

DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM CULTIVARES TRADICIONAIS DE ABÓBORA VIA MARCADORES F-AFLP

Semíramis R. R. Ramos¹; Telma N. S. Pereira²; Manoel A. de Queiróz³; Ioná S. Araújo²; Gonçalo A. de Souza Filho²; Rogério F. Daher²; Antonio T. do Amaral Júnior²; Messias G. Pereira²

Palavras-Chave: Análise multivariada, *Cucurbita moschata*, Germoplasma, Marcadores moleculares, Recursos genéticos.

INTRODUÇÃO

A abóbora (*Cucurbita moschata* D.) é uma olerícola amplamente cultivada na região Nordeste do Brasil, havendo forte aceitação do mercado regional para as populações tradicionais ou tipos locais, que são popularmente denominadas de abóbora “Maranhão” ou abóbora “comum” (Ramos et al., 2000).

Esquinas-Alcazar & Gulick (1983), destacam o Nordeste do Brasil como área de alta variabilidade em populações tradicionais de abóbora. Algo dessa variabilidade já foi coletada (Queiróz et al., 1993; Queiróz et al., 1994; Moura & Queiróz, 1997; Ramos et al., 1997; Lopes, 1997), o que permitiu a formação do “Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste brasileiro”, que atualmente conta com 540 acessos de *C. moschata* (Queiróz, 1998)

A partir da realização de estudos de caracterização morfológica, foi possível quantificar a diversidade genética nos acessos preservados no Banco Ativo. No entanto, devido a dificuldade do grande número de descritores propostos para caracterização (Esquinas-Alcazar & Gulick, 1983), apenas uma amostra de quarenta acessos foi avaliada (Ramos et al., 1999, Ramos et al., 2000).

Assim, é necessário estudo de caracterização molecular para que informações mais amplas e seguras sobre a similaridade e distância genética entre acessos permitam o melhor conhecimento e o manejo racional do banco de germoplasma.

Esse trabalho é parte de um projeto na área de recursos genéticos e melhoramento que tem como um dos objetivos a utilização de marcadores moleculares para quantificar a

¹ Embrapa Meio-Norte, CP.01, Teresina, PI. CEP 64006-220. E-mail: srramos@cpamn.embrapa.br

² Universidade Estadual do Norte Fluminense, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28015-620, Campos dos Goytacazes, RJ.

³ Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Av. Edgard Chastinet Guimarães, s/n, Bairro São Geraldo, 48900-970, Juazeiro-BA.

variabilidade genética entre acessos de abóbora coletados em diversos municípios da região Nordeste, visando valorizar e maximizar a utilização dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram realizados no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, Setor de Genética Aplicada, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, localizado em Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro.

Foram avaliados noventa e seis acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Cucurbitáceas para o Nordeste Brasileiro, pertencente a Embrapa Semi-Árido, localizada no município de Petrolina, Estado de Pernambuco.

Os acessos foram escolhidos ao acaso e foram provenientes de coletas realizadas em vários municípios de seis Estados da região Nordeste (BA, PI, MA, RN, SE, PB).

O isolamento do DNA genômico foi feito de acordo com o protocolo descrito por Doyle & Doyle (1995), com algumas modificações. Utilizaram-se amostras compostas de folhas jovens, coletadas em dez plantas de cada acesso.

Para a utilização da técnica de f-AFLP (“Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados de DNA marcados por fluorescência”), as amostras de DNA genômico foram ajustadas a uma concentração de 25ng/μl e seguiram-se procedimentos de Vos et al. (1995), com algumas modificações sugeridas pelo AFLP™ Core Reagent Kit (Gibco Brl-Life Technologies).

Preparou-se uma mistura contendo 1μl de formamida deionizada, 0,5μl de “blue dextran” 25 mM EDTA e 0,25 μl de “gene scan-500Rox”, marcado com fluorescência vermelha, servindo como padrão de comprimento de fragmentos.

A resolução dos fragmentos amplificados foi feita em sequenciador automático de DNA ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), em três géis de poli-acrilamida previamente preparados.

Os resultados foram analisados pelos softwares GenesScan (versão 2.5) e Genotyper (versão 3.1.) (The Perkin Elmer Corp.). A dissimilaridade foi estimada por meio do complemento aritmético do Índice de Jaccard. O agrupamento dos acessos foi efetuado por meio do método de otimização de Tocher (Cruz & Regazzi, 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão relacionadas as combinações de “primers” AFLP utilizadas e o número de marcas monomórficas e polimórficas geradas. Observa-se que foi possível obter 94,24% de marcas polimórficas a partir da utilização das três combinações de “primers” (ACT-CTG, AAG-CAT, AGG-CTG). Estes resultados confirmam a precisão da técnica descrita na literatura (Vos et al., 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Bezte & Penner, 1998) que se destaca entre as demais pelo grande número de fragmentos gerados permitindo elevada amostragem do genoma.

O agrupamento dos 96 acessos de abóbora pelo método de otimização de Tocher encontra-se na Tabela 2. Houve a formação de 10 grupos de similaridade. Constatou-se que os grupos I, II, III, IV, V e VI foram formados por acessos provenientes de diversos municípios de todos os Estados (BA, MA, PI, SE, PE, e RN) contemplados na coleta de germoplasma. Tal constatação nos informa que a variabilidade de abóbora está dispersa entre os municípios coletados nos diversos Estados, não havendo relação direta entre procedência geográfica e similaridade genética.

No entanto, verificou-se ainda a formação de mais quatro grupos formados por acessos únicos, os quais foram provenientes, respectivamente, do município de Juazeiro-BA (grupo VII), Pastos Bons-MA (grupo VIII), Barra do Corda-MA (IX) e Mirangaba-BA (Grupo X). Essa formação indica, provavelmente, que uma seleção diferenciada e individual dos agricultores, praticada em diferentes áreas, por tipos de frutos diferentes, permitiu a formação de grupos distintos ou geneticamente dissimilares, conforme constatado por Ramos et al. (2000), em estudo de divergência por meio da utilização de marcadores morfológicos.

Tabela 1- Combinações de *primers* AFLP utilizadas com os respectivos números de marcas monomórficas e polimórficas geradas.

Combinações de <i>primers</i>	Marcas		
	Polimórficas	Monomórficas	Totais
“EcoRI- MseI”			
ACT – CTG	97	14	111
AAG – CAT	75	0	75
AGG – CTG	90	2	92
Total	262	16	278

Tabela 2 - Agrupamento de noventa e seis acessos de abóbora baseado na dissimilaridade genética obtida pelo complemento aritmético do índice de Jaccard e no agrupamento pelo método de Tocher, utilizando marcadores f-AFLP.

Grupo	Acessos
I	13, 15, 12, 9, 11, 8, 4, 2, 6, 5, 16, 10, 14, 7, 1, 3
II	27, 31, 30, 28, 29, 21, 22, 24, 20, 25, 26, 18, 23, 19, 32, 17
III	89, 93, 95, 85, 96, 94, 88, 92, 91, 87, 90, 86, 83, 123, 84
IV	36, 40, 43, 37, 45, 46, 48, 38, 41, 42, 49, 47, 34, 39, 33, 148
V	69, 71, 73, 80, 78, 77, 70, 79, 75, 76, 74, 81, 67, 72
VI	54, 61, 59, 62, 159, 55, 64, 57, 60, 53, 63, 65, 50, 51, 56
VII	52
VIII	68
IX	66
X	82

A partir dos dados obtidos constatou-se que a técnica de f- AFLP pode ser bastante utilizada na caracterização de acessos de abóbora, pois permitiu detectar e quantificar a variabilidade presente entre os acessos. Tais resultados, aliados aos dados morfológicos, poderão auxiliar na identificação de acessos promissores ao programa de melhoramento e na proposição de uma futura coleção nuclear da espécie.

CONCLUSÕES

- 1- Há divergência genética entre os noventa e seis acessos de abóbora analisados.
- 2- Os marcadores f-AFLP mostram-se consistentes na detecção da variabilidade genética entre os acessos estudados.
- 3- O conhecimento da variabilidade genética detectada pode ser útil para o melhor manejo do banco de germoplasma, propor inferências para a formação de uma coleção nuclear além de favorecer o enriquecimento da base genética da população inicial de melhoramento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZTE, L. PENNER, G. AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism. In: Millach S. (Ed). **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, 1998. p.123-129

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG, UFV, Impr. Univ., 1994. 490 p.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p.13-15, 1990.

ESQUINAS-ALCAZAR, J.T.; GULICK, P.J. **Genetic resources of cucurbitaceaes**. Rome; IBPGR, 1983. 101 p. (IBPGR-82/84)

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

LOPES, J.F., MENEZES SB^o, J. A Coleta e multiplicação de germoplasma de abóboras e morangas. In: Simpósio latino-americano de recursos genéticos vegetais. 1997. Campinas, Programa e **Resumos...** Campinas: IAC/EMBRAPA/CENARGEN, 1997. p. 83.

MOURA, M.C.C.L.; QUEIRÓZ, M.A de. Coleta de acessos de Cucurbitaceae em 16 municípios do estado do Maranhão. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 12: 1997, Maceió, **Resumos...** Maceió, SBG-AL/UFAL/CNPQ/CAPES, 1997, p. 118.

QUEIROZ, M.A. Cucurbitáceas no Semi-Árido do Nordeste brasileiro: resgate, conservação e uso, *In*:: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 15, p. 1-12, **Anais...** Piracicaba –SP. 1998.

QUEIRÓZ, M. A de; PEDROSA, J. F.; PINHEIRO, R.N. Coleta de acessos de *Cucurbita moschata* e *C. maxima* na Barra do Punaú (Maxaranguape, RN). In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 10, 1994, João Pessoa. **Resumos...** João Pessoa: UFPB/ Ed. Universitária/PRPG, 1994. p.111.

QUEIRÓZ, M.A. de; RAMOS, S.R.R.; ROMÃO, R. L.; ASSIS, J. G. de A. Coleta de germoplasma de *Cucurbita moschata* e *Cucurbita maxima* em duas regiões do Nordeste brasileiro. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO SOBRE RECURSOS GENÉTICOS DE ESPÉCIES HORTICULAS, 2, 1991, Mar del Plata, Argentina. **Actas...**Balcarce: INTA - Estacion Experimental Agropecuaria Balcarce, 1993. p. 35-43.

RAMOS, S.R.R.; QUEIRÓZ, M. A. DE; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D. Divergência genética em germoplasma de abóbora procedente de diferentes áreas do Nordeste. Horticultura brasileira, Brasília, v.18, n.3, 2000. p. 195-199.

RAMOS, S.R.R.; QUEIRÓZ, M. A. DE; CASALI, V.W.D.; CRUZ, C.D. Recursos genéticos de *Cucurbita moschata*: Caracterização morfológica de populações locais coletadas no Nordeste Brasileiro. In: QUEIRÓZ, M. A de; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R., ed. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro** (on line). Versão 1.0. Petrolina-PE: Embrapa Semi-Árido/Brasília –DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, nov 1999. Disponível via Word Wide Web <http://www.cpatsa.embrapa.br>. ISBN 85-7405-001-6. 1999.

RAMOS, S.R.R.; SILVA, M.A.S. DA; QUEIRÓZ, M.A. DE Coleta de germoplasma de abóbora (*Cucurbita moschata*) na região de Paripiranga-BA. In: ENCONTRO DE GENÉTICA DO NORDESTE, 12: 1997, Maceió, **Resumos...**Maceió, SBG-AL/UFAL/CNPQ/CAPES, 1997. p. 115.

VOS, P.; HAGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M. ; LEE, T. VAN DE; HORNES, M; FRIJTERS, A; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** , v. 21, p. 4407-4414. 1995.