

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Agrárias**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais**

Andressa Layane Ferreira Linhares

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) VISANDO SUA  
INTRODUÇÃO NO SEMIÁRIDO E ZONAS DE TRANSIÇÃO**

**Montes Claros**

**2024**

Andressa Layane Ferreira Linhares

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) VISANDO SUA  
INTRODUÇÃO NO SEMIÁRIDO E ZONAS DE TRANSIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais.

Orientador: Demerson Arruda Sanglard.

**Montes Claros**

**2024**

L735d  
2024

Linhares, Andressa Layane Ferreira.

Diversidade genética em cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) visando sua introdução no semiárido e zonas de transição [manuscrito] / Andressa Layane Ferreira Linhares. Montes Claros, 2023.

55 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Ciências Florestais. Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Demerson Arruda Sanglard.

Banca examinadora: Ariadna Faria Vieira, Maximiliano Soares Pinto, Demerson Arruda Sanglard.

Inclui referências: f. 48-53.

1. Biometria – Teses. 2. Marcadores biológicos – Teses. 3. Plantas oleaginosas – Teses. I. Sanglard, Demerson Arruda. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 633.85



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Aos 06 dias do mês de dezembro do ano de dois mil e vinte e três, às 18:30 horas, sob a Presidência do Professor Demerson Arruda Sanglard, D. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores Ariadna Faria Vieira, D. Sc. (UESPI) e Maximiliano Soares Pinto, D. Sc. (UFMG/ICA), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de Defesa de Dissertação de Andressa Layane Ferreira Linhares, aluna do Curso de Mestrado em Ciências Florestais. Após a avaliação da referida aluna, a Banca Examinadora procedeu à publicação do resultado da defesa da Dissertação intitulada: "DIVERSIDADE GENÉTICA EM CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) VISANDO SUA INTRODUÇÃO NO SEMIÁRIDO E ZONAS DE TRANSIÇÃO", sendo a aluna considerada **APROVADA**. E, para constar, eu, Professor Demerson Arruda Sanglard, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: A aluna somente receberá o título após cumprir as exigências do ARTIGO 74 do regulamento do Curso de Mestrado em Ciências Florestais, conforme apresentado a seguir:

Art. 74 – Para dar andamento ao processo de efetivação do grau obtido, o candidato deverá, após a aprovação de sua Dissertação e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do colegiado do Curso, com a anuência do orientador, no mínimo 3 (três) exemplares impressos e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação, no prazo de 60 (sessenta) dias.

**Montes Claros - MG, 07 de dezembro de 2023.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Demerson Arruda Sanglard, Professor do Magistério Superior**, em 11/12/2023, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maximiliano Soares Pinto, Professor do Magistério Superior**, em 19/12/2023, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ariadna Faria Vieira, Usuária Externa**, em 19/12/2023, às 16:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2889174** e o código CRC **B2942CC7**.

Dedico este trabalho à minha família, sobretudo à minha filha, Hannah Vitória, e à minha mãe, Maria Luciene; são minha força e minha base.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me deixar desamparada, principalmente nos momentos em que fraquejei.

No âmbito do ensino, agradeço aos docentes com quem convivi durante o período do Mestrado, pelo conhecimento compartilhado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de fomento imprescindível à realização deste trabalho, relativo ao projeto “Diversidade genética em cártamo visando à obtenção de populações de melhoramento para o Norte de Minas Gerais” (APQ-01105-14).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), pela oferta de bolsa durante o curso de Mestrado, cujas implicações se estendem ao estado do Maranhão.

Ao Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMA-MT), por ter cedido os germoplasmas avaliados neste estudo.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), por me receber como aluna e me oferecer ótimas condições de estudo.

No âmbito dos trabalhos e das ações, minha gratidão ao Professor Demerson Arruda Sanglard, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela orientação, e à Técnica Flávia Échila Ribeiro Batista, pelo apoio no Laboratório de Biotecnologia - CPCA I.

Agradeço à minha rede de apoio – família, namorado e amigos –, em especial ao Prof. Roldão Carlos de Andrade Lima, que me mostrou oportunidades acadêmicas, e ao Yago Luan Santos Vila Nova, que sempre permaneceu ao meu lado, apoiando-me e confiando em mim.

“O mais difícil de uma longa caminhada é o primeiro passo”.

*Lao-Tsé.*

# DIVERSIDADE GENÉTICA EM CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius* L.) VISANDO SUA INTRODUÇÃO NO SEMIÁRIDO E ZONAS DE TRANSIÇÃO

## RESUMO

No campo das pesquisas agrárias, a produção de diferentes espécies com potencial energético é expressiva e busca atender à grande demanda mundial por espécies bioenergéticas. O cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) é uma espécie cultivada há mais de dois milênios, sendo utilizado na fabricação de chás, esmaltes, tintas, azeite, entre outros produtos. É reconhecido como uma cultura de alta capacidade de desenvolvimento e produção sob baixa disponibilidade hídrica, principalmente para o semiárido e as zonas de transição que possuem precipitação irregular. O objetivo desse trabalho foi caracterizar 24 genótipos de cártamo, por meio de marcadores ISSR e caracteres morfoagronômicos. Inicialmente, foram realizadas extrações de DNA, ampliações via PCR com oligonucleotídeos ISSR e obtenção de matriz de dissimilaridade, pelo índice de Nei e Li. Na sequência, os acessos mais divergentes foram avaliados para os seguintes caracteres: altura de planta; número de ramos primários por planta; número de capítulos por planta; diâmetro do capítulo; produtividade de matéria seca; produtividade de grãos e produtividade de óleo. Os resultados dos testes de diversidade genética indicaram que os métodos se complementam entre si e os marcadores moleculares promovem varreduras mais detalhadas das diferenças entre genomas. Por meio das estimativas de herdabilidade, foi possível selecionar os caracteres com maior potencial de melhoramento genético, destacando-se altura, diâmetro, ramificação primária, produção de grãos e produção de óleo. Através do método de Tocher, foi possível identificar as características dos indivíduos e separá-los em quatro grupos. Conclui-se que o estudo envolvendo a análise da diversidade genética de cártamo abre caminho para o melhoramento genético, considerando dados moleculares e morfoagronômicos, o que fornece embasamento para o manejo dos acessos disponíveis quanto à condução de populações de melhoramento.

Palavras-chave: Biometria. Marcadores Moleculares. Oleaginosa.



# GENETIC DIVERSITY IN THE SOFFLOWER (*Carthamus tinctorius* L.) AIMING ITS INTRODUCTION IN THE SEMI-ARID AND TRANSITIONAL ZONES

## ABSTRACT

In the agricultural research field, the production of different species with energy potential is significant, and seeks to meet the global demand for bioenergetic species. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) is a species that has been cultivated for more than two millennia, being used in the manufacture of teas, enamels, paints, olive oil, among other products. It is recognized as a crop with high development and production capacity under low water availability, mainly for the semiarid and transition areas that have irregular precipitation. The study aimed to characterize 24 safflower genotypes using ISSR markers and morphoagronomic traits. Initially, DNA extractions, were performed followed by PCR amplifications with ISSR oligonucleotides to generate a dissimilarity matrix using the Nei and Li index. Subsequently, the most divergent accessions were evaluated for the following traits: plant height; number of primary branches per plant; number of capitula per plant; captulum diameter; dry matter productivity; grain productivity, and oil productivity. The results of the genetic diversity tests indicated that the methods complement each other and the molecular markers promote more detailed scans of the differences between genomes. Heritability estimates facilitated the identification of traits with the greatest potential for genetic improvement, highlighting characteristics such as height, diameter, primary branching, grain and oil production. Through Tocher's method, it was possible to identify the characteristics of each individual and separate them into four groups. In conclusion the analysis of safflower genetic diversity paves the way for genetic improvement, by integrating molecular and morphoagronomic data, which provides a basis for the management of available accessions in terms of conducting breeding populations.

Key words: Biometry. Molecular Markers. Oilseed.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Capítulo e flores de cártamo. 16
- Figura 2 – Amplificação dos genomas de 24 acessos de cártamo. As sequências ordinais (1 a 24) referem-se às eletroforeses de ampliações com oligonucleotídeos ISSR UBC 850, 849, 848 e 825, respectivamente. Cada uma das amostras continha 25 uL de mix-PCR, 5 uL de GelRed™ e 3 uL de corante tipo IV, submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), durante 3 h. 36
- Figura 3 – Dendrograma ilustrativo do padrão de dissimilaridade obtido pelo método do vizinho mais próximo, com base na distância de Mahalanobis: (A) Dispersão gráfica dos escores; (B) Variáveis canônicas (VC1 e VC2) entre os acessos de cártamo. 44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Material genético (acessos) de cártamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.) utilizado nos estudos de diversidade genética molecular (dissimilaridades).	24
Tabela 2 – Condições de amplificação via PCR para oligonucleotídeos ISSR, envolvendo 24 acessos de cártamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.).	26
Tabela 3 – Oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).	27
Tabela 4 – Resultados de quantificações de DNAs de acessos de cártamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.) por espectrofotometria.	31
Tabela 5 – Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNAs de cártamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.) amplificados com oligonucleotídeos ISSR.	32
Tabela 6 – Resultados das amplificações via PCR envolvendo 24 acessos de cártamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.) amplificados com 23 oligonucleotídeos ISSR.	34
Tabela 7 – Comparações sobre os acessos mais 92 e menos divergentes, considerando-se 92 fragmentos (locos) amplificados em 24 acessos de cártamo, a partir de 23 oligonucleotídeos ISSR.	37
Tabela 8 – Matriz de dissimilaridade (%) – complemento aritmético do índice de "Nei e Li" – entre 24 acessos de cártamo, estimada com base em fragmentos (locos), a partir de 23 oligonucleotídeos ISSR.	38
Tabela 9 – Teste Scott-Knott para o agrupamento de médias ao nível de 5% de significância e estimativas de parâmetros genéticos para oito caracteres avaliados em dez acessos de cártamo.	39
Tabela 10 – Estimativas de correlações genotípicas entre oito caracteres avaliados em acessos de cártamo.	43
Tabela 11 – Agrupamentos formados com base no método de Tocher e distância generalizada de Mahalanobis, considerando-se dez acessos de cártamo.	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	Ácido Graxo Monoinsaturado
AGP	Ácido Graxo Poliinsaturado
CMS	Cytoplasmic Male Sterile
BAG's	Bancos Ativos de Germoplasmas
VC	Varição Canônica
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
GMS	Genetic Male Sterile
GMU	Germplasm Manegement United
IMA	Instituto Mato-Grossense do Algodão
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
SSR	Simple Sequence Repeats
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIC	Polymorphism Information Content
WRPIS	Westen Regional Plant Introduction Station
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo Geral .....	14
2.2. Objetivos Específicos .....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 A Cultura do cártamo e sua importância.....	15
3.2 Melhoramento genético do cártamo e os marcadores moleculares ISSR	18
3.3. Parâmetros biométricos aplicados ao melhoramento de plantas .....	20
4.1. ARTIGO - Diversidade genética do cártamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.) visando sua introdução no semiárido e zonas de transição .....	22
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS.....	48

## 1. INTRODUÇÃO

Com o evidente crescimento populacional, o mercado competitivo e a grande demanda mundial por espécies bioenergéticas motivaram o desenvolvimento de espécies e tecnologias mais apropriadas e sustentáveis nas atividades de produção tanto agrícolas, como pecuárias e florestais (BALBINO *et al.*, 2011a). Dentre as espécies, o cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) é uma oleaginosa que vem ganhando espaço nesse cenário de plantas alternativas para produção de energia (OLIVEIRA, 2016).

O cártamo é uma espécie cultivada há mais de dois milênios. É reconhecido como uma cultura de alta capacidade de desenvolvimento e produção sob baixa disponibilidade hídrica, boa opção para o semiárido e zonas de transições. Apesar do alto potencial e de sua capacidade de adaptação, o cártamo ainda tem pouca expressão econômica em diversos países de agricultura desenvolvida, como o Brasil. A falta de conhecimentos básicos a respeito das técnicas de cultivo e o uso de cultivares melhoradas e adaptadas são os principais obstáculos para expansão dessa cultura (SINGH; NIMBKAR, 2007).

Neste sentido, quando há poucas informações a respeito de uma espécie a ser introduzida, torna-se imperativa a caracterização da diversidade genética, visando obter informações básicas necessárias para iniciar um programa de melhoramento. Para isso, análises moleculares associadas a procedimentos multivariados em medidas de dissimilaridade e métodos de agrupamento são ferramentas úteis, as quais permitem avaliar cada indivíduo na sua multidimensionalidade, proporcionando uma visão mais ampla de cada genótipo e da relação de proximidade que eles estabelecem entre si (DANIELI *et al.*, 2011).

A quantificação da diversidade genética auxilia no planejamento de estratégias mais eficazes que venham a maximizar os ganhos genéticos no melhoramento. Dentre as possibilidades de estudos da diversidade, destacam-se: determinação das inter-relações genéticas entre linhagens, cultivares e populações; identificação de combinações parentais adequadas à obtenção de híbridos altamente heteróticos e que possibilitem maior segregação em recombinações, com o aparecimento de transgressivos; e introgressão de genes favoráveis provenientes dos acessos de bancos de germoplasma.

Atualmente, os programas de melhoramento genético têm utilizado a associação de técnicas clássicas a marcadores moleculares. Uma das principais vantagens da utilização destes é propiciar a redução do tempo para identificação da diversidade genética entre os indivíduos trabalhados (XAVIER *et al.*, 2005).

Este trabalho, com enfoque no melhoramento genético vegetal, prevê a seleção de acessos de cártamo e subseqüentes hibridações, no intuito de desenvolver populações segregantes para futuros intentos de melhoramento, o que pode ser uma opção vantajosa para localidades semiáridas e zonas de transição.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Selecionar 24 genótipos de *Carthamus tinctorius* L., por meio de marcadores ISSR e parâmetros morfoagronômicos, visando à obtenção de híbridos e populações de melhoramento.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a estrutura genética contida nos 24 acessos de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) oriundos do WRPIS (*Westen Regional Plant Introduction Station*), por meio de oligonucleotídeos (*primers*) ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*);
- Selecionar uma amostra dessa coleção que represente o máximo da diversidade genética, para ser utilizada em estudos de diversidade genética com base em dados biométricos;
- Realizar cruzamentos entre os acessos mais divergentes e promissores, visando obter híbridos e populações segregantes para as principais características de interesse na cultura;
- Estimar parâmetros genéticos visando gerar informações capazes de obter previsões de ganhos genéticos.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 A Cultura do cártamo e sua importância

O cártamo tem sua origem em uma área que abrange Índia, China, Paquistão, Afeganistão, Irã, Turquia e em vários outros lugares do Oriente Médio (SEHGAL; RAINA, 2011). A origem de sua nomenclatura, *Carthamus*, é referente à sua cor entre tons amarelados, laranjados e avermelhados, usada no tingimento dos tecidos; e *tinctorius* é referente à ação de tingir, na linguagem árabe (PUREY; SHARMA, 2008). Sua classificação botânica, de acordo com Robles (1985), é pertencente à família Asteraceae, subfamília Carduceae (Tubulifloras), tribo Cynereae, gênero *Carthamus* e espécie *C. tinctorius* L.

Popularmente conhecido como açafão, açafão bastardo, entre outras denominações, o cártamo é uma cultura utilizada desde a Antiguidade, quando a extração, proveniente das flores, era usada para tingir tecidos como algodão e seda, alimentos, em cerimônias religiosas e até mesmo para ungir múmias no Egito (WEISS, 1971).

É uma planta arbustiva, anual, herbácea, com caule grosso e ereto, cheio de ramificações, com altura que pode variar de 30 cm a 150 cm. O sistema radicular é extremamente forte e desenvolvido, pivotante e pode chegar a uma profundidade de até 300 cm, o que torna a cultura bastante tolerante a climas quentes, secos, ao estresse hídrico e a solos de baixa fertilidade (SANTOS; SILVA, 2015).

Ela possui o ciclo relativamente curto e sua maturação ocorre de 110 a 150 dias. Dependendo do tipo do genótipo e condições ambientais, esses dias de maturação podem ser antecipados ou prolongados. A germinação acontece entre 3 e 8 dias após a semeadura. Durante o estágio de roseta, que ocorre nos primeiros 30 ou 40 dias, dependendo do material genético, a planta cresce lentamente e diversas folhas de aspecto alongado e serrilhado são produzidas próximas do solo. Essa é uma das etapas críticas e sensíveis do desenvolvimento da planta, a qual leva de 6 a 8 semanas, sendo a fase mais competitiva da planta por água, luz, nutriente e com plantas invasoras (OELKE *et al.*, 1992).

Quando se inicia o alongamento do caule, boas características genéticas e nutricionais são fundamentais para determinar a quantidade de ramificação, que varia de 2 a 5 ramos, sendo descritos também como primários, secundários e terciários,

surgindo de uma altura de 20 a 30 cm do solo. No entanto, o crescimento cessa quando a floração é iniciada (INIA, 1962ab; ANÓNIMO, 1970ab).

Nesse estágio, as folhas apresentam aspecto mais ovalado, serrilhado e que termina em pequenos espinhos. As folhas inferiores ficam com o aspecto do estágio de roseta, largas e alongadas, e as superiores ficam estreitas e finas, dependendo do material genético (QUEIROGA *et al.*, 2021).

A inflorescência do cártamo é um capítulo e sua quantidade irá ser influenciada pelo manejo da cultura, pelo genótipo e ambiente (CORONADO, 2010). O capítulo (FIGURA 1) é uma estrutura alargada como um receptáculo, podendo ser plano, côncavo ou convexo, onde estão em torno de 20 a 250 flores agrupadas envolvidas por diversas brácteas verdes, espinhosas e sobrepostas, que assim o formam, podendo conter de 15 a 30 sementes. As flores são tubulares, hermafroditas, mas com uns 10% de hibridação (QUEIROGA *et al.*, 2021).

Figura 1 – Capítulo e flores de cártamo.



Fonte: da autora, 2022.

O início do florescimento ocorre em torno de 60 a 100 dias, começando na haste central e se espalhando para as ramificações secundárias. O estágio de floração ocorre de 4 a 6 semanas após o início da floração e depende do clima. A colheita ideal se dá entre 2 e 3 semanas após a maturidade. Após esse período, as plantas se encontram senescidas completamente e apresentando uma coloração marrom das folhas e dos capítulos. A umidade das sementes nessa fase encontra-se com aproximadamente 10% (EMONGOR, 2010).

A semente é um fruto tipo cripsele, que é típico das Asteraceae e semelhante ao

aquênio, mas com a presença de papus (modificação do cálice). O pericarpo (casca) que se adere à semente é rígido e esclerificado, representando entre 20 e 60% do peso seco do fruto (SMITH, 1996). A semente descascada possui 28-38% de óleo e a farinha resultante da moagem dos frutos sem descascar 14-15% de proteína e 32-40% de fibra bruta (LATA; PRAKASH, 1984).

As sementes de cártamo possuem uma quantidade elevada de óleo em sua composição, de ótima qualidade tanto para o consumo humano como para o uso industrial, apresentando valores que variam de 35 a 450% de teor de óleo, dependendo da variedade, e 15 a 20% de proteína (KLAJN *et al.*, 2018).

Essa cultura tem grande importância entre as oleaginosas (sementes) destinadas à produção de biodiesel em nível mundial, sendo antecedida pela soja (*Glycine max* (L.) Merr.), canola (*Brassica napus* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), gergelim (*Sesamum indicum* L.), linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e mamona (*Ricinus communis* L.) – (RAI *et al.*, 2016; FAOSTAT, 2017).

O óleo dessa cultura destaca-se porque produz uma alta concentração de ácido oleico, chegando a 75% (ácido graxo monoinsaturado - AGM) e ácido linoleico, chegando ao teor de 78% (ácido graxo poliinsaturados - AGP), que desempenham papéis importantes ao reduzirem os níveis de colesterol no sangue, melhorando a saúde humana (SHAHROKHANIA; SEPASKHAH, 2016).

Quando comparado os teores de ácido oleico do cártamo com os de outras culturas, como milho, soja, amendoim e azeite, o ácido oleico é significativamente baixo nessas plantas, ficando em torno de apenas 20% (OELKE *et al.*, 2011).

Para manter as propriedades extraordinárias, o óleo das sementes deve ser extraído frio nas prensas do tipo expeller, utilizadas para extrair o óleo das matérias-primas espremendo-as sob alta pressão, em uma única etapa (SEIFI *et al.*, 2010). A preferência é que sempre seja apenas uma prensagem, sem causar o refinamento. O resíduo vegetal que sobra vira subproduto rico em proteínas e fibras, podendo ser usado para produção de farinha, torta e servido como suplemento para bovinos e aves (EMONGOR, 2010; DANIELI *et al.*, 2011).

Na indústria, o óleo oferece grandes potencialidades na confecção de esmaltes, sabões e tintas, principalmente porque a cor transparente do seu óleo, com a propriedade de não amarelar com o tempo, viabiliza sua utilização em tintas brancas e/ou claras (KAFFKA *et al.*, 2000).

Outra utilidade do óleo é na medicina. Estudos já comprovaram que sua utilização como suplementação alimentar teve efeitos positivos no perfil lipídico e no aumento de colesterol bom (HDL), além de uma potente ação antioxidante (CAMPANELLA *et al.* 2014).

De ótima qualidade para diversos fins, suas sementes também são fontes ricas em minerais (Zn, Cu, Mn e Fe), vitaminas (tiamina e  $\beta$ -caroteno) e tocoferóis  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (VELASCO *et al.*, 2005). Além disso, por ser o óleo insípido e incolor, semelhante ao do óleo de girassol, agrega grande valor de mercado (KAFFKA; KEARNEY, 2000).

Pesquisas iniciais indicaram a espécie como alternativa de cultivo na entressafra, especialmente para produção de óleo, visando atender à necessidade para matriz energética do país (SANTOS; SILVA, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2016). O biodiesel, por ser considerado uma alternativa renovável, com capacidade de suprir a necessidade dos combustíveis, é considerada uma fonte de energia limpa, por diminuir a emissão de carbono (CARDOSO *et al.*, 2010).

O Brasil se destaca como um dos países com grande potencial em produção de energia e programas de produção de biocombustíveis (SACHS, 2010). O Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), criado em 2004, e a Lei 11.907, elaborada em 2005, introduziram o biodiesel na matriz energética do país, tanto para o consumo como para a produção (BRASIL, 2005). Seu objetivo foi criar uma cadeia produtora de biodiesel no país e proporcionar apoio à agricultura familiar, sendo esta a principal responsável em oferecer a matéria-prima para a produção, contribuindo para a geração de renda e o desenvolvimento da economia no campo, principalmente em regiões mais carentes (BRASIL, 2005; STACHIW *et al.*, 2016).

Esse incentivo à renda permite a geração de emprego e o desenvolvimento local, e a agricultura familiar têm um importante papel para a cadeia de produção de biodiesel, pois através dela é possível haver uma produção diversificada de sementes oleaginosas, favorecendo todas as regiões do Brasil. Villela *et al.* (2014) afirmam que as oleaginosas podem ser utilizadas para consolidar programas de energia renovável em benefício da agricultura familiar, garantindo emprego e renda para a população no campo.

### **3.2 Melhoramento genético do cártamo e os marcadores moleculares ISSR**

O melhoramento genético do cártamo tem se voltado para o incremento da produtividade de sementes, do óleo, da resistência a doenças e pragas e de outras

características agronômicas, incluindo estresses abióticos (EKIN, 2005).

O cártamo é uma espécie diploide, contendo os cromossomos de  $2n = 24$  (EKIN, 2005). Dajue; Mündel (1996) caracterizaram o cártamo quanto à sua reprodução como uma planta predominantemente autógama, com uma taxa superior a 90% de autofecundação e a fecundação cruzada por polinização entomófila, em que as abelhas são os principais agentes polinizadores. CARVALHO et. al., (2008) dizem que o melhoramento em plantas autógamas visa à obtenção de plantas individuais, sendo a base de seleção o indivíduo, ou seja, cada indivíduo é objeto de avaliação e observação, ao contrário do que se dá em plantas alógamas, cuja ênfase é dada à população.

A hibridação permite a recombinação de caracteres de interesse encontrados em dois ou mais indivíduos e a posterior segregação. Porém, para que se possa gerar uma variedade notável é de extrema importância escolher bem os pais para realizar o cruzamento. Esse tipo de melhoramento conduz as plantas novamente à homozigose, selecionando as melhores plantas em cada geração (SIGH; NIMBKAR, 2006; CARVALHO et. al., 2008).

As cultivares comerciais de cártamo são classificadas em dois grupos, de acordo com seu teor de óleo: o grupo oleico e linoleico. No primeiro grupo, suas sementes são compostas em média de 70% a 75% de ácido graxo, e no segundo grupo as sementes tem em sua constituição 70% de ácido linoleico (GERHARDT, 2014). Três alelos determinam os níveis de ácido linoleico e oleico, com os níveis intermediários sensíveis à temperatura: o teor de linoleico é alto sob temperaturas frias e o teor de oleico é alto sob altas temperaturas (KNOWLES, 1972).

Os novos desafios genéticos do cártamo são: desenvolvimento de variedades sem espinho com alto rendimento e alto teor de óleo, com resistência à murcha, alternaria e pulgões; exploração de heterose através do desenvolvimento de linhas CMS (Cytoplasmic Male Sterile), mantenedor e restaurador e; desenvolvimento de tecnologia de produção de sementes para os híbridos com background GMS (Genetic Male Sterile) – (DAMODARAM, 2006).

Nesse contexto, a utilização de técnicas moleculares via marcadores moleculares em estudos com cártamo é necessária para o melhoramento genético da cultura, pois auxilia na identificação de variabilidade genética e estrutura populacional. Ambas as informações são de fundamental importância para o uso racional da diversidade genética das populações.

Os marcadores moleculares conhecidos como ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é baseado em Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e foram desenvolvidos a partir da necessidade de explorar repetições microssatélites sem a utilização de sequenciamento do DNA, ou seja, não requerem o conhecimento prévio do genoma da espécie-alvo de estudo e, mesmo assim, são eficazes na detecção de polimorfismo e variabilidade genética das plantas (FAJARDO, 2018; PINHEIRO *et al.*, 2017).

Além das informações citadas anteriormente, os marcadores moleculares também permitem a caracterização do germoplasma, construção de mapas genéticos e estima similaridade/dissimilaridade genética entre os indivíduos (BORÉM; CAIXETA, 2016).

A utilização dos marcadores no melhoramento genético de plantas é de grande importância para obtenção mais rápida e eficiente de plantas com características de interesse, pois eles possuem baixos custos, são abundantes no genoma e com alto grau de reprodutibilidade. (NADEEM *et al.*, 2018).

### **3.3. Parâmetros biométricos aplicados ao melhoramento de plantas**

A Estatística, relativamente ao melhoramento genético, é uma ferramenta importante para o estudo das variações fenotípicas, genotípicas e ambientais, que impactam diretamente na seleção de genótipos superiores (PIRES *et al.* 2011). Ou seja, esses parâmetros têm sido fundamentais para consolidar a genética quantitativa e, juntos, subsidiam a tomada de decisão no melhoramento genético.

Algumas pesquisas citam a importância das correlações de dois ou mais caracteres observados. Cruz e Regazzi (1994) destacam que o ambiente se torna uma causa de correlação entre duas características, quando essas são influenciadas pelas mesmas variações nas condições ambientais, ou seja, o ambiente pode favorecer ou prejudicar determinadas características, sendo possível obter informações úteis para os programas de melhoramento.

Nesse contexto, a biometria assume importância no auxílio da seleção genética, permitindo que a triagem seja feita com base no potencial genético dos indivíduos. Atualmente, é possível realizar uma série de análises biométricas ótimas no melhoramento genético, como: divergência genética, correlações genéticas, variabilidade, otimização de seleção via tamanho efetivo populacional, índice de seleção de produtividade, adaptabilidade e estabilidade, entre outros (RESENDE,

2016). Usando corretamente as análises biométricas, viabiliza-se o sucesso dos programas de melhoramento.

## 4. ARTIGO

### 4.1. Artigo - Diversidade genética do cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) visando sua introdução no semiárido e zonas de transição

Este artigo foi elaborado conforme normas do Periódico Genetics and Molecular Biology.

A.L.F. Linhares<sup>1</sup>, C.A. Silveira<sup>2</sup>, F.E.R. Batista<sup>3</sup> e D.A. Sanglard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia, Centro de Pesquisas em Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, Brasil

Autor para correspondência: A.L.F. Linhares

E-mail: andressalayane.florestal@gmail.com

**RESUMO.** O cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) é uma planta originária da África Setentrional, a qual possui elevado potencial produtivo para óleo. Este é utilizado em composições de fármacos, cosméticos, biocombustíveis e resinas. Além do óleo extraído das sementes, a planta pode ser utilizada na alimentação animal, como forragem rica em proteínas e produção de flores ornamentais. Este trabalho objetivou a caracterização molecular e biométrica de genótipos de cártamo, como subsídio ao início de um programa de melhoramento e acessos para consorciamento florestal. Inicialmente, foram amplificados os DNAs de 24 acessos oriundos do Instituto Mato-Grossense do Algodão (IMA-MT), por meio de 45 oligonucleotídeos ISSR (*Inter Simple Sequences Repeats* - UBC set #9). As bandas reveladas nos procedimentos de eletroforese foram codificadas em uma matriz de valores binários (0 e 1), visando identificar os genótipos mais divergentes com base no coeficiente de coincidência simples. Além disso, os acessos foram caracterizados quanto aos caracteres agrônômicos: altura de planta, matéria seca da parte aérea, diâmetro do caule, ramificações primária e secundária, inflorescência, produção de grãos e conteúdo de óleo (*n*-hexano em extrator Soxhlet). Os dados dos caracteres foram submetidos a agrupamento de otimização de Tocher, análise de variância, teste Scott-Knott e correlação linear de Pearson. Também se estimaram herdabilidades ( $H^2$ ), coeficientes de variação ambiental (Cve), genética (Cvg) e relação Cvg/Cve. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia (ICA/UFMG) e em área de campo vinculada. A partir de 40 oligonucleotídeos ISSR, obteve-se a amplificação de 88 bandas polimórficas e 04 monomórficas, o que permitiu selecionar 10 genótipos de maior divergência molecular. As análises biométricas subsequentes geraram os seguintes agrupamentos: G1 ('IMA340', 'IMA211', 'NOVO343' e 'NOVO338'); G2 ('IMA 118', 'IMA 195', 'IMA 133' e 'IMA 73'); G3 ('IMA117') e G4 ('IMA 193'). Os 10 genótipos apresentaram produtividade de grãos e conteúdo de óleos variando de (1.345,04 a 3.029,17 kg.ha<sup>-1</sup>) e (315,03 a 895,83 kg.ha<sup>-1</sup>), respectivamente. As relações CVg/Cve foram maiores que 1,00 para altura de planta (1,03), diâmetro de caule (1,38) e ramificação primária (1,24), o que reforça a predominância dos efeitos genéticos sobre os ambientais para esses caracteres. Além disso, constataram-se correlações positivas do conteúdo de óleo em relação à inflorescência (0,57) e à ramificação primária (0,73); sendo negativa para diâmetro do caule (-0,90). Este trabalho intentou obter híbridos com elevados índices heteróticos e informações úteis aos processos de seleção em populações segregantes.

**Palavras-chave:** Biometria; Dissimilaridade, Marcadores moleculares; Oleaginosa; Pré-melhoramento.



## INTRODUÇÃO

Das oleaginosas exploradas no mundo, nos últimos anos, o cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) tem recebido bastante destaque por seu caráter econômico, versatilidade de propriedades e grande potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel (Abud *et al.*, 2010).

Considerando o crescente interesse por plantas com potencial energético e que também sejam tolerantes aos estresses abióticos dos climas tropicais, o cártamo é uma alternativa viável, principalmente por ser uma espécie que pode ser cultivada no Brasil no período de outono-inverno (Sarto *et al.*, 2018).

O melhoramento de plantas tem o intuito, principalmente, de aumentar a produtividade das plantas. Para que um programa de melhoramento genético de plantas seja bem executado, ele necessita da presença de variabilidade genética entre os indivíduos que serão submetidos à seleção (Ivoglio *et al.*, 2008; Saadaoui *et al.*, 2017).

Nesse sentido, pesquisas com cártamo mostram que há diversidade entre seus genótipos, permitindo assim otimizar o desenvolvimento de material genético em programas de melhoramento de plantas (Pearl e Burke, 2014; Silva *et al.*, 2021), pois, desta maneira, pode-se identificar possíveis genitores ou até mesmo genótipos com características superiores (Silva *et al.*, 2012).

Conhecer as características dos diferentes genótipos de cártamo ajuda os programas de melhoramento a obterem informações básicas sobre a cultura, o que acarreta melhorias nas mesmas (Golkar, 2014). A diversidade genética é expressa na forma de genótipos preservados em bancos de germoplasma e pode ser avaliada por características morfológicas, agronômicas, fisiológicas e moleculares (Boldt, 2014).

Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar a divergência genética, selecionar os genótipos de cártamo e subseqüentes hibridações, no intuito de explorar populações de melhoramento adaptadas ao semiárido e zonas de transição.

## METODOLOGIA

### Material genético

Foram avaliados 24 acessos do Banco Ativo de Germoplasma Norte-Americano WRPIS (*Western Regional Plant Introduction Station*), obtidos por intermédio do IMA-MT (Instituto Mato-Grossense do Algodão), os quais foram remetidos ao Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, *campus* Montes Claros - MG (Tabela 1), para estudos de diversidade genética, com o auxílio de 45 oligonucleotídeos ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*).

**Tabela 1.** Material genético (acessos) de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) utilizado nos estudos de diversidade genética molecular (dissimilaridades).

Nº	Código do acesso <sup>a</sup>	Código do acesso <sup>b</sup>	País de origem
1	IMA 13	PI 183890	Etiópia
2	IMA 22	PI 186346	Índia
3	IMA 46	PI 195743	Etiópia
4	IMA 73	PI 199909	Índia
5	IMA 117	PI 209289	Desconhecido
6	IMA 118	PI 209290	Egito
7	IMA 124	PI 210456	Etiópia
8	IMA 129	PI 211700	Etiópia
9	IMA 133	PI 212979	Índia
10	IMA 164	PI 237880	Etiópia
11	IMA 193	PI 248375	Índia
12	IMA 195	PI 248378	Índia
13	IMA 209	PI 248416	Paquistão
14	IMA 211	PI 248628	Paquistão
15	IMA 217	PI 248995	Etiópia
16	IMA 287	PI 249008	Paquistão
17	IMA 312	PI 249122	Etiópia
18	IMA 338	PI 249709	México
19	IMA 340	PI 250200	Paquistão
20	NOVO 202	PI 250062	México
21	NOVO 213	PI 250073	Argentina
22	NOVO 338	PI 250198	Paquistão
23	NOVO 343	PI 250203	Paquistão
24	NOVO 356	PI 251712	Paquistão

<sup>a</sup>Código utilizado pelo IMA (Instituto Mato-Grossense do Algodão), Brasil; <sup>b</sup>Código utilizado pelo WRPIS (*Western Regional Plant Introduction Station*), Estados Unidos da América. Fonte: elaborada pela autora, 2022.

## Extrações de DNA

As extrações de DNA seguiram os procedimentos recomendados por Doyle e Doyle (1990). Fragmentos de folhas de cártamo de cada um dos 24 acessos tirados foram macerados em microtubos de 1,5 mL, com o auxílio de um disruptor / homogeneizador de amostras biológicas (Equipamento da marca Dremel, modelo 4000), sob capela de exaustão de gases.

Durante o procedimento de maceração, em cada microtubo, houve a adição de 750 µL do tampão de extração [PVP 2% (m/v); Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; β-mercaptoetanol 0,2 % (v/v) e CTAB 2% (m/v)]. Em seguida, os microtubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 45 minutos e, depois disso, adicionaram-se neles 750 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1).

Em seguida, para melhor efetividade do clorofórmio, foram efetuadas inversões suaves durante cinco minutos, sendo os microtubos centrifugados por 8 minutos (10.000 x g) – (Equipamento da marca Hettich Zentrifugen, modelo Mikro 120). Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, com a adição de 600 µL de isopropanol gelado, ficando em repouso durante 12 horas sob refrigeração (4°C).

Após esse período, foram centrifugados novamente por 8 minutos (10.000 x g), de modo a formar pellets, sendo o isopropanol (sobrenadante) descartado. Então, foram executadas as lavagens dos pellets com 300 µL de etanol PA (70%), durante três repetições.

Após o descarte do etanol na terceira lavagem, os pellets foram ressuspensos com 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0), contendo Ribonuclease A e Proteinase K, ambas na concentração de 40 ug/mL.

As ressuspensões ocorreram por incubação em banho-maria a 37°C, durante 45 minutos. Após isso, foram acrescentados, a cada microtubo, 30 µL de NaCl 5M e 220 µL de isopropanol, mantendo-os refrigerados (4°C) por outras 12 horas. Após esse período, foi realizada uma nova centrifugação por 8 minutos (10.000 x g), para a precipitação de pellets.

Novamente, procedeu-se às lavagens dos pellets com 300 µL de etanol PA (70%),

durante três repetições. Após o descarte do etanol na terceira lavagem, os pellets foram ressuspensos, em definitivo, com 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0).

As concentrações de DNA das amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Equipamento da marca TECAN, modelo Infinite M Plex), por leitura da absorbância a 260 nm, sendo cada unidade de absorbância correspondente à concentração de 50 ng/mL de DNA fita dupla (Sambrook *et al.*, 1989).

### Testes de gradientes de temperaturas de anelamento

Antes das execuções das amplificações propriamente, foram realizados testes de gradientes de temperaturas de anelamento, por meio de termocicladores com esse recurso (Equipamentos da marca Eppendorf, modelo Nexus Gradient). As máquinas foram configuradas para o espectro de 45°C a 65°C, sendo utilizados DNAs de dois indivíduos aleatórios da população de acessos triados.

### Condições de amplificação

Foram utilizados 45 oligonucleotídeos ISSR nos procedimentos de amplificações dos acessos, cujas condições estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições de amplificação via PCR para oligonucleotídeos ISSR, envolvendo 24 acessos de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.).

Reagentes	Concentrações estoque	Concentrações finais	Volumes por reação
H <sub>2</sub> O ultrapura	-	-	12,4 uL
MgCl <sub>2</sub>	20,0 Mm	2,8 Mm	3,5 uL
Tris / KCl pH 8,3	100 mM / 500 mM	10 mM / 50 mM	2,5 uL
d'NTP (A, T, C, G)	2,5 mM (cada)	0,1 mM (cada)	1,0 uL
<i>Primer</i> ISSR	4,0 uM	0,4 uM	2,5 uL
<i>Taq</i> polymerase	1,0 un/uL	1,0 uM	0,1 uL
DNA	10 ng/uL	30 ng	3,0 uL
Total			25,0 uL

Fonte: elaborada pela autora, 2022.

As reações foram programadas em uma fase inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos; seguida por 35 ciclos de [desnaturação (94°C / 1 minuto), anelamento (46°C a 59°C / 1 minuto) e extensão (72°C / 2 minutos)]; e uma fase de extensão final de 72°C por 7 minutos.

Logo após essas ciclagens, o aparelho conservou as reações a 4°C, até a retirada das amostras.

Os oligonucleotídeos ISSR utilizados para as amplificações compõem uma coleção da UBC

(*University of British Columbia, Canada*) – (Tabela 3).

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC primer set #9, Vancouver, Canada).

Nº UBC	Sequência <i>primer</i> (5' → 3')	Nº UBC	Sequência <i>primer</i> (5' → 3')
801	ATA TAT ATA TAT ATA TT	851	GTG TGT GTG TGT GTG TYG
802	ATA TAT ATA TAT ATA TG	852	TCT CTC TCT CTC TCT CRA
803	ATA TAT ATA TAT ATA TC	853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT
804	TAT ATA TAT ATA TAT AA	854	TCT CTC TCT CTC TCT CRG
805	TAT ATA TAT ATA TAT AC	855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
806	TAT ATA TAT ATA TAT AG	856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	858	TGT GTG TGT GTG TGT GRT
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA
811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	861	ACC ACC ACC ACC ACC ACC
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	862	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	863	AGT AGT AGT AGT AGT AGT
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	865	CCG CCG CCG CCG CCG CCG
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	867	GGC GGC GGC GGC GGC GGC
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	869	GTT GTT GTT GTT GTT GTT
820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	870	TGC TGC TGC TGC TGC TGC
821	GTG TGT GTG TGT GTG TT	871	TAT TAT TAT TAT TAT TAT
822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	872	GAT AGA TAG ATA GAT A
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	873	GAC AGA CAG ACA GAC A
824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	874	CCC TCC CTC CCT CCC T
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	875	CTA GCT AGC TAG CTA G
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	876	GAT AGA TAG ACA GAC A
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	877	TGC ATG CAT GCA TGC A
828	TGT GTG TGT GTG TGT GA	878	GGA TGG ATG GAT GGA T
829	TGT GTG TGT GTG TGT GC	879	CTT CAC TTC ACT TCA
830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	880	GGA GAG GAG AGG AGA
831	ATA TAT ATA TAT ATA TYA	881	GGG TGG GGT GGG GTG
832	ATA TAT ATA TAT ATA TYC	882	VBV ATA TAT ATA TAT AT
833	ATA TAT ATA TAT ATA TYG	883	BVB TAT ATA TAT ATA TA
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	884	HBH AGA GAG AGA GAG AG

835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	885	BHB GAG AGA GAG AGA GA
836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	886	VDV CTC TCT CTC TCT CT
837	TAT ATA TAT ATA TAT ART	887	DVD TCT CTC TCT CTC TC
838	TAT ATA TAT ATA TAT ARC	888	BDB CAC ACA CAC ACA CA
839	TAT ATA TAT ATA TAT ARG	889	DBD ACA CAC ACA CAC AC
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	890	VHV GTG TGT GTG TGT GT
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	891	HVH TGT GTG TGT GTG TG
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	892	TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C
843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	893	NNN NNN NNN NNN NNN
844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	894	TGG TAG CTC TTG ATC ANN NNN
845	CTC TCT CTC TCT CTC TRG	895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC
846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	896	AGG TCG CGG CCG CNN NNN NAT G
847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	897	CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G
848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	898	GAT CAA GCT TNN NNN NAT GTG G
849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA	899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC A
850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	900	ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T). Fonte: elaborada pela autora, 2022.

### Eletoforese e fotodocumentação

Os produtos resultantes das ampliações foram separados por eletroforese horizontal com géis de agarose 1,2% (m/v), imersos em tampão TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1 mM), seguindo procedimentos adaptados de Sambrook *et al.* (1989). No momento da aplicação, foram adicionados, a cada amostra, 3 µL do corante tipo IV [0,125% (m/v) de azul-de-bromofenol e 10% (m/v) de sacarose] e 5 µL de GelRed™. Os géis foram submetidos a uma carga de 120 V, por 3 horas. Findadas as eletroforeses, os géis foram analisados por meio de um sistema de fotodocumentação (Equipamento da marca Locus Biotecnologia, modelo L-PIX).

### Biometria de dados moleculares

Os dados foram analisados por meio de matrizes de dados binários, considerando-se a presença (1) e a ausência (0) de bandas aferidas durante as fotodocumentações. Os coeficientes para os cálculos de dissimilaridades genéticas foram o complemento aritmético do índice de "Nei e Li" ( $S_{NL}$ ) =  $[2a / (2a + b + c)]$ , "Jaccard" ( $S_j$ ) =  $[a / (a + b + c)]$  e "Coincidência Simples" ( $S_{CS}$ )

=  $[(a + d) / (a + b + c + d)]$ ; tal que "a" = número de coincidências do tipo (1)-(1) para cada par de acessos; "b" = número de discordâncias do tipo (1)-(0) para cada par de acessos; "c" = número de discordâncias do tipo (0)-(1) para cada par de acessos; "d" = número de coincidências do tipo (0)-(0) para cada par de acessos.

Concomitantemente, procedeu-se à análise de agrupamento pelo "Método Hierárquico" [Ligação média entre grupos (UPGMA)] e "Otimização de Tocher", com estruturação em dendrograma e dispersão gráfica, tendo como base a matriz de dissimilaridade gerada no índice de "Nei e Li" (Cruz *et al.*, 2013). No UPGMA, a distribuição dos indivíduos no dendrograma não segue um critério de formação de grupos, uma vez que o principal aspecto deste método consiste nas ramificações que são obtidas. Os indivíduos são agrupados aos pares, utilizando-se médias aritméticas da dissimilaridade. A matriz de distâncias geradas pelo coeficiente aritmético do índice de "Nei e Li" também foi utilizada para o agrupamento dos genótipos pelo método de otimização de Tocher. Adicionalmente, efetuou-se o cálculo do coeficiente de correlação cofenético para ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado.

A diversidade genética dos locos foi estimada com base em H (*Heterozygosity*) estimado por  $2pq$  e no PIC (*Polymorphism Information Content*), que é uma estimativa utilizada para a avaliação do poder discriminatório de um loco. A informatividade do loco  $p_i$  é a frequência do alelo  $p$  no loco  $p_i$ , calculado pela equação:  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ ; e a informatividade do *primer*  $p_{ij}$  é a frequência do alelo  $p$  do loco  $i$ , no oligonucleotídeo  $j$ , sendo calculada por  $PIC_{oligo} = 1 - \sum p_i^2 - \sum p_i^2 p_j^2$  (Rezende *et al.*, 2009). Todas as análises foram executadas com o auxílio do programa computacional GENES (Cruz, 2013).

### **Análises de caracteres morfoagronômicos**

Foram avaliados caracteres morfoagronômicos de dez acessos selecionados a partir dos dados de dissimilaridades em nível molecular. O experimento foi conduzido no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, sob condições de ambiente

protegido (telado).

Importantes características morfológicas foram mensuradas: (i) altura da planta – medições da distância vertical entre a superfície do solo ao ápice das plantas, com auxílio de régua graduada; (ii) massa seca da parte aérea – através da secagem; (iii) diâmetro do caule – medições a uma altura de 2 cm da superfície do solo, utilizando um paquímetro digital; (iv) número de ramificações primárias e secundárias – por contagem direta; (v) florescência – número de capítulos – contagem direta após 112 dias do plantio; (vi) produção de grãos – pesagens corrigidas para 10% de umidade; (vii) produção de óleo – obtida pela multiplicação do teor de óleo pela produtividade de sementes.

Os substratos foram preparados em proporções de 3:1 (solo: esterco curtido) e alocados em vasos de polietileno com capacidade de 14L. Utilizou-se solo classificado como Latossolo-Vermelho-Amarelo distrófico (Santos *et al.*, 2013). Durante o ciclo de produção, lâminas de água foram aplicadas diariamente, até atingir-se a capacidade de campo do solo. O controle de plantas daninhas foi realizado manualmente, mantendo-se três plantas por vasos de 12 L.

Realizou-se um corte de modo a separar os capítulos do restante da planta, para medição das variáveis de matéria seca, produção de sementes e teor de extrato etéreo.

Os colmos, juntamente com as partes aéreas das plantas, foram colocados em estufa de circulação de ar forçado por 72 horas a 65°C, para obtenção da matéria seca. As sementes dos capítulos foram extraídas manualmente, com subsequente pesagem em balança de precisão e quantificação da produção de grãos. A quantificação do extrato constituiu-se de fluxo de arraste com o reagente éter em um destilador. Após a extração, as amostras foram encaminhadas para um forno mufla, com objetivo de evaporar o éter (Detmann *et al.*, 2012).

### **Biometria de dados morfoagronômicos**

O delineamento experimental empregado foi em blocos casualizados, com dez tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e às médias



agrupadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os caracteres avaliados foram submetidos à correlação linear de Pearson. Utilizando-se os componentes de variância, obtiveram-se as estimativas de herdabilidade ( $H^2$ ) e os coeficientes de variação ambiental (Cve) e genética (Cvg), além da relação Cvg/Cve.

Para a aplicação do método de agrupamento de Otimização de Tocher 5%, citado por Rao (1952), foi utilizada a distância generalizada de Mahalanobis (V1 e V2) com medida de dissimilaridade. O dendrograma ilustrativo do padrão de dissimilaridade obtido pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) também foi utilizado no estudo da diversidade genética entre os híbridos, permitindo avaliar melhor a divergência e confrontando os resultados obtidos por diferentes metodologias de análise uni e multivariada. Todas as análises foram executadas com o auxílio do programa computacional GENES (Cruz, 2013).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análises moleculares

De acordo com a Tabela 4, todas as amostras de DNA alcançaram concentrações acima de 10 ng/uL, valor recomendado de padronização visando a ampliações com oligonucleotídeos ISSR (Gordwin *et al.*, 1997).

**Tabela 4.** Resultados de quantificações de DNAs de acessos de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) por espectrofotometria.

Nº	Código do acesso	A260 <sub>nm</sub>	A280 <sub>nm</sub>	A260 <sub>nm</sub> / A280 <sub>nm</sub>	[DNA] (ng/uL)	DNA (uL)*	TE (uL)*
1	IMA 13	0,0635	0,0321	1,98	37,7	80,0	220,0
2	IMA 22	0,0552	0,0245	2,25	43,2	70,0	230,0
3	IMA 46	0,1212	0,0799	1,52	63,5	48,0	252,0
4	IMA 73	0,0417	0,0206	2,02	21,2	142,0	158,0
5	IMA 117	0,0700	0,0366	1,91	50,0	60,0	240,0
6	IMA 118	0,0414	0,0287	2,48	46,4	64,0	236,0
7	IMA 124	0,0414	0,0287	1,44	39,4	77,0	223,0

8	IMA 129	0,0394	0,0237	1,66	36,1	84,0	216,0
9	IMA 133	0,0273	0,0144	1,89	18,9	159,0	141,0
10	IMA 164	0,1223	0,0629	1,94	199,4	25,0	275,0
11	IMA 193	0,0482	0,0248	1,94	171,2	18,0	282,0
12	IMA 195	0,0189	0,0104	1,82	55,2	55,0	245,0
13	IMA 209	0,0488	0,0425	1,15	80,4	38,0	262,0
14	IMA 211	0,0273	0,0144	1,89	18,9	159,0	141,0
15	IMA 217	0,1223	0,0629	1,94	199,4	25,0	275,0
16	IMA 287	0,0700	0,0366	1,91	50,0	60,0	240,0
17	IMA 312	0,0414	0,0287	2,48	46,4	64,0	236,0
18	IMA 338	0,0414	0,0287	1,44	39,4	77,0	223,0
19	IMA 340	0,0394	0,0237	1,66	36,1	84,0	216,0
20	NOVO 202	0,0508	0,0244	2,48	44,7	68,0	232,0
21	NOVO 213	0,1361	0,0855	1,59	166,3	19,0	281,0
22	NOVO 338	0,0769	0,0407	1,89	83,3	37,0	263,0
23	NOVO 343	0,1447	0,0729	1,98	107,8	28,0	272,0
24	NOVO 356	0,0406	0,0227	1,79	122,3	15,0	285,0

TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0); \*Volumes em diluições compatíveis à preparação de 300 uL de DNA (10 ng/uL). Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Após a amplificação dos DNAs, ocorreu o teste de temperaturas de gradiente intervaladas entre 45°C e 65°C, conforme recurso de randomização do próprio aparelho termociclador (Eppendorf, Nexus Gradient). Durante a execução das análises moleculares, foram testados 45 oligonucleotídeos ISSR, cujos resultados são apresentados na Tabela 5. Desse total, 23 caracterizam-se como sendo amplamente polimórficos sob as temperaturas de anelamento específicas apontadas nesse procedimento.

**Tabela 5.** Resultados dos testes de gradiente de temperaturas de anelamento, envolvendo DNAs de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) testados com oligonucleotídeos ISSR.

Nº	Oligonucleotídeos ISSR (5' → 3')	Temperaturas de anelamento [Ta (°C)]
1	UBC 803 (ATA TAT ATA TAT ATA TC)	Não amplifica na espécie
2	UBC 805 (TAT ATA TAT ATA TAT AC)	Não amplifica na espécie
3	UBC 807 (AGA GAG AGA GAG AGA GT)	54°C
4	UBC 808 (AGA GAG AGA GAG AGA GC)	47°C
5	UBC 810 (GAG AGA GAG AGA GAG AT)	47°C
6	UBC 812 (GAG AGA GAG AGA GAG AA)	47°C

7	UBC 814 (CTC TCT CTC TCT CTC TA)	Monomórfico
8	UBC 820 (GTG TGT GTG TGT GTG TC)	46°C
9	UBC 821 (GTG TGT GTG TGT GTG TT)	Monomórfico
10	UBC 823 (TCT CTC TCT CTC TCT CC)	46°C
11	UBC 825 (ACA CAC ACA CAC ACA CT)	46°C
12	UBC 827 (ACA CAC ACA CAC ACA CG)	52°C
13	UBC 828 (TGT GTG TGT GTG TGT GA)	46°C
14	UBC 830 (TGT GTG TGT GTG TGT GG)	54°C
15	UBC 832 (ATA TAT ATA TAT ATA TYC)	Monomórfico
16	UBC 836 (AGA GAG AGA GAG AGA GYA)	46°C
17	UBC 838 (TAT ATA TAT ATA TAT ARC)	Não amplifica na espécie
18	UBC 842 (GAG AGA GAG AGA GAG AYG)	56°C
19	UBC 843 (CTC TCT CTC TCT CTC TRA)	Não amplifica na espécie
20	UBC 844 (CTC TCT CTC TCT CTC TRC)	Não amplifica na espécie
21	UBC 847 (CAC ACA CAC ACA CAC ARC)	48°C
22	UBC 848 (CAC ACA CAC ACA CAC ARG)	46°C
23	UBC 849 (GTG TGT GTG TGT GTG TYA)	46°C
24	UBC 850 (GTG TGT GTG TGT GTG TYC)	46°C
25	UBC 853 TCT CTC TCT CTC TCT CRT)	Monomórfico
26	UBC 855 (ACA CAC ACA CAC ACA CYT)	48°C
27	UBC 856 (ACA CAC ACA CAC ACA CYA)	56°C
28	UBC 863 (AGT AGT AGT AGT AGT AGT)	Não amplifica na espécie
29	UBC 866 (CTC CTC CTC CTC CTC CTC)	56°C
30	UBC 867 (GGC GGC GGC GGC GGC GGC)	59°C
31	UBC 870 (TGC TGC TGC TGC TGC TGC)	Não amplifica na espécie
32	UBC 876 (GAT AGA TAG ACA GAC A)	48°C
33	UBC 877 (TGC ATG CAT GCA TGC A)	Monomórfico
34	UBC 879 (CTT CAC TTC ACT TCA)	Monomórfico
35	UBC 883 (BVB TAT ATA TAT ATA TA)	Não amplifica na espécie
36	UBC 884 (HBH AGA GAG AGA GAG AG)	46°C
37	UBC 886 (VDV CTC TCT CTC TCT CT)	51°C
38	UBC 888 (BDB CAC ACA CAC ACA CA)	Monomórfico
39	UBC 889 (DBD ACA CAC ACA CAC AC)	Monomórfico
40	UBC 891 (HVH TGT GTG TGT GTG TG)	Monomórfico
41	UBC 892 (TAG ATC TGA TAT CTG AAT TCC C)	Não amplifica na espécie
42	UBC 895 (AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC)	Não amplifica na espécie
43	UBC 896 (AGG TCG CGG CCG CNN NNN NAT G)	Monomórfico
44	UBC 897 (CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G)	Não amplifica na espécie
45	UBC 900 (ACT TCC CCA CAG GTT AAC ACA)	Não amplifica na espécie

N = (A, G, C, T); R = (A, G); Y = (C, T); B = (C, G, T) (I. e. not A); D = (A, G, T) (I. e. not C); H = (A, C, T) (I. e. not G); V = (A, C, G) (I. e. not T). Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Os 23 oligonucleotídeos ISSR selecionados nos testes de gradiente foram utilizados na análise de diversidade genética, envolvendo os 24 acessos de Cártamo triados. As reações efetuadas com esses iniciadores proporcionaram 92 fragmentos amplificados, dos quais 88 foram polimórficos (95,65%) e apenas quatro monomórficos (4,35%) – (Tabela 6). Essa informação

sugere alta variabilidade para a espécie que, sendo uma planta, remonta sua origem na magnitude de milhões de anos atrás (Misof *et al.*, 2014). Por conseguinte, quanto mais uma espécie persiste no tempo, maior a expectativa de acúmulo de mutações em seus genomas (Ridley, 2006).

**Tabela 6.** Resultados das ampliações via PCR envolvendo 24 acessos de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) amplificados com 23 oligonucleotídeos ISSR.

Oligonucleotídeos ISSR	TF	FM	FP	H <sub>oligo</sub>	PIC <sub>oligo</sub>
UBC 807 (AGA GAG AGA GAG AGA GT)	4	0	4	0,3985	0,3174
UBC 808 (AGA GAG AGA GAG AGA GC)	2	0	2	0,4065	0,3210
UBC 810 (GAG AGA GAG AGA GAG AT)	3	0	3	0,3407	0,2772
UBC 812 (GAG AGA GAG AGA GAG AA)	4	0	4	0,3420	0,2731
UBC 820 (GTG TGT GTG TGT GTG TC)	4	0	4	0,2321	0,1939
UBC 823 (TCT CTC TCT CTC TCT CC)	5	0	5	0,4553	0,3505
UBC 825 (ACA CAC ACA CAC ACA CT)	4	0	4	0,3574	0,2872
UBC 827 (ACA CAC ACA CAC ACA CG)	4	0	4	0,2563	0,2194
UBC 828 (TGT GTG TGT GTG TGT GA)	5	0	5	0,3942	0,3101
UBC 830 (TGT GTG TGT GTG TGT GG)	5	3	2	0,1674	0,1314
UBC 836 (AGA GAG AGA GAG AGA GYA)	5	0	5	0,2696	0,2259
UBC 842 (GAG AGA GAG AGA GAG AYG)	3	0	3	0,3783	0,3016
UBC 847 (CAC ACA CAC ACA CAC ARC)	5	0	5	0,3893	0,3090
UBC 848 (CAC ACA CAC ACA CAC ARG)	3	0	3	0,3179	0,2615
UBC 849 (GTG TGT GTG TGT GTG TYA)	5	0	5	0,3030	0,2457
UBC 850 (GTG TGT GTG TGT GTG TYC)	6	0	6	0,2328	0,2038
UBC 855 (ACA CAC ACA CAC ACA CYT)	3	0	3	0,4466	0,3466
UBC 856 (ACA CAC ACA CAC ACA CYA)	5	0	5	0,3039	0,2554
UBC 866 (CTC CTC CTC CTC CTC CTC)	5	0	5	0,3028	0,2447
UBC 867 (GGC GGC GGC GGC GGC GGC)	2	0	2	0,3963	0,3132
UBC 876 (GAT AGA TAG ACA GAC A)	4	0	4	0,4640	0,3554
UBC 884 (HBH AGA GAG AGA GAG AG)	3	0	3	0,3795	0,3075
UBC 886 (VDV CTC TCT CTC TCT CT)	3	1	2	0,2809	0,2205
Totais	92	4	88	-	-
Médias	4,000	0,1739	3,8260	0,3397	0,2770

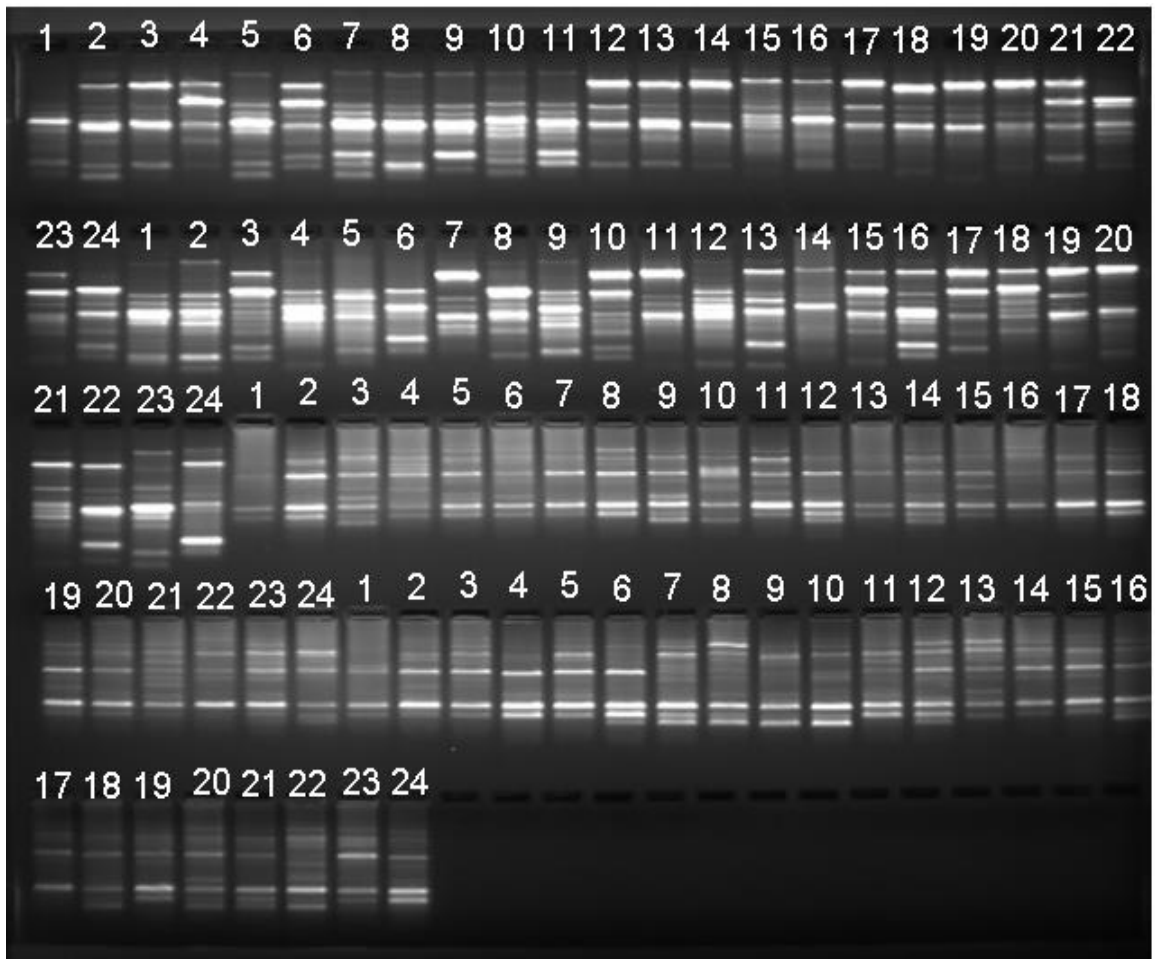
TF: Total de Fragmentos; FM: Fragmentos Monomórficos; Fragmentos Polimórficos; H<sub>oligo</sub>: Heterozigiosidade dos oligonucleotídeos; PIC<sub>oligo</sub>: Conteúdo de Informação Polimórfica (*Polymorphism Information Content*) dos oligonucleotídeos. Fonte: elaborada pela autora, 2022.

Ainda considerando os dados da Tabela 6, verifica-se que o número de fragmentos utilizados variou de dois (UBC 808, UBC 830, UBC 867 e UBC 886) a seis (UBC 850), sendo que, do total de 23 oligonucleotídeos, 14 geraram pelo menos quatro fragmentos (60,8%).

Embora UBC 850 tenha gerado maior número de fragmentos, seu  $PIC_{oligo}$  foi relativamente baixo, ou seja, esse valor é muito alto se considerarmos a população. É preciso levar em conta a frequência dos alelos analisados. O valor de  $PIC_{oligo}$  é uma medida importante, pois fornece uma estimativa do poder discriminatório do marcador, por considerar não somente o número de alelos por loco, mas também a frequência relativa desses alelos (Jiao *et al.*, 2010).

De maneira geral, os valores de  $PIC_{oligo}$  são inferiores aos obtidos para  $H_{oligo}$ . Neste estudo, a média de fragmentos polimórficos de cada oligonucleotídeo foi de 3,8260. Comparada a outros trabalhos sobre diversidade com a mesma coleção de oligonucleotídeos desenvolvidos pela *University of British Columbia* (UBC primer set #9, Vancouver, Canada) – (Souza *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2015), tem-se que a média deste foi relativamente inferior. Uma possível explicação seria o fato de este estudo contabilizar apenas os fragmentos com excelente nitidez e separação vertical nos géis, conforme ilustrado na Figura 2. Outra questão refere-se à natureza dos marcadores moleculares ISSR, os quais são classificados como dominantes. Embora não realizem a discriminação multialélica, foram pertinentes para o atendimento do objetivo principal acerca das estimativas de dissimilaridades, uma vez que não demandam conhecimento prévio do genoma ao qual sejam aplicados (Jiao *et al.*, 2010). Além disso, ao aplicar-se 23 oligonucleotídeos, vislumbrava-se um número expressivo como modo de compensação aos potenciais discriminantes de marcadores co-dominantes (Nadeem *et al.*, 2018).

**Figura 2.** Amplificação dos genomas de 24 acessos de Cártamo. As sequências ordinais (1 a 24) referem-se às eletroforeses de ampliações com oligonucleotídeos ISSR UBC 850, 849, 848 e 825, respectivamente. Cada uma das amostras continha 25 uL de mix-PCR, 5 uL de GelRed™ e 3 uL de corante tipo IV, submetida a uma eletroforese em gel de agarose 1,2% (m/v), durante 3 h.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

De posse dos resultados das ampliações, foram geradas, pelos coeficientes de dissimilaridade dos índices de "Nei e Li", "Jaccard" e "Coincidência Simples", as matrizes de distâncias genéticas. Na Tabela 7, observam-se comparações entre os índices, considerando os acessos mais e menos divergentes, levando em conta as porcentagens relativas.

Em contraste com o índice de "Coincidência Simples", os índices de "Nei e Li" e "Jaccard" apresentam a vantagem de não considerarem coincidências do tipo (0)-(0), que, por sua vez, não significam necessariamente alelos recessivos idênticos. Caso haja alta probabilidade de não amplificação de bandas em pares de acessos, tal situação não deve ser interpretada como uma característica comum, ou seja, não implicam regiões do DNA idênticas, sendo mais adequado aplicar coeficientes que excluem a coocorrência negativa (Nadeem *et al.*, 2018).

No entanto, não se devem descartar as medidas de similaridade que levam em consideração a concordância negativa, pois em determinadas situações, como é caso de

populações controladas  $F_2$ , a ausência da marca pode ser tratada como um fator de similaridade entre acessos a serem comparados (Nadeem *et al.*, 2018).

No caso deste estudo, os acessos de cártamo foram obtidos de banco de germoplasma, o que remete ao caráter de amostragem semelhante ao de populações exogâmicas obtida livremente na natureza. Alguns trabalhos têm comparado a eficiência dos coeficientes de similaridade em expressar o grau de divergência genética (Faria *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2015). De modo geral, quase sempre o número de grupos formados altera conforme o índice utilizado, e aqueles que consideram a coocorrência negativa (0-0) produzem resultados bastante discrepantes dos demais, o que também foi notado quanto aos apontamentos dos acessos na Tabela 7.

Portanto, o índice de "Coincidência Simples" não seria o mais pertinente para estimar a divergência genética neste trabalho. Tem sido consenso a ideia de que, ao se trabalhar com materiais exóticos ou envolvendo espécies diferenciadas, a princípio pouco relacionadas, o adequado seria adotar o índice de "Nei e Li", o qual pondera em duas vezes os valores de coincidências do tipo (1)-(1) para cada par de acessos (Mir *et al.*, 2021).

Contudo, se o estudo for feito dentro de uma população, ou mesmo, espécie, em que coincidências de ocorrência de bandas podem ser admitidas como um fenômeno esperado, seria plausível optar pelo índice de "Jaccard". Neste estudo de diversidade envolvendo Cártamo, todas as análises subsequentes embasaram-se no índice de "Nei e Li".

**Tabela 7.** Comparações sobre os acessos mais e menos divergentes, considerando-se 92 fragmentos (locos) amplificados em 24 acessos de cártamo, a partir de 23 oligonucleotídeos ISSR.

Comparações	Índices de dissimilaridade		
	Nei e Li	Jaccard	Coincidência Simples
Mais dissimilares	Acessos 7 e 23 (30 %)	Acessos 7 e 21 (27 %)	Acessos 7 e 23 (28 %)
Menos dissimilares	Acessos 2 e 3 (8 %)	Acessos 3 e 6 (10 %)	Acessos 2 e 3 (12 %)

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Na matriz de dissimilaridade gerada pelo complemento aritmético do índice de "Nei e Li"

(Tabela 8), observam-se os valores de dissimilaridade entre os 24 acessos de cártamo. Considerando as divergências entre pares de acessos, 35 apresentaram valores superiores a 20% (Tabela 8).

A diferenciação genética observada neste trabalho está condizente com a maioria dos estudos de diversidade, sejam eles envolvendo animais, plantas ou microorganismos; executados com a mesma coleção de oligonucleotídeos da *University of British Columbia* (UBC primer set #9, Vancouver, Canada) – (Souza *et al.*, 2008; Vieira *et al.*; 2015).

Considerando a ploidia da espécie Cártamo ( $2n = 24$ ), a qual possui nº básico  $X = 12$  Ekin (2005), tem-se uma média de 7,67 locos amostrados por cromossomo, levando-se em conta os 92 fragmentos utilizados na geração da matriz. A partir dos dados moleculares, foram realizadas hibridações entre os acessos que resultaram nas dez maiores porcentagens de dissimilaridades entre si (Tabela 8).

**Tabela 8.** Matriz de dissimilaridade (%) – complemento aritmético do índice de "Nei e Li" – entre 24 acessos de cártamo, estimada em base em 92 fragmentos (locos), a partir de 23 oligonucleotídeos ISSR.

Nº do acesso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1	0																								
2	18	0																							
3	19	08	0																						
4	12	12	14	0																					
5	13	14	17	14	0																				
6	23	09	19	17	15	0																			
7	15	21	15	19	15	17	0																		
8	19	11	11	15	19	19	15	0																	
9	18	19	23	11	24	18	17	10	0																
10	11	22	12	23	22	11	18	16	11	0															
11	19	14	12	12	23	19	18	19	28	16	0														
12	10	17	13	12	18	10	10	17	27	15	17	0													
13	11	19	11	16	12	11	21	12	10	18	13	11	0												
14	10	17	16	16	21	10	11	23	28	22	12	19	17	0											
15	12	11	18	17	13	12	17	14	18	15	12	12	12	15	0										
16	16	23	17	16	23	13	14	18	10	10	13	13	12	13	10	0									
17	16	12	13	14	15	16	19	17	24	10	23	17	19	16	13	22	0								
18	15	12	11	16	19	18	19	16	10	16	17	16	16	10	14	11	21	0							



19	17	11	11	12	18	11	17	11	28	12	18	11	17	11	11	12	18	11	0					
20	16	11	12	12	11	19	11	19	18	11	23	11	24	18	19	10	16	20	18	0				
21	14	13	11	16	19	10	11	13	18	19	14	12	12	13	19	18	19	18	16	19	0			
22	16	16	19	25	21	30	12	11	10	13	10	15	19	15	11	18	17	14	15	11	20	0		
23	12	12	18	17	28	10	18	11	17	14	13	11	16	19	10	11	13	18	14	13	11	26	0	
24	12	19	23	16	13	12	11	19	18	18	21	23	11	24	18	18	15	13	11	14	18	18	15	0

Números grifados referem-se a combinações (pares) de acessos mais divergentes entre si (menos similares). Fonte: elaborada pela autora, 2022.

### Caracteres morfoagronômicos

No prosseguimento do trabalho, conduziram-se diversas análises de caracteres morfológicos e produtivos, com base nos genitores dos inter cruzamentos obtidos. A Tabela 9 apresenta a análise estatística das variáveis afeitas aos dez híbridos estudados.

Constatou-se que altura de planta, diâmetro do caule, ramificação primária, produção de grãos e teor de óleo apresentaram diferenças significativas. Já as variáveis matéria seca da parte aérea, ramificação secundária e unidade de inflorescência não apresentaram diferenças significativas. O local de origem pode ser um dos fatores que contribuem para as diferenças, como relatado por Istanbuluoglu *et al.* (2009), em que a altura de planta, o período de florescimento, a susceptibilidade à doenças e a coloração da inflorescência são fortemente influenciados pelo local de origem dos genótipos de cártamo.

**Tabela 9.** Teste Scott-Knott para o agrupamento de médias ao nível de 5% de significância e estimativas de parâmetros genéticos para oito caracteres avaliados em dez acessos de cártamo.

Acessos	ALT (cm)**	MSPA (g) <sup>ns</sup>	DIAM (mm)**	RAM1 (un.)**	RAM2 (un.) <sup>ns</sup>	FLOR (un.) <sup>ns</sup>	P. grãos (Kg ha <sup>-1</sup> )**	P. óleo (Kg ha <sup>-1</sup> )**
IMA 73	71,13 b	14,19	7,14 b	9,27 a	8,57 a	13,10	3.084,70 a	895,83 a
IMA 117	74,87 b	17,74	7,41 b	5,87 c	4,57 a	9,20	2.477,81 a	654,13 a
IMA 118	77,80 b	15,55	6,90 b	7,60 b	5,30 a	10,87	2.954,83 a	823,80 a
IMA 133	78,20 b	17,17	7,70 b	9,27 b	6,60 a	11,20	2.389,29 a	592,51 b
IMA 193	103,87 a	16,59	7,65 b	6,60 c	3,33 a	9,07	2.577,88 a	695,57 a
IMA 195	73,07 b	13,77	6,90 b	7,20 b	5,73 a	10,53	3.029,17 a	806,66 a
IMA 211	83,20 b	14,87	8,88 a	5,87c	5,34 a	9,67	1.872,27 b	538,20 b
IMA 340	80,87 b	16,77	9,53 a	6,27 c	6,40 a	10,93	2.154,01 b	589,14 b
NOVO 343	79,87 b	17,13	9,43 a	6,20 c	5,73 a	10,20	1.474,47 b	353,73 b

NOVO 338	87,80 b	18,55	10,54 a	5,13 c	4,73 a	9,00	1.345,04 b	315,03 b
CVe	10,34	17,33	10,92	13,94	33,17	21,95	30,14	34,14
CVg	10,60	5,83	15,07	17,32	19,92	7,09	22,95	37,68
(CVg/CVe)	1,03	0,34	1,38	1,24	0,60	0,32	0,76	0,78
H <sup>2</sup>	84,01	36,18	90,50	88,53	64,34	34,30	74,35	75,15

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Altura de plantas (ALT); matéria seca da parte aérea (MSPA); diâmetro do troco (DIAM); ramificação primária (RAM1); ramificação secundária (RAM2); inflorescência (FLOR); produção de grãos (P. grãos); produção de óleo (P. óleo); Coeficiente de variação ambiental (CVe); Coeficiente de variação genotípica (CVg) e Herdabilidade (H<sup>2</sup>).

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Com relação à altura na tabela anterior, o acesso IMA 193 (103,87 cm) foi a superior. Os demais acessos não diferiram entre si, apresentando variação na altura de 71,13 a 87,80 cm. A altura é uma variável de grande importância para agricultura mecanizada, afetando a regulação dos equipamentos para a colheita, uma vez que plantas de porte elevado aumentam o risco de acamamento no campo, o que pode acarretar perdas significativas na colheita (Amini *et al.*, 2008).

Os acessos NOVO 343, IMA 340, NOVO 338 e IMA 211 destacaram-se com maiores diâmetros de caule (9,43; 9,53; 10,54 e 8,88 mm, respectivamente). O maior diâmetro do caule está relacionado a uma maior resistência ao acamamento e tombamento, além da maior capacidade de acúmulo de nutrientes (N, P, K, S e Mg) e eficiência na relação fonte-dreno (Velasco, 2005).

Para ramificações primárias, o acesso IMA 73 apresentou maior média com 9,27 unidades por planta. Os menores valores foram observados nos acessos IMA 211, IMA 193, NOVO 338, IMA 340, IMA 117 e NOVO 343; com números de inflorescências variando de 5,13 a 6,6 unidades (Tabela 9).

Os acessos que apresentaram maiores desempenhos com relação à produção de grãos foram IMA 133, IMA 117, IMA 73, IMA 118, IMA 193 e IMA 195 (2.389,29 a 3.084,70 kg ha<sup>-1</sup>). Já os acessos NOVO 343, IMA 340, NOVO 338 e IMA 211 (1.345,04 a 2.154,01 kg.ha<sup>-1</sup>) apresentaram as menores produções. Essas variações nas produções de grãos podem estar

relacionadas às diferentes pressões de seleção dos locais de origem dos acessos. Em testes a campo propriamente, Istanbuluoglu *et al.* (2009) mencionam que a produtividade de grãos do cártamo varia de acordo com o estresse hídrico, mencionando amplitudes de 4,9% a 60,3%.

Os acessos IMA 117, IMA 73, IMA 193, IMA 118 e IMA 195 apresentaram maiores produções de óleo (654,13 a 895,83 kg.ha<sup>-1</sup>), enquanto os menores valores (315,03 a 592,51 Kg.ha<sup>-1</sup>) foram apresentados por NOVO 343, IMA 133, IMA 340, NOVO 338 e IMA 211 (Tabela 9). Yeilaghi *et al.* (2012), estudando a produção em condições de estresse salino, inferiram que, dependendo do genótipo, a produção de óleo variou de 23,4% a 35,5% sob condições de cultivo ideais, com produção de óleo de 487,8 a 1.166,3 Kg.ha<sup>-1</sup>. Sob condições de campo salino, o espectro foi de 19,9% a 32,8%, com produção de 266,9 a 847,5 kg.ha<sup>-1</sup>. Ainda de acordo com os autores, outra observação relevante relaciona-se ao uso de menores espaçamentos e variedades com maiores potenciais de ramificações, o que favorece a cobertura e fechamento precoce do terreno, diminuindo os custos com controle de plantas invasoras. Entretanto, o adensamento de plantas pode interferir também no crescimento das ramificações laterais, acarretando no crescimento apenas vertical (Coronado, 2010).

A variação fenotípica de uma variedade pode ser atribuída a fatores genéticos, variações ambientais e a interações entre as mesmas (Amini *et al.*, 2008). O CVe é a proporção em que as características ambientais influenciam na expressão do fenótipo, o qual possibilita uma análise mais acurada nos processos de melhoramento genético.

Neste trabalho, estimou-se CVe acima de 20% para os caracteres ramificação secundária, número de inflorescência, produção de grãos e de óleo. Esse percentual é esperado devido à elevada influência do ambiente sobre esses parâmetros (Amini *et al.*, 2008). As variáveis altura de planta, diâmetro de caule, matéria seca da parte aérea, ramificação primária e inflorescência apresentaram CVe abaixo de 20%, indicando que, para esses parâmetros, a expressão fenotípica possui menor influência ambiental.

As características morfológicas que apresentaram a razão  $CV_g/CV_e$  maiores que 1,00 foram a altura de plantas (1,03), o diâmetro de caule (1,38) e a ramificação primária (1,24). Esse resultado reforça a predominância da expressão do efeito genético sobre os efeitos ambientais quanto a tais caracteres, o que não ocorreu nos casos de matéria seca da parte aérea (0,34), ramificação secundária (0,60), inflorescências (0,32), produção de óleo (0,76) e produção de grãos (0,78).

Para a herdabilidade ( $H^2$ ) exposta na Tabela 9, as maiores estimativas foram observadas para as características de altura de planta (84,01%), diâmetro do caule (90,50%), ramificação primária (88,53%), produção de grãos (74,35%) e produção de óleo (75,15%). Esse parâmetro indica que, para essas características, há uma maior proporção da expressão fenotípica, determinada pela herança genética aditiva. Previsões desses caracteres para gerações futuras podem ser inferidas, devido ao alto valor de herdabilidade, observando-se a genealogia de progênies, o que facilita os trabalhos de melhoramento genético.

Caracteres com elevados valores de herdabilidade podem ser facilmente empregados em programas de melhoramento genético para potencialização de componentes de produtividade. Os coeficientes de herdabilidade para matéria seca da parte aérea e inflorescências foram baixos neste trabalho, possivelmente devido à baixa umidade relativa (Amini *et al.*, 2008).

O coeficiente de variação genética ( $CV_g$ ) acompanhou os valores de coeficientes de herdabilidade, com maior índice para a produção de óleo (37,68%) e para produção de grãos (22,95%) – (Tabela 9). Os demais caracteres apresentaram índices abaixo de 20%. Os caracteres produção de grãos, duração do florescimento e dias para a maturação poderiam ser explicados pela ocorrência de ações gênicas epistáticas, demandando mais estudos (Araújo, 2006).

No que tange às análises de correlações (Tabela 10), houve positivities entre os caracteres produção de óleo e inflorescência (0,57), ramificações primárias (0,74) e produção de grãos, ramificações secundárias (0,32) e produção de óleo. Entretanto, o diâmetro do caule apresentou correlação negativa (-0,90), indicando que com as seleções dos caracteres número de

inflorescências, ramificações primárias e secundárias, seriam esperadas maiores produções de grãos.

**Tabela 10.** Estimativas de correlações entre oito caracteres avaliadas em acessos de cártamo.

Caracteres	ALT	MSPA	FLOR	RAM1	RAM2	DIAM	P. grãos	P. óleo
ALT	1,00							
MSPA	0,37	1,00						
FLOR	-0,62	-0,55	1,00					
RAM1	-0,43	-0,57	0,88	1,00				
RAM2	-0,72	-0,44	0,93	0,71	1,00			
DIAM	0,32	0,60	-0,39	-0,69	-0,15	1,00		
P. grãos	-0,33	-0,66	0,53	0,74	0,28	-0,93	1,00	
P. óleo	-0,32	-0,72	0,57	0,73	0,32	-0,90	0,99	1,00

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A produção de grãos apresentou correlação positiva com os caracteres inflorescência (0,53), ramificação primária (0,74) e secundária (0,28) e correlação negativa com diâmetro do caule (-0,93). A inflorescência teve correlação forte com ramificações primárias (0,88) e secundárias (0,93), produção de óleo (0,53) e de grãos e (0,56) e correlação negativa para os caracteres altura (-0,62), matéria seca da parte aérea (-0,55) e diâmetro de caule (-0,39).

A produção de óleo apresentou correlação positiva com os caracteres inflorescência (0,56), ramificação primária (0,73) e secundária (0,32) e correlação negativa com diâmetro do caule (-0,89), indicando que o conteúdo de matéria seca e o diâmetro contribuem inversamente para produção de óleo, ou seja, quanto menor o teor de matéria seca, maior a produção de óleo. Para o caráter altura, não se pode inferir com precisão sua relação com a produção de óleo, pois sua correlação foi de baixa magnitude.

O caráter inflorescência apresenta forte correlação com ramificações primárias (0,88) e secundárias (0,93), produção de óleo (0,57) e de grãos (0,53) e correlação negativa para os

caracteres de altura (-0,62), matéria seca da parte aérea (-0,55) e diâmetro do caule (-0,39). Assim, plantas com maiores números de ramificações primárias e secundárias tendem a apresentar uma maior produção de inflorescências.

Na tabela 10, a altura das plantas apresenta correlação positiva com matéria seca (0,38) e diâmetro do caule (0,32), sendo negativa para inflorescência (-0,62), ramificações primárias (-0,43), secundárias (-0,72), produção de óleo (-0,32) e de grãos (-0,33), implicando que a seleção de plantas baseada na altura não irá refletir em maior produção de grãos e de óleo. Através do método de Tocher foi possível o agrupamento dos 10 genótipos em quatro grupos de maior similaridade genética (Tabela 11). Os grupos 1 e 2 foram formados por quatro variedades e os grupos 3 e 4 foram formados por apenas um genótipo cada.

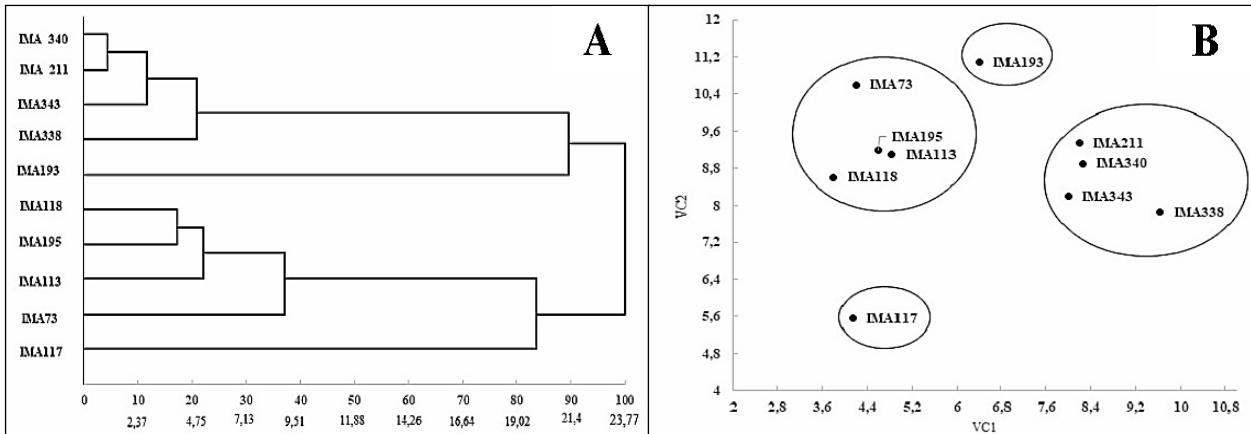
**Tabela 11.** Agrupamentos formados com base no método de Tocher e distância generalizada de Mahalanobis, considerando-se dez acessos de cártamo.

Grupos	Acessos
1	IMA 340, IMA 211, NOVO 343 e NOVO 338
2	IMA 118, IMA 185, IMA 133 e IMA 73
3	IMA 117
4	IMA 193

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Baseando-se na Figura 3, observam-se a caracterização dos indivíduos em dendrogramas (A) e o agrupamento de Tocher. As características de matéria seca da parte aérea, ramificação secundária e inflorescência apresentaram menor contribuição para formação e distinção dos grupos, já que foram caracteres semelhantes para todos os grupos e não contribuíram na distinção deles.

**Figura 3.** Dendrograma ilustrativo do padrão de dissimilaridade obtido pelo método do vizinho mais próximo, com base na distância de Mahalanobis: (A) Dispersão gráfica dos escores; (B) Variáveis canônicas (VC1 e VC2) entre os acessos de cártamo.



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

O grupo 1 foi formado pelos acessos IMA 340, IMA 211, NOVO 343 e NOVO 338, caracterizados pela semelhança em altura, diâmetro, ramificação primária, produção de grãos e produção de óleo. Estes acessos apresentaram superioridades no diâmetro do caule, parâmetro favorável ao melhoramento, tendo correlação positiva para altura de planta e massa seca da parte aérea, apesar desses caracteres não se correlacionarem diretamente com o aumento da produtividade.

O grupo 2, na Tabela 11, foi formado pelos genótipos IMA 118, IMA 195, IMA 133 e IMA 73; caracterizando-se pela semelhança em altura, diâmetro, produção de grãos e produção de óleo. Para a produção de grãos e de óleo, a variedade IMA 133 divergiu das demais dentro do grupo, apresentando superioridade, enquanto a variedade IMA 73 destacou-se quanto à altura.

O grupo 3 foi formado pelo genótipo IMA 117, que se destacou quanto à produção de óleo e de grãos. O grupo 4 foi formado pelo acesso IMA 193, sendo esse divergente dos demais grupos para os caracteres estudados, destacando-se as características altura de planta, produção de óleo e de grãos.

Amini *et al.* (2008) encontraram uma relação estreita entre genótipos de cártamo por meio de oligonucleotídeos ISSR e caracteres morfoagronômicos, diferindo deste trabalho por um maior grau de parentesco entre os seus materiais estudados. Portanto, constatou-se neste trabalho que os métodos de Otimização de Tocher e Dispersão Gráfica das Variáveis Canônicas foram concordantes entre si (Figura 3).

Peng *et al.* (2008) realizaram estudos de diversidade genética utilizando marcadores morfológicos e moleculares, concluindo que os métodos utilizados se complementam entre si. Mahasi *et al.* (2009) e Vilatersana *et al.* (2005), também realizando caracterizações para o pré-melhoramento, encontraram divergência entre as variedades estudadas, fato atribuído ao distanciamento geográfico entre os locais em que as variedades foram cultivadas ao longo dos processos de domesticação e seleção natural.

De acordo com Peng *et al.* (2008) a aferição isolada de caracteres morfológicos visando distinguir genótipos de uma espécie possui limitações devidas ao número reduzido e proeminentes influências ambientais. Os marcadores moleculares promovem varreduras mais detalhadas das diferenças entre genomas.

### **Conflito de interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## **CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Na perspectiva deste trabalho, sintetizam-se as principais conclusões:

(i) Foi validado um protocolo de extração de DNA para a espécie *Carthamus tinctorius* L., plenamente satisfatório quanto a intentos de análises moleculares.

(ii) O teste de gradiente de temperatura de anelamento, executado de forma prévia às investigações na população, foi eficiente na seleção de oligonucleotídeos ISSR amplificáveis e polimórficos para o cártamo, além de ter otimizado recursos e esforços nas tarefas de amplificação populacional.

(iii) A aplicação conjunta das análises moleculares e morfoagronômicas sobre os dados levou à constatação de uma elevada variabilidade entre os 24 acessos da população e apontou



alguns indivíduos superlativamente diferenciados, que seriam boas opções como genitores em um programa de melhoramento, a partir da coleção estudada.

(iv) Por meio das estimativas de herdabilidade, foi possível selecionar os caracteres com maior potencial de melhoramento genético, destacando-se o diâmetro do caule e a ramificação primária.

(v) Através das análises multivariadas, foi possível obter e discriminar os dez acessos selecionados em quatro grupos de maior proximidade genética.

(vi) Os caracteres que estão diretamente ligados às maiores produções de grãos e de óleo são inflorescência, ramificações primárias e ramificações secundárias, os quais são de relevância para a condução de populações segregantes, uma vez que possuem altos coeficientes de herdabilidade.

## REFERÊNCIAS

- ABUD, H.F.; REIS, R. de G.E.; INNECCO, R.; BEZERRA, A.M.E. Emergência e desenvolvimento de plântulas de cártamos em função do tamanho das sementes. **Revista Ciências Agrônômica**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 95-99, jan./mar. 2010a.
- ABUD, H.F.; GONÇALVES, N.R.; REIS, R. de G.E.; GALLÃO, M.I.; INNECCO, R. Morfologia de sementes e plântulas de cártamos. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 41, n. 2, p. 259-265, abr./jun. 2010b.
- AMINI, F.; SAEIDI, G.; ARZANI, A. Study of genetic diversity in safflower genotypes using agro-morphological traits and RAPD markers. **Euphytica**. v. 163, p. 21-30, 2008.
- ARAUJO, P. A. Detecção da epistasia para produção de grãos e caracteres agrônômicos em soja. Tese de doutorado. 2006. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo**. 78p.
- BALBINO, L.; CORDEIRO, L.; OLIVEIRA, P.; KLUTHCOUSKI, J.; GALERANI, P.; VILELA, L. Agricultura sustentavel por meio da integração lavoura- pecuária- floresta (iLPF). Informações agrônômicas. **IPNI. International Plant Nutrition Institute**. Nº 138, 2011a. Julho/2012.
- BARDHI, N.; SUDAJ, E.; DODONA, E.; KALLÇO, I.; MERO, G.; SUSAJ, L. Productivity indicators of five safflower cultivars (*Carthamus tinctorius* L.) Grown under lushanja, Albania, Climatic conditions. **Online International Interdisciplinary Research Journal**. v. 3 n. 6, 2013.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. Marcadores moleculares. 3. ed. **Viçosa: UFV**, 2016. 385 p. 2016.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. Melhoramento de plantas. 4. ed. **Viçosa: UFV**, 2005. 525p.
- BRASIL, Congresso Nacional. Lei nº 11.097 de 13 de Janeiro de 2005. Brasília, DF, 2005. \_\_\_\_\_. **Resolução n. 510 de 07 de abril de 2016**. Dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais. Brasília: DOU, 2016. \_\_\_\_\_. Resolução n. 115 de 23 de novembro de 2017. Dispõe sobre a nova configuração do semiárido brasileiro. Brasília: DOU, 2017.
- BOLDT, A. S. Coleções nucleares e associação do teor de óleo de cártamo com variáveis ecogeográficas por inteligência computacional. 67f. Tese. **Universidade Federal de Viçosa UFV, MG**. 2014.
- CAMPANELLA, L. C. A.; SILVA, A. C. S.; FREYGANG, J.; MAGRO, D. D. D. Efeito da suplementação de óleo de cártamo sobre o peso corporal, perfil lipídico, glicídico e antioxidante de ratos wistar induzidos a obesidade. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, 2014;35(1):141- 147 ISSN 1808-4532.
- CARDOSO, M. S. *et al.* Biocombustível a partir de *Rícinus communis* L. em Alagoas. Anais **5º Congresso Norte-Nordeste de Pesquisa e Inovação**, Alagoas, 2010.
- CARVALHO, F. I. F.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V. S.; SILVA, S. A. **Condução de populações no melhoramento de plantas**. Pelotas: Ed. Universitária, 2008. 2Ed.
- CORONADO, L. M. El cultivo del cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) en México. **Ciudad Obregon-México: SGI**, 2010, 96p.

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

CRUZ, C. D. **Programa GENES: Aplicativo computacional em genética e estatística versão Windows**. Viçosa: UFV. 2013. 382p.

DAJUE, L.; MÜNDEL, H. H. Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) - Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crop. **IPGRI: International Plant Genetic Resource Institute**. Rome. 1996. 81p.

DANIELI *et al.* The potential role of spineless safflower (*Carthamus tinctorius* L. var. Inermes) as fodder crop in central Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v.4, n.6, p19-22, 2011.

DAMODARAM T.; HEGDE D.M. Oilseeds situation: a statistical compendium 2002. **Directorate of Oilseeds Research**, Rajendranagar, Hyderabad 500030, India, 2002, p. 471.

DESTRO, D.; MONTALVÁN, R. **Melhoramento genético de plantas**. Londrina. Ed.UEL, p.818, 1999.

DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES, S. C.; QUEIROZ, A. C.; BERCHIELLI, T. T.; SALIBA, E. O. S.; CABRAL, L. S.; PINA, D. S.; LADEIRA, M. M.; AZEVEDO, J. A. G. **Métodos para análise de alimentos - INCT - Ciência Animal**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 214p.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. Focus, 12:13-15, 1990.

EKIN, Z. Resurgence of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) utilization: A global view. **Journal Agronomic**, v.4, n.2, p.83-87, 2005.

EMONGOR, V. Safflower (*Carthamustinctorius* L.) the Underutilized and Neglected Crop: A Review. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9; n. 6, p. 299-306, jan. 2010.

FAJARDO, C. G. Genetic diversity in natural populations of *Hancornia speciosa* Gomes: implications for conservation of genetic resources. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 42, n. 6, p. 623-630, 2018.

FARIAS, L. D. N.; BONFIM-SILVA, E. M.; PIETRO-SOUZA, W.; VILARINHO, M. K.; SILVA, T. J.; GUIMARÃES, S. L. Características morfológicas e produtivas de feijão guandu anão cultivado em solo compactado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-1Agriambi**, v. 17, n. 5, p. 497- 503, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-43662013000500005>.

FAOSTAT - Safflower Seed. **Food and agriculture organization of the united nations statistics division**. 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/safflower/en/>>. Acesso em ago 2022.

GOLKAR, P. 2014. Breeding improvements in safflower ('*Carthamus tinctorius*' L.): a review. **Australian Journal of Crop Science**, 8(7), 1079-1085.

GERHARDT, F. S., 1988- **Divergência genética entre acessos de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.)** / Ismael Fernando Schegoscheski Gerhardt. – Botucatu: [s.n.], 2014.

GORDWIN, I. D.; AITKEN, E. A. B.; SMITH, L. W. application of inter simple sequence repeat (issr) markers to plant genetics. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 18, p. 1524- 1528, 1997.

INIA. El cártamo o azafrancillo. Parte I. **Agricultura de las Américas**, v.11, n.12, p.9-11, 1962a.

INIA. El cártamo o azafrancillo. **El Surco**, v.67, n.5, p.7-10, 1962b.

JIAO. M. **Química**. 2010, p. 20, 9253-9260.

VOGLO, M. G., FAZUOLI, L. C., OLIVEIRA, A. C. B. D., GALLO, P. B., MISTRO, J. C., SILVAROLLA, M. B., & TOMA-BRAGHINI, M. (2008). **Divergência genética entre progênies de café robusta**. *Bragantia*, 67(4), 823-831

INTEGRACIÓN DE LAS AMÉRICAS S.A.S. ¿Sembrare cártamo este año? **El Surco.**, p.1-17, 1970a. Disponível:

<[https://issuu.com/abarriguda/docs/c\\_rtamo\\_\\_carthamus\\_tinctorius\\_l.\\_\\_tecnologias\\_de\\_p](https://issuu.com/abarriguda/docs/c_rtamo__carthamus_tinctorius_l.__tecnologias_de_p)>.

Acesso em novembro de 2023.

INTEGRACIÓN DE LAS AMÉRICAS S.A.S. Site. El cártamo conquista más tierras. **Agricultura de las Américas**. v.9, p.27- 32, 1970b. Disponível em:

<[https://issuu.com/abarriguda/docs/c\\_rtamo\\_\\_carthamus\\_tinctorius\\_l.\\_\\_tecnologias\\_de\\_p](https://issuu.com/abarriguda/docs/c_rtamo__carthamus_tinctorius_l.__tecnologias_de_p)>.

Acesso em novembro de 2023.

ISTANBULLUOGLU, A.; GOCMEN, E.; GEZER, E.; PASA, C.; KONUKCU, F. Effects of water stress at different development stages on yield and water productivity of winter and summer safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **Agricultural Water Management**. v. 96 p. 1429-1434, 2009.

KAFFKA, S. R.; KEARNEY, T. E.; KNOWLES P. D.; MILLAR, M. D. Safflower production in California. **UC Agriculture & Natural Resources** Publication 21565, DANR Communication Services, University of California, Oakland, CA, USA. 2000.

KLAJN, F. F., IACONO, G. E. P., LENZ, N. B. G. & SANTOS, R. F. (2018). Perspectivas do uso de *Carthamus tinctorius* L. como biocombustível. In: Santos, R. F. & Bassegio, D. (2018). **Cártamo: (Carthamus tinctorius L.): alternativa de cultivo para o brasil**. **Edunioeste**, 131-143.

KNOWLES, P. F. Genetics and breeding of oilseed crops. **Econ. Bot.**, v.37, p.423–433, 1983.

LATA, T. S.; PRAKASH, Y. V. Studies on the proteins from safflower seed (*Carthamus tinctorius* L.). **J. Agric. Food Chem.**, v.32, p.1412–1416, 1984.

MAHALANOBIS, P. C. On the generalized distance in statistic. **Proceedings of the National Institute of Science of India**, p. 49-55, 1936.

MAHASI, M. J.; WACHIRA, F.; PATHAK, R. S.; RIUNGU, T. C. Genetic polymorphism in exotic safflower (*Carthamus tinctorious* L.) using RAPD markers. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**. v. 1, n. 1, p. 8-12, 2009.

MISOF, B. LIU, S. MEUSEMANN, K. *et al.* 2014. A filogenômia resolve o momento e o padrão da evolução. **Ciência**, 346, 763-767.

- MIR M. A.; SHABIR, A. G.; SHEIKH, M.; SUMIRA JAN, P. M.; KHALID, Z. M.; HENNA, AMIN, M.U.; REHAMAN, P. A. Isolation, purification and characterization of naturally derived Crocetin beta-d-glucosyl ester from *Crocus sativus* L. against breast cancer and its binding chemistry with ER-alpha/HDAC2. Saudi J. **Biology Science**. 27 (3). 2020, pp. 975-984.
- NADEEM, M. A., NAWAZ, M. A., SHAHID, M. Q., DOĞAN, Y., COMERTPAY, G., YILDIZ, M., HATIPOĞLU, R., AHMAD, F., ALSALEH, A., LABHANE, N., ÖZKAN, H., CHUNG, G., & BALOCH, F. S. (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing, **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, 261-285. doi/full/10.1080/13102818.2017.140040.
- OELKE, E. A.; OPLINGER, E. S.; TEYNOR, T. M.; PUTNAM, D. H.; DOLL, J. D.; KELLING, K. A.; DURGAN, B. R.; NOETZEL, D. M. Safflower: alternative field crops manual. **Alternative Field Crops Manual**, 8p. Feb 1992. Disponível em: <<https://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/safflower.html>>. Acesso em: 10 ago 2022.
- OELKE, E. A.; OPLINGER, E. S.; TEYNOR, T. M.; PUTNAM, D. H.; DOLL, J. D.; KELLING, K. A.; DURGAN, B. R.; NOETZEL, D. M. Safflower: alternative field crops manual. **Wisconsin: Cooperative Extension**, 2011. Disponível em: <<http://www.hot.purdue.edu/newcrop/afcm/safflower.html>>. Acessado em: 10 ago 2022.
- OLIVEIRA, C.V.K. **Análise do cártamo como cultura energética**. 2016. 47p. Tese (Mestrado em Engenharia de Energia na Agricultura) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2016.
- PEARL, S. A., & BURKE, J. M. 2014. Genetic diversity in *Carthamus tinctorius* (Asteraceae; safflower), an underutilized oilseed crop. **American journal of botany**, 101(10), 1640-1650.
- PENG, S. A.; FENG, N. A.; GUO, M.; CHEN, Y.; GUO, Q. Genetic variation of *carthamus tinctorius* L. and related species revealed by SRAP analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 531-538, 2008.
- PINHEIRO, L. G.; CHAGAS, K. P. T.; FREIRE, A. S. M.; FERREIRA, M. C.; FAJARDO, C. G.; VIEIRA, F. A. Anthropization as a determinant factor in the genetic structure of *Copernicia prunifera* (Arecaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 16, p. 1-14, 2017.
- PINTO, R. J. B. **Introdução ao melhoramento genético de plantas**. Maringá: Eduem, 2009. 2ed.
- PIRES, I. E.; RESENDE, M. D. V.; SILVA, R. L.; JÚNIOR, M. F. R. R. **Genética florestal**. Viçosa (MG): Arka, 2011. 318 p.
- PUREY, S.; SHARMA, N.C. Safflower – An Ancient Wonderful Crop. In: MUKHERJE, S.P. (Ed.). **Everyman's Science**. Calcutá: v.43, n.3, 2008.
- QUEIROGA, V. P.; GIRÃO, E. G.; ALBUQUERQUE, E.M. B. **Cártamo (*Carthamus tinctorius* L.): Tecnologias de plantio e utilização**. 1ed. / Organizadores, Vicente de Paula Queiroga, Ênio Giuliano Girão, Esther Maria Barros de Albuquerque – Campina Grande: AREPB, 2021.
- RAI, M. K. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection – An overview of the recent progress. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p.89-98, 2011.

- RAO, C. R. **Advanced statistical methods in biometric research**. New York: John Wiley & Sons; 1952. 390p.
- RESENDE, M. D. V. Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 330-339, 2016.
- RIDLEY, M. 2006. Evolution. Third Edition. **Blackwell Publishing Ltda**.
- ROBLES, S. R. Producción de oleaginosas y textiles. Segunda edición. **Editorial Limusa**. México, D. F. 1985, p.141-142.
- ROSSMAN, H. Estimativas de parâmetros genéticos e fenotípicos de uma população de soja avaliada em quatro anos. Tese de doutorado. 2001. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo**. 91p.
- SAADAOU, E.; MARTÍN, J. J.; TLILI, N.; CERVANTES, E. Castor bean (*Ricinus communis* L.): Diversity, seed oil and uses. *In: PARVAIZ, A.* (eds.). Oil seed crops: yield and adaptations under environmental stress, Nova Jersey: Wiley Online Library. v. 15, p. 19-33, 2017.
- SACHS, I. Barricadas de ontem, campos de futuro. **Estudos avançados**, v. 24, n. 68, p. 25-38, 2010.
- SHAHROKHANIA, M. H.; SEPASKHAH, A. R. Effects of irrigation strategies, planting methods and nitrogen fertilization on yield, water and nitrogen efficiencies of safflower. **Agricultural Water Management**. 172: 18-30, 2016.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory**, 1989, v. 3, p. 8.
- SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília: Embrapa, 2013. 353p.
- SANTOS, R. F.; SILVA, M. A. *Carthamus tinctorius* L.: Uma alternativa de cultivo para o Brasil. **Acta Iguazu**, Cascavel, v.4, n.1, p.26-35. 2015.
- SARTO, M. V. M. *et al.* **Safflower root and shoot growth affected by soil compaction**. *Bragantia*, v. 77, n. 2, p. 348-355, 2018.
- SEIFI, M.R.; ALIMARDANI, R.; AKRAM, A.; ASAKEREH, A. Moisture-Depend Physical Properties of Safflower (Goldasht). **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, n. 6, p. 340-345, nov. 2010.
- SEHGAL, D.; RAINA, S.N. *Carthamus*. In: KOLE, C. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. Berlim: **Editora Spring**, p.63- 95, 2011.
- SMITH, J. R. Safflower. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996, 606p.
- SINGH, V; NIMBKAR, N: Safflower (*Carthamus tinctorius* L.), In: SINGH, R, J: **Genetic Resources Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Oil C crops**. Boca Raton: CRC Press. p167-194, 2007.
- SILVA, V. P. da., Vital, A. H. A., Lira, J. P. E., Poletine, J. P., Morais, L. H. P., Oliveira, A. J.

de, Felipin-Azevedo, R., & Barelli, M. A. A. 2021. Análise da divergência genética em genótipos de cártamo através de caracteres morfológicos. **Research, Society and Development**, 10(5), e40610514596.

SILVA, C. J. Caracterização Agronômica e Divergência Genética de Acessos de Cártamo. 2013. Tese de doutorado. **Faculdade de Ciências Agronômicas**, UNESP. 51p.

SILVA, S. D.; ALVES, J. M.; MESQUITA, G. M. Efeito da compactação do solo no desenvolvimento aéreo e radicular do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e crambe (*Crambe abyssinica* Hochst). **Global Science And Technology**, v. 5, n. 2, p. 87-97, 2012.

SOUZA, M. A.; DETMANN, E.; FRANCO, M. O.; BATISTA, E. D.; ROCHA, G. C.; VALADARES FILHO, S. C.; SALIBA, E. O. S. Estudo colaborativo para avaliação dos teores de proteína bruta em alimentos utilizando o método de Kjeldhal. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Salvador, v.17, n. 4, p. 696-709, 2008.

STACHIW, R. *et al.* Potencial de produção de biodiesel com espécies oleaginosas nativas de Rondônia, Brasil. **Acta Amazonica**. v. 46, n. 1, p. 81-90, 2016.

VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Genetic structure of an insectpollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. **Biodiversity and Conservation**, v. 17, n.2, p. 2305- 2321, 2008.

VIEIRA, F. A.; NOVAES, R. M. L.; FAJARDO, C. G.; SANTOS, R. M.; ALMEIDA, H. S.; CARVALHO, D.; LOVATO, M. B. Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America: phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.177, n.2, p.189-201, 2015. <<http://dx.doi.org/10.1111/boj.12241>>.

VELASCO, L. B.; PÉREZ-VICH, J. M.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ. Identification and genetic characterization of a safflower mutant with a modified tocopherol profile. **Plant Breeding**. v. 124, p. 459-463. 2005.

VILATERSANA, R.; GARNATJE, T.; SUSANNA, A.; GARCIA-JACAS, N. Taxonomix problemas in *Carthamus* (Asteraceae): RAPD markers and sectional classification. **Journal of the Linnean Society**. v. 147, n. 3, p. 375-383, 2005.

VILLELA, A. A.*et al.* Status and prospsects of oil palm en the Brazilian Amazon. **Biomass and Bioenergy**. v. 67, p. 270-278, 2014.

WEISS, E. A. **Safflower In: WEISS, E. A. Castor, Sesame and Safflower**. New York: Barnes & Noble, p.529–744, 1971.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.

YEILAGHI, H.; ARZANI, A.; FOTOVAT, R.; FEIZI, M.; POURDAD, S. S. Effect of salinity on seed oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. **Food chemistry**. v. 130, p. 618-625, 2012.