

REBECA LOURENÇO DE OLIVEIRA

**DIVERGÊNCIA E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS EM  
CRAMBE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48d  
2017 Oliveira, Rebeca Lourenço de, 1987-  
Divergência e estimativas de parâmetros genéticos  
em crambe / Rebeca Lourenço de Oliveira. - Viçosa, MG,  
2017.

vi, 26f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Luiz Antonio dos Santos Dias.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Plantas oleaginosas. 2. *Crambe abyssinica*.  
3. Melhoramento genético. 4. Análise multivariada.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia.  
II. Título.

CDD 22 ed. 633.85

REBECA LOURENÇO DE OLIVEIRA

**DIVERGÊNCIA E ESTIMATIVAS DE PARÂMETROS GENÉTICOS EM  
CRAMBE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 22 de fevereiro de 2017.

---

Carlos Nick Gomes

---

Felipe Lopes da Silva  
(Coorientador)

---

Thais Roseli Corrêa

---

Luiz Antônio dos Santos Dias  
(Orientador)

Aos meus pais João Carlos e Cláudia e  
Ao meu avô Argemiro Lourenço (*in memoriam*) pelo amor a mim dedicado e pelo apoio  
constante.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força nos momentos mais difíceis,

Aos meus pais, João Carlos e Cláudia, pelo apoio, carinho, confiança e por sempre terem acreditado em mim,

As minhas irmãs Letícia e Edivânia, pelas conversas e conselhos,

Aos meus avós: Argemiro (*in memoriam*), Zilda e Arlete, aos meus tios: Mara, Luciano, Maninho, Luiza, Darlene e aos meus primos: Angélica, Ana Paula, Carol e Milton, pelo apoio, incentivo, brincadeiras e constante carinho,

A minha afilhada Ana Luiza, pelo carinho e por todos os momentos proporcionados de alegria,

Ao meu namorado Pedro, pelo amor, compreensão e ajuda durante todo esse período,

Ao meu orientador Luiz Antônio dos Santos Dias, pelos ensinamentos e orientação,

A Doutora Eveline Teixeira Caixeta, pela ajuda, conselhos e contribuições,

Aos professores Felipe Lopes da Silva e Carlos Nick Gomes pela disponibilidade e contribuições,

A Thais Roseli Corrêa, pelos conselhos e contribuições,

Aos amigos do laboratório de Melhoramento de Oleaginosas, que sempre me ajudaram, em especial a Martha, pelas conversas, apoio e sugestões,

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realização desse curso,

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos,

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da realização desse trabalho,

Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	4
2.1 Experimento de campo .....	4
2.1.1 Delineamento experimental.....	4
2.1.2 Características avaliadas .....	4
2.1.3 Análises estatísticas.....	5
2.2 Experimento molecular .....	7
2.2.1. Local.....	7
2.2.2 Extração e quantificação do DNA.....	7
2.2.3 Análise com marcadores ISSR.....	8
2.2.4 Eletroforese em gel de agarose.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	10
3.1 Ensaio de campo .....	10
3.1.1 Análise de variância .....	10
3.1.2 Estimativas de parâmetros genéticos.....	11
3.1.3 Correlações.....	12
3.1.4 Divergência genética .....	13
3.1.5 Importância relativa das características.....	15
3.2 Análise molecular .....	16
4. CONCLUSÕES .....	19
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

## RESUMO

OLIVEIRA, Rebeca Lourenço, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Divergência e estimativas de parâmetros genéticos em crambe**. Orientador: Luiz Antônio dos Santos Dias. Coorientadores: Eveline Teixeira Caixeta e Felipe Lopes da Silva.

*Crambe abyssinica* Hochst. é uma planta oleaginosa, hexaplóide e em processo de melhoramento. Estudos de diversidade genética são importantes no melhoramento a fim de identificar potenciais genitores para cruzamentos futuros e conhecer a constituição genética dos mesmos. Os objetivos do presente trabalho foram: i) avaliar a divergência genética entre 10 genótipos de crambe, por meio da avaliação de características morfoagronômicas e de qualidade, utilizando análises multivariadas; ii) estimar os parâmetros genéticos e correlações entre as características avaliadas nesses genótipos; e iii) testar marcadores ISSR para avaliar a divergência entre os genótipos. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, e os dados obtidos foram submetidos a análises multivariadas e de divergência genética. Todas as características avaliadas, altura de planta (ALT), diâmetro do caule (DC), número de ramos por planta (NR), altura do primeiro ramo produtivo (ARP), massa de 1000 grãos (M1000), produtividade de grãos (PROD) e de óleo (PO) apresentaram diferenças significativas. O coeficiente de variação apresentou boa precisão experimental (4,29 a 13,81%). As médias de PROD (1936,94 kg/ha) e de PO (660,10 kg/ha) foram elevadas. Todas as características apresentaram altas estimativas de herdabilidade no sentido amplo em nível de médias de progênes ( $h^2 > 73,65$ ). A correlação da PROD com a PO foi de 0,9937. Os métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA, separaram os genótipos em cinco grupos distintos. A PROD foi a característica com maior contribuição (22,31%) para a diversidade genética entre os genótipos. As amostras de DNA apresentaram concentrações superiores a 34,4 ng/ $\mu$ L. Entre os 33 *primers* testados nenhum detectou polimorfismo. As características produtividade, altura do primeiro ramo produtivo, número de ramos e diâmetro do caule foram as que mais contribuíram para a diversidade genética. Os genótipos 2 e 4 podem ser utilizados como genitores em cruzamentos futuros, como os mais promissores na obtenção de populações segregantes. Já os genótipos 3 e 6 podem seguir avançando como linhagens. Para a seleção de genótipos de crambe com maior produtividade de óleo, deve-se realizar a seleção indireta e simultânea de plantas com maior diâmetro do caule, massa de 1000 grãos e produtividade de grãos.

## ABSTRACT

Oliveira, Rebeca Lourenço de Oliveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Divergence and estimations of genetic parameters in crambe.** Advisor: Luiz Antônio dos Santos Dias. Co-Advisors: Eveline Teixeira Caixeta and Felipe Lopes da Silva.

*Crambe abyssinica* Hochst. is an oleaginous plant, hexaploid and in breeding's process. Genetic diversity studies are important in breeding to identify potential genitors for crosses and to know the genotypes' genetic constitution. The aim of the present study were: i) to evaluate the genetic divergence among 10 crambe genotypes, through the evaluation of morphoagronomic characteristics and quality using multivariate analyzes; ii) to estimate the genetic parameters and correlations between the characteristics evaluated in these genotypes; and iii) testing ISSR markers to assess the divergence between genotypes. The experiment was conducted in a greenhouse at the Universidade Federal de Viçosa, and the obtained data were submitted to multivariate analysis and genetic divergence. All evaluated characteristics, plant height (ALT), stem diameter (DC), number of branches per plant (NR), height of the first productive branch (ARP), mass of 1000 grains (M1000), grain yield (PROD) and oil (PO) presented significant differences. The coefficient of variation showed good experimental accuracy (4.29 to 13.81%). The averages of PROD (1936.94 kg/ha) and PO (660.10 kg/ha) were high. All traits presented high heritability estimates in the broad sense at the level of progeny averages ( $h^2 > 73.65$ ). The correlation between PROD and PO was 0.9937. The Tocher and UPGMA clustering methods separated the genotypes into five distinct groups. The PROD was the characteristic with the highest contribution (22.31%) to the genetic diversity among the genotypes. The DNA samples had concentrations higher than 34.4 ng/ $\mu$ L. Among the 33 primers tested none allowed to detect polymorphism. The characteristics of productivity, height of the first productive branch, number of branches and diameter of the stem were the ones that contributed most to the genetic diversity. Genotypes 2 and 4 can be used as parents at future crosses, as the most promising in obtaining segregant populations. However, genotypes 3 and 6 can continue to advance as lineages. For the selection of crambe genotypes with higher oil yield, the indirect and simultaneous selection of plants with larger stem diameter, mass of 1000 grain and grain yield should be performed.

## 1. INTRODUÇÃO

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) é uma espécie hexaplóide ( $2n=6x=90$ ), oleaginosa pertencente à família Brassicaceae. Esta família abrange cerca de 350 gêneros e 3200 espécies. Outras espécies dessa família, como a canola (*Brassica napus*) e vários tipos de mostarda (*B. juncea*, *B. campestris*, *B. alba*, *B. nigra*), apresentam semelhança com o crambe (DESAI et al., 2004). O gênero *Crambe* é constituído por mais de 30 espécies sendo *C. abyssinica* a única cultivada (DESAI et al., 2004).

Existe divergência na literatura quanto ao centro de origem do gênero *Crambe*. Alguns autores (LEPPIK; WHITE, 1975; KNIGHTS, 2002; FALASCA et al., 2010) citam a Etiópia como centro de origem e a região do Mediterrâneo como centro de domesticação. Outros como Warwick; Gugel (2003), Muller (2008) e Souza et al. (2009) argumentam que o centro de origem do *Crambe* é a região do Mediterrâneo.

O crambe é uma planta herbácea, de ciclo curto e anual (entre 90 a 100 dias), com bastante ramificações e cerca de um metro de altura, no entanto, podendo variar conforme a densidade e época de plantio (COLODETTI et al., 2012). A espécie possui sistema radicular pivotante, alcançando profundidades superiores a 15 cm (KNIGHTS, 2002; COLODETTI et al., 2012). Suas folhas são alternadas, largas, opostas, ovais e assimétricas (FALASCA et al., 2010) com aproximadamente 10 cm de comprimento e 7,5 de largura. O pecíolo é pubescente com cerca de 20 cm de comprimento (OPLINGER et al., 2000).

As flores são hermafroditas, pequenas, de coloração branca e produzem grande número de frutos esféricos, que são inicialmente verdes e se tornam amarelados com a maturação. Cada fruto contém apenas uma semente esférica com diâmetro variando de 0,8 a 2,6 mm (DESAI et al., 2004).

As sementes apresentam dormência fisiológica pós-colheita que é quebrada após um período de armazenamento (POLETINE et al., 2015). O teor de óleo das sementes varia de 26 a 38% (NEVES et al., 2007; PAULOSE et al., 2010) e apresenta elevada concentração de ácido erúxico (50 a 60%) (FALASCA et al., 2010), que ocasiona lesões nos tecidos do coração, inviabilizando seu uso como alimento (AIR, 1997).

O espaçamento de plantio entre linhas é de 17 a 45 cm, com gasto de sementes entre 8 a 22,5 kg/ha, respectivamente, e profundidade de 3 cm (KNIGHTS, 2002; PITOL et al., 2010). A cultura é tolerante a seca e ao frio, porém as geadas podem ocasionar abortamento das flores. A temperatura ideal durante o período vegetativo é de 15 a 25 °C (OLIVEIRA et al., 2013). No

Brasil, devido as condições climáticas, é considerada uma cultura outono/inverno (PITOL et al., 2008), e tem se mostrado uma boa alternativa para o período de safrinha após a colheita da soja (ROSCOE; DELMONTES, 2008; FALASCA et al., 2010). O cultivo pode ser totalmente mecanizado, podendo se utilizar os mesmos equipamentos de culturas tradicionais como a soja (PITOL et al., 2010). Nas condições edafoclimáticas brasileiras, a produtividade de grãos pode variar de 1000 a 1500 kg/ha (Fundação MS, 2008). Em áreas experimentais na cidade de Umuarama-PR, Silva et al. (2013) obtiveram média de produtividade de 1770 kg/ha. Há relatos nos EUA e Europa de produtividades de 3000 kg/ha (PITOL et al., 2010), enquanto que na China foram registradas produtividades de 1485 a 5250 kg/ha (WANG et al., 2000).

No passado, as plantas de crambe eram utilizadas como forrageiras para cobertura do solo. Atualmente, a planta apresenta alto potencial para a produção de óleo vegetal. O óleo extraído das suas sementes é usado na fabricação de filmes plásticos, adesivos, náilon, isolantes térmicos, inibidores de corrosão, borracha sintética, lubrificante industrial e biodiesel (CARLSON et al., 1996). O óleo produzido pelas sementes de crambe podem ser utilizados para biodiesel, apresentando grande vantagem em relação a biodiesel produzido a partir de outros óleos vegetais, como maior resistência à degradação e à oxidação (BISPO et al., 2010). No entanto, quando refinado, o óleo pode ser usado na produção de cosméticos e ceras (PITOL et al., 2010). O farelo de crambe, subproduto da extração do óleo, apresenta ótima qualidade nutricional, com até 45% de proteína bruta, e pode ser utilizado como suplemento proteico na alimentação de ruminantes (CARLSON et al., 1996).

As sementes de crambe são eficazes na remoção de metais tóxicos avaliados em soluções aquosas, como o cádmio, chumbo e cromo (GONÇALVES JR. et al., 2013). Já o extrato de crambe pode ser utilizado como nematicida no controle de *Meloidogyne javanica* em culturas susceptíveis a este patógeno, como o tomateiro (COLTRO-RONCATO et al., 2016). A incorporação dos resíduos do crambe, utilizado como rotação de cultura, bem como seu cultivo, reduzem a população de *Heterodera glycines* (NASCIMENTO et al., 2016), um nematoide de importância no cultivo da soja. Segundo Pitol (2008), a cultura do crambe tem potencial para o uso de fertilizantes residuais de culturas anteriores, podendo ser considerada uma cultura que recicla nutrientes.

O melhoramento do crambe ainda é insipiente, com poucas cultivares de interesse (CARVALHO, 2006), os objetivos do melhoramento nessa cultura visam o aumento da produtividade, teor de óleo no grão, teor de ácido erúico no óleo, menor dormência das sementes, entre outros (KNIGHTS, 2002). No Brasil, a única cultivar comercial é a FMS

Brilhante, obtida a partir de amostras vindas do México, na década de 1990. Em outros países, como nos EUA, existem outras cultivares como Meyer, Indy, Bellan, Prophet e Bellinzian (KNIGHTS, 2002).

Em programas de melhoramento é de suma importância estudos sobre a divergência genética para identificação de potenciais genitores para cruzamentos, e conhecimento da base genética dos genótipos (PAIXÃO et al., 2008). O uso da análise multivariada na quantificação dessa divergência é vantajoso, já que possibilita: i) identificar fontes de variabilidade, ii) avaliar a importância de cada caráter mensurado e, ainda, iii) conhecer as combinações híbridas heteróticas, antes mesmo da realização dos cruzamentos (SÁVIO et al., 2008).

O uso de marcadores moleculares nos estudos de diversidade genética são úteis para detectar variações no genoma, aumentando assim o poder de análise genética das plantas (CAIXETA et al., 2009). Dentre os marcadores moleculares disponíveis, os ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) são amplamente utilizados em estudos de diversidade genética, por apresentarem baixo custo de desenvolvimento, não precisarem de informações prévias da sequência de DNA e por terem alta reprodutibilidade (BARTH et al., 2002). Os marcadores ISSR utilizam uma sequência simples repetida como oligonucleotídeo iniciador para amplificar um fragmento de DNA, gerando alto nível de polimorfismo sendo eficiente na análise da diversidade genética (PESSOA DA SILVA et al., 2011).

Outra análise importante no melhoramento de plantas é a obtenção das estimativas de parâmetros genéticos pois permitem identificar a natureza da ação dos genes envolvidos no controle de caracteres quantitativos, além de avaliar a eficiência das estratégias de melhoramento para a obtenção de ganhos genéticos (CRUZ et al., 2014). Um dos parâmetros genéticos de maior importância é o coeficiente de herdabilidade, que mede a proporção da variação genética em relação a variação total. Contudo, esse coeficiente pode sofrer variações devido as mudanças nas condições ambientais (BORÉM; MIRANDA, 2013).

Nesse contexto, o trabalho teve como objetivos: i) avaliar a divergência genética entre 10 genótipos de crambe, por meio da avaliação de características morfoagronômicas e de qualidade utilizando análises multivariadas; ii) estimar os parâmetros genéticos e correlações entre as características avaliadas nesses genótipos; e iii) testar marcadores ISSR para avaliar a divergência entre os genótipos.

## **2. MATERIAL E METÓDOS**

### **2.1 Experimento de campo**

#### **2.1.1 Delineamento experimental**

O experimento foi instalado em casa de vegetação no campo experimental “Diogo Alves de Mello”, no Vale da Agronomia, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), e conduzido de abril a julho de 2016. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições e 10 genótipos, cujas sementes foram fornecidas pela Fundação Mato Grosso do Sul.

As sementes foram tratadas com o fungicida Derosal Plus e plantadas a uma profundidade de aproximadamente 3 cm, sendo utilizadas três sementes por vaso. Aos 20 dias após a semeadura foi realizado o desbaste para condução de uma planta por vaso.

#### **2.1.2 Características avaliadas**

Foram avaliadas as seguintes características:

- Altura de planta (ALT, em cm), medida com auxílio de uma trena, como sendo a distância entre a superfície do solo e o ápice da planta;
- Diâmetro do caule (DC, em mm). Medições realizadas rente ao solo, utilizando um paquímetro digital;
- Número de ramos por planta (NR) obtido por contagem dos ramos em cada planta;
- Altura do primeiro ramo produtivo (ARP, em cm), correspondente à medida da distância entre a superfície do solo até o primeiro ramo produtivo;
- Massa de 1000 grãos (M1000, em g). Determinada através da pesagem de oito sub-amostras de 100 grãos por planta. As amostras foram pesadas, corrigindo-se o grau de umidade para 9%. M1000 foi determinada de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009);
- Produtividade de grãos (PROD, em kg/ha). Avaliada através da colheita de cada planta, sendo o valor obtido transformado para kg/ha, com correção de umidade para 9%;
- Teor de óleo (TO, em %). Determinado com emprego do extrator Soxhlet. Para isto, utilizaram-se 10g de sementes trituradas que foram colocadas em cartuchos de papel filtro pré-pesados, registrando-se o peso conjunto. As amostras foram levadas ao Soxhlet, utilizando como agente extrator o hexano à 80 °C e, subsequentemente, à 110 °C por 4 horas. Após este processo, as amostras foram colocadas em estufas por 24 horas. Após esse período os cartuchos foram pesados novamente para determinação do teor de óleo com base na massa seca. Essa

avaliação foi realizada no Laboratório Biotecnologia e Pós-colheita de Macaúba da UFV. O teor de óleo foi estimado através da fórmula:

$$TO = \frac{CAA - CAD}{CAA - CSA} * 100$$

em que:

CAA: cartucho com amostra antes da extração

CAD: cartucho com amostra depois da extração

CSA: cartucho sem amostras antes da extração

- Produtividade de óleo (PO), em kg/ha, obtida pela expressão:  $\frac{(PROD * TO)}{100}$

### 2.1.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA) para avaliar a existência de variabilidade genética entre os genótipos, segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + g_i + b_j + \varepsilon_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$ : valor observado para dada característica, relativo à i-ésimo genótipo, no j-ésimo bloco;

$\mu$ : média geral do experimento;

$g_i$ : efeito associado ao i-ésimo genótipo, sendo  $i = 1, 2, \dots, g$ ;

$b_j$ : efeito associado ao j-ésimo bloco, sendo  $j = 1, 2, \dots, b$ ;

$\varepsilon_{ij}$ : efeito do erro experimental, sendo  $\varepsilon_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$

As significâncias dos quadrados médios foram testadas pelo teste F ( $p < 0,01$ ) e, a partir da ANOVA, os parâmetros genéticos abaixo foram estimados para cada característica, conforme CRUZ et al. (2012):

- Coeficiente de variação genotípico (%):  $CV_g = 100 \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_g^2}}{\mu}$

- Razão entre o coeficiente de variação genético e o ambiental:  $\frac{CV_g}{CV_e}$

- Variância genotípica média:  $\hat{\sigma}_g^2 = \frac{QMG - QMR}{b}$

- Variância fenotípica média:  $\hat{\sigma}_f^2 = \frac{QMG}{b}$

- Variância ambiental média:  $\hat{\sigma}^2 = \frac{QMR}{b}$

- Coeficiente de herdabilidade em nível de médias de genótipos (%):  $h^2 = \frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_f^2} * 100$

Os coeficientes de correlações genotípicas ( $r_G$ ), fenotípicas ( $r_F$ ) e ambientais ( $r_E$ ) entre as características avaliadas foram estimados pelas seguintes expressões (CRUZ et al., 2012):

$$r_F(xy) = \frac{\hat{\sigma}_{fxy}^2}{\sqrt{\hat{\sigma}_{fx}^2 \hat{\sigma}_{fy}^2}}$$

$$r_G(xy) = \frac{\hat{\sigma}_{gxy}^2}{\sqrt{\hat{\sigma}_{gx}^2 \hat{\sigma}_{gy}^2}}$$

$$r_E(xy) = \frac{\hat{\sigma}_{exy}^2}{\sqrt{\hat{\sigma}_{ex}^2 \hat{\sigma}_{ey}^2}}$$

em que

$r_{xy}$  é a correlação entre os caracteres X e Y

As análises multivariadas para quantificação da divergência foram realizadas por meio da distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) entre os genótipos combinados dois a dois, onde a distância entre o par de genótipos i e i' é definida pela expressão (CRUZ et al., 2011):

$$D_{ii'}^2 = \delta_{ii'}' \Psi^{-1} \delta_{ii'}$$

em que

$D_{ii'}^2$ : é a distância generalizada de Mahalanobis entre os genótipos i e i', sendo que  $i = 1, 2, \dots, g$

$\delta_{ii'}' = [d_1 d_2 \dots d_n]$  sendo  $d_n = Y_{ij} - Y_{i'j}$  para genótipos i e i'

$d_n$  é a diferença entre médias de dois genótipos i e i' para cada característica avaliada

$Y_{ij}$  é a média do i-ésimo genótipo em relação à j-ésima característica, sendo que  $j = 1, 2, \dots, p$

$\Psi^{-1}$  é a inversa da matriz de variâncias e covariâncias residuais.

Sobre a matriz de dissimilaridade gerada foram aplicadas análises de agrupamento. A análise de agrupamento de Tocher identifica, na matriz de distâncias, o par de genótipos mais similares, formando um grupo inicial e, a partir desse, é avaliada a possibilidade de inclusão de novos genótipos no grupo, pelo critério de que as médias de dissimilaridade dentro de cada grupo deva ser menor que as distâncias médias entre os grupos (CRUZ et al., 2012). Outra análise de agrupamento empregada foi a UPGMA (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Averages), onde a matriz de distâncias é atualizada calculando-se a média das distâncias entre os indivíduos de dois grupos, o que evita estimar a dissimilaridade por valores extremos.

A contribuição relativa das características para a divergência entre os genótipos estudados foi avaliada pelo método de Singh (1981), por meio das estimativas de distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ). Todos os procedimentos da análise estatística dos dados experimentais foram realizados utilizando o software Genes (CRUZ, 2013).

## **2.2 Experimento molecular**

### **2.2.1. Local**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da UFV, e nos Laboratórios de Biotecnologia do Cafeeiro e de Biotecnologia Vegetal. Foram coletadas amostras foliares dos três indivíduos mais discrepantes de uma população de 10 genótipos de crambe

### **2.2.2 Extração e quantificação do DNA**

Para a extração de DNA, foram utilizadas folhas completamente desenvolvidas do terço médio das plantas. As amostras coletadas foram acondicionadas em envelope de papel alumínio e armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. As amostras foram liofilizadas, maceradas e armazenadas em microtubos de 2 mL.

O DNA das folhas foi extraído segundo o protocolo proposto por Diniz et al. (2005). Para isso, parte do material macerado foi colocado em microtubo identificado, acrescentando 750  $\mu\text{L}$  do tampão de extração, e homogeneizado em vortex. Em seguida, foi acrescentado 750  $\mu\text{L}$  do tampão e homogeneizado novamente. Os microtubos foram incubados em banho maria a  $65^{\circ}\text{C}$  por 40 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos. Após esfriarem, chegando a temperatura ambiente, foram colocados para centrifugar por 10 minutos a 14000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos de 2 mL com acréscimo de 1 mL de

CIA (clorofórmio:isoamil 24:1). Os microtubos foram agitados com inversões suaves por 10 minutos e centrifugados por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para microtubo de 1,5 mL e adicionados 800  $\mu$ L de isopropanol gelado. Os tubos foram alocados em freezer (-20°C) por cerca de 2 a 3 horas. Após esse período, foram centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado vertendo o tubo. O pellet foi lavado com 500  $\mu$ L de etanol 70%, para a retirada do sal, e depois com etanol 95%. O álcool foi descartado e os tubos foram secos a temperatura ambiente por 15 minutos. O DNA foi ressuspendido em 200  $\mu$ L de TE (10 mM Tris- HCl e 1 mM EDTA em pH 8), contendo RNase (10 mg/mL) e levado ao banho maria a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 40  $\mu$ L de NaCl e 200  $\mu$ L de isopropanol gelado aos tubos para precipitar o DNA. Os tubos foram colocados no freezer a -20°C de 2 a 3 horas e, então, centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet foi lavado com 500  $\mu$ L de etanol 70% e novamente com etanol 95%. Após os tubos serem deixados a temperatura ambiente para secar o pellet, o DNA foi ressuspendido em 200  $\mu$ L de TE.

Após a extração foi realizada a quantificação do DNA pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000c, que por meio da absorbância de luz estimou a quantidade de DNA presente em cada amostra em ng/ $\mu$ L. A qualidade do DNA extraído foi testada utilizando gel de agarose 1% (5  $\mu$ L de DNA e 2  $\mu$ L de corante *Bromophenol blue*). As amostras de trabalho foram padronizadas por meio da diluição para uma concentração de 25 ng/ $\mu$ L e mantidas à -20°C.

### **2.2.3 Análise com marcadores ISSR**

Nas reações de PCR foram testados 33 *primers* ISSR (Tabela 1). As reações foram realizadas em volume total de 25  $\mu$ L e consistiram de: 200  $\mu$ M de dNTP (Promega); 0,2  $\mu$ M do *primer* (Invitrogen®); 0,6 unidades de Taq DNA *polymerase* (Invitrogen®); 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®); 2  $\mu$ L de Tampão de reação 10x (Invitrogen®); 30 ng de DNA; e água ultrapura.

As reações de PCRs foram realizadas em termociclador Veriti™ com bloco de 96 poços, no qual as amostras foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 10 minutos, seguidos de 38 ciclos, com desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento de 30 segundos e extensão de 72°C por 1 minuto. Na fase de anelamento, onde os *primers* se ligam a região alvo da amplificação, as amostras foram submetidas a três diferentes temperaturas (52°C, 45°C e 60°C), a fim de testar a melhor temperatura. Ao final de todos os ciclos foi realizado uma extensão final a 72°C por 7 minutos e em seguida as amostras foram resfriadas a 4°C.

**Tabela 1.** Lista dos 33 *primers* ISSR usados no ensaio molecular com genótipos de crambe

Primer	Sequência (5' - 3')	Primer	Sequência (5' - 3')
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	UBC 846	CAC ACA CAC ACA CAC ART
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	UBC 847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC
UBC 810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	UBC 848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	UBC 849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA
UBC 812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	UBC 855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
UBC 814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
UBC 816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	UBC 857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	UBC 859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC
UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	UBC 862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
UBC 823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	UBC 879	CTT CAC TTC ACT TCA
UBC 827	ACACACACACACACACG	UBC 887	DVD TCT CTC TCT CTC TC
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	UBC 888	BDB CAC ACA CAC ACA CA
UBC 840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	UBC 889	DBD ACA CAC ACA CAC AC
UBC 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	UBC 890	VHV GTG TGT GTG TGT GT
UBC 843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG
UBC 845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG		

#### 2.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, com a utilização de corante *Bromophenol Blue* e tampão TBE 1x. Utilizou-se marcador de DNA ladder (Invitrogen, USA) de 100 pares de bases para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. A eletroforese teve duração de duas horas em voltagem de 80V. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,6 ng/mL e visualizados por meio de luz ultravioleta. As imagens foram digitalizadas em sistema de captura de imagens.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Ensaio de campo

##### 3.1.1 Análise de variância

Pela análise de variância univariada (ANOVA) foi verificado efeito do genótipo significativo ( $p < 0,01$ ) sobre as características avaliadas, indicando a presença de variabilidade genética. Além disso, a variação genética estimada reafirma a variabilidade entre os genótipos, por meio da variância genética, que foram todas diferentes de zero (Tabela 2).

De maneira geral, o coeficiente de variação foi baixo o que significa que o experimento apresentou uma boa precisão (PIMENTEL GOMES, 2009), variando de 4,29% para a característica produtividade de grãos (PROD) e 13,81% para altura do primeiro ramo produtivo (ARP). Lara (2013) em estudo com progênies de crambe oriundas de seleção de plantas individuais observou valores altos de CV para número de ramos ( $> 14,93\%$ ), porém ainda com boa precisão experimental. Cargnelutti Filho et al. (2010) encontraram valores superiores de coeficiente de variação experimental para a altura da planta (19,54%) e produtividade de grãos (61,96%).

No geral, os genótipos apresentaram alta produtividade média de grãos (1936,94 kg/ha) e de óleo (660,10 kg/ha) (Tabela 2). Em estudo com diferentes doses de fertilizante, Zenatti et al. (2012) obtiveram valores semelhantes a este trabalho para a produtividade de grãos (1935,34 kg/ha). Jasper et al. (2010) relataram produtividade de grãos de 1507,05 kg/ha e de óleo de 500 L/ha em crambe sob sistema de plantio direto, portanto com produtividades médias mais baixas que as encontradas no presente trabalho.

A altura do primeiro ramo produtivo (ARP) é uma característica importante quando se trata de colheita mecanizada. A baixa altura desse ramo dificulta a colheita mecanizada, o que pode aumentar as perdas devido a plataforma de corte trabalhar rente ao solo (CORTEZ, 2007). Em soja, a altura da primeira vagem para realizar a colheita mecânica sem grandes perdas é de pelo menos 10 a 12 cm (AGUILA et al., 2011; MARCOS FILHO, 1986). Foi verificado que a média de altura do primeiro ramo produtivo dos genótipos de crambe avaliados foi de 11,20 cm, sendo possível o uso da colheita mecanizada para esses genótipos.

Em condições de campo, estudando o desempenho do crambe em função dos espaçamentos e densidade de plantio, Freitas et al. (2013) encontraram valores médios inferiores aos observados nesse estudo para as características altura de planta (109 cm), massa de 1000 grãos (7,95 g), número de ramos (12,91) e produtividade de grãos (783 kg/ha). Laghetti

et al. (1995) obtiveram média de 7,00 g para M1000, enquanto que Lara (2013) observou média de 7,72 g para a mesma característica estudada na cidade de Botucatu-SP, em 2011, valores estes menores ao obtido nesse trabalho (8,90).

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância e estimativas de parâmetros genéticos para as características altura da planta (ALT), diâmetro do caule (DC), altura do primeiro ramo produtivo (ARP), número de ramos (NR), massa de 1000 grãos (M1000), produtividade de grãos (PROD) e de óleo (PO) em 10 genótipos de crambe

FV	gl	Quadrados Médios						
		ALT	DC	ARP	NR	M1000	PROD	PO
Blocos	3							
Genótipos	9	169,75**	3,06**	20,58**	9,47**	1,04**	67679,78**	7668,85**
Resíduo	27	44,72	0,35	2,39	1,38	0,24	6894,55	1341,00
Estimativas de Parâmetros Genéticos								
Média		146,34	11,05	11,20	16,89	8,90	1936,94	660,10
CV (%)		4,57	5,39	13,81	6,95	5,46	4,29	5,55
Mínimo		130,00	8,85	6,20	13,40	7,51	1663,48	582,35
Máximo		162,60	12,91	18,40	21,25	10,19	2191,28	808,58
$CV_g$ (%)		3,82	7,45	19,03	8,42	5,04	6,36	6,03
$CV_g/CV_e$		0,84	1,38	1,38	1,21	0,92	1,48	1,09
$\sigma_g^2$		32,26	0,68	4,55	2,02	0,20	45196,31	1581,96
$\sigma_e^2$		44,72	0,35	2,39	1,38	0,24	6894,55	1341,00
$h_m^2$ (%)		73,65	88,42	88,36	85,44	77,31	89,81	82,51

\*\* significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. CV: coeficiente de variação;  $CV_g$ : coeficiente de variação genotípico;  $CV_g/CV_e$ : razão entre o coeficiente de variação genético e ambiental;  $\sigma_g^2$ : variância genotípica média;  $\sigma_e^2$ : variância ambiental média;  $h_m^2$ : coeficiente de herdabilidade em nível de médias de genótipos.

### 3.1.2 Estimativas de parâmetros genéticos

As estimativas das variâncias genotípicas e ambientais, assim como o coeficiente de herdabilidade em nível de média de genótipos, o coeficiente de variação genético e a razão entre o coeficiente de variação genético e o ambiental ( $CV_g/CV_e$ ), estão apresentadas na Tabela 2.

O coeficiente de variação genético ( $CV_g$ ) permite compreender a magnitude da variabilidade genética que está presente na população para todas as características em estudo auxiliando na seleção de genótipos superiores (RESENDE, 2002). O coeficiente de variação

genética variou de 3,82% a 19,03% para as características altura da planta e altura do primeiro ramo produtivo, respectivamente. No caso de seleção, o CVg indica a proporcionalidade do ganho em relação à média. A razão CVg/CVe indica situação favorável à seleção de genótipos superiores, quando for maior que a unidade ( $>1$ ), pois a variação genética supera a ambiental (VENCOVSKY, 1987). A razão CVg/CVe foi superior a unidade para DC, ARP, NR, PROD e PO indicando que a variação genética foi superior a variação ambiental, favorecendo a seleção para estas características.

O coeficiente de herdabilidade é um dos parâmetros mais importantes no melhoramento genético. Esse coeficiente mostra o quanto da variação genética é de natureza herdável para a geração após a seleção (ALLARD, 1999). Todas as características avaliadas apresentam alta herdabilidade ( $h^2 > 73,65\%$ , para ALT), mesmo se tratando de características influenciadas pelo ambiente como a produtividade de grãos (89,81%) e a massa de 1000 grãos (77,31%), o que pode ser explicado pelo fato desses materiais terem origens variadas e, conseqüentemente, apresentar variações que possibilitem maior sucesso na seleção de genótipos superiores. Valores elevados de herdabilidade para produtividade (90,53%) e peso de 1000 grãos (87,67%) foram observados em acessos de cártamo (GERHARDT, 2014). Lara-Fioze et al. (2016) encontraram altos coeficientes de herdabilidade ( $> 74,00\%$ ) para as características estudadas em progênies autofecundadas de crambe, exceto para massa de 1000 grãos.

### 3.1.3 Correlações

As correlações medem o grau de associação entre duas ou mais características (HAULLAUER; MIRANDA FILHO, 1981). Correlações fenotípicas ( $r_F$ ) significativas positivas foram encontradas entre os caracteres ALT x ARP, DC x PROD, DC x PO, PROD x PO (Tabela 3).

As correlações genotípicas ( $r_G$ ) das características, com exceção de ALT x M1000 e M1000 x PO, apresentaram valores superiores e de mesmo sinal as suas respectivas correlações fenotípicas ( $r_F$ ), o que indica que o ambiente influencia pouco na expressão do fenótipo. Este fato foi também observado por Silva et al. (2014) em estudo de correlação em diferentes arranjos espaciais em crambe.

A produtividade de grãos apresentou correlações genotípicas positivas e de alta magnitude com a produtividade de óleo (0,9937) e diâmetro do caule (0,7397), e de magnitude mais baixa com massa de 1000 grãos (0,3269). Nota-se que as correlações fenotípicas dessas características foram de mesmo sinal e inferiores (0,9311; 0,6921 e 0,2573, respectivamente)

as genotípicas. Com isso, a escolha de genótipos mais produtivos resultará em aumentos nas características relacionadas.

**Tabela 3.** Correlações fenotípicas ( $r_F$ ), genotípicas ( $r_G$ ) e ambientais ( $r_E$ ) entre as características avaliadas em genótipos de crambe

Características		DC	ARP	NR	M1000	PROD	PO
ALT	$r_F$	-0,3516	0,6376*	0,1344	0,1799	-0,4323	-0,3584
	$r_G$	-0,4332	0,7513	0,1961	0,1251	-0,5751	-0,4012
	$r_E$	-0,0117	0,1798	-0,1083	0,3497	0,2162	-0,0730
DC	$r_F$		-0,5981	0,2728	0,2454	0,6921*	0,6621*
	$r_G$		-0,6423	0,3444	0,3070	0,7397	0,7831
	$r_E$		-0,2611	-0,2044	-0,052	0,3033	-0,0481
ARP	$r_F$			-0,3539	0,2989	-0,6955 *	-0,529
	$r_G$			-0,4142	0,3002	-0,7856	-0,6729
	$r_E$			0,0461	0,3122	0,0404	0,3194
NR	$r_F$				-0,3019	0,1346	-0,0351
	$r_G$				-0,3639	0,1686	-0,0778
	$r_E$				-0,0340	-0,1081	0,1893
M1000	$r_F$					0,2573	0,9394
	$r_G$					0,3269	0,4592
	$r_E$					-0,0992	0,1334
PROD	$r_F$						0,9311**
	$r_G$						0,9937
	$r_E$						0,5674

\*e \*\*, significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente, pelo teste t.

### 3.1.4 Divergência genética

Mediante a análise de agrupamento pelo método de Tocher, realizado com base nos dados da matriz de distância de Mahalanobis, houve a formação de cinco grupos distintos, em função da semelhança entre as características avaliadas, sendo os grupos III, IV e V formados por apenas um genótipo cada (Tabela 4). As médias das características de cada grupo encontram-se na Tabela 5. O grupo I apresentou a segunda melhor média de produtividade de grãos (2047,99 kg/ha) e a média mais elevada de produtividade de óleo (699,08 kg/ha) e de massa de 1000 grãos (9,15 g), podendo ser considerado um grupo promissor por apresentar altas médias de características desejáveis a cultura. O grupo II composto por três genótipos

obteve moderada produtividade de grãos (1812,32 kg/ha) e o menor rendimento de óleo (620,75 kg/ha), assim como menor diâmetro do caule (9,99 mm) e número de ramos (16,1).

Os grupos III, IV e V foram representados por apenas um genótipo cada, com destaque para o grupo V pela maior produtividade de grãos entre todos os grupos, com média de 2090,50 kg/ha, além de alta produtividade de óleo (693,52 kg/ha) e número de ramos (19,95). Já o grupo III apresentou as menores médias de produtividade de grãos (1786,66 kg/ha) e de massa de 1000 grãos (7,88 g). Enquanto que o grupo IV foi o que obteve maior altura de planta (158,27 cm) e valores altos para diâmetro do caule, altura do primeiro ramo produtivo, número de ramos e massa de 1000 grãos (11,57 mm; 12,2 cm; 18,67 e 9,14 g, respectivamente) (Tabela 5).

Apesar de alguns autores relatarem a falta de variabilidade em *C. abyssinica* (PAPATHANASIOU et al. 1966; LESSMAN; MEYER 1972) este fato não foi observado neste trabalho, assim como no trabalho de Lara-Fiores et al. (2016) que observou variabilidade fenotípica para todas as características agrônômicas de interesse.

**Tabela 4.** Agrupamento, pelo método de Tocher, de 10 genótipos de crambe, com base na dissimilaridade expressa pela distância generalizada de Mahalanobis

Grupos	Genótipos
I	3 6 5 8
II	4 7 10
III	9
IV	1
V	2

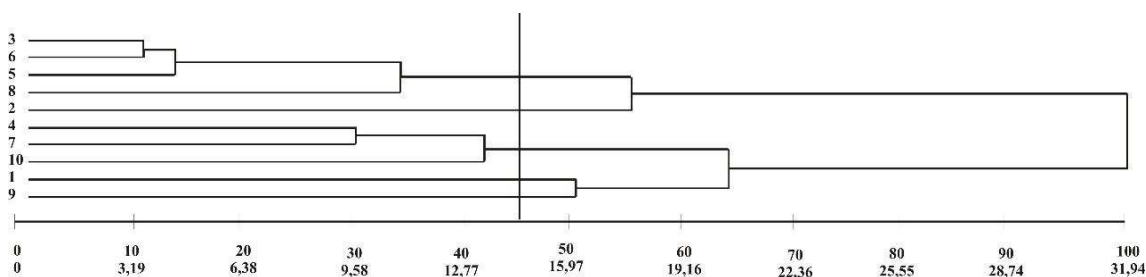
**Tabela 5.** Médias de altura da planta (ALT), diâmetro do caule (DC), altura do primeiro ramo produtivo (ARP), número de ramos (NR), massa de 1000 grãos (M1000), produtividade (PROD) e produtividade de óleo (PO) dos diferentes grupos de crambe formados a partir do método de otimização de Tocher

Grupos	ALT	DC	ARP	NR	M1000	PROD	PO
	cm	mm	cm	n°/planta	G	kg/ha	kg/ha
I	142,03	11,67	9,71	16,23	9,15	2047,99	699,08
II	148,26	9,99	13,69	16,10	8,97	1812,32	620,75
III	147,20	10,75	10,87	17,05	7,88	1786,33	623,12
IV	158,27	11,57	12,20	18,67	9,14	1863,68	625,82
V	144,97	11,51	9,03	19,95	8,44	2090,50	693,52

O dendrograma gerado pelo método hierárquico UPGMA, com base na matriz de distância de Mahalanobis, possibilitou a separação dos genótipos também em cinco grupos

(Figura 1). Essa metodologia apresentou resultados semelhantes aos observados pelo método de Tocher, com a correspondência entre os cinco grupos formados por ambos os métodos. Assim, todos os grupos formados pelo do método UPGMA, foram compostos exatamente pelos mesmos genótipos constituintes dos grupos formados método de otimização de Tocher.

Os genótipos 3 e 6 mostraram-se como os genótipos mais similares entre todos os pares estudados, com  $D^2$  igual a 3,29 e os genótipos 2 e 4 apresentou maior dissimilaridade com  $D^2$  de 57,52.



**Figura 1.** Dendrograma da análise de agrupamento UPGMA baseado na distância generalizada de Mahalanobis entre 10 genótipos de crambe.

### 3.1.5 Importância relativa das características

Em relação a contribuição relativa de cada característica para a diversidade genética entre os genótipos com base no método de Singh (1981), verificou-se que as características PROD, ARP, NR e DC, contribuíram com 72,90% da variação entre os genótipos (Tabela 6). Pode-se então afirmar que essas características são importantes no estudo da divergência genética entre os genótipos, por apresentarem as contribuições mais expressivas.

A produtividade de óleo apresentou o menor valor de  $S_j$ , onde  $S$  é a medida da importância relativa da variável  $j$  para a diversidade genética estudada, não sendo importante para a avaliação da divergência geral entre os genótipos. As características dispensáveis no estudo da divergência genética são aquelas que relativamente não variam entre os indivíduos estudados ou são redundantes por estarem correlacionadas a outra característica (CRUZ et al., 2012). Nesse estudo, a produtividade de óleo foi a característica de menor importância, podendo ser descartada para estudos de diversidade por apresentar alta correlação com a produtividade de grãos e a massa de 1000 grãos (Tabela 5).

**Tabela 6.** Contribuição relativa das características para a diversidade baseada na distância generalizada de Mahalanobis, em genótipos de crambe

Características	Contribuição Relativa	
	S.j	Valor em %
PROD	242,39	22,31
ARP	210,10	19,34
NR	184,60	16,99
DC	155,02	14,27
ALT	116,05	10,68
M1000	110,98	10,21
PO	67,43	6,21

### 3.2 Análise molecular

A concentração de DNA das amostras extraídas variou entre 34,4 ng/μL a 358,7 ng/μL (Tabela 7). Dentre os nove genótipos que foram extraídos, os indivíduos 1.2 e 2.2 que apresentaram as maiores concentrações. Esses resultados demonstram a eficiência e adaptabilidade do protocolo de Diniz et al (2005) na extração de DNA para a espécie de Crambe.

**Tabela 7.** Quantificação de DNA obtida por genótipo de crambe por meio do espectrofotômetro (NanoDrop2000c)

Amostras	Concentração de DNA ng/μL	260/280 nm	260/230 nm
1.1	39,3	1,91	1,53
1.2	358,7	1,93	2,15
1.3	43,7	1,89	1,82
2.1	37,8	1,86	1,62
2.2	66,6	1,84	1,79
2.3	34,4	1,84	1,34
3.1	58,3	1,85	1,75
3.2	39,4	1,82	1,61
3.3	36,1	1,83	1,42

Independentemente da quantidade, a qualidade do DNA extraído foi alta, com pureza relativa de DNA variando de 1,82 a 1,93. Uma proporção A260/A280 inferior a 1,6 demonstra existência de resquícios de proteínas ou outros contaminantes, que provavelmente não foram retiradas de forma eficiente no processo de extração enquanto uma razão superior a 2,0 indica que as amostras podem estar contaminadas com substâncias fenólicas (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), fatos estes não apresentados nessa extração.

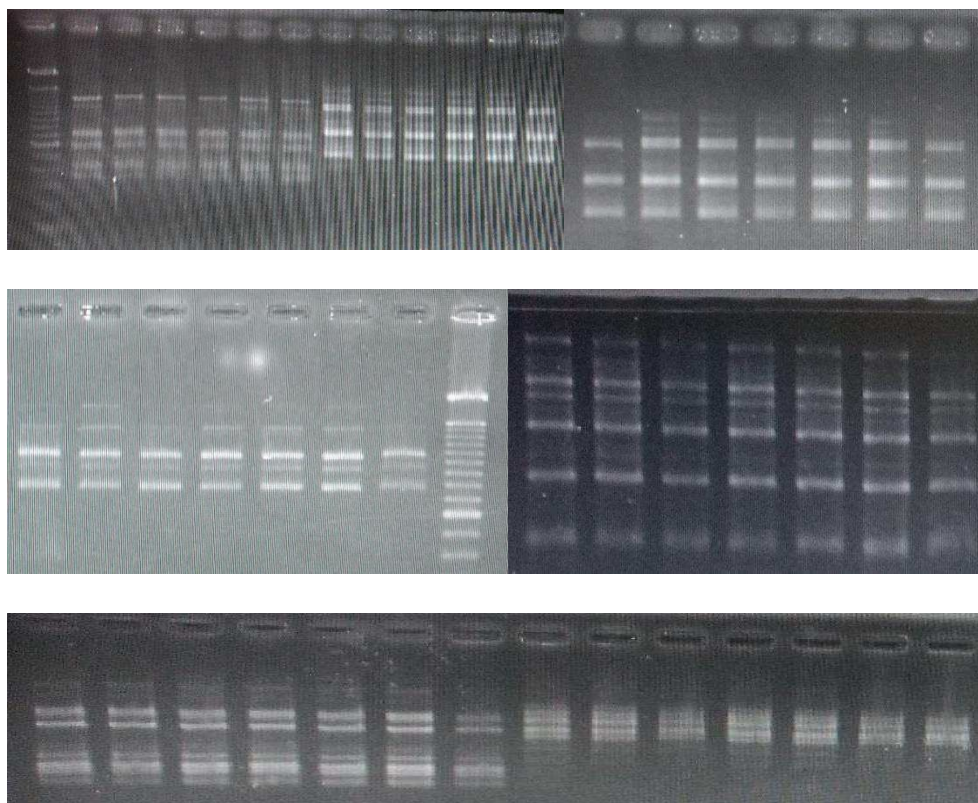
Visando adaptar os marcadores ISSR para crambe, diferentes temperaturas de anelamento foram testadas na amplificação do DNA. A melhor temperatura de anelamento observada foi a 52° C, esta temperatura proporcionou melhor amplificação dos fragmentos de DNA.

Dentre os 33 *primers* testados nenhum permitiu detectar a presença de polimorfismo nos genótipos analisados (Figura 2). Portanto, apesar dos *primers* terem sido eficazes na amplificação de fragmentos de DNA de crambe, eles não foram eficientes na diferenciação dos genótipos estudados nesse trabalho (Figura 2). Werner et al. (2015) obtiveram polimorfismo para os *primers* UBC 810, 827, 864 e 890, em estudo de estabilidade genética com plantas micropropagadas de crambe. Polimorfismo também foi detectado com nove *primers* ISSR para estudar a relação genética entre 32 acessos de germoplasma silvestres de crambe, separando os acessos em dois grandes grupos (TARIKAHYA-HACIOGLU, 2016). No entanto, nesses trabalhos utilizaram-se acessos silvestres e que, provavelmente, apresentam maior diversidade que os analisados no presente trabalho.

Os resultados obtidos demonstram que o material genético de crambe cedido pela Fundação Mato Grosso do Sul apresenta baixa diversidade genética. No entanto, ao analisar características agronômicas foi possível observar diferenças nesses genótipos. O mesmo foi observado em estudos preliminares em variedades de café demonstravam diferenças agronômicas entre as cultivares (AGUIAR, 2001), porém os trabalhos mais antigos de caracterização molecular do germoplasma de *Coffea* indicaram baixa diversidade genética, com baixo nível de polimorfismo molecular em *C. arabica* (LASHERMES et al., 1993; MALUF et al., 2005; PONCET et al., 2006), dificultando as pesquisas genéticas dessa espécie (MISSIO et al., 2010). Com o desenvolvimento de novos marcadores moleculares específico para espécie e determinação de conjuntos de marcadores informativos, a diversidade genética do cafeeiro passou a ser acessada pela análise molecular e vem sendo utilizada como ferramenta de auxílio para os programas de melhoramento (CUBRY et al., 2008; MISSIO et al., 2009, 2011; GELETA et al. 2012, ALKIMIN, et al. 2017; SOUSA et al., 2017).

Muitas vezes genótipos fenotipicamente diferentes não apresentam variações em análises moleculares. A não identificação de polimorfismos pode estar relacionada a diversos fatores dentre eles ao número limitado de marcadores testados nos genótipos, ao tipo do marcador, a não especificidade ou não associação com a regiões codificadoras (WARWICK; GUGEL, 2003). Essas limitações são realçadas quando a espécie apresenta base genética estreita. Nesse caso, para identificar conjunto de marcadores informativos pode-se analisar

diferentes tipos de marcadores moleculares. Um dos marcadores que poderia ser utilizado seria o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) que amplifica um grande número de locos por *primer* (FALEIRO et al., 2001). Dessa forma, um grande número de locos seria analisado tendo maior chance de identificar o polimorfismo entre os genótipos. Outro marcador seria o SSRs (*Single Sequence Repeats*), um marcador multialélico que vem sendo desenvolvidos para a cultura do crambe e tem apresentado resultados que facilitam a avaliação da diversidade genética de crambe que apresentam moderada diferenciação genética (QI et al., 2016) Os marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), derivados de sequenciamento do genoma e capazes de identificar diferenças de um único par de bases (CHO et al., 1999), são outra opção, no entanto ainda precisa ser desenvolvida para crambe.



**Figura 2.** Géis de agarose, mostrando ausência de polimorfismo em diferentes *primers* testados em genótipos de crambe

#### 4. CONCLUSÕES

As estimativas de parâmetros genéticos indicam a presença de variabilidade genética entre os genótipos avaliados. As características produtividade, altura do primeiro ramo produtivo, número de ramos e diâmetro do caule foram as que mais contribuíram para a diversidade genética

Os genótipos 2 e 4 podem ser utilizados como genitores em cruzamentos futuros, como os mais promissores na obtenção de populações segregantes. Já os genótipos 3 e 6 podem seguir avançando como linhagens.

Para a seleção de genótipos de crambe com maior produtividade de óleo deve-se realizar a seleção indireta e simultânea de plantas com maior diâmetro do caule, massa de 1000 grãos e produtividade de grãos.

Apesar de diferentes *primers* ISSR testados, nenhum deles foi capaz de identificar polimorfismos nos genótipos avaliados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIR. *Crambe abyssinica*, a comprehensive program – Workshop – Part 4 – Utilization Summary information. AIR-CT 94-2480, 1997.

AGUIAR, A. T. E. **Descritores para caracterização de cultivares e linhagens de café tipo arábica**. 2001. 98 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) - Instituto Agronômico, Campinas, SP, 2001.

ALLARD, R. W. **Principies of plant breeding**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 254p.

ALKIMIM, E. R. et al. Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease. **Molecular Breeding**, v. 37, n. 1, p. 6, 2017.

BARTH, S. et al. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v.11, p.495-505, jul. 2002.

BISPO, A. S. et al. Caracterização de óleos vegetais extraídos mecanicamente sob condições variadas, visando à produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 4; CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 7., Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, MG: TECPAR, 2010.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 6 ed. Viçosa, MG: UFV, 2013, 523p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 11-101.

CARGNELUTTI FILHO, A. et al. Tamanho de amostra e relações lineares de caracteres morfológicos e produtivos de crambe. **Ciência Rural**, v. 40, n. 11, p. 2262-2267, 2010.

CARLSON, K. D. et al. Crambe: new crop success. In: JANICK, J. (ed.). **Progress in new crops**. Alexandria: ASHS Press, 1996, p. 306-322.

CARVALHO, J. M. F. C. et al. **Fatores inerentes a micropropagação**. Embrapa Algodão: Campina Grande – PB, documentos 148, 2006

CHO, R. J. et al. Genome- wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, New York, v. 23, p. 203-207, 1999.

COLODETTI, T. V. et al. Crambe: aspectos gerais da produção agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, GO, v. 8, n. 14, p. 258-269, 2012.

COLTRO-RONCATO, S. et al. Nematicidal effect of *Crambe abyssinica* leaf extracts to *Meloidogyne javaica* on tomato. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 32, p. 3004-3011, 2016.

CORTEZ, J. W. **Densidade de sementeira da soja e profundidade de deposição do adubo no sistema plantio direto**. 2007. 100 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, SP, 2007.

CRUZ, C. D. GENES – a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P.S.C.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**, vol. 2. 3 ed. Viçosa, MG: UFV, 2014, 668p.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, M.F.; PESSONI, A.L. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**, vol.1. Viçosa, MG: UFV, 2011, 620 p.

CRUZ, C. D.; REGAZI, A. J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**, vol 1. 4 ed. Viçosa, MG: UFV, 2012, 514p.

CUBRY, P. et al. Diversity in coffee assessed with SSR markers: structure of the genus *Coffea* and perspectives for breeding. **Genome**, v. 51, n. 1, p. 50-63, 2008.

DESAI, B. B. **Seeds handbook**: biology, production processing and storage. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 787 p.

DINIZ, L. E. C. et al. Analysis of AFLP markers associated to the Mex-1 resistance locus in Icatu progenies. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, MG, v.5, p.387-393, 2005.

FALASCA, S. L. et al. *Crambe abyssinica*: an almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, p. 5808-5812, 2010.

FALEIRO, F. G. et al. Caracterização de variedades clonais de *Theobroma cacao* L. com base em marcadores RAPD, AFLP e microssatélites. **Agrotropica**, Itabuna, v. 13, p. 79-86, 2001.

FREITAS, M. E. et al. Espaçamento e densidade de plantas no desempenho agrônomo da cultura do crambe. **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 25, n. 3/4, p. 175-181, 2013.

FUNDAÇÃO MS. **Crambe (Crambe abyssinica)** – cultivar FMS Brilhante: uma boa alternativa para produção de biodiesel. **Boletim informativo**, 2008.

GELETA, M. et al. Genetic diversity of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as estimated by simple sequence repeat markers. **The Scientific World Journal**, p.1-11, 2012.

GERHARDT, I. F. S. Divergência genética entre acessos de cartamo (*Carthamus tinctorius* L.). 2014. 43f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas – UNESP, Botucatu, SP, 2014.

GONÇALVES JR., A. C. et al. The use of *Crambe abyssinica* seeds as adsorbent in the removal of metals from Waters. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 3, p. 306-311, 2013.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. **Quantitative genetics in maize breeding**, 2 ed. Ames: Iowa State University Press, 1981. 468 p.

JASPER, S. P. et al. Análise energética da cultura do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) produzida em plantio direto. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 03, p. 395-403, 2010.

KNIGHTS, E. G. **Crambe: A North Dakota case study**. A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC: Kingston, 2002. 25 p.

LAGHETTI, G. et al. Yield and oil quality in selected lines of *Crambe abyssinica* (Hochst. ex. R. E. fries) and *C. hispânica* (L.) grown in Italy. **Industrial Crops and Products**, v.4, n. 3, p. 203-212, 1995.

LARA, A. C. C. **Seleção individual com teste de progênes em crambe (*Crambe abyssinica* Hochst)**. 2013. 70 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas Campus Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2013.

LARA-FIOREZE, A. C. C. et al. Inbreeding depression in crambe. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 46, n. 4, p. 401-406, 2016

LASHERMES, P. et al. Use of random amplified DNA markers to analyse variability and relationships of *Coffea* species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 40, p. 91-99, 1993.

LEPPIK, E. E.; WHITE, F. A. Preliminary assessment of Crambe germplasm resources. **Euphytica**, v.24, p. 681-689. 1975.

LESSMAN, K. J.; MEIER, V. D. Agronomic evaluation of crambe as a source of oil. **Crop Science**, Madison, v. 12, p. 224-227, 1972.

MALUF, M. P. et al. Genetic diversity of cultivated *Coffea arabica* inbred lines assessed by RAPD, AFLP and SSR marker systems. **Scientia Agricola**, v.62, n.4, p.366-373. 2005.

MARCOS FILHO, J. **Produção de sementes de soja**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. 86p.

MISSIO, R. F. et al. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. **Bragantia**, v. 68, n. 3, p. 573-581, 2009.

MISSIO, R. F. et al. Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 10, p. 89-94, 2010.

MISSIO, R. F. et al. Genetic characterization of an elite coffee germplasm assessed by gSSR and EST-SSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p. 2366-2381, 2011.

MULLER, A. Armazenamento e germinação de sementes de Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst, Brassicaceae), Campo Grande, **Anais...Campo Grande**, 2008, UCDB.

NASCIMENTO, D. D. et al. The role of *Crambe abyssinica* in the control of *Heterodera glycines* (Thylenchida: Heteroidae). **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 25, p. 2245-2249, 2016.

NEVES, M. B. et al. Qualidade fisiológica de sementes de crambe produzidos em Mato Grosso do Sul. In: SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA, 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas, RS: EMBRAPA, 2007. p. 97-98.

OLIVEIRA, R. C. et al. Cultura do Crambe. In: RESULTADOS DE EPSQUISA DE CRAMBE 2012/13, 2013, Cascavel: FACULDADE ASSIS GURGACZ, 2013. p.1-70.

OPLINGER, E. S. et al. **Crambe**: alternative field crops manual. St. Paul: University of Wisconsin and University of Minnesota, 2000.

PAIXÃO, S. L. et al. Divergência genética e avaliação de populações de milho em diferentes ambientes no estado de alagoas. **Caatinga**, v. 21, p. 191-195, 2008.

PAPATHANASIOU, G. A. et al. Evaluation of eleven introductions of crambe, *Crambe abyssinica* Hochst. **Agronomy Journal**, Madison, v. 58, p. 587-589, 1966.

PAULOSE, B. et al. Expression profiling of *Crambe abyssinica* under arsenate stress identifies genes and gene networks involved in arsenic metabolism and detoxification. **BMC Plant Biology**, v.10, n.108, p.1-12, 2010.

PESSOA DA SILVA, K. V. et al. Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 9, p. 1082-1088, 2011.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de Estatística Experimental**. 15 ed. Piracicaba: Fealq, 2009. 451p.

PITOL, C. Cultura do Crambe. In: **Tecnologia e Produção: Milho Safrinha e Culturas de Inverno – 2008**. 1. ed. Maracajú: Fundação MS, 2008. v.1. c.11, p.85-88.

PITOL, C. et al. **Tecnologia e Produção: Crambe 2010**. Maracaju: Fundação MS, 2010. 60p.  
PONCET, V. et al. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. **Molecular and Genetics Genomics**, v.276, p.436-449, 2006

POLETINE, J. P. et al. Divergência genética entre progênies de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst). **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 4, n. especial, p. 347-359, 2015.

QI, W. et al. High-throughput development of simple sequence repeat markers for genetic diversity research in *Crambe abyssinica*. **BMC Plant Biology**, n.16, n. 1, p. 139-150,2016.

RESENDE, M. D. V. **Genética biométrica e estatística no melhoramento de plantas perenes**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnologia, 2002. 975p.

ROSCOE, R.; DELMONTES, A. M. A. **Crambe é nova opção para biodiesel**. Agrianual, São Paulo: Instituto FNP, 2008, p. 40-41.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001, 2100p.

SÁVIO, F. L. et al. Divergência genética em híbridos de sorgo cultivados sob diferentes níveis de fósforo, em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 7, n. 3, p. 305-321, 2008.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v. 36, p. 237-245. 1981

SILVA, T. R. B. et al. Nitrogen top dressing application and growing season of crambe cultivated on two crop year. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.11, n.3/4, p.1463-1466, 2013.

SILVA, F. A. et al. Correlações e parâmetros genéticos em crambe cultivado em diferentes arranjos espaciais. **Revista de Ciência Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 441-446, 2014.

SOUZA, A. D. V. et al. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

SOUSA, T. V. et al. Molecular markers useful to discriminate *Coffea arabica* cultivars with high genetic similarity. **Euphytica** (Wageningen), 2017.

TARIKAHYA-HACIOGLU, B. Molecular diversity of the wild *Crambe* (Brassicaceae) taxa in Turkey detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 214-219, 2016.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Fundação Cargill, 1987. p.137-214.

WANG, Y. P. et al. A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.12, n.1, p.47-52, 2000.

WARWICK, S. I.; GUGEL, R. K. Genetic variation in the *Crambe abyssinica* – *C. hispanica* – *C. glabrata* complex. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 50, p. 291-305, jul./nov. 2003.

WERNER, E. T. et al. Genetic stability of micropropagated plants of *Crambe abyssinica* Hoschst using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n. 4, p. 16450-16460, 2015

ZENATTI, R. H. et al. Produtividade de grãos e óleo da cultura do crambe em relação a doses de fertilizantes. **Revista Cultivando o Saber**, v. 5, n.4, p. 155-163, 2012.