens que formam cada grupo, como a própria denominação informa. É conhecido como método da média aritmética entre pares não ponderados UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average*), desenvolvido por Sokal & Michener (1958).

No entanto, o que há de comum entre todos os três métodos de agrupamento descritos é que eles operam sobre a matriz de distância,

dispensando o retorno à matriz de dados originais (Dias & Kageyama, 1998). O processamento de análises multidimensionais pode ser realizado por meio de *softwares* como, por exemplo, o programa NTSYS – PC 2,0, desenvolvido por Rohlf (2001).

2.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico pode ser obtido em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, constituindo indiretamente uma das vantagens apresentadas nas análises de polimorfismos em estudos moleculares. No intuito de fornecer um material intacto e livre de substâncias que possam inibir reações enzimáticas, além de ser livre de contaminação de DNA não nuclear (cloroplastos e mitocôndrias, por exemplo), a quantidade e pureza são extremamente relevantes na escolha de um protocolo de isolamento de DNA (Cunha, 2006). Vários autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal (Mercado et al., 1999; Romano & Brasileiro, 1999; Kidwell & Osborn, 1992), os quais são resultantes, principalmente, do co-isolamento de polissacarídeos, proteínas, substâncias fenólicas e compostos secundários.

Contaminantes, como os compostos polifenólicos e terpenóides, liberados durante a lise celular, principalmente de tecidos de folhas maduras, aderem irreversivelmente ao DNA, inibindo a digestão com endonucleases de restrição e/ou a amplificação através de PCR - “Polymerase Chain Reaction” (Couch & Fritz, 1990). O rompimento da célula também libera polissacarídeos, os quais são de difícil separação do DNA e inibem muitas diferentes DNA polimerases e enzimas de restrição (Lodhi et al., 1994). Tecidos maduros de muitas espécies de plantas contêm compostos fenólicos envolvidos na defesa contra herbivoria, os quais podem interferir nos procedimentos de extração de DNA. Estes compostos, frequentemente, estão ausentes ou encontra-se em

baixas concentrações, em folhas jovens e em sementes ou pólen (Mitton et al., 1979).

A escolha e a maneira utilizada para coletar e preservar o tecido vegetal é um dos fatores mais importantes na extração do DNA de plantas. Atualmente, as análises envolvendo marcadores moleculares na área de produção e tecnologia de sementes, são realizadas, principalmente, a partir de amostras de plântulas, sendo necessária a germinação das sementes, implicando em tempo adicional para a avaliação. De forma alternativa, o uso de DNA obtido diretamente de tecidos de sementes foi pesquisado com sucesso para várias espécies (Benito et al., 1993; Chunwongse et al., 1993; McDonald et al., 1994; Marcos Filho et al., 1997). Contudo, as sementes possuem baixos teores de ácidos nucléicos, e os níveis de RNA e/ou DNA, por plântula, aumentam precocemente durante a germinação (Street & Öpik, 1970), o que dificulta a utilização dessas na extração de DNA genômico.

A baixa concentração de DNA por grama de semente de milho foi observada anteriormente por Zhang et al. (1996), que verificaram ainda a predominância do DNA obtido do tecido embrionário, seguido do endosperma. O valor reduzido é atribuído à perda de DNA pelo tecido endospermático durante a fase de acúmulo de reservas nas sementes (McDonald et al., 1995). Quando o amido é formado, ocorrem rupturas em organelas e o conteúdo celular é modificado, com redução expressiva da quantidade de ácidos nucléicos, culminando com a morte da célula e total preenchimento pelas reservas. Uma vez que as sementes de milho são constituídas, em maior parte, pelo tecido endospermático, mesmo com elevado conteúdo de DNA no embrião a quantidade em relação à semente inteira é baixa (Ramos et al., 2006). Também, a presença de quantidade elevada de impurezas associadas ao DNA isolado a partir de sementes, contribui para a redução na concentração de DNA extraído. As sementes são estruturas de multiplicação vegetal, com tecido de reserva rico

em carboidratos, lipídios e proteínas, responsáveis pelos suprimentos do embrião durante o processo de germinação (Carvalho & Nakagawa, 2000). Essas substâncias de reserva dificultam o isolamento do DNA, exigindo maior número de lavagens com solvente orgânico (clorofórmio-álcool isolamílico), durante o protocolo de extração. Esse procedimento implica, também, em redução na quantidade total de DNA isolado, pois parte dessas moléculas não se separam de outros compostos orgânicos e são conseqüentemente descartadas (Cunha, 2006).

Tecidos de plântulas ou plantas são usados na maioria dos protocolos para extração de DNA vegetal, pois permitem o isolamento de concentrações elevadas de DNA por amostra. Porém, para laboratórios de análise de sementes, o período necessário para o desenvolvimento dessas estruturas é indesejável e pode comprometer o uso de técnicas moleculares em análises de rotina (McDonald et al., 1994).

De um modo geral, todos os procedimentos para extração de DNA envolvem a quebra ou digestão das paredes e membranas para liberação dos constituintes celulares. Essa etapa é realizada geralmente na presença de gelo ou nitrogênio líquido e posterior quebra mecânica. Após a etapa inicial de quebra, o DNA é liberado em tampão de extração que normalmente contém detergentes, sendo o CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*) amplamente utilizado em espécies vegetais (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O pH do tampão de extração, em torno de 8,0, juntamente com o detergente EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), comumente adicionado ao tampão, fornece proteção contra nucleases endógenas. O EDTA é um agente quelante de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Ca^{+2} , e, portanto inibe a ação de DNAses que usam metais como co-fatores (Sambrook et al., 1989).

Vários produtos podem ser adicionados ao tampão de extração visando evitar efeitos indesejáveis como à oxidação. O PVP (*polyvinylpyrrolidone*) é um antioxidante que inibe a ação de compostos fenólicos. Já a BSA (*bovine serine*

albumine) atua absorvendo os polifenóis, evitando, portanto a ação dessas substâncias que tornam o DNA oxidado e inacessível às enzimas de restrição. O agente redutor 2- mercaptoetanol protege o DNA contra atividades de enzimas tais como peroxidases e polifenoloxidades, desnaturando-as (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Em seguida, é realizada a extração com solventes orgânicos como fenol e/ou clorofórmio: álcool isoamílico para desnaturação das proteínas, as quais ficam retidas na interfase, enquanto o DNA e os contaminantes mantêm-se na fase aquosa. O DNA pode então ser precipitado ou sofrer diferentes tratamentos que o separam dos outros componentes (Romano, 1998). A adição de álcool (isopropanol ou etanol) á fase aquosa promove a precipitação de DNA na presença de sal, que pode ser sedimentado por centrifugação. Ao término do isolamento, o DNA é lavado e suspenso em água ou tampões que permitam seu armazenamento. Purificações por centrifugação por gradiente de densidade de Cloreto de Césio, apesar de laboriosas, são eficientes na remoção de RNA, polissacarídeos, proteínas e outros contaminantes da amostra de DNA (Romano & Brasileiro, 1999). Uma alternativa que vêm sendo utilizada para obtenção de DNA de melhor qualidade é o uso de RNases, que promovem a degradação de RNA, resultando num material genético mais puro.

Não só a qualidade genética, mas outros aspectos de qualidade como o fisiológico e o sanitário devem ser considerados na obtenção de matérias com maior potencial produtivo. As sementes de mamona apresentam problemas de dormência e de microorganismos, havendo necessidade de garantir o potencial fisiológico e sanitário dos materiais.

2.4 Métodos para avaliação do potencial fisiológico e sanitário

A escassa utilização de sementes selecionadas no cultivo tradicional da mamona é a principal causa da baixa produtividade e da suscetibilidade às doenças, entre outros problemas agronômicos associados à cultura da oleaginosa (Anthonisen, 2007). De acordo com Freire et al. (2001) e Azevedo & Lima (2001), a baixa produtividade média observada no Brasil deve-se ao uso de sementes de baixa qualidade, multiplicadas pelos próprios agricultores, acarretando alto grau de heterogeneidade e grande diversidade de tipos locais. Além disso, segundo Savy Filho (2005), a produtividade também está relacionada ao plantio em época adequada.

Para que se tenha conhecimento da qualidade real de um lote de sementes é necessário ter disponíveis métodos que permitam obter resultados uniformes e comparáveis entre diferentes análises e analistas. A fim de se alcançar este objetivo, é imprescindível a disponibilidade de instalações adequadas, pessoal treinado e métodos uniformes, bem como um programa de pesquisa em análise de sementes que procure desenvolver novos métodos e aprimorar os já existentes (Weikert, 1991; McDonald, 1998).

Dessa maneira, a produção de sementes de mamoneira tende a se tornar cada vez mais tecnificada, com a participação de grandes empresas neste segmento de mercado. A obtenção de informações precisas e completas sobre a qualidade das sementes produzidas torna-se importante durante a produção e comercialização, principalmente, em comparação a outras opções para a produção do biodiesel, como a soja, o amendoim e o girassol, que dispõem de tecnologias estabelecidas de produção de sementes (Gaspar-Oliveira et al., 2007). O emprego de sementes de alta qualidade é um fator de grande valia no estabelecimento dos cultivos, possibilitando elevadas produções. Portanto é de fundamental importância a caracterização da qualidade fisiológica das sementes (Lima et al., 2007).

Uma semente de qualidade reflete o desempenho de lotes em diferentes condições de campo, podendo ser avaliado pelo estabelecimento de um estande ideal, pelo potencial produtivo determinado pelas características de melhoramento, ou mesmo pela ausência de contaminantes como pragas, doenças e plantas invasoras (Carvalho et al., 2006). Dentre os atributos que caracterizam a qualidade da semente, o potencial fisiológico é aquele que reflete a capacidade de desempenho das funções vitais da semente caracterizada pela germinação, vigor e longevidade (Poppinigis, 1985). Entre os métodos disponíveis para testar a qualidade das sementes de um modo geral, se destacam os testes de germinação, testes de vigor e viabilidade como tetrazólio e condutividade elétrica, porém o método tradicionalmente usado para avaliar a qualidade fisiológica de sementes de mamona baseia-se na realização do teste de germinação, que demanda no mínimo 14 dias para sua realização (Souza, 2007).

O teste de germinação é definido como sendo a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, em laboratório, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo (Brasil, 1992). Este é conduzido sob condições ótimas, para proporcionar a máxima germinação da amostra analisada. A germinação da semente e a emergência das plântulas de mamona é um processo influenciado por diversos fatores, como temperatura, características físicas do solo, umidade, profundidade de plantio e disponibilidade de oxigênio (Severino et al., 2004). Baixas temperaturas ou falta de oxigênio tornam o processo de germinação lento, podendo demorar até 15 dias entre o plantio e a emergência das plântulas (Azevedo et al., 2001).

A germinação das sementes de mamona é do tipo epígea e, de acordo com as Regras de Análise de Sementes, as temperaturas indicadas para o teste de germinação são de 20°-30°C alternadas, com a primeira contagem aos 7 dias. Recomenda-se ainda que a carúncula das sementes seja retirada para realização

do teste de germinação, por ser uma estrutura propícia ao desenvolvimento de fungos causadores de doenças na plântula (Souza, 2007). A semente apresenta dormência que varia entre cultivares e entre racemos (Lago et al., 1979) tornando-se quase nula após nove meses de armazenamento, independente da cultivar. Porém, essa dormência tem sido pouco detectada em lotes comerciais de mamona.

O vigor é definido pela Associação dos Analistas Oficiais de Sementes, como a manifestação de um conjunto de características que determinam o potencial para emergência e rápido desenvolvimento de plântulas normais, sob ampla diversidade de condições ambientais (Association of Official Seed Analysts – AOSA, 1983). Por esse conceito torna-se muito difícil o desenvolvimento de apenas um teste que indique com precisão razoável o potencial de desempenho das sementes expostas às mais variadas situações, necessitando da realização de outros testes, para se inferir sobre as causas de baixo vigor (Fanan et al., 2009).

Os testes de vigor como tetrazólio e condutividade elétrica se caracterizam pela sua simplicidade e rapidez de execução, mas demandam o desenvolvimento de metodologias específicas para avaliação da qualidade das sementes de mamona. O teste de tetrazólio permite uma rápida avaliação da viabilidade ou vitalidade das sementes; fundamenta-se na alteração da coloração dos tecidos das sementes, em presença de uma solução de sal de tetrazólio, o qual é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos tecidos vivos, resultando num composto chamado formazan, de coloração vermelha carmim. Os tecidos mortos ou muito deteriorados apresentam-se descoloridos. Dessa forma, o padrão de coloração dos tecidos pode ser utilizado para diferenciar sementes viáveis ou vivas das não viáveis (Vieira et al., 1999).

Já o teste de condutividade elétrica baseia-se na avaliação da integridade do sistema de membranas que se desestrutura ao longo do processo de

deterioração. Quando uma semente seca é colocada em água para embeber, verifica-se uma rápida embebição no início, associada à lixiviação de eletrólitos do interior das células para o meio externo. Uma das teorias mais aceita sobre o processo de deterioração das sementes está relacionada com alteração ou perda de integridade das membranas celulares. Em função dessa desorganização das membranas celulares, as sementes sofrem um processo de redução e perda de qualidade, fato esse diretamente relacionado com o aumento da quantidade de lixiviados liberados na água de embebição, ou seja, existe uma relação inversa entre a perda de lixiviados e a qualidade de semente, baseada, principalmente, na perda de integridade de membranas e de constituintes celulares (Bewley & Black, 1994).

As sementes constituem-se em importantes e eficientes veículos de disseminação de patógenos os quais podem causar doenças nas mais diferentes culturas (Fanani et al., 2009). A associação de patógenos com sementes pode afetar, de forma severa, a qualidade fisiológica e sanitária dessas. Muitos desses fungos afetam a germinação das sementes e podem ser transmitidos à progênie resultante, podendo se estabelecer no campo de cultivo e causar redução na qualidade e produtividade das culturas (Castellani et al., 1996).

Dentre os patógenos que estão associados às sementes, o grupo dos fungos é a sua maioria, seguidos pelas bactérias, vírus e nematóides. Em sementes de mamona é comum a alta incidência de fungos, principalmente quando elas são colhidas com alto teor de água. Os fungos reduzem a qualidade das sementes devido ao aquecimento provocado pela respiração e do consumo ou alterações na constituição das reservas, as quais causam a descoloração da semente e a produção de micotoxinas, inibidoras de proteínas e de ácidos nucléicos (Machado, 2000).

Os fungos presentes nas sementes podem ser divididos em dois grupos: de campo e de armazenamento. O primeiro invade as sementes ainda no campo,

requerendo para seu crescimento umidade relativa em torno de 90–95%. Os mais comuns são: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium* (Carvalho & Nakagawa, 2000). Os fungos de armazenamento, por sua vez, podem ter origem no próprio campo ou podem ser adquiridos na fase de pós-colheita, através de contaminações nas etapas de transporte, beneficiamento, tratamentos e nas embalagens (Machado, 1999). Porém, são capazes de sobreviver em ambiente com baixa umidade, proliferando em sucessão aos fungos de campo e causando a deterioração das sementes. Os fungos de armazenamento mais frequente geralmente são *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp (Carvalho & Nakagawa, 2000). Fungos de armazenamento são sensíveis às mudanças de temperatura. Quando a temperatura estiver abaixo de 12–15°C o seu desenvolvimento é bastante reduzido com exceção do *Penicillium* spp. (Lazzari, 1997).

Massola & Bedendo (2005) e Savy Filho (2005) avaliando a qualidade sanitária das sementes de mamona, consideraram os fungos *Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini* causador da murcha de *Fusarium* e *Alternaria ricini* causadora de manchas foliares, como os principais fungos patogênicos, do Estado de São Paulo, transmitidos por sementes. E ainda, dependendo das condições edafoclimáticas, da densidade do inóculo do patógeno nos restos culturais ou no solo e do nível de resistência da cultivar, a murcha de *Fusarium* pode causar sérios danos à cultura da mamona.

Os patógenos, transmissíveis ou não por sementes, também podem afetar-lhes o vigor no campo, tendo efeito ainda mais pronunciado quando se tratam de organismos que colonizam os tecidos internos das sementes. Por outro lado, o baixo vigor de sementes, decorrente de fatores não infecciosos, pode predispor essas estruturas à ação mais severa de patógenos (Carvalho & Nakagawa, 2000). Portanto, a utilização de sementes de alta qualidade expressa pelos componentes genético, físico, fisiológico e sanitário, possibilita a obtenção

de estandes que garantem uma população de plantas com altos rendimentos (Popinigis, 1985).

O teste de sanidade de sementes tem como objetivo determinar a condição sanitária de um lote de sementes, fornecendo informações para programas de certificação, serviços de vigilância vegetal, tratamento de sementes, melhoramento de plantas e outros (Henning, 1994; Machado, 2000).

Dentre as metodologias de testes de sanidade para a detecção de fungos em sementes, os testes com incubação sob condições controladas têm o objetivo de facilitar o crescimento e esporulação dos fungos e a indução de sintomas, o que permite uma identificação rápida e segura do microrganismo envolvido. Os métodos desenvolvidos nos últimos anos incluem técnicas que variam em grau de complexidade. Dentre os métodos considerados simples cita-se o do substrato de papel com suas variações na metodologia. Atualmente, este método é de uso rotineiro em laboratórios de análise por preencher os requisitos de rapidez, simplicidade, baixo custo e permitir o levantamento da microflora associada à diversos tipos de sementes, quantificação do inóculo e avaliação preliminar da germinação (Lucca Filho, 1987; Tanaka, 2001).

2.5 Degradação do material genético nas sementes

A qualidade fisiológica das sementes é máxima por ocasião da maturidade; a partir deste momento processos degenerativos começam a ocorrer. Essas alterações, que podem ser de natureza física, fisiológica ou bioquímica, caracterizam a deterioração, sendo a perda da capacidade germinativa uma das suas conseqüências finais (Spinola et al., 2000). A deterioração é um dos grandes problemas do armazenamento de sementes, principalmente das oleaginosas (Braccini et al., 2001) e ocorre em níveis molecular, genético, celular, de tecido e de população da semente (Matthews, 1985). A sensibilidade das sementes ao processo de deterioração, em determinado ambiente, tem sido

atribuída à constituição genética. Existem diferenças entre as espécies, entre as cultivares dentro de uma mesma espécie e entre as sementes de um mesmo lote (Popinigis, 1985).

As sementes oleaginosas apresentam menor potencial de armazenamento que as amiláceas, devido à menor estabilidade química dos lipídios em relação ao amido, uma vez que uma elevação moderada da temperatura, como consequência do processo respiratório, já é suficiente para a decomposição dos lipídios e elevação da taxa de deterioração. Por esse motivo, as sementes de mamona devem ser armazenadas com grau de umidade inferior ao recomendado para as amiláceas, ou seja, entre 8 e 10% (Fanani, 2009). A deterioração de tais sementes é especialmente importante, pelo seu alto conteúdo de triglicerídios. Durante esse processo, as gorduras presentes na semente sofrem alterações por vias oxidativas e, principalmente, hidrolíticas. Essa última via, mediada por lipases, resulta na produção de ácidos graxos livres. A semente de mamona é particularmente rica em lipases (Bonner, 1950; Davies et al., 1969). Pomeranz (1974) afirma que essas alterações são grandemente aceleradas pela presença de fungos cuja atividade lipolítica é alta.

Dentre as alterações bioquímicas, ocorre a queda na síntese e na integridade do DNA, principalmente do DNA embrionário. As proteínas dos núcleos das células dos embriões das sementes se degeneram com o tempo, causando aberrações cromossômicas que impedem a germinação (Kramer & Kozłowski, 1972; Fontes et al., 2001). Ocorrem também quebras no DNA, causando redução na capacidade de síntese de proteínas (Ghosh et al., 1981), danos no metabolismo de DNA (Vázquez-Ramos, 1996), além de danos cromossômicos durante o envelhecimento (Murata et al., 1981).

Os danos genéticos são um dos principais eventos durante o processo de deterioração de sementes, causando aberrações em cromossomos ou cromátides, e evidenciado que a perda da viabilidade está correlacionada à extensão com que

ocorre este tipo de dano (Roberts, 1988). Segundo McGree (1983) parece haver um acúmulo de mutações indesejáveis com o aumento na idade do tecido que, por fim, conduzem a disfunções metabólicas. Há de considerar, nesse processo, que a severidade dos danos genômicos, assim como a taxa de perda de viabilidade, está diretamente relacionada à temperatura, ao acúmulo de umidade e ao tempo de armazenamento das sementes. Portanto, os mecanismos de deterioração não são mutuamente exclusivos. Um conjunto de mecanismos ou de fatores pode estar interagindo no decorrer do processo (Lopes, 2005). Segundo Colbear (1995), as danificações ao genoma são causas primárias de deterioração, sendo que um pequeno dano pode resultar no acúmulo de pontos de mutação, que podem afetar a morfologia ou o funcionamento das plantas em um estágio mais avançado de crescimento. Pode ocorrer desenvolvimento de plântulas anormais ou esterilidade de grãos de pólen ou, então, a perpetuação de genes recessivos para gerações futuras.

Os danos ao material genético que acontecem durante o processo de deterioração podem ser observados na quantidade e qualidade de DNA extraído das sementes. Marcos Filho et al. (1997), avaliaram as mudanças da integridade do DNA que acontece durante o envelhecimento da semente de soja utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD. Os autores observaram haver diferenças na concentração de DNA extraído de sementes armazenadas em câmara fria e condições ambientais.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos.** Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.

ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas.** São Paulo: E. Blücher, 1971. 381 p.

AMARAL JÚNIOR, A. T.; THIÉBAUT, J. T. L. **Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais.** Campos dos Goytacazes: UENF/CCTA, 1999. 55 p.

ANTHONISEN, D. G. **Caracterização de genótipos de mamona: marcadores RAPD, teor de óleo nas sementes por Soxhlet e RMN e rendimento da extração do óleo usando etanol.** 2007. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook.** East Lansing: AOSA, 1983. 93 p. (Contribution, 32).

AZEVEDO, D. M. P. de; NÓBREGA, L. B. da; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S.; BELTRÃO, N. E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil.** Brasília: Embrapa Algodão, 2001. cap. 6, p. 121-160.

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

BALIZA, D. P.; CARDOSO, M. das G.; VILELA, F. J.; GUIMARÃES L. G. de L.; SILVA, V. de F.; PEREIRA, A. de A.; CASTRO NETO, P.; FRAGA, A. C. **Extração do óleo fixo da torta oriunda da prensagem industrial de sementes de *Ricinus communis* (mamona).** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

BENITO, C.; FIGUEIRAS, A. M.; ZARAGOZA, C.; GALLEGU, F. G.; DE LA PEÑA, A. Rapid identification of triticeae genotypes from single seeds using polymerase chain reaction. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 21, p. 181-183, 1993.

BERED, F.; CARVALHO, F. I. F.; BARBOSA NETO, J. F. Variabilidade genética em trigo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 14, p. 14-17, 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seed physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BONNER, J. **Plant biochemistry**. New York: Academic, 1950. 537 p.

BRACCINI, A. L.; BRACCINI, M. C. L.; SCAPIM, C. A. Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 11, n. 1, p. 10-15, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SND/CLAV, 1992. 365 p.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília: STI/MIC, 1985. 27 p.

CARLSON, J. D.; WHALON, M. E.; GLAUBITE, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 83, n. 2, p. 194-200, 1991.

CARVALHO, L. J. C. B.; SCHAAL, B. A. Assessing genetic diversity in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection in Brazil using PCR based markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 120, p. 133-142, 2001.

CARVALHO, M. L. M.; FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C. Controle de qualidade na produção de semente. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 52-58, maio/jun. 2006.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CASTELLANI, E. E.; SILVA, A.; BARRETO, M.; AGUIAR, I. B. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. var *variegata*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 18, n. 1, p. 41-44, 1996.

CHUNWONGSE, J.; MARTIN, G. B.; TANKSLEY, S. D. Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 694-698, 1993.

COLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: Food Products, 1995. p. 223-277.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2008/2009 – quarto levantamento – jan/2009**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_08.09.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2009.

COSTA, M. R.; CARDOSO, E. R.; OHAZE, M. M. M. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, p. 158-164, 2003.

COUCH, J. A.; FRITZ, P. J. Isolation of DNA from plants high in polyphenolics. **Plant Molecular Biology Reporter**, Netherlands, v. 8, p. 8-12, 1990.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1994. 390 p.

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.

DAVIES, D. D.; GIOVANELLI, J.; REES, T. A. **Bioquímica vegetal**. Barcelona: Ediciones Omega, 1969. 504 p.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y. Multivariate genetic distance and hybrid performance of cação (*Thebroma cação*). **Brazil Journal of Genetic**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 63-70, Mar. 1998.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **A cultura da mamona**. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/index.html>>. Acesso em: 20 dez. 2004.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Relatório de safras 2006**. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas&id=674>. Acesso em: 20 ago. 2006.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; BELLON, G.; PEIXOTO, J. R. **Diversidade genética de variedades comerciais de maracujazeiro-azedo com base em marcadores RAPD**. In: REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO, 4., 2005, Planaltina. **Anais...** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 5-109.

FANAN, S.; MEDINA, P. F.; CAMARGO, M. P.; RAMOS, N. P. Influência da colheita e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 31, n. 1, p. 150-159, 2009.

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

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucariaangustifolia*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2. p. 346-355, mar./abr. 2001.

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

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Germination test improvement for castor bean seeds (*Ricinus communis* L.) In: ISTA CONGRESS, 28.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 15., 2007, Foz do Iguaçu. **Anais...** Bassersdorf: ISTA, 2007. p. 70.

GHOSH, B.; ADHIKARY, J.; BANERJEE, N. C. Changes of some metabolites in rice seeds during ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, n. 1, p. 468-473, 1981.

HENNING, A. A. **Patologia de sementes**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1994. 43 p. (EMBRAPA-CNPSO. Documento, 90).

HOLANDA, A. **Biodiesel e inclusão social**. Brasília: Coordenação de Publicações, 2004. 47 p. (Série Cadernos de altos estudos, 1).

KIDWELL, K. K.; OSBORN, T. C. Simple plant DNA isolation procedures. In: BECKMANN, J. S.; OSBORN, T. C. **Plant genomes: methods for genetic and physical mapping**. London: Kluwer Academic, 1992. p. 1-13.

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 745 p.

KRYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

LAGO, A. A.; ZINKE, E.; RAZERA, L. F.; BANZATTO, N. V.; SAVY FILHO, A. Dormência em sementes de três cultivares de mamona. **Bragantia**, Campinas, v. 38, p. 41-44, 1979.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Paranaset, 1997. 134 p.

LIMA, M. G. de S.; MENDES, C. R.; MORAES, D. M. de; LOPES, N. F.; RODRIGUES, M. A. V. Caracterização da qualidade fisiológica de sementes de mamona cultivar Guarani. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 675-677, jul. 2007.

LODHI, M. A.; YE, G. N.; WEEDEN, N. F.; REISCH, B. I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Reisch, v. 12, p. 6-13, 1994.

LOPES, K. P. **Criopreservação de germoplasma de oleaginosas de importância econômica para o nordeste brasileiro**. 2005. 131 f. Tese (Doutorado em Agronomia) –Universidade Federal da Paraíba, Areia.

LOXDALE, H. D.; BROOKES, C. P.; BARROS, P. J. Application of novel molecular markers (DNA) in agricultural entomology. In: SYMONDSON, W. O. C.; LIDDELL, J. E. **The ecology of agricultural pests: biochemical approaches**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 149-212.

LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. das S. (Ed.). **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.

MACÊDO, M. H. G. **Mamona**. Brasília: CONAB, 2003. 7 p.

MACÊDO, M. H. G. **Mamona**. Brasília: CONAB, 2004. 9 p.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.

MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes**. Lavras: UFLA, 1999. 107 p. Apostila.

MARCOS-FILHO, J.; MCDONALD, M. B.; TEKRONY, D. M.; ZHANG, J. RAPD fragment profiles from deteriorating soybean seeds. **Seed Technology**, Lincoln, v. 19, n. 1, p. 34-44, 1997.

MASSOLA, N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da mamoneira (*Ricinus communis*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2.

MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. **Outlook on Agriculture**, London, v. 14, n. 2, p. 19-23, 1985.

MAZZANI, B. Euforbiáceas oleaginosas, Tártago. In: _____. **Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas**. Caracas: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 1983. p. 277-360.

MCDONALD, M. B.; ELLIOT, L. J.; SWEENEY, M. P. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science & Technology**, Zürich, v. 22, n. 2, p. 171-176, 1994.

MCDONALD, M. B. Seed quality assessment. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 8, n. 2, p. 265-275, June 1998.

MCDONALD, M. D. Genetic purity: from eletrophoresis to RAPDs. In: ANNUAL CORN AND SOEGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 50., 1995, Washington. **Proceeding...** Washington: American Seed Trading Association, 1995. p. 256-271.

MCGREE, D. C. Symposiun: deterioration mechanisms in seeds: introduction. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 73, n. 2, p. 314-317, 1983.

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

MERCADO, J. A.; MANSOURI, I.; JIMÉNEZ-BERMUDEZ, S.; PLIEGO-ALFARO, F.; QUESADA, M. A. A convenient protocol for extraction and purification of DNA from *Fragaria*. **Cellular and Developmental Biology Plant**, Tsukuba City, v. 35, n. 2, p. 152-153, 1999.

MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 140 p.

MITTON, J. B.; LINHART, Y. B.; STURGEON, K. B.; HAMRICK, J. L. Allozyme polymorphism detected in mature needle tissue of Ponderosa pine. **Journal of Heredity**, Iowa City, v. 70, n. 2, p. 86-89, 1979.

MOREIRA, J. A. N.; SANTOS, J. W.; OLIVEIRA, S. R. M. **Abordagem e metodologias para avaliação de germoplasma**. Campina Grande: Embrapa-CNPA, 1994. 115 p.

MOSHKIN, V. A. Flowering and pollination. In: MOSHKIN, V. A. (Ed.). **Castor**. New Delhi: Amerind, 1986. p. 43-49.

MURATA, M.; ROSS, E. E.; TSUCHIYA, T. Chromosome damage induced by artificial seed aging in barley: I. germinability and frequency of aberrant anaphases at first mitosis. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 267-280, 1981.

MURPHY, D. J. The future of new and genetically modified oil crops. In: JANICK, J. **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS, 1999. p. 216- 219.

MYCZKOWSKI, M. L. **Variabilidade genética para o teor de óleo entre progênes autofecundadas de mamona (*Ricinus communis* L.) da cultivar Guarani**. 2003. 33 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.

PARENTE, E. J. S. **Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Tecbio, 2003. 68 p.

PIMENTA, M. R. **Estudo molecular em *Ricinus communis* L., visando a divergência genética, a inibição causada pelo extrato protéico sobre tripsina de *Erinnyis ello* L. e a prospecção de genes do tipo inibidor de tripsina.** 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

POMERANZ, Y. Biochemical, functional, and nutritive changes during storage. In: CHRISTENSEN, C. M. (Ed.). **Storage of cereal grains and their products.** Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1974. p. 56-114.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

RAMOS, N. P.; AMORIM, E. P.; SAVY FILHO, A. Potencial da cultura da mamona como fonte de matéria-prima para o programa nacional de produção e uso de biodiesel. In: CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. (Coord.). **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para biodiesel.** Piracicaba: Esalq, 2006. p. 81-104.

ROBERTS, E. H. Seed ageing: the genome and its expression. In: NOODEN, L. D.; LEOPOLD, A. C. (Ed.). **Senescence and ageing in plants.** San Diego: Academic, 1988. p. 465-498.

ROHLF, J. **NTSYSpc 2.1.** Nova Iorque: Applied Biostatistics, 2000. 1 CD-ROM.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia**, Brasília, v. 2, n. 9, p. 40-43, 1999.

ROMANO, F. Extração de DNA de tecidos vegetais. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C. (Ed.). **Manual de transformação de plantas.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa Cenargen, 1998. 309 p.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIST, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 88 p.

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

SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas.** Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 385-407.

SEVERINO, L. S.; VALE, L. S.; LIMA, R. L. S.; SILVA, M. I. L.; BELTRÃO, N. E. M.; CARDOSO, G. D. C. Repicagem de plântulas de mamoneira visando à produção de mudas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA - ENERGIA E SUSTENTABILIDADE, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

SILVA, S. D. A.; GOMES, C. B.; BUENO, B.; ANTHONISEN, D. G.; GALHARÇA, S. P.; BAMMANN, I.; ZANATTA, Z. G. C. N. Avaliação de cultivares de mamona em Pelotas-RS, Safra 2003/04. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

SMIDERLE, O. J. **A mamona que pode gerar emprego e renda.** 2006. Disponível em:
<http://www.cpafrf.embrapa.br/index.php/cpafrf/artigos/a_mamona_que_pode gerar_emprego_e_renda>. Acesso em: 22 abr. 2006.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical methods for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, Lawrence, v. 38, p. 1409-1438, 1958.

SOUZA, L. A. **Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade de sementes de mamona.** 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SPINOLA, M. C. M.; CÍCERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

STREET, H. E.; OPIK, H. **Fisiologia das angiospermas - crescimento e desenvolvimento.** São Paulo: USP, 1974. 332 p.

TANAKA, M. A. de S. Recentes avanços no desenvolvimento de métodos de detecção de fungos em sementes, no Brasil. **Informativo Abrates**, Londrina, v. 11, n. 1, p. 24-31, 2001.

VÁZQUEZ, E.; MONTIEL, F.; VÁZQUEZ-RAMOS, J. M. DNA ligase activity in deteriorated maize embryo axes during germination: a model relating defects in DNA metabolism in seed to loss of germinability. **Seed Science Research**, Willingford, v. 1, p. 269-273, 1991.

- VENKATACHALAM, P.; PRIYA, P.; SARASWATHY-AMMA, C. K.; THULASEEDHARAM, A. Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD marker in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Mvelli.) Arg.]. **Plant Cell Reports**, Park City, v. 23, p. 327-332, 2004.
- VIEIRA, M. G. G. C.; PINHO, E. V. R. V. Metodologia do teste de tetrazólio em sementes de algodão. In: KRZIZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, 1999. p. 1 -13.
- VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. Diagnóstico e perspectivas da mamoneira no Brasil. In: REUNIÃO TEMÁTICA MATÉRIAS-PRIMAS OLEAGINOSAS NO BRASIL: DIAGNÓSTICO, PERSPECTIVAS E PRIORIDADES DE PESQUISA, 1., 1997, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa-CNPA/MAA/ABIOVE, 1997. p. 139-150. (Embrapa-CNPA. Documentos, 63).
- VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F. **Importância sócio econômica e melhoramento genético da mamoneira no Brasil** - recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. Brasília: Embrapa Algodão, 2006. 8 p.
- WEIKERT, M. J. B. **Comparação e aprimoramento de metodologias do teste padrão de germinação e tetrazólio na determinação da viabilidade de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuai)**. 1991. 58 p. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- WELSH, L.; MCCLELLAND, M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.
- WIER, B. S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. Massachusetts, Sunderland: Sinauer, 1990. 377 p.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBERLIK, A. R.; LIVAK, K. L.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified with arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.
- ZHANG, J.; MCDONALD, M. B.; SWEENEY, M. P. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) from dry seeds of differing soybean and maize genotypes. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 24, n. 2, p. 513-522, 1996.

CAPÍTULO 2

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE SEMENTES DE MAMONA (*Ricinus comunnis* L.) RECÉM COLHIDAS E ARMAZENADAS

1 RESUMO

O isolamento de DNA genômico puro e amplificável da mamona constitui-se num passo crucial para a aplicação das tecnologias de biologia molecular, devido especialmente aos seus altos níveis de compostos secundários. Diversos métodos para extração de DNA genômico de plantas estão disponíveis, embora em Laboratórios de Análises de Sementes o período necessário para o desenvolvimento de plântulas para posterior extração do material genético pode comprometer o uso de técnicas moleculares em análises de rotina e em grandes escalas, onde os fatores tempo e praticidade são imprescindíveis. Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Lavras – UFLA. Foram utilizadas sementes de 5 cultivares comerciais de mamona: Brejeira, IAC 80, Mexicana, Nordestina e Paraguaçu. As extrações foram realizadas a partir de dois tipos de tecido vegetal: plântulas e sementes. Também foram utilizados dois estágios de armazenamento, ou seja, sementes recém colhidas e sementes armazenadas em condições de câmara fria por um período de 2 anos. Para a extração de DNA, foi utilizado um procedimento modificado de Rogers & Bendich (1988). Apesar das substâncias presentes na mamona, a utilização do protocolo estabelecido possibilitou a obtenção de altas concentrações de DNA, podendo ser observadas diferenças altamente significativas ($P \leq 0,01$) para as concentrações de DNA nas 5 cultivares avaliadas, indicando variabilidade genética para esta característica. Nas cultivares Nordestina e Paraguaçu foram obtidas maiores concentrações de DNA, 273,9 e 259,7 ng/ μ L, não diferindo estatisticamente entre si. Maiores concentrações de DNA podem ser obtidas a partir de tecidos frescos, ou seja, plântulas jovens. Porém, apesar das maiores concentrações obtidas de plântulas (207,57 ng/ μ L), as concentrações verificadas nas sementes (179,21 ng/ μ L) também são satisfatórias e em quantidades suficientes para estudos moleculares, como análises de diversidade e identificação de genes de interesse agrônômicos. A concentração média de DNA extraído de semente recém colhida foi superior (231,09 ng/ μ L) à obtida a partir de sementes armazenadas (155,69 ng/ μ L).

2 ABSTRACT

Isolation of pure, amplifiable genomic DNA from Castor oil plant is a critical step in the application of molecular biology techniques, especially due to the presence of high levels of secondary compounds. Various methods for plant genomic DNA extraction are available, however in seed analysis laboratories the period for seedling development to extract genetic material, may jeopardize the use of molecular techniques in routine analysis and great scale analysis, where time and applicability are key factors. This work was performed at the Molecular Genetic's Laboratory from Universidade Federal de Lavras – UFLA, Brazil. Five commercial Castor oil plant cultivars were used: Brejeira, IAC 80, Mexicana, Nordesteina and Paraguaçu. DNA extraction was made from two types of vegetal tissue: seeds and seedlings. Stored and fresh harvested seeds were also used, as fresh harvested seeds and seeds stored in cooling chamber during a period of two years. A method modified from Rogers & Bendich (1988), was used for DNA extraction. Despite substances present in Castor oil plant, the use of the established protocol allowed attaining high DNA concentrations, with highly significant differences ($P < 0,01$) for DNA concentration in all cultivars evaluated, demonstrating genetic variability for this characteristic. Higher DNA concentrations were obtained in Nordesteina and Paraguaçu cultivars, with 273,9 and 259,7 ng/ μ L, without statistical difference among them. Higher DNA concentrations were obtained from fresh tissues, that is, young plants. However, despite the higher concentrations obtained from seedlings (207,57 ng/ μ L), concentrations verified in seeds (179,21 ng/ μ L) are also satisfactory and obtained in enough quantities for molecular studies, as in analysis of diversity and identification of genes of agronomic interest. Mean DNA concentration obtained from fresh harvested seeds was higher (231,09 ng/ μ L) to the obtained from stored seeds (155,69 ng/ μ L).

3 INTRODUÇÃO

A obtenção de DNA genômico de qualidade permite a realização de vários estudos moleculares, como por exemplo, variabilidade genética de populações bem como taxonomia de organismo. Fatores como quantidade e pureza são extremamente relevantes na escolha de um protocolo para isolamento de DNA. Uma das considerações em qualquer procedimento de extração de DNA de plantas é quanto a maneira de coleta, preservação e, principalmente, a escolha do material vegetal utilizado para a extração. O DNA genômico pode ser obtido em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, constituindo indiretamente uma das vantagens apresentadas nas análises de polimorfismos nas análises moleculares.

Atualmente, as análises envolvendo marcadores moleculares na área de produção e tecnologia de sementes é realizada, principalmente, a partir de amostras de plântulas, sendo necessária a germinação das sementes, implicando em tempo adicional para a avaliação. De forma alternativa, o uso de DNA obtido diretamente de tecidos de sementes foi pesquisado com sucesso para várias espécies (Chunwongse et al., 1993; McDonald et al., 1994; Shatters Júnior et al., 1995; Zhang et al., 1996; Marcos Filho et al., 1997; Salgado, 2001).

Portanto, para laboratórios de análise de sementes, o período necessário para o desenvolvimento de plântulas para posterior extração do material genético pode comprometer o uso de técnicas moleculares em análises de rotina e em grandes escalas, onde os fatores tempo e praticidade são imprescindíveis. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi verificar a viabilidade da extração do DNA genômico diretamente de sementes de mamona, bem como conhecer o comportamento do material genético durante o armazenamento dessas sementes.

4 MATERIAS E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras, MG, no período de junho de 2007 a setembro de 2007.

4.1 Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de 5 cultivares comerciais de mamona: Brejeira, IAC 80, Mexicana, Nordestina e Paraguaçu.

As extrações foram realizadas a partir de dois tipos de tecido vegetal: plântulas e sementes. As sementes foram colocadas para germinar em substrato à 25°C até obtenção das plântulas para extração, ou seja, 150mg de tecido foliar. Já na extração do DNA a partir das sementes, inicialmente foi realizada uma escarificação mecânica com um triturador de amostras por aproximadamente 15 segundos.

Para verificação da quantidade do DNA após o período de armazenamento, também foram utilizados dois estágios de armazenamento, ou seja, sementes recém colhidas e sementes armazenadas em condições de câmara fria por um período de 2 anos (Figura1).

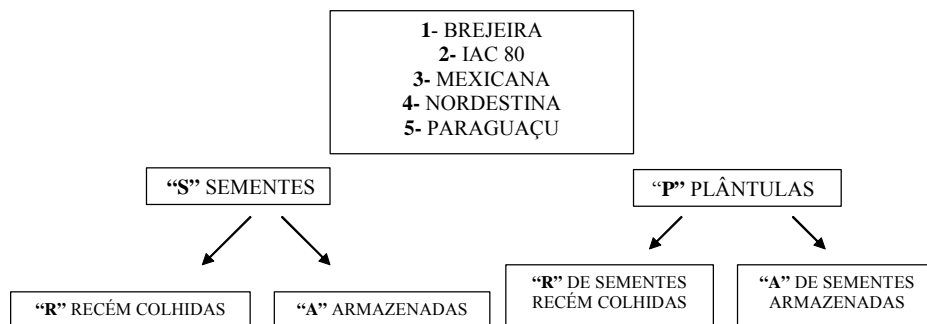


FIGURA 1 Esquema dos tratamentos para extração de DNA genômico de 5 cultivares de mamona, Lavras, 2007.

4.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizado um procedimento modificado de Rogers & Bendich (1988). Para extração das plântulas, as folhas jovens foram maceradas com areia esterilizada, juntamente com 10ml do tampão de extração pré-aquecido a 65°C (0,2g de CTAB; 1 ml de Tris 1M, 0,4 ml de EDTA 0,5M, 0,82 e água pura para completar 10 ml) e 20µl de 2-β- mercaptoetanol. Já na extração das sementes, utilizou-se o mesmo tampão de extração, porém, a partir do material já triturado, ou seja, da pasta obtida. Para evitar reações de oxidações durante a trituração, foi utilizado nitrogênio líquido. Em seguida, o macerado de ambos os tecidos (plântulas e sementes) foi mantido em banho-maria a 65°C por 30-40 minutos, agitando-se 3 a 4 vezes. Posteriormente, foram adicionados 10ml da solução 24 clorofórmio: 1 álcool isoamil e a suspensão foi homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos na velocidade de 5.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, misturado com 30 ml da solução 6:1 (álcool 95°: acetato de amônio) 7,5M e mantido no freezer por cerca de uma noite. Em seguida, foi coletado o DNA e foram adicionados de 200-300µl de Tris

1mM e EDTA 0,1 mM, pH 8,0 (TE). Após o DNA ter se dissolvido, ele foi precipitado com o triplo do seu volume com a solução 20 álcool 95°: 1 acetato de sódio 3M e mantido no freezer por pelo menos uma hora. A solução de álcool-acetato foi eliminada e o DNA, dissolvido em 200-300 µl de TE. A operação seguinte constituiu em quantificar a concentração do DNA em fluorímetro (Hoefer Scientific). Para isso foram usados 2 µl da solução de DNA em 2ml de tampão (Tris 10mM, EDTA 1,0mM, NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1 µg/ml do corante H32258.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, constituído de três repetições, sendo cada uma composta por extração de uma amostra de cinco sementes ou das plântulas num esquema fatorial 5x2x2 (cultivares; sementes, plântulas e material vegetal recém colhidos e armazenado). As médias dos tratamentos foram comparadas utilizando-se teste Scott Knott, a 5 % de probabilidade. Foi utilizado o Programa Estatístico Sisvar.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos (Tabela 1), podem ser observadas diferenças significativas ($P \leq 0,05$) para as concentrações de DNA nas 5 cultivares avaliadas, nos dois tipos de material vegetal (semente e plântula) e também nos dois períodos (antes e após armazenamento), o que indica haver variabilidade genética para estas características, ou seja, a quantidade de material genético extraído varia em função do genótipo, da idade e do tipo de tecido vegetal utilizado.

Pela Tabela 2 é possível observar que as cultivares Nordeste e Paraguaçu tanto antes quanto após o armazenamento apresentaram maiores concentrações de DNA, principalmente quando extraído das sementes. A menor quantidade de DNA extraído foi da cultivar Mexicana nas sementes e plântulas antes do armazenamento e apenas nas sementes após o armazenamento. De modo geral, apesar de ter havido variação na concentração de DNA para as diferentes cultivares, os resultados variaram de 65,83 ng/ μ L no caso da extração das sementes após o armazenamento da cultivar Mexicana até 361,67 ng/ μ L no caso de extração de plântulas obtidas de sementes antes do armazenamento para a cultivar Paraguaçu. Variações na concentração de DNA em função do genótipo também foram observadas em sementes de soja quando comparadas cinco cultivares em trabalhos realizados por Marcos Filho et al. (1997).

A única variação significativa observada entre as concentrações de plântulas e sementes ocorreu para a cultivar IAC80 com superioridade para a concentração de DNA extraído de plântulas (312,33 ng/ μ L) antes do armazenamento. Ferreira & Grattapaglia (1996), relataram que vários tipos de tecidos de plantas podem ser usados como fonte de DNA, inclusive sementes. Entretanto, tecidos vegetais em sua fase de crescimento ativo promovem os melhores resultados. McDonald et al. (1994) concluíram que o procedimento de extração do DNA de sementes secas foi útil para algumas espécies (milho, algodão, soja, trigo e trevo-

forrageiro), porém, também concluíram que este protocolo não é universalmente aplicável para todas as espécies, pois não gerou resultados consistentes para sementes de amendoim. Nas cultivares de mamona avaliadas, pôde-se notar que as concentrações de DNA não só diferiram quanto ao tipo de material vegetal utilizado para extração de DNA, mas também quanto as características como o período de armazenamento.

A comparação das concentrações de DNA obtidas antes e após o armazenamento permite inferir que para aquelas cultivares que apresentam diferenças na concentração de DNA antes e após do armazenamento foi constatada uma diminuição da concentração após o armazenamento (Tabela 3). Antes do armazenamento não foram observadas variações na concentração do DNA para todas as cultivares independente do material vegetal utilizado para a extração. Já as cultivares Brejeira e Paraguaçu apresentaram reduções nas concentrações de DNA após o armazenamento das sementes quando o DNA foi extraído dos diferentes materiais vegetais. No caso da cultivar IAC80 houve diminuição significativa da concentração de DNA de plântulas após o armazenamento. As cultivares Mexicana e Nordestina não apresentou variações na quantidade de DNA antes e após o armazenamento para sementes e plântulas. Reduções na quantidade DNA extraído após o armazenamento das sementes são normalmente esperadas uma vez que a queda na integridade do DNA pode ocorrer como o processo de deterioração (Kramer & Kozlowski, 1972; Fontes et al., 2001).

Entre os eventos que compõem o processo de deterioração e que envolvem o material genético, estão as quebras no DNA, causando redução na capacidade de síntese de proteínas (Ghosh et al., 1981), danos no metabolismo de DNA (Roberts, 1973; Cheach & Osborn, 1978; McGee, 1983).

TABELA 1 Resumo das análises de variância individuais da concentração de DNA ng/ μ L de sementes e plântulas, antes e após armazenamento de 5 cultivares de mamona.

| FV | GL | QM |
|--|-----------|-----------------------|
| Cultivares | 4 | 60276,3** |
| Material vegetal | 1 | 12060,94* |
| Armazenamento | 1 | 85287,95** |
| Cultivar*Material vegetal | 4 | 3879,88 ^{NS} |
| Cultivar*Armazenamento | 4 | 18356,73** |
| Material vegetal*Armazenamento | 1 | 10450,70* |
| Cultivar* Material vegetal*Armazenamento | 4 | 10156,63** |
| Erro | 40 | 1865,85 |
| Média | | 193,39 |
| CV(%) | | 22,34 |

*, ** - Significativo pelo teste de F a 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

TABELA 2 Concentração de DNA ng/ μ L de plântulas e sementes de 5 cultivares de mamona antes e após o armazenamento.

| Cultivares | Concentração de DNA ng/μL | | | |
|-------------------|---|------------------|-----------------------------|------------------|
| | Antes do armazenamento | | Após o armazenamento | |
| | Sementes | Plântulas | Sementes | Plântulas |
| 1 Brejeira | 189,67 bA | 238,00 bA | 105,33 cA | 135,70 bA |
| 2 IAC80 | 112,33 cB | 312,33 aA | 124,17 cA | 82,00 bA |
| 3 Mexicana | 114,94 cA | 124,96 cA | 65,83 cA | 127,67 bA |
| 4 Nordestina | 267,50 aA | 255,40 bA | 281,73 aA | 291,33 aA |
| 5 Paraguaçu | 334,16 aA | 361,67 aA | 196,50bA | 145,50 bA |

Média seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas e maiúsculas nas linhas para cada condição de armazenamento e cultivar diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott e Knot com 5% de probabilidade.

TABELA 3 Concentração de DNA ng/ μ L antes e após o armazenamento de plântulas e sementes de 5 cultivares de mamona.

| Cultivares | Material Vegetal | Concentração de DNA ng/ μ L | |
|--------------|------------------|---------------------------------|--------------------|
| | | Antes Armazenamento | Após Armazenamento |
| 1 Brejeira | Sementes | 189,67 a | 105,33 b |
| | Plântulas | 238,00 a | 135,70 b |
| 2 IAC80 | Sementes | 112,33 a | 124,17 a |
| | Plântulas | 312,33 a | 82,00 b |
| 3 Mexicana | Sementes | 114,94 a | 65,83 a |
| | Plântulas | 124,97 a | 127,67 a |
| 4 Nordestina | Sementes | 267,50 a | 281,73 a |
| | Plântulas | 255,40 a | 291,33 a |
| 5 Paraguaçu | Sementes | 334,17 a | 196,50 b |
| | Plântulas | 361,67 a | 145,50 b |

Média seguida de letras diferentes nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott e Knot com 5% de probabilidade.

Coello & Vázquez-Ramos, 1996), além de danos cromossômicos durante o envelhecimento (Abdalla & Roberts, 1968, 1969; Roberts, 1973; Villiers, 1974; Murata et al., 1981). Em soja, um dos eventos primários que causa a perda da qualidade de sementes é a degradação do DNA. Marcos Filho et al. (1997), avaliou as mudanças da integridade do DNA que acontece durante o envelhecimento da semente utilizando marcadores moleculares do tipo RAPD.

Apesar das substâncias presentes na mamona, como alcalóides, esteróides, flavonóides, saponinas, taninos, compostos fenólicos, glicósidos e triterpenos interferirem no processo de isolamento e, conseqüentemente, em digestões de DNA e PCRs por formar caracteristicamente uma matriz espessa, marrom e gelatinosa como descrito pelos autores como Fonseca (2001) e Rodrigues et al. (2002), a utilização do protocolo estabelecido possibilitou a obtenção de altas concentrações de DNA. Assim, o protocolo proposto nesse estudo, mostrou-se eficiente, sendo possível obter concentrações suficientes para a maioria dos estudos moleculares, tanto nos diferentes cultivares avaliadas, bem com no tipo de material vegetal utilizado e período de armazenamento. Porém, o tipo de marcador a ser utilizado é um fator fundamental. Segundo Upadhyay et al. (2004) a técnica do RAPD requer menor quantidade de DNA comparada a outras técnicas moleculares como o AFLP onde é necessário concentrações em torno de 250 ng/ μ L (Fonseca, 2001).

6 CONCLUSÕES

É possível obter DNA diretamente de sementes de mamona, em quantidades viáveis, para utilização em estudos moleculares.

A concentração de DNA de mamona é variável em função da cultivar, do material utilizado para extração (sementes ou plântulas) e também em relação ao nível de deterioração das sementes no armazenamento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, F. H.; ROBERTS, E. H. Effects of temperature, moisture, and oxygen on the induction of chromosome damage in seeds of barley, broad beans, and pea during storage. **Annals of Botany**, New York, v. 32, p. 119-136, 1968.

ABDALLA, F. H.; ROBERTS, E. H. The effects of temperature and, moisture, on the induction of genetic damage in seeds of barley, broad beans, and pea during storage. **Annals of Botany**, New York, v. 33, p. 153-167, 1969.

CHEACH, K. S.; OSBORN, D. DNA lesions occur with loss of viability in embryos of ageing sycamore seed. **Nature**, London, v. 272, n. 5654, p. 593-599, Apr. 1978.

CHUNWONGSE, J.; MARTIN, G. B.; TANKSLEY, S. D. Pregermination genotypic screening using PCR amplification of halfseeds. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 694-698, 1993.

COELLO, P.; VÁZQUEZ-RAMOS, M. Maize DNA polymerase 2 (an a-type enzyme) suffers major damage after seed deterioration. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 6, n. 1, p. 1-7, Mar. 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1996. 220 p.

FONSECA, A. M. **Caracterização farmacognóstica das folhas de palma-christi – *Ricinus communis* L. – Euphorbiaceae**. 2001. 97 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista.

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 2, p. 346-355, mar./abr. 2001.

GHOSH, B.; ADHIKARY, J.; BANERJEE, N. C. Changes of some metabolites in rice seeds during ageing. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, n. 1, p. 468-473, 1981.

KRAMER, P. F.; KOZLOWSKI, T. **Filosofia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972. 745 p.

MARCOS FILHO, J.; MCDONALD, M. B.; TEKRONY, D. M.; ZHANG, J. RAPD fragment profiles from deterioration soybean seeds. **Seed Technology**, Lincoln, v. 19, n. 1, p. 34-44, 1997.

MCDONALD, M. D.; ELLIOT, L. J.; SWEENEY, P. A. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 1, p. 171-176, 1994.

MCGEE, D. C. Symposium: deterioration mechanisms in seeds : introduction. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 73, n. 2, p. 314-317, 1983.

MURATA, M.; ROSS, E. E.; TSUCHIYA, T. Chromosome damage induced by artificial seed aging in barley: I. germinability and frequency of aberrant anaphases at first mitosis. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 267-280, 1981.

ROBERTS, E. H. Loss of viability: ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 3, p. 529-545, 1973.

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.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extration of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 69-76, 1988.

SALGADO, K. C. C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SHATTERS JÚNIOR, R. G.; SCHWEDER, M. E.; WEST, S. H.; ABDELGHANY, A.; SMITH, R. L. Environmentally induced polymorphisms detected by RAPD analysis of soybean seed DNA. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 5, p. 109-116, 1995.

UPADHYAY, A.; JAYADEV, K.; MANIMEKALAI, R.; PARTHASARATHY, V. A. Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, p. 353-362, 2004.

VILLIERS, T. A. Seed aging: chromosome stability and extended viability of seed stored fully imbibed. **Plant Physiology**, Osney Mead, v. 53, p. 875-878, 1974.

ZHANG, J.; MCDONALD, M. B.; SWEENEY, M. P. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) from dry seeds of differing soybean and mayze genotypes. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 24, n. 2, p. 513-522, 1996.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA, FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE MAMONA UTILIZADAS NA SAFRA 2006 NO ESTADO DE MINAS GERAIS

1 RESUMO

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

2 ABSTRACT

Characterization and evaluation of cultivars is essential for the establishment of differences or similarities among germplasm access, as well as for encouragement for its utilization to rescue plant culture development. Traditionally, this is made through morphologic characterization and description, but the use of alternative methods, as the use of molecular tools is desirable. This work was performed in the Seed's Analysis and Molecular Genetic Laboratories – UFLA, Brazil. Twelve Castor oil plant seed lots from 9 counties, collected by the Technical Assistance and Rural Extension Enterprise from Minas Gerais State, EMATER-MG, were used. To evaluate Castor oil plant seed quality, purity and germination tests were used, as well as tetrazolium and mass electrical conductivity and potassium lixiviation. For molecular characterization 99 primers belonging to the kits OPA, OPE, POM, OPN and OPP, with ten base pairs (Operon Technologies, Inc), were tested. Only 25% lots had germination above 85 %, the national standard for commercialization of certificated seeds. Among the primers tested, the average generated monomorphic products, however, among the 17 primers used to diversity studies, 88 fragments were generated, with 50 of them being polymorphic (56,8%). It was also verified a high incidence of microorganism that influenced the establishment of seedlings. High genetic variability was observed among the genotypes, even within the same cultivar, thus reflecting the high morphologic and agronomic variability contained in the Castor oil plant germplasm and the high allogamy rates of this species.

3 INTRODUÇÃO

As oleaginosas já estão sendo inseridas na matriz energética global, como fonte de matéria prima alternativa ao combustível tradicional de petróleo, ou como componentes de produtos biodegradáveis, que contribuem para proteção da camada de ozônio, colaborando para reciclagem do lixo urbano. No entanto, para que a ampliação da oferta dessa matéria-prima seja bem sucedida, é necessário desenvolver um conjunto de conhecimentos que permitam a obtenção de maior produtividade e qualidade para que culturas alternativas façam frente a outras opções como a soja, o amendoim e o girassol, cuja tecnologia de produção é mais aprimorada. A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de grande importância, apresentando também inúmeras aplicações na área industrial. A ricinocultura vem sendo praticada em todo o país, tradicionalmente, pelos pequenos e médios produtores, constituindo-se numa cultura com grande apelo social. Na região Sudeste, o estado de Minas Gerais se destaca na produção de mamona, apresentando a maior área plantada da região. Na safra de 2007/2008 a cultura da mamona teve a área plantada em Minas Gerais de 5,6 mil ha dos 6,8 mil ha de toda a região Sudeste, isto é, quase 83%. Em segundo lugar fica o estado de São Paulo com uma área plantada de 1,2 mil ha (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2009).

O cultivo da mamona tem sido estimulado no Norte de Minas Gerais, principalmente devido a algumas condições favoráveis, tais como a garantia de comercialização com boa margem de lucro pelas unidades fabris de Montes Claros, Itacarambi e São Francisco. No entanto, como acontece em outras regiões do país, a ricinocultura apresenta um acervo de informações tecnológicas bastante reduzido (Freire et al., 2001). No ano agrícola 2007/2008, foi cultivada área de 5,6 mil ha, com produção de 8,4 mil toneladas e uma produtividade média de 1,505 kg/ha em Minas Gerais (CONAB, 2009).

Um dos principais problemas para a exploração racional da mamona, está relacionado segundo Moreira et al. (1996), à inadequada disponibilidade de sementes de cultivares adaptadas, produtivas, com alto teor de óleo e tolerantes às pragas e doenças, que possam atender às necessidades dos agricultores e processadores. Além disso, mesmo se tratando de cultivares com potencial produtivo, aspectos como o potencial fisiológico, sanitário ou físico do lote de sementes podem interferir na conservação da semente e na capacidade de estabelecimento da cultura. Um dos grandes desafios na implantação das lavouras de mamona é a produção de sementes em quantidade e qualidade para suprir a demanda e Minas Gerais vem enfrentando problemas de produtividade que provavelmente se relacionam entre outros fatores, com a baixa qualidade das sementes.

Apesar da produção de sementes de mamoneira se apresentar cada vez mais tecnificada, com a participação de grandes empresas neste segmento de mercado, a grande parte dos produtores utiliza sementes de baixa qualidade e na maioria das vezes sem nenhum conhecimento principalmente da origem genética desses materiais. A obtenção de informações precisas e completas sobre a qualidade fisiológica, sanitária e genética das sementes produzidas torna-se importante durante a produção e comercialização, principalmente, em comparação a outras opções para a produção do biodiesel, como a soja, o amendoim e o girassol, que dispõem de tecnologias estabelecidas de produção de sementes (Gaspar-Oliveira, 2007).

A caracterização molecular com base na avaliação da divergência genética de mamona tem sido investigada, com alguns estudos a respeito desse assunto. Cunha (2006) utilizou com êxito marcador do tipo RAPD e verificou uma alta diversidade genética do germoplasma de mamona avaliado, o que segundo a autora, refletiu a ampla variabilidade morfológica e agrônômica observada. Segundo Pimenta (2006), os marcadores RAPD permitem uma

análise de variabilidade genética rápida e de custo relativamente reduzido, tornando-se bastante acessível, onde é possível verificar uma grande divergência genética entre as cultivares avaliadas.

Diante disso, o objetivo na pesquisa foi realizar um diagnóstico sobre a qualidade fisiológica e sanitária de alguns lotes de semente utilizadas em Minas Gerais na implantação de campos de produção de mamona, bem como realizar uma caracterização molecular de várias amostras de sementes coletadas de diferentes regiões produtoras do estado de Minas Gerais, e avaliar as diferenças genótípicas dos materiais que têm sido plantadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras – MG no período de março à outubro de 2007. Após levantamento das regiões produtoras do estado de Minas Gerais, foram detectados 51 municípios com potencial produtivo de mamona com base nos dados na produção de mamona no ano agrícola de 2006, região do estado e na produtividade. No ANEXO A estão representados as regiões do estado, os municípios, a produtividade média em Kg/ha do plano amostral realizado. Em função do desestímulo dos produtores do estado na safra de 2007, houve considerável redução na área e número de municípios produtores de mamona o que dificultou a coleta das amostras não sendo possível obter amostras de todas as cidades selecionadas. Alguns municípios amostrados foram excluídos do estudo visando obter maior representatividade das regiões onde foi possível a coleta: Zona da Mata, Sul de Minas, Norte e Rio Doce, principais regiões produtoras. As coletas foram realizadas no período de dezembro a janeiro de 2007, ou seja, antes do período de semeadura. Cada amostra era constituída de 2 (dois) quilos de sementes ou grãos coletadas aleatoriamente dos materiais que foram utilizados para semeadura.

Foram então utilizados 12 amostras de sementes de mamona coletadas em 9 municípios produtores pela da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais, EMATER-MG (Tabela 1). Por ocasião da coleta, foi realizado um levantamento das principais características das sementes enviadas, como a procedência, empresa produtora, categoria, safra, método de coleta, % de germinação e produtividade esperada (ANEXO B).

TABELA 1 Identificação das amostras de cultivares coletados nos municípios produtores de mamona no estado de Minas Gerais.

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

Os lotes coletados foram enviados ao laboratório onde permaneceram armazenados em câmara fria e seca (10°C e 40% UR) até a realização das avaliações a partir de mês de fevereiro de 2007.

Para avaliação da qualidade de sementes de mamona foram utilizados testes de pureza, germinação seguindo critérios estabelecidos na RAS (Brasil, 1992), além dos testes de tetrazólio e condutividade elétrica de massa e lixiviação de potássio.

Teor de água

A determinação do teor de água foi efetuada pelo método de estufa a 105°C \pm 3°C por 24 horas (Brasil, 1992) utilizando-se duas repetições de 20 sementes cortadas ao meio. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado em substrato papel toalha do tipo Germitest, na forma de rolo, umedecidos com uma quantidade de água equivalente 2,5 vezes o peso seco do papel. As contagens do teste de germinação foram realizadas aos 7 (Primeira contagem) e 14 dias após a sementeira, e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais.

Tetrazólio

Para o teste de tetrazólio, as sementes de mamona foram embebidas entre papel a 30°C por 3 horas. O tegumento foi retirado e as laterais das sementes cortadas longitudinalmente, sendo então imersas em 0.5% da solução de tetrazólio e mantidas no escuro a 30°C, por 6 horas. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagens de sementes viáveis.

Condutividade elétrica

O teste de condutividade elétrica de massa foi realizado seguindo os procedimentos propostos por Souza (2007). Foram utilizadas 8 repetições de 25 sementes. Estas foram pesadas e colocadas para embeber em copos plásticos de 200 ml, contendo 75 ml de água deionizada. As sementes foram mantidas em BOD, à temperatura constante de 25°C, onde permaneceram por 6 horas. A condutividade elétrica da solução foi medida em condutivímetro modelo Digimed, modelo CD-21, com resultados expressos em $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$.

Lixiviação de potássio

Após a leitura da condutividade elétrica de massa, as sementes foram descartadas e a solução de embebição após 6 horas, foi acondicionada em recipiente plástico. A determinação de potássio foi realizada empregando-se a

fotometria de chama DIGIMED NK-2002 após diluição de 19,5 vezes e os resultados expressos em porcentagem.

Sanidade

O teste de sanidade foi conduzido pelo método de incubação em papel de filtro sem congelamento (Neergaard, 1979) com 8 repetições de 25 sementes por lote. As sementes foram distribuídas em placa de Petri de 15 cm de diâmetro contendo três folhas de papel filtro previamente esterilizadas e umedecidas em solução de 2,4-D. As sementes foram incubadas a $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em câmara com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, durante sete dias. Para a identificação de patógenos presentes nas sementes, foram utilizados lupa estereoscópica e microscópio ótico. A incidência foi avaliada em porcentagem de fungos encontrados nas sementes.

Extração de DNA

Para a extração de DNA, utilizou-se um procedimento modificado de Rogers & Bendich (1988). Foram utilizadas cinco sementes de cada amostra, que foram trituradas por um mixer por aproximadamente 15 segundos. Para evitar o processo de oxidação, foi utilizado nitrogênio líquido. Foram utilizados 10ml do tampão de extração pré-aquecido a 65°C (0,2g de brometo de cetiltrimetil-amônio; 1 ml de Tris 1M, 0,4 ml de EDTA 0,5M, 0,82 e água pura para completar 10 ml) e $20\mu\text{l}$ de 2- β -mercaptoetanol. Em seguida, o macerado foi mantido em banho-maria a 65°C por 30-40 minutos, agitando-se 3 a 4 vezes. Após, foram adicionados 10ml da solução 24 clorofórmio: 1 álcool isoamil e a suspensão foi homogeneizada e centrifugada durante 10 minutos na velocidade de 5.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, misturado com 30 ml da solução 6 álcool 95°: 1 acetato de amônio 7,5M e mantido no freezer por cerca de uma noite. Em seguida, foi coletado o DNA e foram adicionados de 200-300 μl de Tris 1mM e EDTA 0,1 mM, pH 8,0 (TE). Após o DNA ter se dissolvido, ele foi

precipitado com o triplo do seu volume com a solução 20 álcool 95°: 1 acetato de sódio 3M e mantido no freezer por uma hora. A solução de álcool-acetato foi eliminada e o DNA, dissolvido em 200-300 µl de TE. A operação seguinte constituiu em quantificar a concentração do DNA em fluorímetro (Hoefler Scientific). Para isso foram usados 2 µl da solução de DNA em 2ml de tampão (Tris 10mM, EDTA 1,0mM, NaCl 0,1M, pH 7,4), juntamente com 0,1 µg/ml do corante H32258. Após, o DNA foi diluído com TE para a concentração de 10ng/µl, que foi usada nas análises de PCR.

Análise PCR

Cada reação PCR foi realizada misturando-se os seguintes ingredientes com as respectivas concentrações (Nienhuis et al., 1995): 200µM dNTPs, 0,6 unidades de Taq DNA polimerase, 0,5 µM de cada primer, tampão de reação (50mM Tris, 1,5mM MgCl₂, 20mM KCl, 250µg/ml de albumina de soro bovino, 1% de ficoll 400, 1mM de tartrazina), 20ng do DNA genômico e água pura até o volume final de 10µl. O dNTP corresponde a uma mistura equitativa de ATP, GTP, CTP e TTP. Foram testados 99 *primers* pertencentes aos kits OPA, OPE, POM, OPN e OPP com 10 pares de bases, da Operon Technologies, Inc. Alamed, CA. As reações de amplificação foram realizadas num termociclador Eppendorf, e o programa utilizado foi o RAPDMARC.

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

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

Delineamento experimental

Os resultados dos testes de germinação, primeira contagem de germinação, teste de tetrazólio, condutividade elétrica de massa e lixiviação de potássio foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizado. Os dados de condutividade elétrica de massa foram transformados em $1/y$ (transformação recíproca). As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Também foram calculados os coeficientes de correlação para todas as combinações entre testes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização das amostras

As amostras coletadas na semeadura efetuada no ano de 2006 em Minas Gerais foram provenientes dos municípios de Divino (Zona da Mata), Nova Resende e Guapé (Sul de Minas), Ubaporanga (Vale do Rio Doce) e Itacarambi, Manga e São João das Missões, Mato Verde e São Francisco (Norte de Minas). As cultivares avaliadas foram: Guarany, IAC-80, BRS149 Nordestina, IAC226 e Paraguaçu com maior representatividade da cultivar Guarany em 41% do total amostrado. Dentre as amostras coletadas, 66.7% eram sementes comerciais; 8,3% sementes próprias e 25% não foi informado. Apenas quatro produtores souberam informar o percentual de germinação da semente utilizada e o número de sacos amostras nas coletas variou de 1 a 11, sendo realizadas de forma manual, sem auxílio de caladores ou amostradores (ANEXO B).

A análise do potencial fisiológico das sementes evidenciou que houve diferença nos lotes avaliados (Tabela 1). O percentual de germinação variou de zero a 88% o que indica grande variabilidade da qualidade fisiológica das sementes utilizadas. Apenas 25% dos lotes apresentaram germinação superior ao padrão nacional de 85% para comercialização de sementes certificadas (DOU, 2005). Aqueles mesmos lotes que apresentaram germinação superior ao padrão nacional se destacaram em relação ao vigor avaliado pela primeira contagem.

Com relação à viabilidade, avaliada pelo Tetrazólio, observa-se a mesma tendência de superioridade das amostras do município de Manga (IAC226) a do município de São Francisco (Paraguaçu) com exceção da amostra procedente do município de Manga (Guarany).

TABELA 1 Valores médios dos resultados de Germinação (G), Primeira contagem de germinação (PC), Tetrazólio (TZ) e Lixiviação de K⁺ (LK⁺) dados em %, Condutividade elétrica de massa (CE) dados em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de sementes dos lotes avaliados em Lavras-MG, 2007.

| Amostra | Testes | | | | |
|---------------------------------|-----------------|--------|---------|--------|-----------------|
| | G | PC | TZ | CE | LK ⁺ |
| Manga (IAC-226) | 88 ^a | 70,50a | 100,00a | 40,01c | 0,0687b |
| Manga (Guarany) | 88 ^a | 70,00a | 77,00c | 47,31d | 0,1012d |
| Mato Verde (IAC-226) | 87 ^a | 75,00a | 99,00a | 40,35c | 0,0625a |
| São João das Missões (IAC-226) | 83b | 70,00a | 100,00a | 37,15b | 0,0564a |
| São Francisco (Paraguaçu) | 79b | 72,00a | 92,00a | 39,78c | 0,0775b |
| ☪ Divino (Guarany) | 67c | 50,00b | 80,00b | 44,55d | 0,0875c |
| Itacarambi (BRS-149 Nordestina) | 66c | 24,00d | 86,00b | 41,30c | 0,0950d |
| Ubaporanga (Guarany) | 62d | 44,50b | 73,00c | 27,49a | 0,0600a |
| Nova Resende (Guarany) | 61d | 36,00c | 83,00b | 34,84b | 0,0700b |
| Itacarambi (Guarany) | 59d | 54,50b | 77,00c | 42,59c | 0,0725b |
| Guapé NI | 21e | 2,00e | 68,00c | 44,55d | 0,0925d |
| Ubaporanga (IAC-80) | 0f | 0,01e | 0,01d | 44,56d | 0,0825c |
| CV (%) | 4,24 | 24,37 | 6,88 | 7,61 | 12,51 |

As médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. NI – não informado.

Os resultados de viabilidade avaliados pelo teste de tetrazólio foram superiores ao da germinação. Esse fato pode ser explicado pela alta incidência de plântulas anormais infeccionadas, o que indica a presença de microorganismos que afetam o estabelecimento de plântulas, evidenciado pelo teste de sanidade.

Apesar de o lote ter potencial de germinação ou viabilidade, o desenvolvimento de plântulas é impedida pela ação de microorganismos, o que é uma das limitações da utilização do teste de germinação segundo Krzyzanowski et al. (1999).

Foram calculados os coeficientes de correlações entre os vários testes realizados (Tabela 2). Pode-se observar que houve correlação significativa entre a germinação e os testes de vigor como a primeira contagem e tetrazólio, com valores altos e positivos (92% e 87%, respectivamente), indicando a consistência nas avaliações das características estudadas. Esses resultados indicam que estes testes propiciaram classificações semelhantes dos lotes. Observou-se também, correlação positiva (73%) entre os testes de vigor, tetrazólio e primeira contagem, dando maior confiabilidade nos dados obtidos por meio destes.

No entanto, não houve correlação significativa entre a germinação e os teste de condutividade elétrica e lixiviação de K^+ . A baixa correlação entre os testes de avaliação do sistema de membranas com os testes de germinação e demais testes de vigor, leva a crer que os testes de Condutividade elétrica e Lixiviação de K^+ não são os mais indicados para a separação de lotes de sementes de mamona em diferentes níveis de qualidade. Tais resultados discordam dos obtidos por Souza (2007), que obteve para a cultivar IAC-80 valores negativos e significativos entre a condutividade elétrica e os testes de primeira contagem, germinação e tetrazólio. Essa variação de resultados pode ser explicada uma vez que os testes podem ser afetados por fatores como as características de composição química

da cultivar, a espessura do tegumento, tamanho da semente entre outros fatores (Powell, 1998; Albuquerque et al. 2001).

TABELA 2 Coeficientes de correlação entre testes de germinação (G), primeira contagem (PC), tetrazólio (TZ), Condutividade Elétrica (CE) e Lixiviação de K⁺ (LK⁺).

| Testes | G | LK ⁺ | CE | TZ |
|-----------------|--------|-----------------|-------|--------|
| PC | 0,92** | -0,40 | -0,14 | 0,73** |
| TZ | 0,87** | -0,30 | -0,26 | |
| CE | -0,19 | 0,74** | | |
| LK ⁺ | -0,27 | | | |

** , Significativo a 1% de probabilidade.

Os fungos detectados nas sementes de mamona utilizadas no estado de Minas Gerais estão relacionados na FIGURA 1. Verificou-se, no total de sementes coletadas nas diferentes regiões avaliadas, uma alta incidência de fungos de armazenamento (*Aspergillus* spp. e *Penicilium* spp.).

Vários pesquisadores consideram que os fungos de armazenamento ocorrem apenas durante a estocagem (Christensen, 1972). Porém, resultados obtidos por Berjak (1987) sugerem que os propágulos destes fungos podem estar comumente associados às sementes recém-colhidas, sendo inibidos, em parte, pela atividade de fungos de campo, ou seja, aqueles que infectam durante o processo de formação e maturação das sementes.

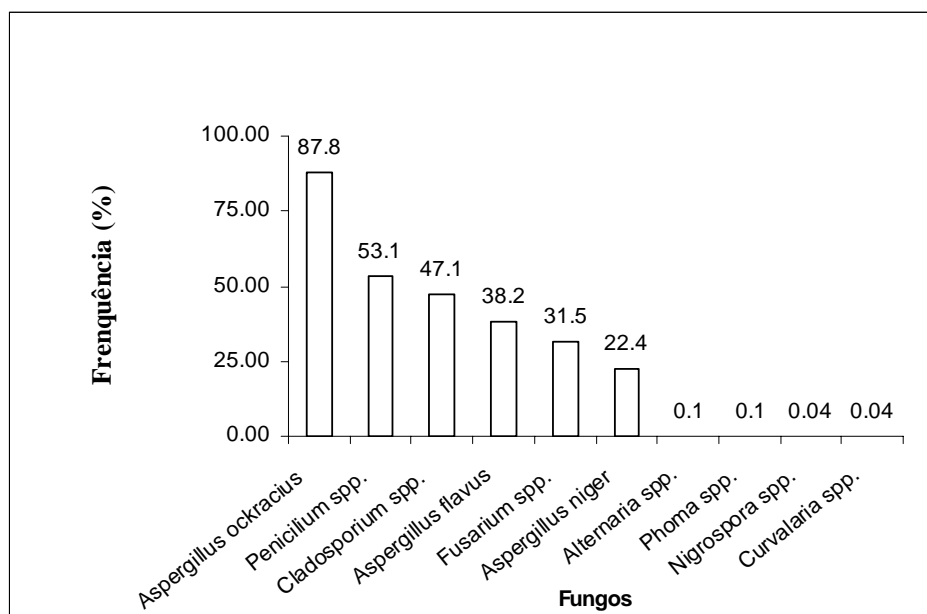


FIGURA 1 Frequência de fungos detectados em sementes de mamona utilizados no estado de Minas Gerais.

Fanan (2008), em estudo sobre qualidade fisiológica e sanitária de sementes de mamona em função das condições climáticas e da colheita, verificou que em sementes recém colhidas, já apresentavam a incidência de fungos de armazenamento, com valores de 1%, em todos os tratamentos avaliados, para o gênero *Aspergillus* e de 11% para o *Penicillium spp.* A ocorrência desses fungos de armazenamento, em baixas porcentagens, em torno de 1%, em sementes que ainda estavam no campo também foi relatada por Kennedy (1979) e Wetzell (1987), contrariando as informações de Dhingra (1985), que negou esta possibilidade.

Dentre o gênero *Aspergillus* o *A. ochraceus* esteve presente em 87, 83% das sementes. Trata-se de um fungo produtor de ocratoxina A, toxina produzida durante o armazenamento de grãos quando os teores de água estão relativamente

altos (16% ou mais) (Sauer, 1992; Lazzari, 1997). Essas micotoxinas podem infectar sementes e grãos e causar graves conseqüências àqueles que consumirem o produto ou subproduto, que não é o caso da mamona como fonte de biodiesel, entretanto, essas micotoxinas estão diretamente ligadas ao teor de ácidos graxos, influenciando assim fortemente a qualidade do óleo extraído.

Ainda foi verificada a presença de fungos de campo como o gênero *Cladosporium spp.* (47,16%) e gênero *Fusarium spp.* (31,5%). De acordo com Massola & Bedendo (2005), a murcha de *Fusarium* causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini* ocorre em praticamente todas as regiões onde se cultiva a mamona no Brasil. Esse fungo é um habitante do solo que vive saprofiticamente em restos de cultura podendo sobreviver na forma de clamidósporos na ausência do hospedeiro.

Dentre as várias amostras coletadas, pode-se notar que a incidência do *A.ochraceus* foi alta em todas as regiões avaliadas e nas diversas cultivares, sempre presente em mais de 88% das sementes, com exceção apenas na cidade de São João das Missões, com 42% desse patógeno nas sementes (TABELA 3). Porém, seu potencial fisiológico não foi afetado, apresentando 100% de sementes viáveis pelo TZ (Tabela 1).

Já a amostra coletada na cidade de Ubaporanga da cultivar IAC 80, com alta incidência tanto de fungos de campo, como de fungos armazenamento (sendo 63% de sementes infectadas pelo gênero *Fusarium*), apresentou baixo poder germinativo e baixa viabilidade de sementes. Savy filho et al. (2007) caracterizou a cultivar IAC-2028 como moderadamente suscetível à mancha-de-alternária e suscetível à murcha de *Fusarium*, o que pode ter contribuído para seu baixo desempenho durante o teste de germinação.

TABELA 3 Incidência média (%) de fungos encontrados em lotes de sementes de mamona utilizadas no estado de Minas Gerais avaliados em Lavras-MG, 2007.

| Amostra | FUNGOS | | | | | |
|---------|---------------------|------------------|---------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| | <i>Cladosporium</i> | <i>A. flavus</i> | <i>A. ochraceus</i> | <i>A. niger</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Penicillium</i> |
| 1 | 62 | 13,5 | 96,5 | 2 | 78,5 | 3 |
| 2 | 47,5 | 10 | 88,5 | 0 | 27,5 | 28 |
| 3 | 24 | 30,5 | 93 | 26 | 47,5 | 70 |
| 4 | 35,5 | 36 | 95 | 8,5 | 12,5 | 49 |
| 5 | 60,5 | 19,5 | 91,5 | 19 | 63 | 18 |
| 6 | 46,5 | 3,5 | 83,5 | 9,5 | 13,5 | 65 |
| 7 | 69,5 | 76 | 88 | 22 | 33 | 53 |
| 8 | 82,5 | 76 | 91 | 9,5 | 15,5 | 84,5 |
| 9 | 49,5 | 89 | 93 | 73 | 41 | 91,5 |
| 10 | 21 | 11,5 | 42,5 | 34 | 21,5 | 68,5 |
| 11 | 65 | 73 | 91,5 | 58,5 | 17,5 | 83,5 |
| 12 | 2,5 | 20 | 100 | 7 | 7 | 23,5 |

Quanto ao comportamento da cultivar Guarani coletada nas cidades de Itacarambi e Manga sem resultado de incidência de *A. flavus*, foram de 76% e 89% respectivamente. Valores estes superiores aos encontrados nas demais regiões com a mesma cultivar. Santos Neto et al., (2008) verificaram que a espécie *Aspergillus flavus* foi aquela de maior incidência em lotes comerciais de sementes de mamona, com uma média de 39%, resultados semelhantes aos obtidos por de Souza (2007) com cinco lotes de sementes de mamona da mesma cultivar.

Fungos de armazenamento, como o *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., causam sérios prejuízos às sementes de mamona. O gênero *Aspergillus* consta da relação de fungos toxigênicos, causadores de deterioração em sementes, sendo

de disseminação fácil devido a seus esporos leves e secos. Podem crescer em baixo potencial hídrico, sendo os primeiros a se desenvolver nas condições de baixa umidade das sementes, facilitando o desenvolvimento de outros gêneros que necessitam de mais umidade, como é o caso do *Penicillium* (Neergaard, 1979; Círio & Lima, 2003; Dhingra, 1985).

5.2 Caracterização Molecular

Embora tenham sido realizadas reações de amplificação com 90 *primers* diferentes, diversos *primers* não produziram fragmentos e/ou os produtos de reação não permitiram uma avaliação consistente acerca da similaridade das amostras testadas. Por isso, foram desprezados 73 *primers*, restando 17, que serviram à avaliação dos genótipos (Tabela 4). Dentre os *primers* testados, a maioria gerou produtos monomórficos, porém, entre os 17 *primers* utilizados para estudo de diversidade, foram gerados 88 fragmentos, dos quais 50 foram polimórficos (56,8%).

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

TABELA 4 Bandas polimórficas obtidas pelos primers RAPD.

| PRIMER | SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS 5' → 3' | BANDAS POLIMÓRFICAS |
|---------------|--|----------------------------|
| OP-E01 | CCC AAG GTC C | 1 |
| OP-E02 | GGT GCG GGA A | 2 |
| OP-E03 | CCA GAT GCA A | 1 |
| OP-E04 | GTG ACA TGC C | 4 |
| OP-E06 | AAG ACC CCT C | 3 |
| OP-E09 | CTT CAC CCG A | 1 |
| OP-E11 | GAG TCT CAG G | 1 |
| OP-E12 | TTA TCG CCC C | 1 |
| OP-E15 | ACG CAC AAC C | 5 |
| OP-E18 | GGA CTG CAG A | 3 |
| OP-E19 | ACG GCG TAT G | 5 |
| OP-E20 | AAC GGT GAC C | 3 |
| OP-M05 | GGGAACGTGT | 6 |
| OP-N12 | CACAGACACC | 3 |
| OP-P01 | GTAGCACTCC | 5 |
| OP-P05 | CCCCGGTAAC | 5 |
| OP-P19 | GGGAAGGACA | 1 |

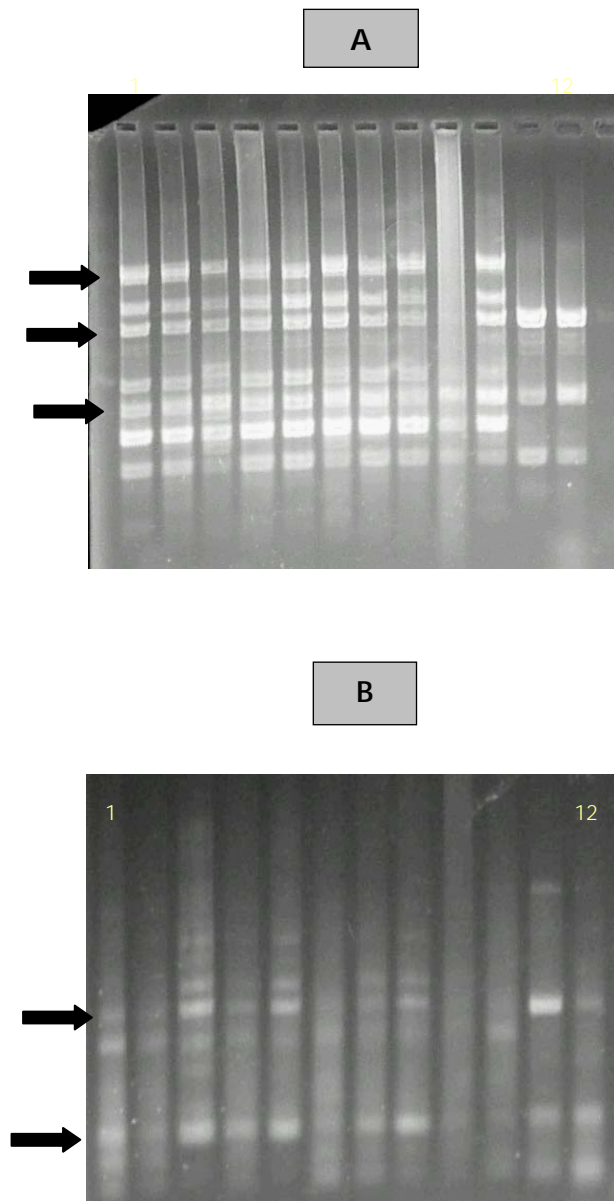


FIGURA 2 Produto de amplificação de RAPD de amostras de mamona (1 a 12 de acordo com o ANEXO B) com o *primer* E12 (A) e E15 (B). Setas indicam padrão polimórficos de amplificação, 950pb.

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

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

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

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

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

Para a cultivar Guarani, que foi enviada por cinco cidades: Divino, Nova Resende, Ubaporanga, Itacarambi e Manga, apenas entre as cidades de Divino e Nova Resende foi observado índice de similaridade de 1,0. Houve uma

separação basicamente de 2 grupos distintos com acerca de 0,4 de similaridade, sendo o I da amostra da cidade de Manga (Guarani) e II das demais cidade, compostas de várias cultivares, dentre elas várias amostras de cultivar Guarani. A cultivar Guarani, disponível para comércio desde 1974, possui frutos indeiscentes, elevada capacidade produtiva com média de 2.800 kg.ha⁻¹ de sementes e teor de óleo nas sementes de 47 a 48%. Resultante do cruzamento entre os cultivares Campinas e Preta, associa a característica indeiscência dos frutos do parental Campinas e a rusticidade e adaptabilidade do cultivar “Preta”, bastante cultivada em todo o país. O cultivar Campinas é indicado, porém, a grandes produtores por apresentar essa indeiscência em seus frutos, fator que favorece a realização de uma única colheita mecanizada (Savy Filho & Banzatto, 1993; Savy Filho et al., 1999). Portanto, a cultivar enviada pelo município de Manga como sendo Guarani pode não ser realmente a cultivar indicada.

Pimenta (2006) realizou estudo de divergência genética em mamona com marcadores do tipo RAPD, verificou então que os acessos formavam seis grupos. No entanto, dentre esses acessos foram observadas grandes variações dentro de uma mesma cultivar, por exemplo, a cultivar Guarani foi representada pelos tipos: Guarani verde, Guarani normal pelada, Guarani normal, Guarani grande e Guarani pelada (GRUPO III) E Guarani repicada (GRUPO IV). Outro exemplo é o da cultivar IAC80 verde que ficou posicionada no GRUPO II e a IAC80 vermelha no GRUPO III. A cultivar IAC-80, foi obtido em 1976 através da seleção massal praticada em material local, apresenta características de porte alto, ciclo vegetativo de 240 dias, produção de 1.500 a 4.500 kg.ha⁻¹ de sementes, 45 a 47% de óleo nas sementes e frutos indeiscentes; (Savy Filho & Banzatto, 1993; Savy Filho et al., 1999).

Quanto a cultivar IAC-226, foram avaliadas amostras de três municípios da região Norte de Minas Gerais: Manga, Mato Verde e São João das Missões. No GRUPO I, a amostra de Manga, no Grupo III a amostra de São João das

Missões e no GRUPO VI a amostra de Mato Verde. Essa cultivar tem como principais características o porte alto com frutos indeiscentes, com produção variando de 1.500 a 5.000 kg.ha⁻¹ de sementes e teor de óleo de 46 a 47% (Savy Filho et al., 1999).

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

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

6 CONCLUSÕES

Existe variação na qualidade fisiológica das sementes utilizadas em Minas Gerais, sendo que 75% dos lotes avaliados apresentam germinação abaixo do padrão nacional.

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

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

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. C. F. E.; MORO, F. V.; FAGIOLI, M.; RIBEIRO, M. C. Teste de condutividade elétrica e lixiviação de potássio na avaliação de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2001.

BERJAK, P. Stored seeds: the problems caused by micro-organisms (with particular reference to the fungi). In: NASSER, L. C.; WETZEL, M. M.; FERNANDES, J. M. (Ed.). **Seed pathology: international advance course**. Brasília: ABRATES, 1987. p. 38-50.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SND/CLAV, 1992. 365 p.

CHRISTENSEN, C. M. Loss of viability in storage: microflora. **Seed Science and Technology**, New Delhy, v. 1, n. 2, p. 547-562, 1973.

CÍRIO, G. M.; LIMA, M. L. R. Z. C. Métodos de detecção do gênero *Aspergillus* em sementes de milho (*Zea Mays* L.) em 270 dias de armazenamento. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 1, p. 19-23, 2003.

COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARTER, A. Diversity within American cassava germoplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2008/2009** – quarto levantamento – jan./2009.

Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/3graos_08.09.pdf>.

Acesso em: 20 jan. 2009.

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.

DHINGRA, O. Prejuízos causados por microrganismos durante o armazenamento de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 7, n. 1, p. 139-146, 1985.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Normas para produção e comercialização de sementes de mamona**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES_DOU/PUBLICACOES_DOU_2005/PUBLICACOES_DOU_D EZEMBRO_2005/DO1_2005_12_20-MAPA_MAPA.PDF>. Acesso em: 15 jun. 2007.

DUDLEY, J. W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: SIMPOSIUM ANALYSIS OF MOLECULAR MARKER DATA, 2., 1994, Oregon. **Proceedings...** Oregon: American Society for Horticultural Science/Crop Science Society American, 1994. p. 3-7.

FANAN, S.; MEDINA, P. F.; CAMARGO, M. P.; RAMOS, N. P. Influência da colheita e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 31, n. 1, p. 150-159, 2009.

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

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Germination test improvement for castor bean seeds (*Ricinus communis* L.) In: ISTA CONGRESS 28.; CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 15., 2007, Foz do Iguaçu. **Anais...** Bassersdorf: ISTA, 2007. p. 70.

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

KENNEDY, B. W. The occurrence of aspergillus spp on stored seeds. In: SEED pathology. Londrina: IAPAR, 1979. p. 257-261.

KRYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: Paranaset, 1997. cap. 2, p. 23-38.

MASSOLA, N. S.; BEDENDO, I. P. Doenças da mamoneira (*Ricinus communis*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2.

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

MOREIRA, J. A. N.; LIMA, E. F.; FARIAS, F. J. C.; AZEVÊDO, D. M. P. de. **Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1996. 30 p. (EMBRAPA-CNPA. Documentos, 44).

MYCZKOWSKI, M. L. **Variabilidade genética para o teor de óleo entre progênies autofecundadas de mamona (*Ricinus communis* L.) da cultivar Guarani**. 2003. 33 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. 2. ed. London: The Macmillan, 1979. 1191 p.

NIENHUIS, J.; TIVANG, J.; SCKROCH, P.; SANTOS, J. B. dos. Genetic relationships among cultivars and lines of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as measured by RAPD marker. **Journal of American society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 120, n. 9, p. 300-306, Mar. 1995.

PIMENTA, M. R. **Estudo molecular em *Ricinus communis* L., visando a divergência genética, a inibição causada pelo extrato protéico sobre tripsina de *Erinnyis ello* L. e a prospecção de genes do tipo inibidor de tripsina**. 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

POWELL, A. A. Seed improvement by selection and invigoration. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, Número especial, p. 126-133, Aug. 1998.

ROGERS, S. O.; BENDICH, A. J. Extration of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 5, n. 2, p. 69-76, 1988.

ROHLF, J. **NTSYSpc 2.1**. Nova Iorque: Applied Biostatistics, 2000. 1 CD-ROM.

SANTOS NETO, A. L.; CARVALHO, M. L. M.; BÁRBARA, C. N. V.; ALVES, R. A.; OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, K. A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de mamona tratadas com fungicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: SEAGRI-Embrapa Algodão, 2008. 1 CD-ROM.

SAUER, D. B. **Storage of cereal grains and their products**. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1992. 615 p.

SAVY FILHO, A.; AMORIM, E. P.; RAMOS, N. P.; MARTINS, A. L. M.; CAVICHIOLI, J. C. IAC-2028: nova cultivar de mamona. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 3, p. 449-452, 2007.

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N. V. Mamona. In: FURLANI, A. M. C.; VIÉGAS, G. P. (Ed.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agrônomo**. Campinas: IAC, 1993. p. 315-353.

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

SAVY FILHO, A. Melhoramento da mamona. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 385-407.

SOUZA, L. A. **Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade de sementes de mamona**. 2007. 53 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

VIDAL, M. S.; MILANI, M.; MENESES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. de S. **Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética *Ricinus communis* L.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 5 p.

WETZEL, M. M. V. S. Fungos de armazenamento. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. da. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação CARGILL, 1987. p. 562-568.

ANEXOS

| | Página |
|--|---------------|
| ANEXO A Plano amostral das regiões e municípios com suas respectivas produtividades em média Kg/ha de mamona em Minas Gerais de acordo com dados da safra de 2006..... | 85 |
| ANEXO B Dados enviados juntamente com cada amostras de sementes de mamona utilizados nos municípios produtores em Minas Gerais. Lavras, 2007..... | 87 |

ANEXO A Plano amostral das regiões e municípios com suas respectivas produtividades médias em Kg/ha de mamona em Minas Gerais de acordo com dados da safra de 2006.

| Região | Municípios | Produtividades (Kg/ha) |
|----------------|------------------------|-------------------------------|
| Central | Morro da Garça | 2000 |
| | Madre de Deus de Minas | 1700 |
| | Monjolos | 1400 |
| | Couto | 800 |
| | Magalhães de Minas | |
| | | |
| Zona da Mata | Simonésia | 2500 |
| | Orizânia | 2000 |
| | Caputira | 1500 |
| | Pedra Bonita | 1500 |
| | Santa Margarida | 1500 |
| | Caparaó | 1200 |
| | Divino | 1300 |
| | Fervedoura | 1400 |
| | Vieiras | 800 |
| | | |
| Sul de Minas | Muzambinho | 3000 |
| | Serrania | 2000 |
| | Campestre | 1600 |
| | Guapé | 1500 |
| | Varginha | 1000 |
| | Éloi Mendes | 1250 |
| | Conceição da Aparecida | 1000 |
| | Botelhos | 800 |
| | Nova Resende | 900 |
| | | |
| Triângulo | Campo Florido | 500 |
| | Uberaba | 2000 |
| | Canápolis | 2000 |
| | Tupaciguara | 2000 |
| Alto Paranaíba | Pedrinópolis | 600 |
| Centro Oeste | BambuÍ | 3000 |
| | Oliveira | 1750 |
| | Bom Despacho | 1800 |

| | | |
|-------------------|---------------------------|------|
| | Nova Belém | 2200 |
| | São João da Mantenhina | 2200 |
| | Mantena | 1800 |
| | Piedade de Caratinga | 667 |
| Rio Doce | Caratinga | 500 |
| | Imbé de Minas | 600 |
| | Santa Rita de Minas | 500 |
| | Ubaporanga | 600 |
| | Itacarambi | 2000 |
| | Juvenília | 2000 |
| | Januária | 2000 |
| | Manga | 2000 |
| | Jaíba | 1502 |
| | Nova Porteirinha | 1400 |
| Norte de Minas | Riacho dos Machados | 1200 |
| | Matias Cardoso | 1111 |
| | Mato Verde | 1000 |
| | São João das Missões | 1000 |
| | Icarai de Minas | 600 |
| | Mamonas | 500 |
| | São Francisco | 500 |

ANEXO B Dados enviados juntamente com cada amostras de sementes de mamona utilizados nos municípios rodutores em Minas Gerais. Lavras, 2007. *Não informado

88

| Amostra Município | Categoria | Variedade | Safra | Germinação embalagem (%) | Área de semeadura (ha) | Produtividade esperada Kg/ha | Método de coleta/nº sacos amostrados |
|--|----------------|-----------------------|-------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------------|--|
| 1 – Divino (Guarany) | NI | Guarani | 06 | NI | 20 | 1300 | Manual/08 |
| 2-Nova Resende (Guarany) | NI | Guarani (?) | 05/06 | NI | 10 | 1000 | Manual/NI |
| 3-Guapé | NI | NI | NI | NI | NI | NI | NI |
| 4 - Ubaporanga (Guarany) | NI | Guarani | 05/06 | NI | 3 | 600 | Manual/NI |
| 5 – Ubaporanga (IAC-80) | NI | IAC 80 | 05/06 | NI | 3 | 600 | Manual/NI |
| 6-Itacarambi (BRS-149 Nordestina) | NI | BRS 149 Nordestina | 05/06 | 92 | NI | NI | Manual/06 |
| 7 – Itacarambi (Guarany) | NI | Guarani | 05/06 | 85 | NI | NI | Manual/06 |
| 8 – Manga (IAC-226) | C ₁ | IAC 226 | 06 | NI | NI | NI | NI |
| 9 - Manga (Guarany) | NI | Guarani | 06 | NI | NI | NI | NI |
| 10 -São João das Missões (IAC- 226) | NI | IAC 226 | 05 | 93 | 20 | 1000 | Manual/11 |
| 11 - Mato Verde (IAC-226) | NI | IAC 226 | 05 | 93 | NI | NI | Manual/01 |
| 12 -São Francisco (Paraguaçu) | NI | Paraguaçu | 05/06 | NI | 15 | NI | Manual/NI |