

ANDRÉIA RODRIGUES RAMOS

**Utilização de Microssatélites e SNPs na capacidade de combinação entre
linhagens de mamona (*Ricinus communis* L.)**

Relatório de Pós-doutorado realizado na
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrônômicas,
Botucatu.

Supervisor(a): Prof. Dr. Evandro Vagner
Tambarussi

Botucatu

2025

Título: Utilização de Microsatélites e SNPs na capacidade de combinação entre linhagens de mamona (*Ricinus communis* L.)

Resumo

A mamoneira é uma oleaginosa que apresenta inúmeras aplicações na área industrial e na produção de biodiesel, demonstrando assim sua importância econômica a nível mundial. Contudo, existe poucos estudos com melhoramento genético da espécie, fato este que acaba prejudicando a expansão da cultura. Portanto, torna-se necessário estudos mais profundos a fim de implementar o melhoramento molecular da espécie. Assim, a presente pesquisa objetivou-se identificar combinações superiores de linhagens de mamona obtidas por meio da distância genética. Os experimentos foram conduzidos em campo e laboratório, sendo realizado a obtenção dos materiais genéticos, posteriormente a obtenção das linhas pistiladas e hermafroditas, por fim, o processo da genotipagem. Mediante os resultados obtidos na primeira fase constatou-se que usando o método de seleção massal baseados em caracteres morfológicos foi possível selecionar um grande número de plantas com alta porcentagem de flores femininas no racemo primário. Conclui-se, que foi possível observar a divergência genética entre as linhagens de mamona, que possibilita formar grupos de acessos para futuros ganhos em melhoramento genético. Assim, a pesquisa foi conduzida com ensaios no campo mediante a formação dos grupos com combinações superiores obtidas na genotipagem, mas em virtude das condições climáticas com excesso de chuva houve perda de algumas linhagens.

Introdução:

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa da família das Euforbiáceas, originária da Etiópia e disseminou-se por várias regiões do mundo, devido sua fácil propagação e adaptação a vários ambientes (WEISS, 1983). Apresenta inúmeras aplicações na área industrial e na produção de biodiesel (GONELI, 2008; SHRIRAME et al., 2011).

Trata-se de uma cultura que do ponto de vista industrial, os frutos são totalmente aproveitados na extração do óleo gerando como subproduto a torta, que pode ser utilizada como fertilizante orgânico e possuir efeito nematicida no solo (SAVY FILHO, 2001). Seu óleo é um dos melhores para a produção de biodiesel pelas suas características como maior densidade, solubilidade em álcool (BELTRÃO et al., 2003) e pode ser usado na indústria têxtil, automobilística e aeronáutica.

A cultura da mamona possui grande potencial para o cultivo em condições brasileiras (FIOREZE et al., 2016). Segundo dados das Organizações das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), os quatro maiores produtores mundiais de sementes de mamona em 2018 foram: Índia, Moçambique, China e Brasil (FAOSTAT, 2022). O Brasil pode se tornar o maior produtor, devido a demanda mundial na cadeia produtiva da mamona

e a dificuldade da Índia em atendê-la. Além disso, essa cultura se encaixa no sistema de produção, podendo ser inserida como segunda safra (Safrinha) período em que muitas áreas ficam em pousio.

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020), a Bahia é o maior Estado produtor de grãos no país com uma produção de 41,4 mil toneladas e o Mato Grosso com produtividade média de 912 kg ha⁻¹. Entretanto, a companhia enfatiza que sua expansão esbarra em questões como a restrição de tecnologia para o cultivo e o manejo ainda incipiente no Estado, bem como na forte concorrência na segunda safra com culturas mais rentáveis, como o milho, algodão e gergelim.

Há alguns anos, os marcadores moleculares baseados na amplificação de fragmentos de DNA do tipo microssatélites eram os mais utilizados para estudos de genética de populações por serem altamente polimórficos em termos de número de alelos, herança codominante e alto grau de repetibilidade quando comparados a outros marcadores (ECHT et al., 1996; FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Essa repetibilidade e o alto polimorfismo dos locos microssatélites fizeram dessa tecnologia uma poderosa ferramenta para estudos de genética de populações e em programas de melhoramento, em especial em estudos que necessitam de alto grau de polimorfismo como análises de agrupamento genético.

No entanto, atualmente os microssatélites vêm sendo substituídos pelos *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) que além de refletirem com mais precisão os padrões reais de diversidade e estrutura genética em todo o genoma, desafiando avaliações anteriores baseadas em microssatélites (SILVA et al., 2020), podem ser utilizados em estudos mais aprofundados de genética já que eles têm maior probabilidade de estarem em desequilíbrio de ligação com genes de interesse. Dessa forma, a utilização da técnica no programa de melhoramento genético da mamoneira vai ser de grande valia tanto para os estudos genético-populacionais, bem como para o início de um programa de seleção genômica com as populações da FCA/Unesp.

A mamona possui uma grande variação em vários caracteres morfológicos devido aos frequentes cruzamentos que acabam influenciando na produtividade (ANJANI, 2012). Assim, a caracterização de genótipos baseada em marcadores moleculares é um método eficiente e confiável. Entretanto, informações a respeito de estudos de variabilidade genética, genotipagem e grau de homozigose usando marcadores SSR em uma população avançada em mamoneira ainda são inéditos (MACHADO et al., 2016; LIU et al., 2016) e a

necessidade de estudos mais profundos a fim de implementar o melhoramento molecular da espécie será primordial (TAN et al., 2014).

Os marcadores desenvolvidos com a mamona servirão de suporte para estabelecer a base para a análise da relatividade genética, seleção e caracterização de novas espécies, genótipos, identificação de QTLs, MAS e mapeamento genético (DHARAJIYA et al., 2020). De acordo com Kallamadi et al. (2015) em estudo sobre a diversidade molecular em mamona oriundas de seis países, constatou que as linhagens são bem distintas a nível molecular que podem ser exploradas nos programas de melhoramento.

Os marcadores microssatélites (SSR) são informativos em razão de sua codominância, seu alto grau de polimorfismo, reprodutibilidade e facilidade de interpretação (BORÉM & MIRANDA, 2009). No melhoramento de plantas, os marcadores genéticos podem ser utilizados para diversos fins, como análise de diversidade, estudos evolutivos, estimativa da taxa de fluxo gênico, identificação de variedade/híbrido, marcação de gene (s), identificação de loci de características quantitativas (QTLs) e dentre outras (MIAH et al., 2013).

Face o exposto e considerando a importância da mamona bem como seu cultivo industrial em todo o mundo e sua potencialidade para a produção de biodiesel devido as suas características particulares de seu óleo, a presente pesquisa objetivou-se identificar combinações superiores de linhagens de mamona obtidas por meio da distância genética.

Objetivos específicos:

- Avaliar a eficiência da utilização da distância genética obtidas por genotipagem na capacidade geral de combinação entre linhagens de mamona.
- Construir populações para serem usadas no melhoramento considerando a distância genética.

Material e Métodos:

A metodologia adotada foram separadas em procedimentos de campo e laboratório, sendo divididas em várias etapas como será descrito a seguir.

I – Obtenção dos materiais genéticos

Os cultivos necessários para obtenção das linhagens foram implantados na Fazenda Experimental São Manuel, localizada no município de São Manuel-SP, pertencente à Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de

Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu-SP. As coordenadas geográficas da área são: 22° 46’ de latitude Sul, 48° 34’ de longitude Oeste e altitude de 740 m.

As linhagens utilizadas nesta pesquisa foram provenientes de duas populações segregantes diferentes de mamona que foram obtidas com a finalidade de reunir os genes (variabilidade genética) para desempenho agrônômico favorável. Portanto, uma população foi formada por intercruzamento entre plantas pistiladas (feminino) e outra população com plantas hermafroditas (masculino). Desta forma, cada uma dessas populações foram cultivadas de forma isolada em uma área de 100 m² extraindo-se, assim, as linhas fêmeas (pistilada) da população A e as linhas machos (hermafroditas) da população B.

II- Obtenção das linhas pistiladas e hermafroditas

A seleção das plantas pistiladas realizou-se a partir início do florescimento e o critério foi identificar plantas em que havia o racemo primário 100% feminino. Assim, todas essas plantas femininas selecionadas formam a nova população A, sendo que nessas linhagens foram realizadas autofecundações sucessivas.

A obtenção das plantas hermafroditas foi realizada com a seleção das inflorescências com 30 á 40% de pólen. Portanto, essas linhagens masculinas formam a população B e posteriormente autofecundações sucessivas.

É válido enfatizar que, as etapas de seleção ocorreram de forma simultânea em cada população (pistilada e hermafrodita). Assim, foi adotado o método de seleção massal, onde cada planta selecionada foi marcada e tiveram seu desenvolvimento acompanhado sendo levado em consideração os caracteres tais como, porte da planta (altura da cacho), ciclo (precoce, superprecoce, intermediário e tardio) e características morfológicas da planta (coloração do caule, presença ou ausência de cera). Portanto, todas as plantas com características indesejáveis foram descartadas durante o processo de seleção e as demais foram autofecundadas.

A autofecundação das plantas selecionadas ocorreu quando do início do florescimento, com a proteção da inflorescência, com as flores ainda fechadas, e o uso de sacos de papel. Dessa forma, ao final do ciclo os racemos autofecundados foram colhidos separadamente por planta e identificados conforme as caracteres adotados na seleção.

As sementes beneficiadas de cada racemo colhido (método de seleção) foram semeadas no campo na Fazenda Experimental São Manuel (São Manuel- SP). Portanto, todos os materiais de cada população (A) obtida foram semeados separadamente, assim foi

realizada uma nova seleção dentro das linhas pistiladas e também na outra população (B) formada pelas linhas machos (hermafroditas). No ano agrícola de 2022 todos os materiais selecionados dentro de cada população foram semeados para realização da genotipagem. Nesse sentido, as plantas selecionadas foram para análise genética molecular.

Com base nestes genótipos é definido um perfil genético que, a depender do nível de polimorfismo na população, permite discriminar cada amostra individualmente e realizar análises de identidade de cultivares (linhagens e híbridos), avaliação de diversidade genética, verificação de parentesco e estimativa de distância e estrutura genética.

III- Processo para genotipagem

A coleta de material biológico para a análise (folhas) dos indivíduos a serem analisados foram realizadas em várias linhagens de mamona. Portanto, as coletas foram realizadas em várias etapas de acordo com a instrução solicitada pelo laboratório. Assim, foram coletadas folhas expandidas (livre de fungos superficiais) da mamona e higienizadas (para evitar presença de água ou umidade sobre as folhas coletadas, pois isso leva ao apodrecimento das mesmas), em seguida serão acondicionadas em saco de papel (tipo saco de pipoca). Uma etiqueta com a identificação da amostra foi inserida no saco juntamente com o material. Posteriormente, as amostras foliares foram enviadas para as análises genéticas.

Dada a importância desta pesquisa para expansão da cultura da mamona, bem como, sua contribuição no melhoramento da espécie, as próximas etapas foram realizadas mediante os resultados obtidos na genotipagem. Cabe ressaltar que, a seleção foi feita de forma morfológica e testamos se a genotipagem pode ser confirmada para obtenção dessas populações. Portanto, após a obtenção dos resultados da análise molecular das linhagens foi realizado cruzamentos de acordo com os grupos selecionados dentro do dendograma.

A partir do dendograma (Figura 1), foi possível observar a formação dos grupos, mostrando a presença de variabilidade genética entre os genótipos avaliados, característica importante dentro de um programa de melhoramento genético, possibilitando a seleção. Portanto, os grupos foram compostos de acordo com a distância genética entre os materiais para realização dos cruzamentos e condução dos ensaios no campo em 2023. Assim, os ensaios foram implantados lado a lado para seleção dentro das progênies e realização dos cruzamentos, com base na distância genética entre elas obtidas na genotipagem.

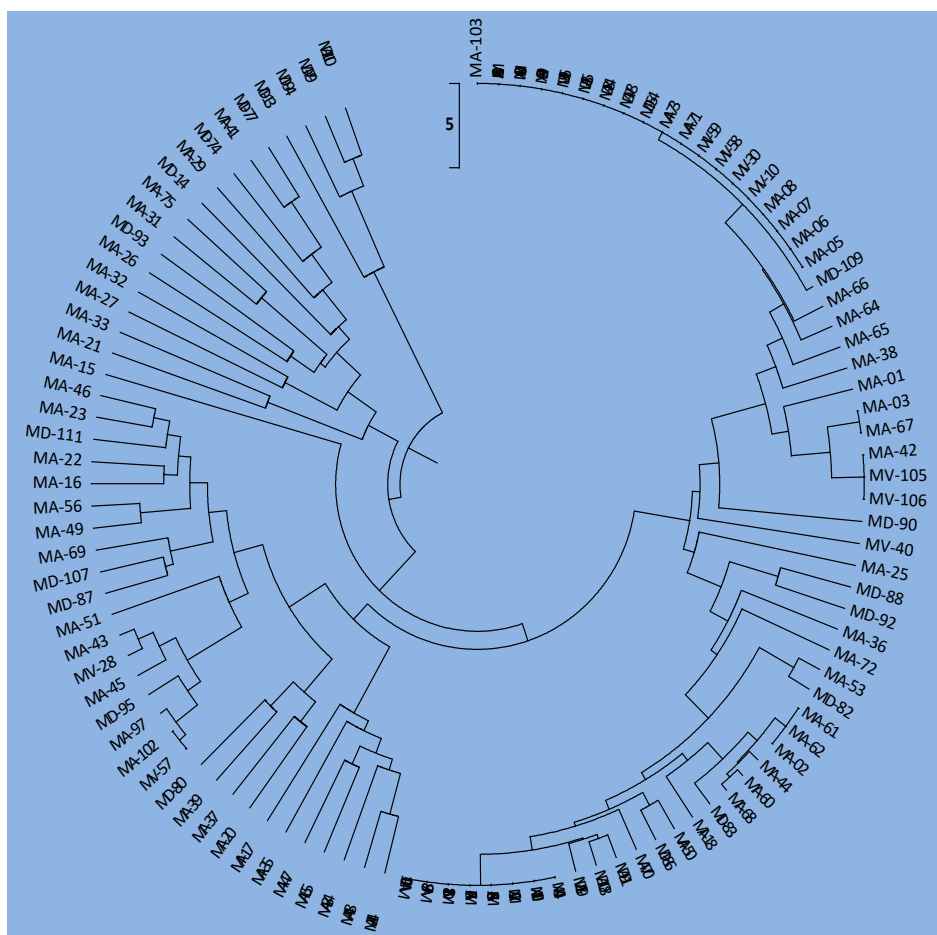


Figura 1 - Dendrograma representativo do agrupamento das linhagens de mamona

Posteriormente, foram avaliadas as seguintes características nos experimentos em campo: início do florescimento, porcentagem de flores femininas, altura de inserção do racemo primário, número de racemos por planta, comprimento efetivo do racemo primário, número de frutos do racemo primário, altura da planta, diâmetro do caule, duração do ciclo, massa de 100 sementes, produtividade, teor e produtividade de óleo nas sementes.

Diversidade genética

Com informações dos marcadores SNPs, a matriz de parentesco genômico aditivo (**G**) será obtida de acordo com VanRaden (2008):

$$\mathbf{G} = \frac{\mathbf{ZZ}'}{2\sum_{i=1}^p p_i(1-p_i)} \quad (4)$$

Seja **M** a matriz de incidência que especifica quais alelos cada indivíduo herdou, com dimensões $n \times m$, onde n é o número de indivíduos e m o número de locos. Dado que a

frequência do segundo alelo em um loco i seja p_i , e que a matriz $\mathbf{P}$ contenha as frequências alélicas expressas como uma diferença de 0,5 e multiplicadas por 2, de modo que cada coluna i de $\mathbf{P}$ seja $2(p_i - 0,5)$, subtrair $\mathbf{P}$ de $\mathbf{M}$, seria igual $\mathbf{Z}$. Esta correção proporciona com que as médias dos efeitos alélicos sejam zero, além disso, dá mais créditos a alelos raros do que alelos comuns no cálculo de $\mathbf{G}$. A divisão por $2\sum p_i(1 - p_i)$ escala a matriz de parentesco para ser análoga à matriz de parentesco dos coeficientes de Wright (matriz $\mathbf{A}$). Para a análise da diversidade genética, após a estimação da matriz $\mathbf{G}$, um dendrograma baseado em UPGMA será construído.

Justificativa por não realizar análise marcadores SNPs

Visando á compreensão das bases moleculares, bem como a importância da utilização dos marcadores SNPs em diversas culturas, pesquisas tem sido intensificadas e vem ganhando muito espaço em estudos de análises genéticas em plantas. Diante desse grande potencial dos marcadores SNPs para as análise genéticas e considerando o seu custo para realização de desenvolvimento de protocolos na cultura da mamona, torna-se necessário justificar que essa etapa não foi realizada. Portanto, esse projeto não teve nenhum financiamento o que inviabilizou a realização da análise.

Por fim, enfatizamos que sem dinheiro não seria possível realizar essa análise, já que o valor total para essa análise ultrapassaria 100 mil reais. É valido ressaltar que, mesmo sabendo da relevância que a mesma poderia proporcionar ao programa de melhoramento genético da mamona, trazendo como vantagens por ser um processo rápido, eficiente e seguro, mas tem um custo alto.

Resultados e Discussão

Mediante os resultados obtidos na primeira fase constatou-se que usando o método de seleção massal baseados em caracteres morfológicos foi possível selecionar um grande número de plantas com alta porcentagem de flores femininas no racemo primário. A obtenção de linhagens femininas é um dos objetivos do melhoramento da mamoneira, pois viabiliza a produção de sementes híbridas (BERTOZZO et al., 2011). Portanto, o vigor das linhagens femininas é indispensável para que a semente híbrida tenha um custo acessível ao agricultor.

É possível observar que tem divergência genética entre as linhagens de mamona, que possibilita formar grupos de acessos para futuros ganhos em melhoramento genético. Portanto, a pesquisa foi conduzida com ensaios no campo mediante a formação dos grupos com combinações superiores obtidas na genotipagem. O resultado da análise molecular e em conjunto com a comprovação de campo possibilitou fornecer informações de futuras combinações superiores, identificar genótipos que reúnam características de alta produtividade e outras informações a respeito dos mecanismos genéticos que são de grande interesse em várias etapas dos programas de melhoramento da mamona.

Com base nos resultados obtidos da genotipagem e as avaliações dos cruzamentos foram construídos novas populações que originaram a formação de novas linhagens. Portanto, foi realizado a semeadura no campo em março de 2024, mas devido as condições climáticas com excesso de chuva, os mesmos foram perdidas por duas vezes consecutivas, sendo que essa cultura não tolera excesso de água (Figura 2).



Figura 2 - Perda do experimento em campo por excesso de chuva e nova semeadura

Referência bibliográfica:

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

BELTRÃO, N.E. de M.; ARAÚJO, A.E. de; AMARAL, J.A.B. do; CARDOSO, G.D.; PEREIRA, J. **Zoneamento e época de plantio da mamoneira para o Nordeste brasileiro com aptidão sem restrições**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. (Comunicado Técnico, 193).

BERTOZZO, F.; LARA, A.C.da C.; ZANOTTO, M.D. Melhoramento genético da mamona visando incremento de flores femininas. **Bragantia**, v.70, n.2, p.271-277, 2011.

BORÉM, A. & MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Editora da UFV, 2009.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Décimo segundo levantamento, Brasília, v.7, p. 1-68, 2020. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 15 out. 2024.

DHARAJIYA, D.T.; SHAH, A.; GALVADIYA, B.P.; PATEL, M.P.; SRIVASTAVA, R.; PAGI , N.K.; SOLANKI, S.D.; PARIDA, S. K.; TIWARI, K.K. Genome-wide microsatellite markers in castor (*Ricinus communis* L.): Identification, development, characterization, and transferability in Euphorbiaceae. **Industrial Crops & Products**, v.151, p. 1-9, 2020.

ECHT, C. S.; MAY-MAQUARDT, P.; HSEIH, M.; ZAHORCHAK, R. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. **Genome**, v. 3, p. 1102-1108, 1996.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. **Castor Oil Seed**. Disponível em: [http: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>](http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize). Acesso em: 20 Out. 2020.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p, 1998.

FIGEZE, S. L.; FIGEZE, A. C. C. L.; PIVETTA, L. G.; RODRIGUES, J. D.; ZANOTTO, M. D. Características agronômicas da mamoneira afetadas pelo método de condução de plantas e densidade de semeadura. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 86-92, 2016.

GONELI, A. L. D. **Variação das propriedades físico-mecânicas e da qualidade da mamona (*Ricinus communis* L.) durante a secagem e o armazenamento**. 186f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2008.

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

LIU, S.; YIN, X.; LU, J.; et al. The first genetic linkage map of *Ricinus communis* L. Based on genome-SSR markers. **Industrial Crops Products**, v.89, p.103-108, 2016.

MACHADO, E.L.; SILVA, S.A.; FERNANDES, L.dos S.; BRASILEIRO, H.S. Variabilidade genética e homozigose em uma população F4 de mamoneira por meio de marcadores microssatélites. **Bragantia**, v. 75, n. 3, p.307-313, 2016.

MIAH, G.; RAFII, M.; ISMAIL, M.; PUTEH, A.; RAHIM, H.; ISLAM, K.; LATIF, M. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v.14, n.11, p.22499-22528, 2013.

SAVY FILHO, A. **Mamona: tecnologia Agrícola**. Campinas, SP: EMOPI, 2005. 105p.
SHRIRAME, H.Y.; PANWAR, N.L.; BAMNIYA, B.R. 2011. Bio diesel from castor oil-A green energy option. **Low Carbon Economy**, v. 2, n.1, p.1-6, 2011.

SILVA, P.I.; SILVA-JUNIOR, O.B.; RESENDE, L.V.; SOUSA, V.A.; AGUIAR, A.V.; GRATTAPAGLIA, D. A 3K Axiom SNP array from a transcriptome-wide SNP resource sheds new light on the genetic diversity and structure of the iconic subtropical conifer tree *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kuntze. **PLoS One**, v.15, n.8, 2020.

TAN, M.; WU, K.; WANG, L.; YAN, M.; ZHAO, Z.; XU, J.; ZENG, Y.; ZHANG, X.; FU, C.; XUE, J.; Wang, L. Developing and characterising *Ricinus communis* SSR markers by data mining of whole-genome sequences. **Molecular Breeding**, v.34, n.3, p.893-904, 2014.

WEISS, E.A. **Oilseed crops**. London: Longman, 1983. 660p.