

NILMARA SANTANA DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES
DE *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE)
PELA METODOLOGIA DE DAF (*DNA
AMPLIFICATION FINGERPRINTING*)**

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Genética
Universidade Federal de Pernambuco**

**Recife, PE
Março, 2004**

NILMARA SANTANA DE OLIVEIRA

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES
DE *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE)
PELA METODOLOGIA DE DAF (*DNA
AMPLIFICATION FINGERPRINTING*)**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon,
Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas,
UFPE, Recife, PE.

Co-Orientador: Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho,
Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas,
UFPE, Recife, PE

**Recife, PE
Março, 2004**

VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE) PELA METODOLOGIA DE DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING)

Aluna:	Nilmara Santana de Oliveira
Orientadora:	Prof^a Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon
Co-Orientador:	Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

Comissão Examinadora

▪ Membros Titulares

Prof^a Dr^a Luiza Suely Semen Martins

Departamento de Biologia
Universidade Federal do Rural de Pernambuco

Prof^a Dr^a Ana Christina Brasileiro Vidal

Departamento de Botânica
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho

Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco

▪ Membros Suplentes

Prof. Dra. Neide Santos

Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix

Departamento de Agronomia
Universidade Federal da Paraíba

A Deus, aos meus pais Gilbete e Neto, às minhas irmãs e irmãos, aos demais familiares e a Daniel Plácido, dedico este trabalho.

***“Quem não sonha, não realiza.
Quem não ousa, não conhece
seus limites”***

Arquimedes Bastos

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, Gilbete e Neto, por todas as coisas que fizeram e fazem por seus filhos.

Aos meus irmãos e familiares por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu noivo, Daniel Plácido, pelo amor e incentivo constantes.

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

A Reginaldo de Carvalho, pela co-orientação, apoio e amizade.

Aos professores Catarina Zita, Maria Helena Zucon, Myrna Landim, Ricardo Scher e Silmara Pantaleão, da Universidade Federal de Sergipe, pela iniciação na pesquisa científica e pelo aprendizado que serviu como base para chegar até aqui.

À Fabiola Spiaggia, por sua paciência e grandeza para ensinar e aprender.

À Claudete Maria Marques, por sua amizade e constante disposição de ajudar em todos os momentos.

A Adriano Barbosa, por sua alegria contagiante e pelo auxílio na análise *in sílico* dos dados.

A Jailson Gitaí, Maria Rita Sales e Mário Correia por compartilharem experiências e por toda ajuda recebida.

Aos meus colegas de Laboratório, Carol, David, Diego, Geyner, Lidiane, Luca, Natalia, Nina, Rafaela e Rodrigo pelo convívio do dia-a-dia.

Aos Professores Constância Ayres, Ederson Kido e Oswaldo Pompílio, pela colaboração laboratorial e em especial a Paulo Paes de Andrade.

À Professora Mônica Carvalho pela oportunidade de lecionar e aprender no estágio de iniciação à docência.

Aos Professores da Pós-Graduação em Genética que contribuíram para meu aprendizado.

A todos os meus colegas de curso, em especial a Amaro, Brígida, e Márcio, pelos momentos compartilhados.

Aos Funcionários da Pós-Graduação e do Departamento de Genética e também a Márcio Pires pelo auxílio e apoio técnico dispensados.

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

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, em especial ao Departamento de Genética pela oportunidade de uso das suas instalações e laboratórios para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	10
Lista de Figuras	11
Lista de Abreviaturas	12
Resumo	14
1- Introdução	15
2- Revisão da Literatura	16
2.1- A espécie <i>Ricinus communis</i> L. – Classificação Botânica	16
2.2- Centro de Origem e Distribuição Geográfica	18
2.3- Importância Econômica	18
2.3.1. Importância no Brasil e na Região Nordeste	18
2.3.2. A Mamona e seus Produtos	19
2.4- Recursos Genéticos	21
2.5- Programas de Melhoramento da Mamona	21
2.6- Caracterização Genética	23
2.6.1. - Estudos Citogenéticos	23
2.6.2. - Marcadores Moleculares	25
2.7- Importância dos Marcadores Moleculares em Plantas	27
2.8- Informações Moleculares Disponíveis em <i>R. communis</i>	28
2.9- Análises Fenéticas e Filogenéticas incluindo Marcadores Moleculares	29
3- Referências Bibliográficas	31
4- Manuscrito de Artigo Científico	39
Genetic Diversity in Subspontaneous Populations of <i>Ricinus communis</i> (Euphorbiaceae) Revealed by DAF (DNA amplification Fingerprinting)	

5- Informações Complementares	61
5.1. Detalhamento do Protocolo de Extração de DNA	62
5.2. Limpeza do DNA Genômico	62
5.3. Planilha de Dados para Análise pelo Programa PHYLIP	63
6- Abstract	64
7- Conclusões	65
8- Anexos	66
8.1- Anexo 1: Instruções para Autores do Periódico <i>Genetics and Molecular Biology</i>	67
8.2- Anexo 2: Instruções para Autores do Periódico <i>Euphytica</i>	70

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

- | | |
|---|----|
| Table 1. List of <i>R. communis</i> genotypes studied including accession identification, provenance and collection time. All Brazilians plants have been collected in the field by the authors | 55 |
| Table 2. Primers tested in the first round of selection (four genotypes) with sequence (5'-3'), number of amplicons and of polymorphic bands. Primers are ordered according to number or polymorphisms in decreasing order (from most to less informative primers) | 56 |
| Table 3. Primers tested in all 16 genotypes with sequence (5'-3'), number of amplicons and of polymorphic bands. Primers are ordered according to number or polymorphisms in decreasing order (from most to less informative primers) | 57 |

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito

- | | | |
|---------------|---|----|
| Figure | 1. Representative pictures of <i>R. communis</i> phenotypes observed in Brazilian populations | 58 |
| Figure | 2. A representative picture of DAF products with polymorphisms generated by the primers OP-C11 and OP-C02 in the genotypes of <i>Ricinus communis</i> | 59 |
| Figure | 3. Consensus unrooted tree (out of 190 000 parsimonious trees) generated from DAF-Data by Maximal Parsimony method and bootstrap analysis after Wagner | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
AL	Alagoas
bp	<i>Base Pairs</i> Pares de Bases
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CMA ₃	Cromomicina A ₃
CNPA	Centro Nacional de Pesquisa do Algodão
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAPI	4´-6-diamidinofenilindol
DAF	<i>DNA Amplification Fingerprinting</i> Impressão Genômica do DNA Amplificado
DF	Distrito Federal
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Dinucleotídeo Trifosfato
EBDA	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S/A
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i> Etiquetas de Seqüências Expressas
FACEPE	Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco
h	Hora
ha	Hectare
IAC	Instituto Agronômico de Campinas

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPA	Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária
kb	kilo bases
MIX	<i>Mixed Method Discrete Characters Parsimony</i> Método Mixto de Parsimônia de Caracteres Discretos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> Centro Nacional de Informação Biotecnológica
nr	Número
OP	Operon
PB	Paraíba
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reação em Cadeia da Polimerase
PHYLIP	<i>Phylogeny Inference Package</i> Pacote de Inferência Filogenética
R\$	Real – Moeda Brasileira
RAPD	<i>Random Amplification Polymorphism of DNA</i> Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
s	Segundo
Taq	<i>Thermophylus aquaticus</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
U	Unidade
US\$	Dólar – Moeda Americana

RESUMO

O Brasil ocupa mundialmente a terceira posição na produção de mamona (*Ricinus communis* L.). Embora existam muitos estudos moleculares voltados às proteínas expressas nas sementes, não existem até o momento análises com marcadores moleculares avaliando a diversidade genética dessa espécie. O presente trabalho estudou a variabilidade genética de 16 genótipos de populações subespontâneas de mamona adquiridas através de coletas em quatro diferentes localidades de Pernambuco e em duas outras regiões do Brasil, comparando-as a acessos cultivados de quatro outros países. Para isso a metodologia de DAF (*DNA amplification Fingerprinting*) foi utilizada, permitindo a geração de em média 14 bandas por primer, sendo 10,72 polimórficas, a partir de 11 primers. Para a construção da matriz de dados 143 bandas foram analisadas, perfazendo 2.288 caracteres. A análise filogenética de máxima parsimônia revelou uma diversidade genética significativa, entre genótipos da mesma população, considerando os diferentes pontos de coleta no Brasil, bem como comparativamente com acessos cultivados no exterior. O estudo confirma a variabilidade sugerida pelos melhoristas para as populações subespontâneas de mamona e demonstra a eficiência deste tipo de marcador para estudos de caracterização de germoplasma desta importante cultura vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: *Ricinus communis*, Mamona, Marcadores de DNA, DAF, *DNA Amplification Fingerprinting*.

1- INTRODUÇÃO

O gênero *Ricinus* pertence à família Euphorbiaceae, uma das maiores dentre as Angiospermae, compreendendo cerca de 300 gêneros e 8000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Webster, 1987; 1994). As espécies mais conhecidas desta família são a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), a seringueira (*Hevea brasiliensis* Müell Arg.) e a mamoneira (*Ricinus communis* L.).

A mamoneira (*R. communis* L.) pertence ao gênero *Ricinus*, o qual é considerado atualmente um gênero monotípico. Em vista de sua ampla ocorrência e distribuição, existem controvérsias sobre a origem de *R. communis*, considerando-se que possa ter-se originado no continente africano ou no asiático (Hemerly, 1981). A Etiópia e o leste da África são apontados como os principais centros de diversidade, ao lado de outros centros secundários (Moshkin, 1986; Webster, 1994).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de mamona e um dos maiores exportadores do seu principal produto, o óleo, que é extraído das sementes (Hemerly, 1981; Carvalho *et al.*, 2002). É possível encontrar a mamoneira em praticamente todo o Brasil de forma subespontânea, mas a importância comercial de seus produtos e subprodutos tem despertado o interesse do governo e dos pesquisadores para trabalhos objetivando o cultivo racional e econômico desta cultura (Savy-Filho, 1999). A mamonocultura no Brasil tem a maior produção no Nordeste, mais precisamente, no Estado da Bahia (Hemerly, 1981; Carvalho *et al.*, 2002).

A mamoneira pode ser totalmente aproveitada, pois tudo o que ela produz tem utilização na indústria ou na própria agricultura, além de perspectivas de uso como fonte energética (biodiesel). A mamonocultura em certas áreas do semi-árido nordestino é a mais rentável cultura de sequeiro, contribuindo como cultura alternativa, devido à presença de condições favoráveis ao seu desenvolvimento e a sua adequação à agricultura familiar, colaborando também na fixação de mão-de-obra e auxiliando na geração de empregos e de matéria-prima industrial (Azevedo *et al.*, 1998; Parente, 2003).

O melhoramento genético da mamona vem sendo direcionado principalmente à otimização de caracteres como porte da planta, tamanho e teor de óleo da semente, precocidade, deiscência da cápsula, produtividade, resistência às pragas e doenças (Moreira *et al.*, 1996; Savy-Filho, 1999; Freire *et al.*, 2001). As mamoneiras possuem uma taxa de alogamia, ou fecundação cruzada, de até 40%, proporcionando um aumento da variabilidade genética. Por outro lado, essa alogamia dificulta a fixação e a manutenção de cultivares melhoradas (Freire *et al.*, 2001).

Marcadores bioquímicos ou moleculares como isoenzimas, podem contribuir com programas de melhoramento genético, caracterizando com segurança um genótipo a partir de células ou tecidos, detectando polimorfismos para alelos de um determinado gene ou de pequenos fragmentos de DNA, permitindo acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejáveis (Ramirez *et al.*, 1991; Ferreira e Grattapaglia, 1998; Benko-Iseppon, 2001). Weising *et al.* (1995) efetuaram uma ampla revisão bibliográfica sobre marcadores do tipo *Fingerprinting* de DNA (Impressão Genômica do DNA). Tais marcadores são considerados altamente informativos, em vista da complexidade de locos que acessam concomitantemente, prestando-se para distinguir inclusive indivíduos proximamente relacionados.

Segundo os últimos levantamentos bibliográficos, o presente trabalho, realizado em populações de *R. communis*, é um dos pioneiros no estudo molecular desse gênero, bem como no uso da metodologia de DAF.

O presente estudo objetivou realizar uma caracterização genética com o auxílio de marcadores moleculares em algumas populações de *R. communis*, ocorrentes principalmente no estado de Pernambuco, através da metodologia de DAF (DNA Amplification Fingerprinting), visando inferir sobre a diversidade genética dessa espécie.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- A espécie *Ricinus communis* L. – Classificação Botânica

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) pertencente à família Euphorbiaceae, subfamília Acalyphoideae, tribo Acalypheae, subtribo Ricininae, e ao gênero *Ricinus*, o qual é considerado monotípico. A família Euphorbiaceae por sua vez, está entre as maiores das Angiospermae, compreendendo cerca de 300 gêneros e 8000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Webster, 1987; 1994).

A taxonomia de *Ricinus* é bastante complexa, havendo divergência entre os sistemas de classificação. Bayma (1958), por exemplo, sugeriu que o gênero seria composto por sete variedades: (1) *R. communis* var. *communis*, (2) *R. communis* var. *sp.*, (3) *R. communis* var. *viridis*, (4) *R. communis* var. *inermis*, (5) *R. communis* var. *zanzibarensis*, (6) *R. communis* var. *sanguineus* e (7) *R. communis* var. *minor*. Por outro lado, Popova e Moshkin (1986) descreveram seis subespécies do gênero: (1) *R. communis* ssp. *zanzibarinus* G. Pop., (2) *R. communis* ssp.

communis, (3) *R. communis* ssp. *indicus* G. Pop. et V. Moshk., (4) *R. communis* ssp. *ruderalis* G. Pop. et V. Moshk., (5) *R. communis* ssp. *sinensis* G. Pop. et V. Moshk., (6) *R. communis* ssp. *persicus* G. Pop., além de 25 variedades botânicas. Mais recentemente, Savy-Filho (1999) reconheceu a existência de apenas quatro subespécies: (1) *R. communis* var. *zanzibarensis*, (2) *R. communis* var. *africanus*, (3) *R. communis* var. *sinensis* e (4) *R. communis* var. *persicus*, bem como 25 variedades botânicas.

Indivíduos da espécie *R. communis* apresentam-se polimórficos, com hábito predominantemente arbustivo, podendo em alguns casos atingir até dez metros de altura (Popova e Moshkin, 1986). Em geral, o sistema radicular da mamoneira é do tipo axial, com uma raiz principal pivotante e as demais raízes laterais. Suas folhas são simples, longo-pecioladas e palmatilobadas. As plantas possuem uma grande variação em suas características, principalmente quanto à coloração de caule, folhas, frutos e sementes, além da ocorrência, ou não, de cera no pecíolo e/ou no caule. Os frutos podem ser deiscentes ou indeiscentes, tricocas, na sua maioria com acúleos, triloculares, com sementes que variam de tamanho, formato, cor e teores de óleo (Savy-Filho, 1999; Beltrão *et al.*, 2001).

Trata-se de uma planta monóica com inflorescência racemosa, formando cachos terminais. As flores femininas ocupam a porção superior e as masculinas a parte basal da inflorescência, proporcionando dois tipos de reprodução: autofecundação e fecundação cruzada, sendo sua polinização geralmente anemófila. Embora seja considerada uma planta autógama por alguns pesquisadores, o nível de alogamia pode atingir até 25% nas mamoneiras de porte anão e 40% nas de alto porte, o que favorece a heterogeneidade e a mistura varietal. Por outro lado, esta ocorrência dificulta o estabelecimento e a manutenção de cultivares melhoradas (Savy-Filho, 1999; Beltrão *et al.*, 2001; Freire *et al.*, 2001).

A maturação das flores femininas ocorre aproximadamente cinco a dez dias antes das flores masculinas caracterizando o fenômeno da protoginia, o que proporciona a manutenção da taxa de alogamia (Savy-Filho, 1999; Beltrão *et al.*, 2001). A quantidade de flores masculinas e femininas, bem como a produção da planta, estão diretamente ligados às condições ambientais, tipos de solo e idade da planta. Em solos férteis, por exemplo, com nutrição adequada, condições hídricas e temperatura satisfatórias, as flores femininas aparecem em maior número (Savy-Filho, 1999), enquanto altas temperaturas, deficiência hídrica e aumento da idade da planta favorecem o desenvolvimento de flores masculinas (Weiss, 1983). Em condições normais, a mamoneira se desenvolve adequadamente em clima quente e úmido. A temperatura ideal é cerca de 20°C a

30°C, e a exigência hídrica no período vegetativo é de, no mínimo, 100 mm de chuva por mês (Hemerly, 1981; Carvalho, 1988; Savy-Filho, 1999).

2.2- Centro de Origem e Distribuição Geográfica

Existem relatos de sementes e de óleo de *R. communis* no Antigo Egito há mais de 4000 anos (Moshkin, 1986). Muitos pesquisadores acreditam numa origem africana para a mamoneira, enquanto outros afirmam que sua origem seria asiática (Hemerly, 1981). A Etiópia e o leste da África são apontados como os principais centros de diversidade, ocorrendo ainda outros centros secundários (Moshkin, 1986).

Acredita-se que sua chegada ao Brasil ocorreu no século XVI, através das grandes expedições exploradoras de portugueses e outros europeus, encontrando aqui condições edafo-climáticas propícias a sua adaptação (Bogêa, 1940; Savy-Filho, 1999). A mamoneira, também conhecida no Brasil pelos nomes de carrapateira, enxerida e palma-crísti, vegeta naturalmente desde a latitude 40° Norte até 40° Sul.

2.3- Importância Econômica

A mamona está entre as olerícolas mais importantes de nosso planeta, sendo cultivada comercialmente em mais de 15 países, destacando-se a Índia, a China e o Brasil, considerados os principais produtores mundiais (Távora, 1982; Santos *et al.*, 2001), enquanto países considerados de alta-tecnologia são os principais consumidores do óleo de mamona (Baldanzi *et al.*, 2003).

2.3.1- Importância no Brasil e na Região Nordeste

É possível encontrar a mamoneira em praticamente todo o Brasil de forma subespontânea, mas a importância comercial de seus produtos e subprodutos tem despertado o

interesse do governo e dos pesquisadores em projetos objetivando o cultivo racional e eficiente dessa cultura (Savy-Filho, 1999).

Apesar do clima e solo apropriados para o cultivo de *R. communis* no Brasil, o país é o terceiro produtor mundial dessa cultura, atrás da Índia e da China. Em 1986, perdeu a liderança na produção de sementes para a Índia e entre 1984 e 1996 aproximadamente 290 mil dos 485 mil hectares de área cultivada com mamona deixaram de produzir (Azevedo *et al.*, 1998; FAO, 2004), supostamente, devido aos sistemas de produção inapropriados, à falta de sementes de cultivares melhorados para as condições locais, à falta de políticas de comercialização adequadas (preços baixos para o produtor) e à carência de assistência técnica especializada (Santos *et al.*, 2001).

A mamoneira no Brasil tem a maior produção no Nordeste, mais precisamente, no Estado da Bahia. No restante do país os Estados mais produtivos são Minas Gerais e São Paulo (Carvalho *et al.*, 2002). O Nordeste brasileiro é caracterizado por problemas sociais e ambientais resultantes, parcialmente, da exploração insustentável dos recursos naturais, do uso inapropriado das terras e da falta de tecnologias modernas aplicadas à agricultura. Compreende mais de 1,5 milhões de quilômetros quadrados e abriga aproximadamente 30% da população brasileira. Possui ainda, a maior variedade de ecossistemas de todas as regiões do Brasil, sendo considerado um dos centros mundiais de biodiversidade, com cerca de 20.000 espécies de plantas (Virgino e Baracat, 1999).

Somente o comprometimento do governo brasileiro em todos os setores, municipal, estadual e federal, poderá viabilizar o desenvolvimento dessa cultura no país. Apenas no Nordeste, a estimativa do potencial de um programa de biodiesel, atingiria dois milhões de famílias com uma renda em torno de R\$ 1.500,00 (US\$ 500/ano), proporcionando uma grande melhoria na qualidade de vida da população local (Parente, 2003).

Para atingir o nível competitivo internacional, é necessário investir na modernização de técnicas agrícolas, nas boas relações dos componentes da cadeia produtiva (agricultor – indústria) bem como em pesquisas visando seu melhoramento (Savy-Filho, 1999).

2.3.2- A Mamona e seus Produtos

A mamoneira pode ser totalmente aproveitada, pois todas suas partes podem ser utilizadas na indústria ou na própria agricultura, além da perspectiva de uso como fonte

energética, com a produção do biodiesel (Parente, 2003). Suas folhas podem ser utilizadas como alimento na sericicultura (cultivo do bicho da seda) ou adicionadas à forragem, após a desintoxicação, visando o aumento da lactação em vacas (Loureiro, 1962). Da sua haste é possível extrair fibras e celulose, usadas na confecção de tecidos grosseiros e papel, respectivamente. A parte mais importante economicamente é a semente, que após ser esmagada para a extração do óleo, é um dos componentes da chamada torta de mamona, juntamente com os restos culturais da planta. A torta é um excelente adubo e nematicida, podendo também ser usada, após tratamento para retirada de produtos tóxicos, na alimentação animal (Hemerly, 1981; Batista *et al.*, 1997; Savy-Filho, 1999).

O óleo desidratado das sementes é aplicado na fabricação de cerca de 400 produtos, na indústria farmacêutica, na indústria de cosméticos, na indústria de lubrificantes, na fabricação de desinfetantes, germicidas, tintas, isolantes, corantes, anilinas, nylon e plásticos (Azevedo *et al.*, 1998).

Porém, é na indústria de lubrificantes que reside sua maior importância, sendo sua inclusão obrigatória em vários lubrificantes, devido a propriedades únicas, como a manutenção da viscosidade a altas temperaturas e baixo ponto de congelamento, necessário por exemplo na lubrificação de aviões. Devido a sua constituição química, o óleo da mamona é um dos produtos mais versáteis encontrados na natureza. Por exemplo, é solúvel em álcool, clorofórmio, ácido acético glacial, éter e metanol (Azevedo *et al.*, 1998).

A importância do óleo de mamona só não é maior devido à existência de uma proteína tóxica, a ricina, encontrada somente no endosperma da semente da mamona (Weiss, 1983; Moshkin, 1986; Savy-Filho, 1999), que pode ser letal para animais e para o homem, dependendo da quantidade de toxina ingerida. Essa toxina vem sendo considerada uma potente arma química, capaz de ligar-se à superfície de carboidratos, inserindo-se assim rapidamente nas células e causando a subsequente inibição da síntese protéica. As formas mais perigosas de contato são por inalação ou por injeção (muscular, subcutânea ou venosa). Quantidades relativamente pequenas (5-10 µg/kg de peso) podem matar em poucas horas (Bradberry *et al.*, 2003). Uma das preocupações da comunidade científica tem sido nocautear este gene, tornando a mamona assim uma das mais importantes plantas oleaginosas para as mais diversas finalidades industriais e alimentícias (Dale *et al.*, 2002).

Recentemente descobriu-se que a ricina tem propriedades moleculares que, se adequadamente modificadas, podem tornar o óleo de mamona um importante agente terapêutico para várias doenças humanas (Dunwell, 1999). Apesar da grande importância de *R. communis* na

produção de óleo industrial e medicinal e de seus subprodutos, ainda não se conhece devidamente toda a diversidade genética disponível na espécie.

2.4- Recursos genéticos

A preservação e o melhoramento dos genótipos de uma espécie são cruciais na prevenção de eventos que possam inviabilizar sua existência, como por exemplo, novas doenças e pragas, extinção de ambientes naturais e perda de resistência. Esses fatores podem impedir sua sustentabilidade econômica e ecológica. A conservação dos genótipos das plantas cultivadas e de seus ancestrais silvestres garante a diversidade e propicia a seleção de cultivares com caracteres agronômicos desejáveis (Nóbrega *et al.*, 2001).

No Brasil várias instituições conceituadas - a Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S/A. (EBDA), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) através do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (EMBRAPA-CNPA), com o apoio do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (EMBRAPA-CENARGEN), o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e a Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) - possuem bancos de germoplasma de *R. communis*, cujo número de acessos varia periodicamente segundo as atividades de introdução, caracterização e avaliação dos mesmos.

Os acessos dos bancos de germoplasma necessitam ser caracterizados e avaliados corretamente para que possam ser empregados de forma eficiente em programas de melhoramento. Na descrição dos acessos de mamoneira, três tipos de dados são utilizados: dados do passaporte, caracterização e avaliação preliminares – características quantitativas e qualitativas, e caracterização e avaliação complementar – características de interesse dos melhoristas (Nóbrega *et al.*, 2001).

2.5- Programas de Melhoramento da Mamona

A mamoneira passou a figurar em trabalhos de pesquisa no Brasil após 1936, quando o Instituto Agronômico de Campinas (IAC) lançou as bases do “Plano Geral dos Trabalhos em Execução nas Seções de Genética e Plantas Oleaginosas”, objetivando o desenvolvimento tecnológico e o cultivo racional e econômico da mamoneira. Desde então, tem-

se procurado a obtenção de cultivares com caracteres agronômicos desejáveis que satisfaçam às necessidades dos produtores e às exigências da indústria (Moreira *et al.*, 1996; Lima e Santos, 1998).

A maioria dos ricinocultores brasileiros utiliza sementes de diferentes variedades numa mesma área de cultivo (Moreira *et al.*, 1996). Crisóstomo *et al.* (1975) citaram mais de 90 tipos diferentes de sementes encontradas na Bahia. Por um lado, este dado contribui para a situação desanimadora da mamoneira no Brasil, uma vez que faltam sementes melhoradas, havendo degenerescência dos materiais cultivados, não havendo um sistema de cultivo que permita ao produtor obter um retorno econômico mínimo para suas necessidades e as da lavoura (Azevedo *et al.*, 1997). Por outro lado, a grande variedade fenotípica facilita o trabalho dos melhoristas. Nos Estados Unidos e em países de agricultura desenvolvida, a produtividade de híbridos comerciais da mamoneira já superou em 14% as cultivares não-híbridas mais produtivas (Zimmerman, 1958).

Dentre as diversas variedades e cultivares existentes e utilizados no Brasil podemos destacar: ‘BRS 149’ (‘Nordestina’), ‘BRS 188’ (‘Paraguaçu’), ‘Baianita’, ‘Amarela-de-Irecê’, ‘Pernambucana’, ‘Sete Canadas’, ‘Vermelhinha’, ‘Preta’, ‘Sangue-de-Boi’, ‘Coty’, ‘Anã Cia’, ‘Canela de Juriti’, ‘Mamoninha’, ‘Cacho de Metro’, ‘Azeitona’, ‘Maringá’, ‘Baker 415-9’, ‘SIPEAL-1’, ‘SIPEAL-2’, ‘SIPEAL-28’, ‘IAC 38’, ‘IAC 80’, ‘Guarani’, ‘Campinas’, ‘Ebapa 02’, ‘LC 5116’ e os híbridos, 415, Baker H.66, Baker H.72 (Crisóstomo *et al.*, 1975; Hemerly, 1981, Mazzani, 1983; Carvalho, 1988; Freire *et al.*, 1990; EMBRAPA, 1998; Lima e Santos, 1998; Vieira *et al.*, 1998; EMBRAPA, 1999).

A obtenção de características que são consideradas satisfatórias para atender determinados objetivos vem sendo proposta e estudada por alguns pesquisadores. Baldanzi *et al.* (2003) propõem uma alteração quanto ao ciclo de vida perene da mamoneira por um modelo de ciclo anual de vida, característica essa, presente na cultura do milho e em tomateiros modificados visando facilitar a colheita.

Rojas-Barros *et al.* (2004) conseguiram isolar um mutante natural que apresenta um alto nível de ácido oléico, média aproximada de 78%, e um baixo nível de ácido ricinoléico, cerca de 14%, no óleo da mamona. Na composição química do óleo das sementes de mamona em geral, a concentração desses ácidos representa uma média de aproximadamente 90% de ácido ricinoléico e 3% de ácido oléico. Essa mudança de concentração no óleo de *R. communis* é ótima para uma aplicação industrial ou alimentícia que requeira alta estabilidade oxidativa.

Em pesquisas realizadas no Brasil por Lima e Santos (1998), algumas correlações genótípicas, fenótípicas e ambientais foram estudadas, observando-se resultados positivos e significativos nas relações entre a altura média da planta e os seguintes caracteres: número de racemos e frutos por planta, número de cápsulas e rendimento de sementes por planta. O número de racemos também foi relacionado de forma positiva com o número de cápsulas e o rendimento por planta. Dados semelhantes foram encontrados como resultado de pesquisas em outros países, como na Rússia e na Índia (Bhatt e Reddy, 1981; Moshkin, 1986).

Alguns dos fatores que influenciam o bom resultado de uma cultura numa determinada região, relacionam-se ao controle dos fatores abióticos (umidade e fertilidade do solo) e bióticos (pragas, doenças e plantas daninhas) (Azevedo *et al.*, 1998). Nas mais importantes regiões produtoras do país observa-se a susceptibilidade da mamoneira aos fungos causadores do mofo cinzento, da murcha-de-fusarium, da podridão-de-botryodiplodia e da podridão-de-macrophomina. As pragas também estão presentes principalmente na forma de lagarta-roscas (*Agrotis* spp. e *Thalesa citrina*) e lagarta-das-folhas (*Spodoptera latifascia*). Encontra-se ainda o percevejo-verde (*Nezara viridula*) e a cigarrinha (*Agallia* spp. e *Empoasca* spp.). Essas doenças e pragas são de grande importância econômica, pois podem causar perdas consideráveis na produção (Lima *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2001).

As primeiras cultivares geneticamente resistentes ao mofo-cinzento causado por *Botryotinia ricini* e *Botrytis ricini*, foram desenvolvidas nos Estados Unidos gerando, por exemplo, a cultivar CMA1 (Távora, 1982). No Brasil, as cultivares mais resistentes ao mofo-cinzento são: ‘Canela-de-Juriti’, ‘Sangue-de-Boi’, ‘SIPEAL 04’, ‘SIPEAL 09’, ‘MPAI T 63/6’ e ‘LC 5116’. A EMBRAPA-CNPA vem trabalhando com a linhagem CNPA M. 93-91, possível fonte de resistência à podridão-de-macrophomina, causada por *Macrophomina phaseolina* (Lima e Batista, 1997).

2.6 – Caracterização Genética

2.6.1- Estudos Citogenéticos

Polimorfismos genéticos importantes na caracterização de cultivares têm sido revelados por um número variado de técnicas citogenéticas. Marcadores citológicos permitem a detecção de alterações cromossômicas estruturais e numéricas e auxiliam na construção de mapas

genéticos. Os estudos nessa área têm contribuído com os programas de melhoramento genético, auxiliando na caracterização de germoplasmas, no entendimento das relações filogenéticas e na identificação da origem de várias espécies (Carvalho, 1999; Benko-Iseppon, 2001).

Informações sobre a citogenética da mamoneira existentes na literatura estão restritas, em sua maioria, a metodologias de citogenética clássica, utilizando técnicas convencionais de coloração em cromossomos mitóticos ou paquitênicos. O número cromossômico diplóide de *R. communis* foi descrito primeiramente por Perry (1943) como sendo $2n=20$ e confirmado por outros autores (Jakob, 1956; Távora, 1982; Gusmão, 2000). Entretanto, Mazzani (1983) argumenta que a mamoneira ($2n=20$) seria um tetraplóide, uma vez que, um indivíduo com $2n=10$ foi encontrado e descrito como um diplóide verdadeiro, fundamentado no número básico $x=5$ (Jelenkovic *et al.*, 1980).

Jelenkovic e Harrington (1973) e Paris *et al.* (1978) descreveram um completo idiograma dos cromossomos paquitênicos de *R. communis* ($2n=20$) evidenciando o tamanho, a posição do centrômero, a razão entre os braços, comprimento e posição das regiões heterocromáticas, além dos cromossomos organizadores de nucléolos. Esses autores afirmaram que os cromossomos dessa espécie podem ser facilmente identificados através da análise do número e forma dos segmentos heterocromáticos em cada bivalente no paquíteno.

Mais recentemente, uma caracterização citogenética utilizando técnicas de coloração convencional e bandeamento cromossômico foi realizada por Gusmão *et al.* (2004), em indivíduos de uma população de *R. communis* ocorrente no Estado de Pernambuco, Brasil. A coloração convencional revelou núcleos interfásicos do tipo semi-reticulado, padrão de condensação cromossômica proximal, morfologia cromossômica de metacêntricos a submetacêntricos, além da presença de um par cromossômico satelitado. Esses resultados estão de acordo com as análises realizadas em cromossomos paquitênicos por Jelenkovic e Harrington (1973) e Paris *et al.* (1978) em relação à morfologia cromossômica.

A técnica do bandeamento C evidenciou nos cromossomos mitóticos uma pequena quantidade de blocos de heterocromatina nesta espécie, discordando do resultado de Paris *et al.* (1978), os quais relataram grandes blocos de heterocromatina presentes na região pericentromérica em cromossomos paquitênicos. O uso de técnicas de bandeamento cromossômico com os fluorocromos CMA₃ e DAPI em *R. communis* foi efetuado pela primeira vez no trabalho de Gusmão *et al.* (2004) revelando sítios ricos em GC (CMA⁺) nas posições subterminais de um dos braços de quatro pares cromossômicos (Gusmão *et al.*, 2004). Os sítios CMA⁺, provavelmente, correspondem às regiões organizadoras de nucléolos descritos em estudos

de cromossomos paquitênicos conforme observado por Paris *et al.* (1978) e Jelenkovic e Harrington (1973).

Os resultados observados após a coloração com nitrato de prata efetuados por Gusmão *et al.* (2004), revelaram um número variado de nucléolos entre os indivíduos analisados, evidenciando de um a oito nucléolos por núcleo interfásico, chegando a ocupar 70-80% da área nuclear. Isso sugere a ocorrência de super expressão de genes organizadores de nucléolos. Em cromossomos metafásicos, oito são marcados com AgNO₃, sendo quatro maiores e quatro menores, o que corresponde ao número máximo de oito nucléolos observados na intérfase. Os autores sugerem que, devido a este fenômeno, a mamona seria a espécie conhecida com maior número de sítios de rDNA expresso por genoma haplóide.

2.6.2- Marcadores Moleculares

A análise genética da diversidade e da relação entre ou dentro de diferentes espécies e populações é um tema central de várias disciplinas das ciências biológicas. Especialmente durante a última década, estratégias clássicas de avaliação da variabilidade genética, como anatomia comparada, morfologia, embriologia e fisiologia, foram complementadas por técnicas moleculares com grande sucesso. Essas incluem a análise de compostos químicos e especialmente de macromoléculas. Os chamados marcadores moleculares, os quais são baseados em polimorfismos encontrados em proteínas ou no DNA, auxiliam grandemente as pesquisas em várias áreas do conhecimento como a taxonomia, a filogenia, a ecologia, a genética e o melhoramento vegetal (Weising *et al.*, 1995; Kumar, 1999; Hedrick, 2001).

Adicionalmente, metodologias de genômica comparativa, a partir do seqüenciamento de porções determinadas do genoma, têm permitido uma visão ímpar das bases genéticas de importantes mecanismos, determinantes da morfologia, fisiologia e adaptação dos mais diversos organismos-modelo, desde unicelulares a complexas plantas e animais, incluindo o ser humano (Martin, 2000; Meinke e Tanksley, 2000).

Marcadores bioquímicos ou moleculares como isoenzimas ou fragmentos de DNA, podem caracterizar com segurança um genótipo a partir de células ou tecidos de um indivíduo. Esses marcadores, ao contrário dos marcadores morfológicos, permitem acelerar o processo de seleção e recombinação dos indivíduos desejáveis. Essas técnicas são capazes de detectar um alto

nível de variabilidade entre cultivares e com isso permitir uma identificação mais segura do material (Ramirez *et al.*, 1991; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

O significado da variabilidade genética detectada por métodos bioquímicos e moleculares difere daquele identificado pela citogenética. No primeiro caso, detecta-se polimorfismos para alelos de um determinado gene ou de pequenos fragmentos de DNA, enquanto no segundo caso, os polimorfismos são referentes a cromossomos, ou seja, a grande fração do genoma da planta, contendo milhares de genes essenciais. Isso significa que o polimorfismo cromossômico, embora mais raramente observado, especialmente em nível intraespecífico, envolve maior número de locos, enquanto os polimorfismos moleculares e bioquímicos denunciam variações genéticas mais pontuais. Porém, ambas as técnicas revelam polimorfismos genéticos importantes na caracterização de cultivares (Benko-Iseppon, 2001).

Milach (1998) e Ferreira e Grattapaglia (1998) consideraram os marcadores de RAPD (*Random Amplified Polymorphism of DNA*, ou Polimorfismos de DNA Amplificados Randomicamente) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, ou Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição) como as classes de marcadores mais utilizadas em genética e melhoramento de plantas. Os autores destacam um maior uso da metodologia de RAPD em detrimento da análise de RFLP, em vista de seu menor custo e maior facilidade de aplicação, embora o segundo tipo de análise apresente maior reprodutibilidade.

Mühlen *et al.* (2000) aplicaram três tipos de marcadores de DNA: RAPD, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, ou Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos Amplificados) e amplificação de microssatélites para estimar a variabilidade genética de etnovariiedades de *Manihot*, gênero também pertencente à família das Euphorbiaceae. Os resultados obtidos foram similares, de forma geral, na distribuição da diversidade genética, sendo que a variabilidade nos locos de microssatélites foi consideravelmente maior que a detectada por RAPD ou AFLP.

Weising *et al.* (1995) efetuaram uma ampla revisão bibliográfica dos marcadores classificados como *Fingerprinting* de DNA (ou impressão genômica do DNA) em plantas e fungos. Tais marcadores são considerados como altamente informativos, em vista da complexidade de locos que acessam concomitantemente, prestando-se para distinguir inclusive indivíduos proximamente relacionados. Os autores destacam que, além do uso de enzimas de restrição, a metodologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, ou Reação em Cadeia da Polimerase), associada à hibridização de fragmentos com microssatélites, têm em muito

colaborado para um refinamento das citadas análises, resultando em um considerável aumento no número de polimorfismos e em reprodutibilidade considerável.

Não foram encontrados estudos prévios na literatura aplicando marcadores moleculares na caracterização de *R. communis*, seja em acessos de bancos genéticos, seja em populações naturais ou subespontâneas. Também parecem não existir quaisquer estudos visando o estabelecimento de mapas genéticos com caracteres morfológicos e moleculares na citada espécie.

2.7- Importância dos Marcadores Moleculares em Plantas

No estudo da variabilidade genética de muitas espécies de plantas como por exemplo, a mandioca (Marmey *et al.*, 1994; Colombo *et al.*, 1998), o cacau (Wilde *et al.*, 1992), o mamão (Stiles *et al.*, 1993), a maçã (Koller *et al.*, 1993), a batata doce (Connolly *et al.*, 1994) e o algodão (Multani e Lyon, 1995) os marcadores moleculares estão sendo usados com frequência (Colombo *et al.*, 2000).

Marcadores moleculares como RAPD, RFLP e microsatélites foram usados com sucesso no desenvolvimento do mapa genético de *Manihot* (Fregene *et al.*, 1997), no estudo da variabilidade genética entre acessos de seu germoplasma e no estabelecimento das relações entre a mandioca e espécies selvagens (Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 1998).

Vários exemplos da aplicação de *Fingerprinting* de DNA na caracterização de acessos de germoplasma, no melhoramento vegetal, na genética de populações, na ecologia e na sistemática têm sido descritos na literatura. Colombo *et al.* (1998) destacaram a aplicação da metodologia de RAPD em relação aos descritores botânicos nos estudos da diversidade genética em mandiocas, na identificação de materiais ou acessos duplicados e na formação de uma “core collection”.

Marcadores moleculares de RAPD foram usados, por exemplo, para detectar variações existentes entre indivíduos e populações de duas espécies leguminosas arbóreas nativas da América Central e do México (*Gliricidia sepium* H.B. & K. e *G. maculata* H.B. & K.), parcialmente influenciadas pelo homem em vista de seu extrativismo e cultivo para extração de madeira (Chalmers *et al.*, 1992). Os resultados evidenciaram populações altamente monomórficas para todos os iniciadores (*primers*) avaliados na região de cultivo e extrativismo, enquanto as populações naturais apresentavam altos níveis de polimorfismo, confirmando as avaliações morfológicas e estudos morfométricos previamente realizados. Os autores sugerem que a área que

sofreu influência antrópica foi selecionada unidirecionalmente, decorrendo em um decréscimo da diversidade.

A análise de *Fingerprinting* de DNA também pode esclarecer alguns aspectos, sobre a origem das plantas ocorrentes em determinadas regiões geográficas. Um exemplo clássico encontra-se na espécie *Microseris pygmaea* D. Don, a qual ocorreria subespontaneamente no Chile, havendo a hipótese de que sua introdução teria ocorrido a partir de uma única semente trazida da América do Norte. Enquanto padrões isoenzimáticos revelaram apenas baixos níveis de variabilidade, hibridização pós-restrição do DNA com o microsatélite GATA resultou em *Fingerprinting* altamente polimórfico, contrariando a hipótese anterior (Houten *et al.*, 1991).

Para o Nordeste brasileiro ainda há poucas espécies analisadas com metodologias de *Fingerprinting* de DNA. Destaca-se um estudo preliminar com a metodologia de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*, ou Impressão Genômica da Amplificação do DNA) em populações selvagens e domesticadas de *Vigna*, incluindo o feijão-de-corda (*V. unguiculata* (L.) Walp.), supostamente introduzida da África e domesticada em várias regiões pelo sertanejo nordestino. O estudo em questão revelou uma variabilidade acima da esperada para o nível intra-específico (Simon *et al.*, 2002), provavelmente devido a diferentes pressões de seleção exercidas por comunidades distintas e isoladas de pequenos produtores, além das condições extremas do ambiente (Simon *et al.*, 2002; Benko-Iseppon, 2001).

A metodologia de DAF tem sido empregada com sucesso na caracterização genética de diversas culturas, incluindo leguminosas como o grão-de-bico (Winter *et al.*, 2000; Benko-Iseppon *et al.*, 2003), mostrando-se relativamente vantajosa quando comparada com outras técnicas moleculares, como o RAPD, especialmente por sua alta reprodutibilidade e por gerar um grande número de polimorfismos.

2.8- Informações Moleculares Disponíveis em *R. communis*

Embora não tenham sido encontrados estudos prévios avaliando a diversidade genética da mamona com marcadores moleculares, pode-se observar um grande número de seqüências de nucleotídeos e proteínas de mamona depositados nos bancos genéticos. No nível de nucleotídeos, existem 1255 seqüências depositadas, a maioria correspondendo a ESTs (*Expressed Sequence Tags*, etiquetas de seqüências expressas) isoladas de diferentes estágios de desenvolvimento das sementes. Apenas 146 seqüências foram provenientes do isolamento de

DNA genômico (em sua maioria também relativas a genes importantes para substâncias existentes nas sementes). No nível protéico, 250 seqüências de aminoácidos encontram-se disponíveis no Genbank, a maioria isolada de sementes (NCBI, 2004). Dentre as seqüências depositadas, poucas são as que efetivamente geraram publicações científicas.

Exemplos de seqüências publicadas, incluem aquelas geradas pelo grupo de Weig e colaboradores (Weig e Komor, 1992; 1996; Weig *et al.* 1994; Weig e Eisenbarth, 2000; Weig e Jakob 2000) que seqüenciaram vários genes expressos (cDNAs) em diferentes etapas de desenvolvimento e germinação das sementes de mamona, incluindo carreadores de açúcar, lipoproteínas e outros solutos.

Um outro estudo incluiu a caracterização do cDNA correspondente à proteína RcPRO1, uma profilina ativa no floema e responsável pelo sistema de transporte de solutos em longa distância (Schobert *et al.*, 2000).

2.9- Análises Fenéticas e Filogenéticas incluindo Marcadores Moleculares

O modelo fenético, também conhecido como taxonomia numérica, descreve as diferenças e semelhanças entre os organismos, baseando-se em muitas características hereditárias. Para complementar a taxonomia numérica, a filogenética leva em consideração o tempo, e se refere à classificação dos organismos tomando como base suas relações evolutivas. A análise filogenética dos dados moleculares tem como base as proposições de Hening na década de 1950, que lançou os fundamentos da sistemática filogenética. Este método, denominado cladística, tenta reconstruir as relações de parentesco entre grupos, gerando uma escala de classificação e vem sendo aperfeiçoado ao longo do tempo, contribuindo com a organização do conhecimento sobre a diversidade biológica, a partir das relações de parentesco, e sobre a evolução das características morfológicas, comportamentais, ecológicas, fisiológicas, citogenéticas e moleculares dos grupos (Weising *et al.*, 1995; Moctezuma e Günter, 2000; Lesk, 2003).

Os polimorfismos visualizados, provenientes do produto das reações de DAF e RAPD, podem ser graficamente representados na forma de árvores (dendrogramas) de base fenética ou filogenética. Para a construção de um dendrograma é necessário a criação de uma matriz de distância baseada em dados polarizados (presença + ou ausência -) para cada banda/indivíduo

gerada pelos diversos primers, bandas fracas ou dados duvidosos são excluídos da análise (Weising *et al.*, 1995; Moctezuma e Günter, 2000; Lesk, 2003).

Vários são os softwares usados para avaliação de matrizes de dados moleculares e morfológicos. O pacote de programas PHYLIP versão 3.6a (versão *off line*) ou 3.6c (versão Linux *on line* no site <http://evolution.gs.washington.edu>) é atualmente o mais usado e citado em publicações científicas. Inclui subprogramas capazes de aplicar métodos de parsimônia, matrizes de distância, máxima verossimilhança e outros métodos com uma variedade de tipos de dados, incluindo seqüências de DNA, RNA e proteínas, mapas de restrição, dados discretos de matrizes de presença e ausência (matrizes 0/1), frequências gênicas e caracteres morfométricos (Felsenstein, 2003).

3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo DMP de, Lima EF, Batista FAZ, Beltrão NE de M, Soares JJ, Vieira R de M and Moreira J de AN (1997) Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Nordeste do Brasil. EMBRAPA - CNPA (Circular Técnica, 25) Campina Grande, 52 pp.
- Azevedo DMP de, Beltrão NE de M, Santos JW, Lima EF, Batista FAZ, Nóbrega LB da, Vieira DJ and Pereira JR (1998) Efeito de população de plantas no consórcio mamoneira/sorgo. Rev Bras Ol Fibras 2: 183-192.
- Baldanzi M, Fambrini M and Pugliesi C (2003) Redesign of the castor bean plant body plan for optimal combine harvesting. Ann Appl Biol 142: 299-306.
- Batista FAS, Lima EF, Azevedo DMP de, Santos JW and Pires VA (1997) Avaliação do nível de resistência de genótipos de mamoneira às podridões causadas por *Macrophomina phaseolina* e *Botryodiplodia theobromae*. Embrapa-CNPA (Comunicado Técnico, 57), Campina Grande, 03 pp.
- Bayma AC (1958) Mamona. Serviço de Informação Agrícola, Produt Rur 7, 96 pp.
- Beltrão NE de M, Silva LC, Vasconcelos OL and Vieira DJ (2001) Fitologia. In: Azevedo DMP and Lima EF. O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 37-61.
- Benko-Iseppon AM (2001) Estudos moleculares e citogenéticos no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. Embrapa Docs 56: 327-332.
- Benko-Iseppon AM, Winter P, Hüttel B, Staginnus C, Muehlbauer FJ and Kahl G (2003) Molecular markers closely linked to Fusarium resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. Theor Appl Genet 107: 379-386.
- Bhatt D and Reddy TP (1981) Correlations and path analysis in castor (*Ricinus communis* L.). Canad J Genet Cytol 23: 525-531.

- Bogêa JP (1940) Ligeiras considerações sobre a mamona na Baía em seus aspectos cultural, industrial e econômico. B Min Agric 29: 23-37.
- Bradberry SM, Dickers KJ, Rice P, Griffiths GD and Vale JA (2003) Ricin poisoning. Toxicol Ver 22: 65-70.
- Carvalho LO (1988) Cultura da mamoneira. Campinas: CATI (Comunicado Técnico, 73), 3 pp.
- Carvalho JMFC, Pio KB, Santos JW and Almeida FAC (2002) Germinação e contaminação de sementes de mamoneira *in vitro* mediante quebra de dormência e desinfecção. Rev Bras Ol Fibras 2: 147-150.
- Carvalho R (1999) Citogenética de *Manihot esculenta* Crantz e oito espécies afins. Master's Thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.
- Chalmers KJ, Waugh R, Sprent L, Simons AJ and Powel W (1992) Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. Heredity 69: 465-472.
- Chavarriaga-Aguirre P, Maya MM, Bonierbale MW, Kresovich S, Fregene MA, Tohme J and Kochert G (1998) Microsatellites in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): discovery, inheritance and variability. Theor Appl Genet 97: 493-501.
- Colombo C, Second G, Valle TL and Charrier A (1998) Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta*). I) RAPD markers. Braz J Genet 21: 105-113.
- Colombo C, Second G and Charrier A (2000) Diversity with American cassava germ plasm based on RAPD markers. Genet Mol Biol 23: 189-199.
- Connolly AG, Godwin ID, Cooper M and DeLacy IH (1994) Interpretation of randomly amplified polymorphic DNA marker data for fingerprinting sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. Theor Appl Genet 88: 332-336.
- Crisóstomo JR, Sampaio HSV and Rodrigues EM (1975) Produtividade das principais variedades de mamoneira (*Ricinus communis* L.) de porte alto cultivadas na Bahia. Embrapa, Representação do Estado da Bahia (Comunicado técnico, 11), Salvador, 17 pp.

- Dale PJ, Clarke B and Fontes EMG (2002) Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnol* 20: 567-574.
- Dunwell JM (1999) Transgenic crops: the next generation, or an example of 2020 vision. *Ann Bot* 85: 29-35.
- EMBRAPA (1998) Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Campina Grande, PB). BRS 149: (Nordestina). Folder, Campina Grande.
- EMBRAPA (1999) Centro Nacional de Pesquisa de Algodão (Campina Grande, PB). BRS 188: (Paraguaçu). Folder, Campina Grande.
- FAO Food and Agriculture Organization (2004) Web page: <http://apps.fao.org/inicio.htm>
Accession date: February/2004.
- Felsenstein J (2003) Theoretical Evolutionary Genetics. Web page: <http://evolution.gs.washington.edu/pgbook/pgbook.html> (free pdf file). Publication date: 2003; accession date: March/2004. 383 pp.
- Ferreira ME and Grattapaglia, D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3^a ed., EMBRAPA-CENARGEN Docs 20, Brasília, 220 pp.
- Fregene M, Angel F, Gomes R, Rodriguez F, Chavarriaga P, Roca WM, Tohme J and Bonierbale MW (1997) A molecular genetic map for cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet* 95: 431-441.
- Freire EC, Andrade FP de, Medeiros LC de, Lima EF and Soares JJ (1990) Competição de cultivares e híbricos de mamona no Nordeste do Brasil. EMBRAPA - CNPA (Pesquisa em andamento, 11), Campina Grande, 13 pp.
- Freire EC, Lima EF and Andrade FP de (2001) Melhoramento Genético. In: Azevedo DMP and Lima EF O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 229-256.
- Gusmão CLS (2000). Citogenética da Família Euphorbiaceae do Nordeste Brasileiro. Master's Thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

- Gusmão CLS, Carvalho R and Benko-Iseppon AM (2004) Caracterização Citogenética e Bandeamento de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae). In prep.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? Trends Ecol & Evol 16: 629-632.
- Hemerly FX (1981) Mamona: comportamento e tendências no Brasil. Embrapa-DTC (Documento, 2), Brasília, 69 pp.
- Houten WHJ Van, Heusden AW Van, Roupe JVV, Raijmann L and Bachmann K (1991) Hypervariable DNA fingerprinting loci in *Microseris pygmaea* (Asteraceae, Lactuceae). Bot Acta 104: 252-255.
- Jakob KM (1956) The pachytene chromosomes of the castor oil plant. Cytologia 21: 76-80.
- Jelenkovic G and Harrington E (1973) Chromosome complement of *Ricinus communis* at pachytene and early diplotene. J Hered 64: 137-142.
- Jelenkovic G, Shiffriss O and Harrington E (1980) Association and distribution of meiotic chromosomes in haploid of *Ricinus communis* L. Cytologia 45: 571-577.
- Koller B, Lehmann A, McDermott JM and Gessler C (1993) Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theor Appl Genet 85: 901-904.
- Kumar LS (1999) DNA markers in plant improvement: an overview. Biotech Adv 17: 143-182.
- Lesk AM (2003) Introduction to Bioinformatics. Oxford University Press Inc. New York, pp 160-215.
- Lima EF, Araújo AE and Batista FAS (2001) Doenças e seu controle. In: Azevedo DMP and Lima EF O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 191-212.
- Lima EF and Batista FAS (1997) Mamona (*Ricinus communis* L.). Controle de doenças. In: Vale FXR do and Zambolim L ed. Controle de doenças de plantas: grandes culturas. UFV, Viçosa, pp 535-551.

- Lima EF and Santos JW (1998) Correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais entre características agronômicas da mamoneira (*Ricinus communis* L.). Rev Oleag Fibr 2: 147-150.
- Loureiro MC (1962) Torta de sementes da mamona na alimentação animal. Campinas, Ceres 6: 290-294.
- Marmey P, Beeching JR, Hamon S and Charrier A (1994) Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collection using RAPD markers. Euphytica 74: 203-209.
- Martin C (2000) Towards the third millennium. Trends Plant Sci 5: 138-140.
- Mazzani B (1983) Euforbiáceas oleaginosas. Tártago. In: Mazzani B. Cultivo y mejoramiento de plantas oleaginosas. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Caracas, Venezuela: pp 277-360.
- Meinke D and Tanksley S (2000) Genome studies and molecular genetics the maturation and specialization of plants genomics. Curr Opin Plant Biol 3: 95-96.
- Melchinger AE, Lee M, Lamkey KR and Woodman WL (1990) Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two diallelic sets of maize inbreds. Crop Sci Gen 30: 1033-1040.
- Milach SCK (1998) Marcadores Moleculares em Plantas. Gráfica UFRGS. Porto Alegre, 141 pp.
- Moctezuma EV and Günter K (2000) Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio) Mundi-Prensa México, S.A. de C.V., México, 150 pp.
- Moreira JAN, Lima EF, Farias FJC. and Azevêdo DMP (1996) Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.). EMBRAPA – CNPA (Documentos, 44) Campina Grande, 30 pp.
- Moshkin VA (1986) Castor. Amerind, New Delhi, 315 pp.
- Mühlen GS, Martins PS and Ando A (2000) Variabilidade Genética de etnovariedades de mandioca, avaliada por marcadores de DNA. Sci Agri 57: 319-328
- Multani DS and Lyon BR (1995) Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. Genome 38: 1005-1008.

- NCBI (2004). National Center for Biological Information. Entrez Database (on line). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Release date 18.02.2004.
- Nóbrega MBM, Andrade FP, Santos JW and Leite EJ (2001) Germoplasma. In: Azevedo DMP and Lima EF O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 257-281.
- Parente EJS (2003) Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Unigráfica and Tecbio. Fortaleza, 68 pp.
- Paris HS, Shifriss O and Jelenkovic G (1978) Idiogram of *Ricinus communis*. J Hered 69: 191-196.
- Perry BA (1943) Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. Amer J Bot 30: 527-543.
- Popova GM and Moshkin VA (1986) Botanical classification. In: Moshkin VA ed. Amerind, New Delhi, pp 315.
- Ramirez H, Calderon A and Roca WM (1991) Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. In: Roca WM and Mroginski LA eds. Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones, Ciat, Cali, pp 825-855.
- Rojas-Barros P, Haro A, Muñoz J and Fernández-Martínez JM (2004) Isolation of a Natural Mutant in Castor with High Oleic/Low Ricinoleic Acid Content in the Oil.Crop Sci 44: 76-80.
- Santos RF, Barros MAL, Marques FM, Firmino PT and Requião LEG (2001) Análise Econômica. In: Azevedo DMP and Lima EF. O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 17-35.
- Savy-Filho A (1999) Melhoramento da Mamona, In: Borém A Melhoramento de Espécies Cultivadas. Editora UFV. Viçosa - Minas Gerais. pp 385-407.
- Schobert C, Gottschalk M, Kovar RD, Staiger JC, Yoo BC and Lucas WJ (2000) Characterization of *Ricinus communis* phofilin, RcPR01. Plant Molec Biol 42: 719-730.

- Simon MV, Resende LV, Benko-Iseppon AM, Winter P and Kahl G (2002) Aplicabilidade da análise de *fingerprinting* de DNA na determinação da diversidade genética intra e interespecífica do gênero *Vigna*. Horticult Bras 20: 1-5.
- Soares JJ, Araújo LHA and Batista FAS (2001) Pragas e seu controle. In: Azevedo DMP and Lima EF O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 213-227.
- Stiles JJ, Lemme C, Sondur S, Morshidi MB and Manshardt R (1993) Using randomly amplified polymorphic DNA for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. Theor Appl Genet 85: 697-701.
- Távora FJAF (1982) A cultura da mamona. Epoca, Fortaleza, 111 pp.
- Vieira R de M, Azevedo DMP de, Lima EF, Batista FAZ, Santos JW and Dourado RMF (1998) Competição de cultivares e linhagens de mamoneira no Nordeste do Brasil – 1993/96. Embrapa - CNPA (Comunicado Técnico, 71), Campina Grande, 14 pp.
- Virgino J and Barakat A (1999) Plants of the Brazilian Northeastern Region Programa Plantas do Nordeste). Web page: <http://www.rbgekew.org.uk/ceb/pne/>
- Webster GL (1987) The saga of the spurges: a review of classification and relationships in the Euphorbiales. Bot J Linn Soc 94: 3-46.
- Webster GL (1994) Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. Ann Miss Bot Gard 81: 33-144.
- Weig A and Eisenbarth DA (2000) Role of aquaporins during elongation growth of castor bean seedlings. In: Hohmann S and Nielsen S (eds.). Molecular biology and physiology of water and solute transport. Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 357-364.
- Weig A, Franz J, Sauer N and Komor E (1994) Isolation of a family of sugar carrier cDNA clones from *Ricinus communis* L. with close homology to the hexose carriers. J Plant Physiol 143: 178-183.
- Weig A and Jakob C (2000) Functional characterization of *Arabidopsis thaliana* aquaglyceroporins. In: Hohmann S and Nielsen S (eds.). Molecular biology and

- physiology of water and solute transport. Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 365-372.
- Weig A and Komor E (1992) The lipid transfer protein C of *Ricinus communis* L.: isolation of two cDNA sequences which are strongly and exclusively expressed in cotyledons after germination. *Planta* 187: 367-371.
- Weig A and Komor E (1996) An active sucrose carrier (Scr1) that is predominantly expressed in the seedling of *Ricinus communis* L. *J. Plant Physiol.* 147: 685-690.
- Weising K, Nybom H, Wolff K and Meyer W (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, 322 pp.
- Weiss EA (1983) Oilseed crops. Longman, London, pp 31-99.
- Wilde J, Waugh R and Powell W (1992) Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor Appl Genet* 83: 835-838.
- Winter P, Benko-Iseppon AM, Hüttel B, Ratnaparkhe M, Tullu A, Sonnante G, Plaff T, Tekeoglu M, Santra D, Sant, VJ, Rajesh PN, Kahl G and Muehlbauer FJ (2000) A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L. genome based on recombinante inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. *Theor Appl Genet* 101: 1155-1163.
- Zimmerman LH (1958) Castor beans: a new oil crop for mechanized production. *Advances in Agronomy* 10:257-288.

4- MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO

GENETIC DIVERSITY IN SUBSPONTANEOUS POPULATIONS OF *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE) REVEALED BY DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING)

DIVERSIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES SUBESPONTÂNEAS DE
Ricinus communis (EUPHORBIACEAE) REVELADA PELA METODOLOGIA
DE DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING)

A ser submetido à revista

Euphytica

Kluwer Academic Publishers

The Netherlands

ISSN 0014-2336

GENETIC DIVERSITY IN SUBSPONTANEOUS POPULATIONS OF *Ricinus communis* (EUPHORBIACEAE) REVEALED BY DAF (DNA AMPLIFICATION FINGERPRINTING)

To be submitted to *Euphytica*

Nilmara Santana de Oliveira¹, Reginaldo de Carvalho¹ & Ana Maria Benko-Iseppon*¹

Laboratory of Plant Genetics and Biotechnology, Genetics Dept., Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego s/no. 50732-970, Recife – PE, Brazil
(*author for correspondence)

Key words: *Ricinus communis*, castor beans, molecular markers, fingerprinting.

ABSTRACT

Brazil is the third producer of castor seeds in the world, after India and China. Despite the significant production, few successful works have been carried out in order to increase production rates in Brazil, especially due to the presence of subsponaneous populations all over the country, collaborating for the introgression of undesired features in selected cultivars through outcrossing. No previous evaluations have been performed using molecular markers to access genetic diversity of castor bean gene pool. The present work evaluated the use of DAF (DNA Amplification Fingerprinting) in the characterization of subsponaneous populations of *R. communis* as compared with cultivated forms from Botanical Gardens in other countries, including a total of 16 genotypes. For this purpose 30 primers have been tested in four selected genotypes generating two to 12 bands and none to eight polymorphic bands. From these, eleven primers have been selected for use in all 16 genotypes. After DAF procedure an average of 14 bands and 10.72 polymorphic bands per primer have been observed. For the construction of the data matrix 143 bands have been analyzed including 2,288 characters. The maximal parsimony phylogenetic analysis revealed a significant diversity between genotypes of the same population considering different Brazilian areas, and also as compared to the accessions from other countries. The results confirm the existing variability in subsponaneous populations, previously suggested by plant breeders and demonstrates the applicability of DAF in germplasm characterization of castor bean genotypes in the future.

1- INTRODUCTION

Castor bean (*Ricinus communis* L.) belongs to the monotypical genus *Ricinus* (family Euphorbiaceae, subfamily Acalyphoideae, tribe Acalypheae, subtribe Ricininae) (Webster 1987, 1994). There are some controversies regarding its origin (Asia or Africa) (Hemerly 1981), but most opinions suggest Ethiopia and eastern region of the African continent as the centre of origin and diversity of this crop (Moshkin 1986; Webster 1994).

Brazil is between the largest castor bean producers, with fields all over the country, but the most significant production has been generated in the state of Bahia in the north-eastern region (Hemerly 1981, Carvalho et al. 2002). This crop is especially advantageous in the dry semi-arid areas of Brazilian northeast, where many other crops are not able to grow, being well accepted by small farmers and generating many jobs, since the production is mostly not mechanized (Azevedo et al. 1998, Parente 2003).

Recently the importance of castor beans increased due to the growing need of alternative energy, once this crop is recognized as a good deliver of biodiesel. Many other important applications have been recognized for this crop that is currently used in more than 400 products, with emphasis on raw material for industries, such as pharmaceuticals, cosmetics and lubricants (Azevedo et al. 1998, Savy-Filho 1999, Parente 2003).

In Brazil, castor bean breeding programs aim to improve mainly characters as erect (not prostrate) habit, size of the plant (small or dwarf), size and oil content of the seeds, non dehiscence of the capsules, early flowering, increased productivity and resistance to the attack of pathogens and insects (Moreira et al. 1996, Savy-Filho 1999, Freire et al. 2001).

To achieve these goals, breeders have been conducting crosses and backcrosses in order to incorporate desirable traits with some success. On the other hand the existence of many subsponaneous castor bean populations all over the country (and also surrounding the fields)

impaired the fixation and maintenance of selected cultivars, with outcrossing levels that are supposed to achieve 40% (Gurgel 1945, Freire et al. 2001).

Despite its importance, no evaluation of *R. communis* genotypes with molecular markers has been carried out until today. The existing germplasm banks have never been evaluated in regard of its genetic diversity with the aid of molecular data. The goal of this work was to evaluate the use of DAF to access genetic variation in this species, probing Brazilian subsontaneous populations as compared with cultivated forms from Botanical Gardens in other countries.

The DAF method is similar to RAPD (Random Amplified Polymorphism of DNA) using lower amounts of DNA and higher amounts of random primers (Caetano-Anollés et al. 1991) that may be 8 to 15meres. Previous comparisons of both methods proved that DAF is more reliable and reproducible than RAPD recommending its use in genetic mapping (Winter et al. 2000, Benko-Iseppon et al. 2003) and for general assessment of genetic diversity and germplasm characterization (Benko-Iseppon 2001, Simon et al. 2002).

MATERIAL AND METHODS

Plant Material and DNA extraction

Leaves and seeds of 10 genotypes of *R. communis* have been collected in two different Brazilian states, with emphasis on the State of Pernambuco. Seeds of six cultivated plants have also been received from Botanical Gardens from four other countries (France, Germany, Japan and Portugal) (Table 1).

All DNA extractions have been carried out from young leaves of plants obtained from seeds. For this purpose, seeds have been scarified with wood sandpaper (nr. 180), washed and immersed in autoclaved tap water for 24 h. After that, they have been disinfected with 4% sodium hypochloride during 10 min and washed twice with distilled water. For germination they have been maintained in sterilized Petri disks over two sheets of filter paper under controlled light (12 h light / 12 h dark) and temperature (22-26°C). After germination they have been transferred to plastic boxes containing the inert substrate Plantmax[®] (a mix of carbonized rice hull and inert vegetal fibbers).

The DNA extraction protocol used was previously described (Sharp et al. 1988) followed by phenol/chlorophorm purification (Ausubel et al. 1992) and RNase digestion. DNA quantification was carried out with the comparative method in agarose gel (1.2 %) using different concentrations of λ -DNA as standard.

DNA amplification fingerprinting and electrophoresis

DAF followed the procedure of Caetano-Anollés et al. (1991) with some modifications introduced by Benko-Iseppon et al. (2003) as follows: PCR was carried out using random (10-mers) primers procured from Eurogentec (Cologne, Germany), Operon Technologies (Alameda, USA) or Roth (Karlsruhe, Germany), respectively. Each 15 μ L PCR reaction contained 1.5 μ L 10x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂; 10 mM dNTP-mix; 0.8 U "Biotools" *Taq* DNA polymerase, 40 pmol oligonucleotide primer, and 1 ng/ μ L of template DNA. The DNA was first denatured for 2 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s denaturation at 95°C, 1 min annealing at 35°C and 2 min elongation at 72°C, with a final elongation at the same temperature for 2 min. The reaction products were separated on 1.8% agarose gels stained with ethidium bromide and viewed under ultraviolet light.

An initial step of primer selection was carried out, evaluating four assorted genotypes (one German and three Brazilian genotypes, see Table 1) with a set of 30 primers (Table 2). Afterwards, only the 11 most polymorphic primers (Table 3) have been used in the evaluation of all 16 genotypes selected for this study.

Data analysis

A data matrix was constructed from the analysis of the bands generated by DAF and visualised after agarose gel electrophoresis. For this purpose, we considered the presence (1) or absence (0) of each analysed band for each of the studied individuals. Dubious or faint bands have been excluded from the analysis, being designated by the letter “n” in order to not influence evaluation. The DAF markers analysed were transformed into binary characters using the MIX program of the PHYLIP package Version 3.6a in order to generate a consensus unrooted Wagner parsimony dendrogram (Felsenstein 2003).

RESULTS

At the time of field collection of Brazilian individuals from subsontaneous populations it was observed that some populations or individuals had completely green fruits, leaves and petioles, while other showed dark red-brownish leaves with bright red petioles and fruits. Also an intermediary form was observed (green leaves with light brownish surface, but bright red petioles and fruits) (Figure 1). These features were annotated and are included in Table 1 (see abbreviation included in accession identification) in order to evaluate the position of the genotypes bearing these features in the dendrograms to be generated.

The first primer selection using 30 different random 10-mers generated a maximum of 14 and a minimum of one amplicon per primer. In average 7.16 amplicons per primer have been generated with this approach. The number of polymorphisms varied between nine and none (observed in five primers). In average four polymorphic bands per primer could be observed (Table 2).

In the second round of amplification, using 11 selected primers on 16 genotypes, a maximal number of 23 (primer OP-A04) and a minimum of seven (primers OP-B05 and OP-D05) bands per primer have been generated. From all primers the most polymorphic was OP-A04 (23 bands) and the less informative was OP-A13 (only one polymorphism from 12 amplicons generated). All amplifications generated in this procedure presented the same banding pattern observed in the first primer selection. Figure 2 presents an example of the amplification patterns observed, illustrated by the primers OP-C11 and OP-C02.

The maximal parsimony phylogenetic analysis revealed a significant diversity between genotypes of the same population considering different Brazilian areas, and also as compared to the accessions from other countries. The generated dendrogram (Figure 3) represents the consensus out of 190.000 most parsimonious bootstrapped data after Wagner parsimony method.

Two basal clades emerged including the accessions Bras-Rec-Red-S1 and Bras-Rec-Lre-S2, both collected in the year 2003 in the urban area of Setúbal (Brazil, Recife). These two individuals appeared in the dendrogram separated from Bras-Rec-Red-S3 and S4 (collected six to seven years early in the same population) that remained together in another clade near to the remaining Brazilian genotypes (Figure 3, group I-C). All four accessions from Setúbal beard red or light red leaves.

From these basal clades a main clade (clade X) emerged and split out into two distinct clades (Y and Z) including Brazilian and non-Brazilian genotypes (Group I and II, respectively) (Figure 3).

The accession from restinga area in Alagoas (Bras-Bno-Gre) remained together in a subclade (Figure 3, Group I-B) with the three accessions from Carpina's semi-arid area (Bras-Car-Gre-01, 02 and 03). All four accessions presents features in common as erect individuals, green leaves and many seeds per infrutescence.

The two accessions from surrounding areas of Dois Irmãos Atlantic Forest reserve in Recife (Bras-Rec-Gre-D1 and 2) appeared in basal positions in the main clade Y (Group I-D and A, respectively).

DISCUSSION

The present evaluation of DAF method for accessing castor bean diversity can be considered successful especially regarding the low number of primers tested (30 decameres), from which only 11 were effectively used in the 16 genotypes evaluated to generate a matrix with 143 characters.

In a similar approach Simon et al. (2002) used a total of 262 primers (10- to 15-meres) to select 48 primers observing an average of 14,1 polymorphic bands per primer in 85 germplasm accessions of six *Vigna* (Fabaceae) species analyzed. This higher number of primers was necessary because of the assumed low diversity at the intraspecific level in some *Vigna* species, what seems not to be the case of castor beans.

Ricinus communis has been considered a species that presents considerable genetic diversity on the basis of phenotypic evaluations (Savy-Filho 1999, Beltrão et al. 2001, Freire et al.

2001), even considering the lack of studies at the molecular level. This diversity may be due to the reproductive features of this species that presents protogyny (maturation of female flowers five to 10 days before maturation of male flowers) favoring outcrossing (Gurgel 1945). These features result in the generation of diversity sources that can be used by breeders in crossing experiments. On the other hand, this feature impairs the fixation of introgressed characters in castor bean fields. Our data reinforce the suggestion of breeders regarding the significant diversity in castor bean populations.

The dendrogram generated by the maximal parsimony analysis revealed an expressive diversity between genotypes of the same population considering different Brazilian areas, and also as compared to the accessions from other countries.

It is interesting to observe that the generated dendrogram (Figure 3) positioned two Brazilian accessions collected in Recife (ruderal area of Setúbal) in a basal clade, with a main secondary clade (X) and two emerging clades including at one side all remaining Brazilian genotypes (clade Y, group I) and at the other all non-Brazilian cultivated forms (clade Z, group II).

It is interesting to note that the two genotypes positioned at the basal clades (Bras-Rec-Red-S1 and Bras-Rec-Lre-S2) have been collected in the year 2003 while both remaining individuals from the same population have been collected six to seven years ago (1996 and 1997). This may suggest some changes in the genetic diversity of the ruderal population occurring in this area, what can be explained by establishment of many civil construction enterprises, generating isolation and reducing gene flow.

It is also interesting to observe that the non-Brazilian cultivated forms are grouped in a separate clade, revealing some relation among them and diverging from Brazilian populations. The two accessions of Portugal (both from different institutions in the city of Porto) formed a clade separated by only three steps (Figure 3, group II). In this non-Brazilian clade the cultivated

form from Oldenburg, Germany (Germ-Old-Gre) appeared in a basal position, followed by the French accession (Fran-Vcf-Gre), the genotype from Hamburg (Germany, Germ-Ham-Gre) the Japanese accession (Japa-Kyo-Gre) and the two accessions of Portugal mentioned above.

Regarding the Brazilian clade (Figure 3, Group I) it is interesting to note that the accession from Alagoas restinga area in Barra Nova (Bras-Bno-Gre) remained together in a subclade (Group I-B) with the three accessions from Carpina's semi-arid area (Bras-Car-Gre-01, 02 and 03). All four accessions are adapted to arid soils and high temperatures. The population of Carpina is supposed to have originated from seeds that escaped the cultivated fields, what can also be suggested for the population of Alagoas, both with features in common as green leaves, erect individuals and many seeds per infructescence.

The two accessions from surrounding areas of Dois Irmãos Atlantic Forest reserve in Recife (Bras-Rec-Gre-D1 and 2) presented green leaves and appeared separated in the main clade Y (Group I-D and A, respectively) as basal clades of the remaining Brazilian genotypes, suggesting that these two genotypes may carry more diversity than the remaining species.

The distribution of the analyzed accessions in the dendrogram at one side confirms some expectations, i.e. was able to separate Brazilian from non-Brazilian accessions and to group some genotypes by area of collection or adaptation to environmental conditions (e.g. semi-arid together with restinga). By the other hand it separated individuals of the same population collected after a period of six years. This suggests that DAF markers may be also useful in monitoring the genetic erosion over a time fashion, what should be evaluated using other biological models.

Germplasm evaluations have been highly optimized by the incorporation of molecular markers together with morphological descriptors. They help at one side to evaluate the genetic distance of accessions in comparison with some features considered important by breeders as well in the choice of contrasting parental lines for mapping purposes.

Among the 30 primers tested in four *R. communis* accessions the most informative was OP-A09 that generated nine polymorphic (out of ten) bands, contrasting for example with the primer OP-A13 that generated the same number of bands (ten) with a single polymorphic one.

In the second round of DAF amplification using 11 decameres, the most informative primer was OP-A04 (sequence 5-3' AATCGGGCTG) that generated 23 bands, all polymorphic, followed by OP-C11 (sequence 5-3' AAAGCTGCGG), that generated 18 bands, from which 15 were polymorphic. It is interesting to observe that most informative primers are GC rich in the 3' terminus. In average the primers used in all 16 genotypes generated 13 bands/primer, from which 10.72 were polymorphic. This is similar to the results reported by Simon et al. (2002) that used 26 polymorphic primers selected out of 262 initially evaluated and observed in average 14.8 bands per primer, from which 13.2 polymorphic. It can be supposed that the number of potential informative primers useful for DAF analysis may increase as soon as additional sequences are tested in *R. communis*.

Regarding the needs of castor bean breeding, the present evaluation may be helpful in indicating that: (i) the most informative primers (presenting many polymorphic amplicons) are potentially useful in DAF characterization of germplasm banks and of natural populations; (ii) DAF may be useful also in the evaluation of segregating lines for mapping purposes, especially considering its discrimination capacity between individuals of the same population; (iii) subspontaneous genotypes present significant genetic diversity that may be evaluated with the aid of molecular markers; (iv) the effective influence of introgression of undesired features in castor bean fields through outcrossing may be evaluated in the future with aid of molecular markers.

In view of the increasing importance of castor bean products for diverse purposes, with emphasis on the pharmaceutical industry (Dunwell 1999) and the production of biodiesel (Savy-Filho 1999) the establishment of a castor bean breeding program with the aid of modern biotechnological methods is urgent.

Especially considering the difficulties observed for its cultivation in temperate climates, as related by Baldanzi et al. (2003) castor bean could be a model tropical crop helping the establishment of new productive chains in south hemispheric poor semi-arid areas, as it is the case of Brazilian northeastern region.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Botanical Gardens of the Oldenburg University and Hamburg University (Germany), Jardin Botanique de Clermont-Ferrand (France), The Nippon Shiniaky Institute for Botanical Research (Kyoto, Japan) and also the Science Faculty of the Porto University and the Botanical Institute Dr. Gonçalo Sampaio-Lordelo do Ouro (both in Porto, Portugal). We also thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for financial support and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for a master fellowship (N.S. Oliveira).

REFERENCES

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & K. Struhl, 1992. Short Protocols in Molecular Biology. Second Edition. John Wiley & Sons, New York.
- Azevedo, D.M.P. de, Beltrão, N.E. de M, Santos, J.W., Lima, E.F., Batista, F.A.Z., Nóbrega, L.B. da, Vieira, D.J. & J.R. Pereira, 1998. Efeito de população de plantas no consórcio mamoneira/sorgo. Rev Bras Ol Fibras 2: 183-192.
- Baldanzi, M., Fambrini, M. & C. Pugliesi, 2003. Redesign of the castorbean plant body plan for optimal combine harvesting. Ann Appl Biol 142: 299-306.
- Beltrão, N.E. de M., Silva, L.C., Vasconcelos, O.L. & D.J. Vieira, 2001. Fitologia. In: Azevedo, D.M.P. & E.F. Lima, O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 37-61.
- Benko-Iseppon, A.M., 2001. Estudos moleculares e citogenéticos no caupi em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. Embrapa Docs 56: 327-332.
- Benko-Iseppon, A.M., Winter, P., Hüttel, B., Staginnus, C., Muehlbauer, F.J. & G. Kahl, 2003. Molecular markers closely linked to Fusarium resistance genes in chickpea show significant alignmentes to pathogenesis-related genes located on Arabidopsis chromosomes 1 and 5. Theor Appl Genet 107: 379-386.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J., & P.M. Gresshoff, 1991. DNA amplification fingerprinting: a strategy for genome analysis. Plant Mol Biol Rep 9: 292-305.
- Carvalho, J.M.F.C., Pio, K.B., Santos, J.W. & F.A.C. Almeida, 2002. Germinação e contaminação de sementes de mamoneira *in vitro* mediante quebra de dormência e desinfecção. Rev Bras Ol Fibras 2: 147-150.
- Dunwell JM (1999) Transgenic crops: the next generation, or an example of 2020 vision. Ann Bot 85: 29-35.

- Felsenstein J. 2003. Theoretical Evolutionary Genetics. Web page: <http://evolution.gs.washington.edu/pgbook/pgbook.html> (free pdf file). Publication date: 2003; accession date: March/2004. 383 pp.
- Freire, E.C., Lima, E.F. & F.P. Andrade, 2001. Melhoramento Genético. In: Azevedo, D.M.P. & E.F. Lima, O agronegócio da mamona no Brasil. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB), Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 229-256.
- Gurgel, J.T.A., 1945. Estudos sobre a mamoneira (*Ricinus communis* L.). USP, 70 pp.
- Hemerly, F.X., 1981. Mamona: comportamento e tendências no Brasil. Embrapa-DTC (Documento, 2), Brasília, 69 pp.
- Moreira, J.A.N., Lima, E.F., Farias, F.J.C. & D.M.P. Azevedo, 1996. Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.). EMBRAPA – CNPA (Documentos, 44) Campina Grande, 30 pp.
- Moshkin, V.A., 1986. Castor. Amerind, New Delhi, 315 pp.
- Parente, E.J.S., 2003. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. Unigráfica e Tecbio. Fortaleza, 68 pp.
- Savy-Filho, A., 1999. Melhoramento da Mamona, In: Borém, A. Melhoramento de Espécies Cultivadas. Editora UFV. Viçosa - Minas Gerais, pp 385-407.
- Sharp, P.J., Kreiss M., Shewry P. & M.D. Gale 1988. Location of b-amylase sequences in wheat and its relatives. Theor Appl Genet 75: 289-290
- Simon, M.V., Resende, L.V., Benko-Iseppon, A.M., Winter, P. & G. Kahl, 2002. Aplicabilidade da análise de *fingerprinting* de DNA na determinação da diversidade genética intra e interespecífica do gênero *Vigna*. Horti Bras 20(2): 1-5.
- Webster, G.L., 1987. The saga of the spurges: a review of classification and relationships in the Euphorbiales. Bot J Linn Soc 94: 3-46.
- Webster, G.L., 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. Ann Miss Bot Gard 81: 33-144.

Winter, P., Benko-Iseppon, A.M., Hüttel, B., Ratnaparkhe, M., Tullu, A., Sonnante, G., Plaff, T., Tekeoglu, M., Santra, D., Sant., V.J., Rajesh, P.N., Kahl, G. & F.J. Muehlbauer, 2000. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L. genome based on recombinante inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: localization of resistance genes for fusarium wilt races 4 and 5. Theor Appl Genet 101: 1155-1163.

Table 1 List of *R. communis* genotypes studied including accession identification, provenance and collection time. All Brazilians plants have been collected in the field by the authors

Accession Identification	Provenance, collection time
Bras-Bno-Gre	Brazil, Alagoas state, city of Barra Nova, restinga vegetation, 300 m from the beach. Collected in July/2003.
Bras-Car-Gre-01	
Bras-Car-Gre-02	Brazil, Pernambuco state, city of Carpina, semi-arid vegetation, near Engenho Caraúba. Individual 1, 2, 3. Collected in September/ 2003.
Bras-Car-Gre-03	
Bras-Rec-Gre-D1 *	Brazil, Pernambuco state, city of Recife, Dois Irmãos Village, near an area of natural Atlantic forest. Individual 1, 2. Collected in July/2003.
Bras-Rec-Gre-D2 *	
Bras-Rec-Red-S1 *	Brazil, Pernambuco state, city of Recife, ruderal area, Setúbal village (Boa Viagem Beach). Individual 1, 2. Collected in July/ 2003.
Bras-Rec-Lre-S2	
Bras-Rec-Red-S3	Brazil, Pernambuco state, city of Recife, ruderal area, Setúbal village (Boa Viagem Beach). Individual 3. Collected in 1997.
Bras-Rec-Red-S4	Brazil, Pernambuco state, city of Recife, ruderal area, Setúbal village (Boa Viagem Beach). Individual 4. Collected in June/1996.
Fran-Vcf-Gre	France, city of Ville de Clermont-Ferrand, Jardin Botanique de Clermont-Ferrand. Index Seminum 2000.
Germ-Ham-Gre *	Germany, city of Hamburg, Botanical Gardens of the Hamburg University. Index Seminum 1997.
Germ-Old-Gre	Gemany, city of Oldenburg, Botanical Gardens of the Oldenburg University. Index Seminum 1999.
Japa-Kyo-Gre	Japan, Kyoto city, The Nippon Shiniaky Institute for Botanical Research. Index Seminum 1998.
Port-Gsl-Gre	Portugal, city of Porto, Porto University, Botanical Institute Dr. Gonçalo Sampaio – Lordelo do Ouro. Index Seminum 1997.
Port-Por-Gre	Portugal, city of Porto, Science Faculty of the Porto University, Hortus Botanicus. Cat. Nr. 099. Index Seminum 2002.

First letters of accession identification designates the country of provenance (Bras=Brazil; Fran=France; Germ=Germany; Japa=Japan; Port=Portugal), second group of three letters refers to the city of provenance or collection, third group of three letters refers to the predominant color of the leaves and petioles at the time of collection (Gre=green; Red=red; Lre=redish leaves with red petioles). For the collections from Recife, two different populations have been considered, designed by the letter D=Dois Irmãos and S=Setúbal. The sign * after accessions number indicate genotypes that have been used for selection of primers listed in Table 2

Table 2 Primers tested in the first round of selection (four genotypes) with sequence (5' - 3'), number of amplicons and of polymorphic bands. Primers are ordered according to number or polymorphisms in decreasing order (from most to less informative primers)

Order	Primer	Sequence 5' - 3'	Number of Amplicons	Number of Polimorphic Bands
1.	OP-A09	GGGTAACGCC	10	9
2.	OP-C05	GATGACCGCC	11	8
3.	OP-C11	AAAGCTGCGG	11	8
4.	OP-C10	TGTCTGGGTG	10	8
5.	OP-C19	GTTGCCAGCC	14	7
6.	OP-A08	GTGACGTAGG	11	7
7.	OP-G05	CTGAGACGGA	9	7
8.	OP-C02	TTGAGGCGTC	10	6
9.	OP-A04	AATCGGGCTG	9	6
10.	OP-A01	CAGGCCCTTC	8	6
11.	OP-B05	TGCGCCCTTC	7	6
12.	OP-A15	TTCCGAAACC	8	5
13.	OP-C18	TGAGTGGGTG	8	5
14.	OP-AB09	GGGCGACTAC	8	4
15.	OP-C08	TGGACCGGTG	8	4
16.	OP-D05	TGAGCGGACA	7	4
17.	OP-B08	GTCCACACGG	6	4
18.	OP-A12	TCGGCGATAG	5	4
19.	OP-C17	TTCCCCCAG	4	3
20.	OP-G03	GAGCCCTCCA	11	2
21.	OP-A06	GGTCCCTGAC	6	2
22.	OP-C01	TTCGAGCCAG	4	2
23.	OP-A13	CAGCACCCAC	12	1
24.	OP-C14	TGCGTGCTTG	4	1
25.	OP-C04	CCGCATCTAC	2	1
26.	OP-A17	GACCGCTTGT	3	0
27.	OP-C12	TGTCATCCCC	3	0
28.	OP-J13	CCACACTACC	3	0
29.	OP-C06	GAACGGACTC	2	0
30.	OP-D16	AGGGCGTAAG	1	0
Average number of bands			7.16	4.0

Table 3 Primers tested in all 16 genotypes with sequence (5´-3´), number of amplicons and of polymorphic bands. Primers are ordered according to number of polymorphisms in decreasing order (from most to less informative primers)

Order	Primer	Sequence 5´ - 3´	Number of Amplicons	Number of Polimorphic Bands
1.	OP-A04	AATCGGGCTG	23	23
2.	OP-C11	AAAGCTGCGG	18	15
3.	OP-G05	CTGAGACGGA	15	15
4.	OP-C05	GATGACCGCC	15	13
5.	OP-C19	GTTGCCAGCC	14	10
6.	OP-G03	GAGCCCTCCA	11	10
7.	OP-AB09	GGGCGACTAC	10	09
8.	OP-C02	TTGAGGCGTC	11	09
9.	OP-D05	TGAGCGGACA	07	07
10.	OP-B05	TGCGCCCTTC	07	06
11.	OP-A13	CAGCACCCAC	12	01
Total number of generated bands			143	118
Average number of bands generated per primer			13.0	10.72

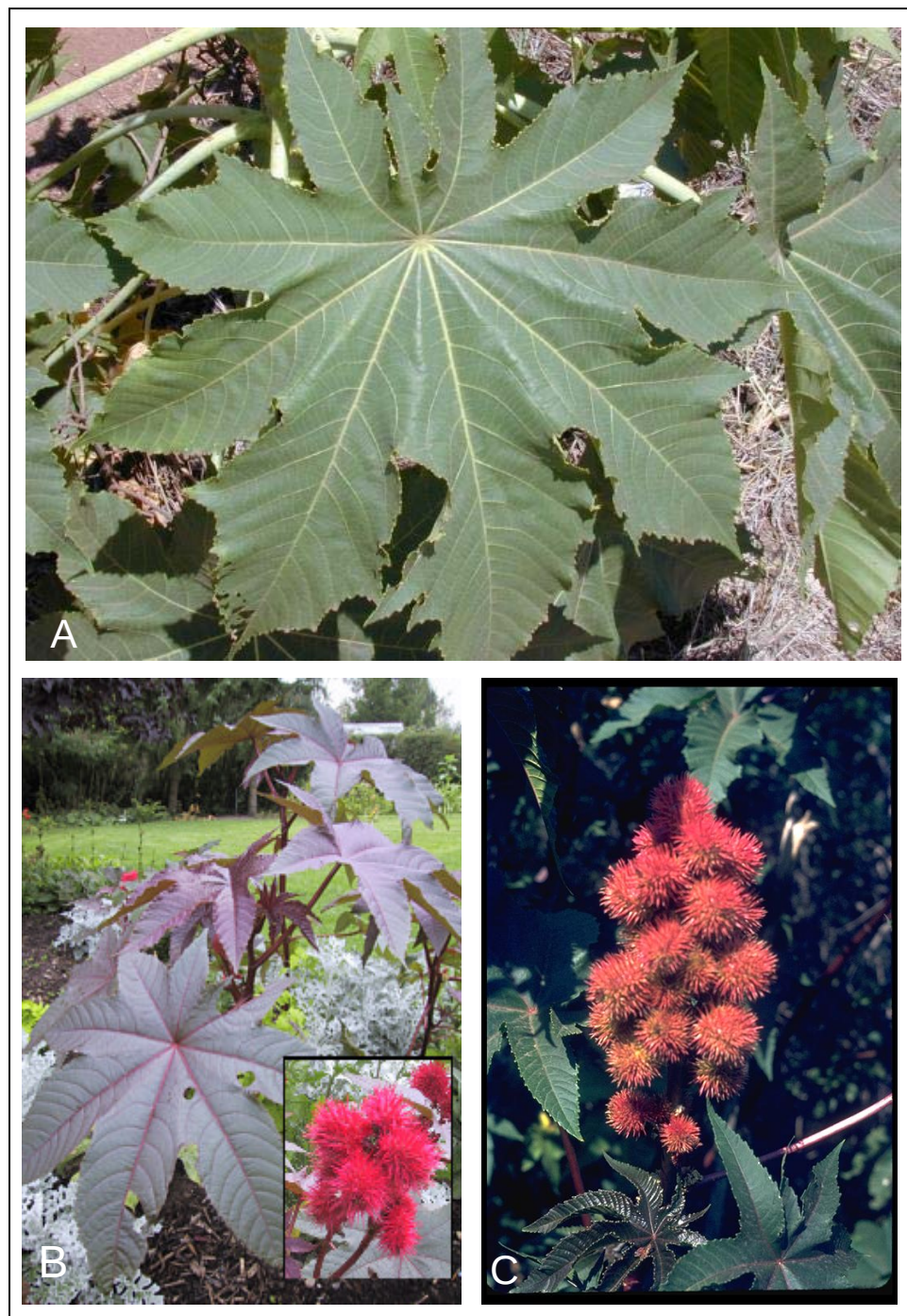


Figure 1 Representative pictures of *R. communis* phenotypes observed in Brazilian populations. **A.** Completely green leaves and petioles; **B.** Red-brownish leaves with bright red petioles and fruits; **C.** Light brownish leaves with bright red petioles and fruits. Pictures from Benko-Iseppon.

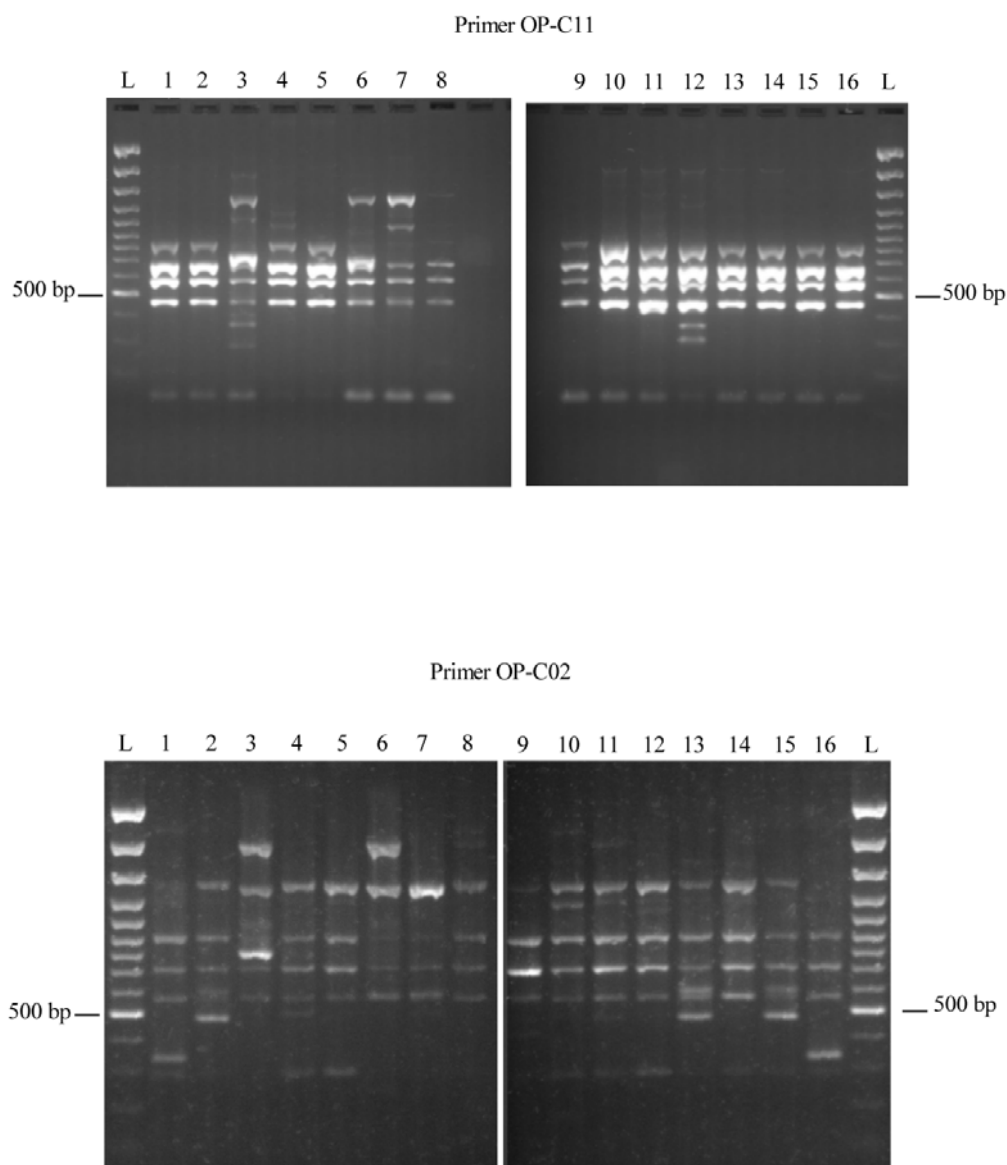


Figure 2 A representative picture of DAF products with polymorphisms generated by the primer OP-C11 and OP-C02 in the genotypes of *R. communis*. Fragment size for polymorphic bands (in bp) are indicated in the picture, as calculated from a 100 bp of DNA ladder (L). Order of the genotypes: (1) Fran-Vcf-Gre; (2) Port-Por-Gre; (3) Bras-Bno-Gre; (4) Bras-Rec-Red-S3; (5) Bras-Red-Red-S4; (6) Bras-Car-Gre-01; (7) Bras-Car-Gre-02; (8) Bras-Car-Gre-03; (9) Bras-Rec-Red-S1; (10) Bras-Rec-Lre-S2; (11) Bras-Rec-Gre-D1; (12) Bras-Rec-Gre-D2; (13) Port-Gsl-Gre; (14) Germ-Ham-Gre; (15) Japa-Kyo-Gre; (16) Germ-Old-Gre. First letters of accession identification designates the country of (Bras=Brazil; Fran=France; Germ=Germany; Japa=Japan; Port=Portugal), second group of three letters refers to the city of provenance or collection, third group of three letters refers to the predominant color of the leaves and petioles at the time of collection (Gre=green; Red=red; Lre=redish leaves with red petioles). For the collections in Recife, two different populations have been considered, designed by the letter D=Dois Irmãos and S=Setúbal.

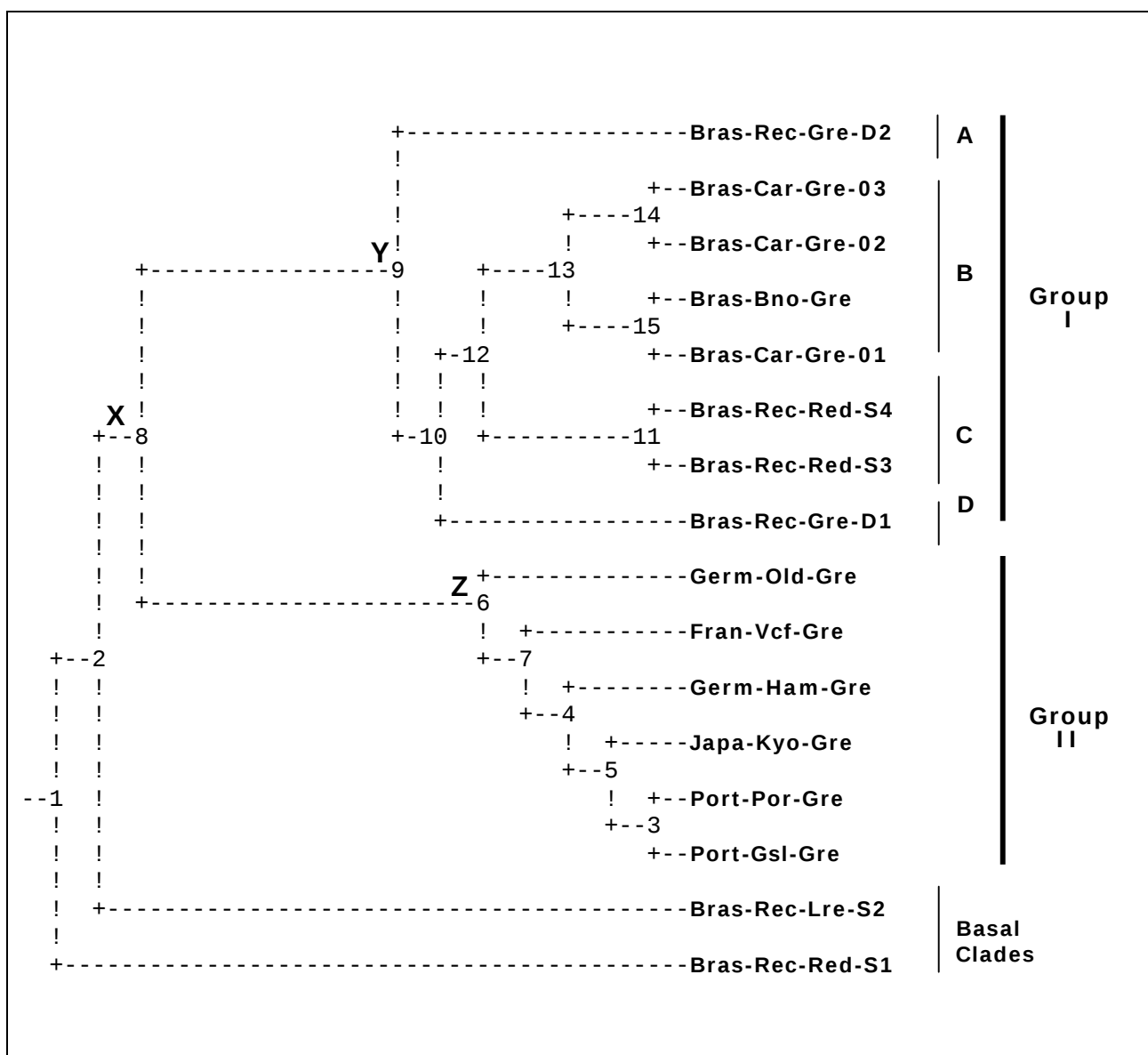


Figure 3 Consensus unrooted tree (out of 190 000 parsimonious trees) generated from DAF-Data by Maximal Parsimony method and bootstrap analysis after Wagner. Numbers in the base of the branches indicate number of steps necessary for the construction of the emerging clade. First letters of accession identification designates the country of provenance (Bras=Brazil; Fran=France; Germ=Germany; Japa=Japan; Port=Portugal), second group of three letters refers to the city of provenance or collection, third group of three letters refers to the predominant color of the leaves and petioles at the time of collection (Gre=green; Red=red; Lre=redish leaves with red petioles). For the collections in Recife, two different populations have been considered, designed by the letter D=Dois Irmãos and S=Setúbal.

5. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

5. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

5.1. Detalhamento do Protocolo de Extração de DNA [segundo Sharp et al. (1988)]

O processo se inicia com a pesagem de 1-3 gramas de folhas jovens, podendo-se também utilizar folhas armazenadas em freezer. As folhas são colocadas em um almofariz e trituradas, em nitrogênio líquido, até formar um pó fino. Adiciona-se 800 µL de tampão de lise, o qual deve ser preparado e autoclavado previamente. No momento do uso, acrescenta-se proteinase K numa concentração de 100 µg/mL. O conteúdo do almofariz é transferido para um tubo Eppendorf estéril de 2 mL, e incubado a 50°C durante 30 min. O tubo é invertido suavemente a cada 7 min, retirado do banho e adicionado um volume de fenol/clorofórmio. Após misturar bem esfria-se em gelo por 15 min, depois centrifuga-se a 12000 rpm durante 10 min a 4°C e transfere-se a fase sobrenadante para outro tubo. Adiciona-se um volume de clorofórmio, mistura-se bem, esfriando no gelo por 5 min e centrifugando-se a 12000 rpm por 5 min a 4°C. A seguir transfere-se a fase sobrenadante para outro tubo e adiciona-se lentamente 2 volumes de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA. Retira-se apenas o DNA, transfere-se para um outro tubo e adiciona-se 1 mL de etanol 70% invertendo o tubo suavemente. Elimina-se o etanol visando secar ligeiramente o DNA, em seguida adiciona-se 500 µL de tampão T.E. e deixa dissolvendo o DNA a 4°C até o dia seguinte.

5.2. Limpeza do DNA Genômico [Ausubel et al. (1992)]

Após adicionar RNase a uma concentração final de 100 µg/mL e incubar durante 30 min a 37°C, adiciona-se SDS e proteinase K a uma concentração final de 0,5% e 100 µg/mL respectivamente e incuba-se a 50° C por 30min. Depois, acrescenta-se um volume de fenol/clorofórmio e mistura-se bem, esfriado em gelo durante 10 min e centrifugado 10 min a 12000 rpm. Transfere-se o sobrenadante para um tubo novo, adiciona-se um volume de clorofórmio e mistura-se bem, esfriar em gelo por 5 min e centrifugar 5 min a 12000 rpm. Transferir o sobrenadante para um tubo novo e adicionar lentamente 2 volumes de etanol absoluto frio, misturar suavemente, centrifugar por 30 segundos a 12000 rpm, obtendo o DNA na forma de *pellet*. Lavar o pellet com etanol 70% descartando-o em seguida e deixando o DNA secar para dissolvê-lo em uma quantidade apropriada de tampão T.E. dependendo do tamanho do pellet obtido.

5.3. Planilha de Dados para Análise pelo Programa PHYLIP (Phylogeny Inference Package). O número 1 designa a presença de banda, enquanto 0 a ausência. A letra 'n' indica dados não analisáveis ou duvidosos.

```
> #1
01101110N0101101110111100000010000000001010011011N011001010011111100111010011
11110111111101000010011000111101000N011001011011NN0010111111N01100
> #2
0110111101111011101111000000000000N01N11100110110011000N0101111110011101001
111110111111010000100110001110010001N11000111011111111111110N110N
> #3
11111101N11N10011101111000000100000111N10111011N100001101011N0010000010110011
10010N01010111000001NN101N0101NN01111100000111N11NN11010NN11000111
> #4
01101110101111011101111000000100000111011N000110111001001001111111100N11010011
1111N111010101000110011000111001000101100011011111NNNNNNNNNNNNNNNN
> #5
011011101111110111011110000000000001110111000110111001001011011111100111010001
11110111111101000110011000111001001101100001111111NNNNNNNNNNNNNNNN
> #6
11111101011110101111111000000100000111N11111011N110001N010110011000N0N0010011
111111101111N0000000N11NN0010000000NN110001111011111010N101011011
> #7
111111010111011111111110000001000001110111110110110001001011111101010011110110
11110110N101N1000000N11000110N01000NN110001111N11111010N101111011
> #8
011N110101111N0111N111100000010000011101111101101100010010111111N111011111011
01111011011N0110000100110001100010N0NN110001111001111010N110111011
> #9
0000001NN01111010001010000000100000111011101000101N001001011N11111100111N1001
111111111111010100010011000111001NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN111110111001101
> #10
0NN0NN1NN0011101N00101110000001000001110110000110110000001011011111100111N100
111111011111101000010001000111001001101100111101100111110111001110
> #11
011011100N1101011100101000000100000111011001011011100N0010N1011111N00111N1000
111110101N11101000010011000111001NNNNNNNN00011101100010111101001110
> #12
01100010011101011101111000000100000111011N01011011100N001011011011100111N100N
110010110111101000010011000111001000N011000N1101101101N11111001100
> #13
0110111000N111011110111000000000001111111100110110001000001N11111100111010011
11110111111101000010011000111001NNNNNNNN00011001101111111011001100
> #14
01101110001011011101111000000000000111111110011011N0010010110111111100111010011
111101111111010000100110001110010000N11000110011N1111111011001100
> #15
01101110001011011101111000000000000111111110011011N001000N01011111100111010011
1111N1111111010000100110001110110000011000011011N1111111N11001110
> #16
0110111N011011011101111000000100000111111101011011N001001010011111100111010001
11110111111101000010011000111011000N01110110101100111111011001100
```

6. ABSTRACT

Brazil is the third world producer of castor seeds, after India and China. Despite the significant production, few successful works have been carried out in order to increase production rates in Brazil, especially due to the presence of subsponaneous populations all over the country, collaborating for the introgression of undesired features in selected cultivars through outcrossing. No previous evaluations have been accomplished using molecular markers to access genetic diversity of castor bean gene pool. The present work evaluated the use of DAF (DNA Amplification Fingerprinting) in the characterization of subsponaneous populations of *R. communis* as compared with cultivated forms from Botanical Gardens in other countries, including a total of 16 genotypes. For this purpose 30 primers have been tested in four selected genotypes generating two to 12 bands and none to eight polymorphic bands. From these, eleven primers have been selected for use in all 16 genotypes. After DAF procedure an average of 14 bands and 10.72 polymorphic bands per primer have been observed. For the construction of the data matrix 143 bands have been analyzed including 2288 characters. The maximal parsimony phylogenetic analysis revealed a significant diversity between genotypes of the same population considering different Brazilian areas, and also as compared to the accessions from other countries. The results confirmed the existing variability in subsponaneous populations, previously suggested by plant breeders and demonstrates the applicability of DAF in germplasm characterization of castor bean genotypes in the future.

KEY WORDS: *Ricinus communis*, genetic diversity, DNA Amplification Fingerprinting.

7. CONCLUSÕES

- A metodologia de DAF mostrou-se eficiente na distinção de genótipos da espécie *Ricinus communis*, por gerar bons níveis de polimorfismo com excelente reprodutibilidade, mesmo considerando o limitado número de primers utilizados.
- Os genótipos das populações brasileiras analisadas revelaram uma considerável diversidade genética tanto a nível intra como interpopulacional, sendo distinguíveis dos acessos cultivados em outros países.
- A hipótese de alta variabilidade genética da espécie *R. communis*, observada a nível fenotípico pelos melhoristas é confirmada pela significativa quantidade de polimorfismos gerados pela técnica de DAF.
- O dendrograma gerado sugere que a técnica de DAF é eficiente na discriminação de grupamentos de fundamento aparentemente geográfico ou ambiental/adaptativo.
- Os resultados sugerem que a metodologia de DAF, por ser discriminatória a nível intraespecífico, é capaz de acessar diversidade tanto em populações subespontâneas de *R. communis*, como na caracterização de bancos de germoplasma e na construção de mapas genéticos por frequência de recombinação.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1
INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Revista
GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

ISSN 1415-4757
Ribeirão Preto, Brasil

Genetics and Molecular Biology - NOTICE TO CONTRIBUTORS

Scope and policy

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética ([Brazilian Society of Genetics](#)).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

The use of registered names and trademarks does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

Submission of papers

1. Manuscripts should be submitted to:

Fábio de Melo Sene, Editor-in-Chief
Genetics and Molecular Biology
Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736
14025-670 Ribeirão Preto, SP - Brasil

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

- A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere;
- Three copies of the manuscript and figures.
- Two copies of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.
- A copy of the text, tables and figures on a disk. Be sure that the disk is adequately protected; if a disk arrives damaged, a new disk will be requested, causing delays in publication. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIF or JPG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.g). Disk must be labeled with the first author's last name, platform and software. (See detailed instructions below). Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution, and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution:

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, and city, state or province, and country;

different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, and arranging for the payment of color illustrations and author alterations charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text: must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use "et al". Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name ("et al" should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should be in the Title.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation. Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: citations must be ordered alphabetically by the first author; only articles that are published or in press should be included; personal communications must be cited within the text; journal titles must be abbreviated according to Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>).

Genetics and Molecular Biology

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.
Bertollo LAC, Takahashi CS and Moreira-Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Rev Bras Genet* 1:103-120.

Sample book citation

Salzano FM and Freire-Maia N (1967) *Populações Brasileiras*. Companhia Editora Nacional and EDUSP, São Paulo, 178 pp.

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Carvalho A, Monaco LC and Krug CA (1966) Melhoramento genético das plantas e sua repercussão econômica. In: Pavan C and da Cunha AB (eds) *Elementos de Genética*. 2nd ed. EDUSP and Companhia Editora Nacional, São Paulo, pp 587-653.

Sample abstracts in meeting citation:

Basile R (1973) Cromossomos Politénicos em células nutritivas de ovócitos de ovário atrofiado de Rhyncosciara. *Ciênc e Cult* 25 (suppl): 248. XXV Reunião Anual da SBPC, Rio de Janeiro, Brazil.

Sample Thesis/Dissertation citation:

Frota-Pessoa O (1953) Revision of the Tripunctata group of *Drosophila* with description of fifteen new species. PhD Thesis, Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

f) Tables each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes, typed directly below the table, should be indicated in lowercase superscript numbers.

g) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Three sets of illustrations of the highest quality must be provided, one original and two copies in glossy paper. If you have created figures electronically, submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIF or JPG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 ppi.

Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600–1200 ppi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author, and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

h) Nomenclature: current standard international nomenclature should be adhered to.

i) Sequences may appear in text or in figure. DNA must be sequenced on both strands. DNA, RNA, or protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into appropriate data bank and the accession number must be provided before publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

j) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

k) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the work was approved by the institutional review board. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained

from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. Their format is that of full-length article. The text must be kept to a minimum.

3.3 Letters to the Editor relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews: publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal.

3.6 History, Story and Memories: accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

8.2. Anexo 2
INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Revista
Euphytica
International Journal of Plant Breeding

ISSN ISSN 0014-2336

Dordrecht, Noruega
Kluwer Academic Publishers

Euphytica ***International Journal of Plant Breeding***

Manuscripts should be written in standard English and four good, clear, legible copies containing original figures should be submitted to the:

Editorial Office *Euphytica*
Kluwer Academic Publishers
P.O. Box 990
3300 AZ Dordrecht

The Netherlands

The author should retain a copy of the manuscript. Manuscripts should be typed double-spaced throughout on one side of DIN A4 paper (21 x 29 cm or 8.5 x 11 inch), with sufficiently wide margins (3-5 cm). All pages (including the tables, figures, legends and references) should be numbered consecutively.

The manuscript should be arranged in the following order (typed cap. + lower case):

Title page (page 1)

- Title (the title should be as short as possible, but should contain adequate information regarding the contents).
- Subtitle (this may be used to supplement and thereby shorten an excessively long main title).
- Author's full name (if more than one, use '&' before the last name).
- Affiliation(s)/Address(es).

Key words/Abstract/Abbreviations (page 2)

- Key words (maximum of 6, in alphabetical order, suitable for indexing).
- Abstract (brief and informative, not to exceed 250 words).
- Abbreviations (arranged alphabetically, only those which are not familiar and/or commonly used).

Main text

- The relative importance of headings and subheadings should be clear. The approximate location of figures and tables should be indicated in the margin. New paragraphs should be indicated by clear indentation.
- The use of footnotes should be avoided. However, if essential, they should be typed on the appropriate pages, but clearly separated from the text with a line above them.

After the main text

- Acknowledgements (also grants, support etc. if any) should follow the text and precede the references.

References

- The literature references should be arranged alphabetically, typed double-spaced and in text referred to as: author and year of publication, e.g.: (Dawson 1987). Citations of personal communications and unpublished data should be avoided, unless absolutely necessary. Such citations should in text appear only as: (E.D. Smith, personal communication), and not in the reference list.
- Abbreviate titles of periodicals according to the style of the *Bibliographic Guide for Editors and*

Authors (Biosis, Chemical Abstract Service and Engineering Index, Inc., 1974).

- Follow the style shown below:
Periodicals
Dawson, W.O. & C. Boyd, 1987. TMV protein synthesis is not translationally regulated by heat shock. *Plant Molec Biol* 8: 145-149.
Books (edited by someone other than author of article)
Lefebvre, D.D. & J.-F. Laliberte, 1987. Mammalian metallothionein functions in plants. In: D.P.S. Verma (Ed.), *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 32-40. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.
Books (identical author and editor)
Bonga, J.M. & D.J. Durzan, 1987. *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.

Tables

- Each table should be typed on a separate page.
- Tables should be numbered with arabic numerals, followed by the title. Horizontal rules should be indicated; vertical rules should not be used. Table-footnotes should be marked with superscript letters.
- Each table should be mentioned in the text.
- Tables may be edited by the publisher to permit more compact typesetting.

Figures

- Each figure should be mentioned in the text.
- Line drawings should be in a form suitable for reproduction without modification. Extremely small type should be avoided as figures are often reduced in size.
- Photographs should be supplied as black-and-white, high-contrast glossy prints. Colour plates may be inserted at the author's own expense.
- Figures as well as legends should be identified by arabic numbers. Where multi-part figures are used, each part should be clearly identified in the legend, preferably with (lower case) letters.
- The top of the figure should be indicated on the back. Figures which need to be placed landscape should be avoided if possible.
- Identify each illustration, on the back, by lightly writing author's name and figure number.

Nomenclature
Taxonomical

- Binary nomenclature; names and genera and higher categories may be used alone.

Genetic

- Applications of the terms phenotype and genotype should be in accordance with Demerec et al. (Genetics 54:61-74, 1966).
- For summaries of the abbreviations, consult *Journal of Bacteriology*, Instructions to Authors.

Abbreviations and units

Only SI units and abbreviations should be used. Abbreviations should be explained when they first appear in the text. If a non-standard abbreviation is to be used extensively, it should be defined in full on page 2 as mentioned above. Whenever in doubt use SI (System International) units.

Format

1. We strongly prefer manuscripts typed on IBM-compatible computers, with operating system MS DOS (versions 3.2 or higher), and wordprocessing package WordPerfect (4.2 or higher).
2. We also accept files in most other wordprocessing packages, that run under MS DOS, and Apple Macintosh diskettes.
3. If this combination is not available to you, please contact us as soon as possible.
4. If you work with the Graphical User Interface Windows or on a Macintosh computer, use only regular fonts like Courier, Times, Helvetica or standard Symbol.

Do's

1. *File.* Identify your file clearly with a sensible name. Make absolutely sure that you send us your final version, and that the printout is identical to what you have saved on the diskette.
2. *Consistency.* Be absolutely consistent and check the use of punctuation, abbreviations, capitals and lower case in headings, spelling, etc. If possible, use the spelling checker on your computer.
3. *Special characters.* If the ASCII character set or the character set(s) of your wordprocessing package does not contain the special characters you need, key in a code between angle brackets and use this each and every time you want the character to appear. *Note:* Always supply us with a list of the codes that you have used!
4. *Headings.* Start headings etc. flush left, with two space lines above (i.e. three Hard Returns) and one space line below (two Hard Returns). Distinguish different levels of headings and be consistent.
5. *Paragraphs.* Indent all paragraphs with a [TAB] code, and separate them from one another with one Hard Return.
6. *Block quotations* should be indented with an [Indent] code and should have one space line (i.e. two Hard Returns) above and below.
7. *Figures* should be submitted in camera-ready form. The position of the figure in the text should be indicated in the margins of the hard copy. Figure legends should be placed at the end of your file.
8. *Tables.* We prefer tables to be submitted in camera-ready form. If you also put your tables on diskette, please separate columns with [TAB] codes (not with spaces) and, consequently, adjust the tabular stops to position the columns.

9. *Equations.* One-line equations without fractions can be typeset from the diskette when they are keyed in as plain text. Other equations can not be used from the diskette: they will be typeset manually from the hard copy.

10. *References and Notes.* Strictly follow the Instructions for Authors of the journal in which the article will be published for the style of referencing and the use of notes.

Don'ts

1. *Hyphenation.* Do not hyphenate words at the end of a line. Use only one hyphen for words such as "well-being", and "re-do" and use two hyphens for sequences of dates and years such as "conference dates are 12--15 September, 1992", "age groups between 20--30 years are welcome", and page number indications in References, e.g. "pp. 240--243".
2. *Hard Returns.* Do not use Hard Returns except when absolutely necessary, such as at the end of paragraphs, headings, etc. Otherwise, let the word wrap feature of your wordprocessor do this work for you.
3. *TAB feature and Spacebar.* If you need more than one space between two items, e.g. when you write in columns, always use the [TAB] feature of your wordprocessing package. Use the spacebar only for separating words from one another. Do not use the spacebar to format tables, for centering or laying out texts, or for any other form of line or page formatting.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail).

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours. Please do not make any changes to the PDF file. Minor corrections (+/- 10) should be sent as an e-mail attachment to: proofscorrection@wkap.nl. Always quote the four-letter journal code and article number and the PIPS No. from your proof in the subject field of your e-mail. Extensive corrections must be clearly marked on a printout of the PDF file and should be sent by first-class mail (airmail overseas).

Offprints

Fifty offprints of each article will be provided free of charge. An order form for additional offprints (both hard copies and PDF files) will be sent to the corresponding author. The corresponding author receives a copy of the issue containing her/his article free of charge.

