

ANÁLISE COMPARATIVA DE FENOGRAMAS GERADOS POR DOIS COEFICIENTES DE SIMILARIDADE BASEADOS EM ISOENZIMAS DE PIMENTA-DO-REINO (*Piper nigrum* L.)¹

José Maria Demetrio GAIA²
Milton Guilherme da Costa MOTA³
Maria Rosa COSTA⁴
Carlos da Silva MARTINS⁵
Marli Costa POLTRONIERI⁴

RESUMO: A pimenta-do-reino (*P. nigrum* L.) é uma espécie cultivada originária da Índia, que possui reduzida base genética e cujos clones cultivados são muito homogêneos. Eletroforese de oito sistemas enzimáticos em gel de poliacrilamida geraram bandas que foram utilizadas para analisar a similaridade genética de 78 clones desta espécie através do coeficiente “simple matching” e do coeficiente de Jaccard pelo método de agrupamento U.P.G.M.A. A faixa de similaridade calculada pelo coeficiente de Jaccard foi mais ampla (12% a 100%) do que a calculada pelo coeficiente de semelhança simples (65% a 100%), apresentando clones com similaridade superior a 75%, ao passo que, pelo coeficiente “simple matching”, 68 clones tiveram similaridade superior a 87%. Os clones de *P. nigrum* L. que mais se destacaram em dissimilaridade, por ambos os coeficientes, foram C60 (Kotavally), C22 (S-1), e C23(G-1), além dos acessos de espécies selvagens. Os acessos originários da Indonésia, Malásia e Tailândia não se separaram nitidamente dos acessos indianos e de seus derivados. Clones com identidade fenética e semelhança na denominação foram observados. Dentre os clones mais cultivados, os que apresentaram maior similaridade em relação ao conjunto foram os de denominação Bragantina e os menos similares foram os de denominação Cingapura. A distribuição dos clones nos grupos foi muito semelhante em ambos os fenogramas.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Diversidade Genética, Melhoramento Genético, Polimorfismo, Germoplasma.

COMPARATIVE ANALYSIS OF PHENOGRAMS BASED ON TWO SET OF SIMILARITY COEFFICIENTS IN ISOZYMES OF BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.)

ABSTRACT: Black pepper (*P. nigrum* L.) is an Indian semiperennial crop that have a reduced genetic base and very homogeneous cultivated clones. Electrophoresis of eight enzymatic systems in

¹ Aprovado para publicação em 17.08.2004

² Engenheiro Agrônomo, aluno do curso de mestrado em Biologia Vegetal Tropical da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA. E-mail: josegaia@interconnect.com.br

³ Engenheiro Agrônomo, Dr., Professor Visitante da UFRA.

⁴ Engenheira Agrônoma, M.Sc., Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental.

⁵ Engenheiro Agrônomo, M.Sc., Pesquisador da Embrapa Amazônia Oriental.

polyacrilamide gel produced bands that were used to analyze the genetic similarity of 78 clones of this crop through the simple matching and the Jaccard's coefficients using the grouping method U.P.G.M.A. The similarity interval calculated by the Jaccard's coefficient was wider (12% a 100%) than the simple matching coefficient (65% to 100%). The Jaccard's coefficient showed 56 clones with 75% of similarity, while the simple matching coefficient had 68 clones with 87% of similarity. The clones of *P. nigrum* L. C60 (Kotavally), C22 (S-1) and C23 (G-1) and accessions of wild species showed the highest dissimilarity by both coefficients. The original accessions from Indonesia, Malaysia and Thailand were not clearly separated from the Indian accessions and their derived ones. Clones with fenetic identity and denomination resemblance were observed. Bragantina was the cultivated clones that showed the highest similarity and cingapore the lowest. The distribution of clones in groups was very similar in both phenograms.

INDEX TERMS: Genetic Diversity, Genetic Breeding, Polymorphism, Germplasm.

1 INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino, arbusto trepador e perene da família das piperáceas, é uma das espécies cultivadas mais antigas do mundo (MARTIN; GREGORY, 1962; ZEVEN, 1974), que se constitui em um importante produto agrícola para o estado do Pará e para o Brasil (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, 1997).

A susceptibilidade a doenças é devido ao cultivo de somente um ou alguns clones. Os principais problemas para obtenção de genótipos resistentes, não obstante já terem sido utilizadas modernas técnicas de melhoramento, são a homogeneidade genética destes clones e a reduzida base genética da espécie (ZEVEN, 1974; PILLAY, 1995).

Martins et al. (1996) detectaram diferenças genéticas (polimorfismo) entre os clones de pimenta-do-reino do banco de germoplasma da Embrapa Amazônia Oriental pela análise de isoenzimas, como, também, um grande número de clones em heterozigose.

Marcadores enzimáticos têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética de plantas cultivadas (DOEBLEY, 1989), assim como em outros estudos, tais como controle genético (HUANG; TOMARU; WANG, 1994), mapeamento genético (TAHIR; MUEHLBAUER, 1994), resistência à doença (KUSMENOGLU; MUEHLBAUER; KAZAN, 1992), ligação de genes (GARVIN; WEEDEN, 1994a), identificação de linhagens (CURN, 1995); e de poliplóides (KING; LEE; SCOTT, 1996), origem geográfica (GARVIN; WEEDEN, 1994b) e relações filogenéticas (RAHMAN; NITO, 1994), análises comparativas de híbridos (ROMERO et al., 1993), etc.

Os coeficientes de similaridade são utilizados para analisar variáveis qualitativas de duplo estado, tais como ausência ou presença de bandas isoenzimáticas. Sneath e Sokal (1973) apresentaram os principais coeficientes de similaridade, sendo que os mais utilizados são o coeficiente de

semelhança simples (“Simple Matching”) (SOKAL; MICHENER, 1958) e o coeficiente de semelhança de Jaccard (1908). Segundo Peroni (1998), o coeficiente de semelhança simples é muito utilizado em estudos de variabilidade, ao passo que o coeficiente de similaridade de Jaccard, segundo Dias (1998), é muito utilizado em estudos biológicos.

Tanto o coeficiente de semelhança simples como o coeficiente de Jaccard são basicamente definidos pela razão entre as concordâncias positivas e negativas e o conjunto total das variáveis (concordâncias e discordâncias), sendo que no coeficiente de semelhança simples são consideradas tanto as concordâncias positivas como as negativas, enquanto que no coeficiente de Jaccard são consideradas somente as concordâncias positivas.

Por concordância positiva ou negativa entende-se uma variável presente ou ausente num par de unidade taxonômica operacional (otu) (indivíduos, clones, variedades, populações, etc.). Além das relações de concordâncias entre otu’s, são também consideradas as relações de discordâncias e elas ocorrem quando uma variável está presente em uma unidade e ausente na outra ou vice-versa.

A partir das definições matemáticas, observa-se que o coeficiente de semelhança simples atribui o mesmo peso à presença ou ausência de uma variável, num par de unidades, enquanto que, no coeficiente de Jaccard, variáveis ausentes entre duas unidades não possuem influência alguma.

A análise de agrupamento (Cluster Analysis) é uma técnica multivariada que visa classificar unidades taxonômicas operacionais (otu’s) avaliadas por um conjunto “p” de caracteres ou variáveis, a partir de uma medida de distância entre as unidades (DIAS, 1998). Esta técnica de avaliação numérica e ordenação de otu’s com base nas suas similaridades foi denominada de Taxonomia Numérica por Sneath e Sokal (1973). Os dados de similaridade e divergência genética são sumariados em um gráfico de esquemas hierárquicos das relações entre as unidades denominado de fenograma por Camin e Sokal (1965). O princípio geral de todos os métodos de agrupamento é maximizar similaridade dentro de grupos e a dissimilaridade entre grupos (DIAS, 1998).

Técnicas de agrupamento utilizando coeficientes de semelhança são úteis para posicionar pares de indivíduos em função do binômio semelhança / dessemelhança, fornecendo informações importantes sobre a diversidade da coleção, bem como o valor genético de cada unidade taxonômica em relação ao conjunto. A descrição dos diferentes níveis de similaridade entre unidades taxonômicas permite utilizar estas informações para fins de melhoramento genético entre elas.

O objetivo da comparação de fenogramas, neste trabalho, é avaliar a estabilidade dos grupos formados em relação ao uso dos coeficientes de semelhança simples (com ênfase para as concordâncias positivas e negativas) e de Jaccard (com

ênfase para as concordâncias positivas), para descrever a similaridade e gerar informações sobre a diversidade da coleção, para utilização em programas de melhoramento genético da espécie em questão, mormente no que se refere à resistência à fusariose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Foram utilizados 78 acessos (clones) de pimenta-do-reino da coleção de germoplasma da EMBRAPA Amazônia Oriental (CPATU) (Quadro 1) existentes no campo experimental de Belém, mantidos sob cultivo com uso de tutores, sob condições de sombreamento. Dentre os acessos relacionados, cerca de 63% são originários da Índia e os demais são provenientes de programas de melhoramento do CPATU e de outros países do Oriente e de algumas espécies do mesmo gênero (Quadro 1). Amostras unitárias foram adotadas levando em conta que as plantas cultivadas de pimenta-do-reino: 1) são autógammas (MARTIN; GREGORY, 1962; WAARD; ZEVEN, 1969); 2) os clones cultivados apresentam homogeneidade genética e a espécie apresenta uma reduzida base genética (ZEVEN, 1974; PILLAY, 1994) e; 3) são propagadas vegetativamente por estacas.

2.2 MÉTODOS

A metodologia e os procedimentos utilizados para coleta de tecido vegetal, extração de proteínas, formulação dos

tampões e do sistema de géis (separador e concentrador), eletroforese, tempo de corrida, condições de migração e revelação das enzimas foram baseados por Tsumura et al. (1990), com as seguintes adaptações para pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.): 1) utilizaram-se 50mg de tecido foliar jovem por ocasião da maceração sob nitrogênio líquido e, simultaneamente, cerca de 75mg de PVPP adicionado a 1mL do tampão de extração; 2) a eletroforese foi realizada sob condições de 16mA durante cerca de cinco horas; 3) as soluções corantes de fosfoglucoisomerase (PGI) e fosfatase ácida (ACP) foram modificadas para 50mL de Tris-HCl, 50mM, pH 8,0; 1mL de D-frutose-6-fosfato (20 mg/mL); 1mL de NADP (6,6 mg/mL); 2mL de MTT (5 mg/mL); 1mL de PMS (5 mg/mL), 1mL de cloreto de magnésio (10,17 g/100mL) e 10 unidades de G6PDH (PGI); 50mL de “ACP buffer” (1,6 g de acetato de sódio tri-hidratado, 4,83mL de ácido glacial acético e 500mL de água destilada); 100mg de α -naftil fosfato, sal dissódico e 12mg de “Fast garnet GBC salt” (ACP).

Além de fosfoglucoisomerase (PGI, 5.3.1.9) e fosfatase ácida (ACP, 3.1.3.2) foram utilizados mais seis sistemas enzimáticos: aconitase (ACO, 4.2.1.3), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH, 1.1.1.44), fumarase (FUM, 4.2.1.2), glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, 1.1.1.49), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT, 2.6.1.1) e xiquimato desidrogenase (SKDH, 1.1.1.25).

Quadro 1 – Relação dos acessos de pimenta-do-reino e outras espécies de do gênero *Piper* da coleção de germoplasma do CPATU analisados, com seus respectivos nomes e origens. Belém (PA), 1999.

Código ¹	Acesso	Origem	Código	Acesso	Origem	Código	Acesso	Origem
C01	0697	Mutante	C27	<i>Piper Columbrinum</i> Link	Brasil	C53	X18	Cruzamento
C02	Cingapura	Malásia	C28	Kottanadan-2	Índia	C54	X32	Cruzamento
C03	Diemberg (acesso 1)	Índia	C29	Karimunda-3	Índia	C55	45	Mutante
C04	Djambi (acesso 1)	Indonésia	C30	Piper Attenuatum-F	Índia	C56	132	Mutante
C05	Balankotta (acesso 1)	Índia	C31	Diemberg (ac. 3, ind-2)	Índia	C57	Cz-5X10	Derivado*
C06	Q.D.S. PL.-F ₆	Derivado*	C32	Iaçará-2	Índia	C58	P3	Derivado*
C07	Perunkoide-S	Índia	C33	Q.B. 5x10-S	Derivado*	C59	Mangueira	Derivado*
C08	Piper Attenuatum-M1	Índia	C34	Papari	Índia	C60	Kovt (Kottavally)	Índia
C09	Piper Attenuatum-M2	Índia	C35	Diemberg (acesso 2)	Índia	C61	239	Derivado*
C10	Piper Attenuatum-M3	Índia	C36	Cz-4X11 (acesso 1)	Derivado*	C62	U.T. (Uthirankotta)	Índia
C11	Guajarina (Karimunda)	Índia	C37	Chumala-S	Índia	C63	1558	Derivado*
C12	Karimunda	Índia	C38	Bragantina (acesso 1)	Índia	C64	Trang	Tailândia
C13	Chumala	Índia	C39	Iaçará-1	Índia	C65	Diemberg (acesso 3)	Índia
C14	Belantung	Indonésia	C40	Kuching	Malásia	C66	Uthirankotta (progênie)	Índia
C15	Djambi (acesso 2)	Indonésia	C41	Piper Attenuatum-X	Índia	C67	Uthirankotta (mãe)	Índia
C16	Balankotta (acesso 2)	Índia	C42	Kudaravalli	Índia	C68	Guajarina (acesso 2)	Índia
C17	Espírito Santo	Índia	C43	Pimenta-da-terra	Índia	C69	Karimunda-S	Índia
C18	Bragantina 6.3.92	Índia	C44	Diemberg (ac. 2, ind-2)	Índia	C70	Uthirankotta-S (Apra)	Índia
C19	Cingapura 6.3.92	Malásia	C45	F1-PL8	Derivado*	C71	Iaçará-S	Índia
C20	Iaçará-1 (ind-2)	Índia	C46	Bragantina (acesso 2)	Índia	C72	S-2	Índia
C21	F6-PL1	Derivado*	C47	Cz-4x11 (acesso 2)	Derivado*	C73	Balankotta Jones	Índia
C22	S-1	Índia	C48	Kaluvalli (acesso 2)	Índia	C74	Guajarina-Inatam	Índia
C23	G-1	Índia	C49	X1	Cruzamento	C75	Pan-1-CEN (Pannyiur-1)	Índia
C24	Piper betle	Índia	C50	X26	Cruzamento	C76	BAG 16x13	Derivado*
C25	Karimunda-2	Índia	C51	X3	Cruzamento	C77	Kaluvalli (ac 2, ind-2)	Índia
C26	Kottanadan-1	Índia	C52	B	Derivado*	C78	Kudaravalli (ind-2)	Índia

¹: Notação adotada para as análises nos programas de computador; *: Derivados de programas

Os padrões de bandas revelados nos géis (fenótipos) tiveram as enzimas identificadas e desenhadas em papel milimetrado para preparar os zimogramas, conforme Cheliak e Pitel (1984), a partir dos quais foram obtidas planilhas para elaboração da matriz de entrada das variáveis de duplo estado (presença e ausência de bandas).

Para descrever os padrões de similaridade foram adotados o coeficiente de semelhança simples (“simple matching”), definido pela relação $S=(a+b)/(a+b+c+d)$, onde o numerador representa o somatório das concordâncias positivas e negativas, e o denominador, o somatório das concordâncias e discordâncias entre bandas, e o coeficiente de similaridade de Jaccard, definido pela relação $J=a/(p-d)$, onde “a” são as concordâncias positivas, “p” é o conjunto das variáveis estudadas e “d” são as concordâncias negativas entre bandas. Foi utilizado, para obtenção do fenograma, o método não-ponderado de agrupamento aos pares (U.P.G.M.A.). O grau de concordância entre o dendrograma e a matriz de distâncias foi avaliado pelo coeficiente de correlação cofenético.

Para o cálculo do coeficiente de similaridade, do coeficiente de correlação cofenético e geração do fenograma foi utilizado o programa de computador Fitopac (George Shepherd-Unicamp).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as bandas enzimáticas e o número de indivíduos em que foram observadas e a Figura 1 mostra

bandas enzimáticas em alguns géis. Na Figura 2, encontra-se o fenograma de agrupamento calculado pelo coeficiente de semelhança simples e, na Figura 3, encontra-se o fenograma calculado pelo coeficiente de similaridade de Jaccard. Tais fenogramas podem ser divididos em cerca de 12 grupos, porém, para não fragmentar demasiadamente o conjunto dos acessos e levando em conta a homogeneidade dos clones, pode-se dividir o fenograma em apenas dois grupos. No fenograma calculado pelo coeficiente de semelhança simples, o grupo à esquerda, com 46 acessos, que vai do acesso X18 (C53) ao acesso Chumala-S (C37); e o grupo à direita, com 32 acessos, onde se encontram os acessos mais divergentes, que vai do acesso Djambi (C04) ao P. betle (C24).

No fenograma obtido pela utilização do coeficiente de Jaccard, o grupo à esquerda do fenograma vai do acesso X18 (C53) ao acesso Perunkóide-S (C07); o grupo à direita do fenograma vai do acesso Djambi (C04) ao acesso P. columbinum Link (C27).

Os valores de similaridade, pelo coeficiente de semelhança simples, variaram de 65% a 100%, sendo que a grande maioria dos acessos apresentou valores de similaridade entre 90% e 100%, e dentre estes, 16 ficaram com similaridade muito próxima de 100% (aproximadamente 98%). Por outro lado, somente 17 acessos apresentaram similaridade entre 70% e 90%, grande parte destes se encontra na faixa de 80% a 90% de similaridade, e somente três se encontram na faixa de 70% a 80% de similaridade.

Tabela 1 – Número de bandas por sistema enzimático e número de vezes em que foram observadas nos 78 acessos examinados. Belém, 1998/99.

	Bandas																	S
	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6	B-7	B-8	B-9	B-10	B-11	B-12	B-13	B-14	B-15	B-16	B-17	
GOT	1	54	5	22	35	4	4	25	5	4	49	5	19	2	3	3	1	241
PGI	34	3	3	3	75	23	62	8	10	48	1	1	1					272
ACP	7	21	17	59	20	24	7	7	2	7	5	7						183
ACO	2	8	1	13	29	51	3	1	23	5	1	3						140
6PGDH	8	7	71	5	21	64	21	7	19	1	67							291
G6PDH	69	3	2	73	66	68												281
SKDH	12	38	69	4														123
FUM	65	6	5															76

(*): B-1, B-2, B-3, etc. representam a sucessiva numeração das bandas em cada sistema, na mesma ordem.



Figura 1 – Bandas isoenzimáticas dos sistemas PGI, SKDH, GOT, 6PGDH revelados em géis de poli-acrilamida, utilizadas para análise da similaridade genética de pimenta-do-reino por meio dos coeficientes de semelhança simples e de jaccard. Belém, 1998/99.

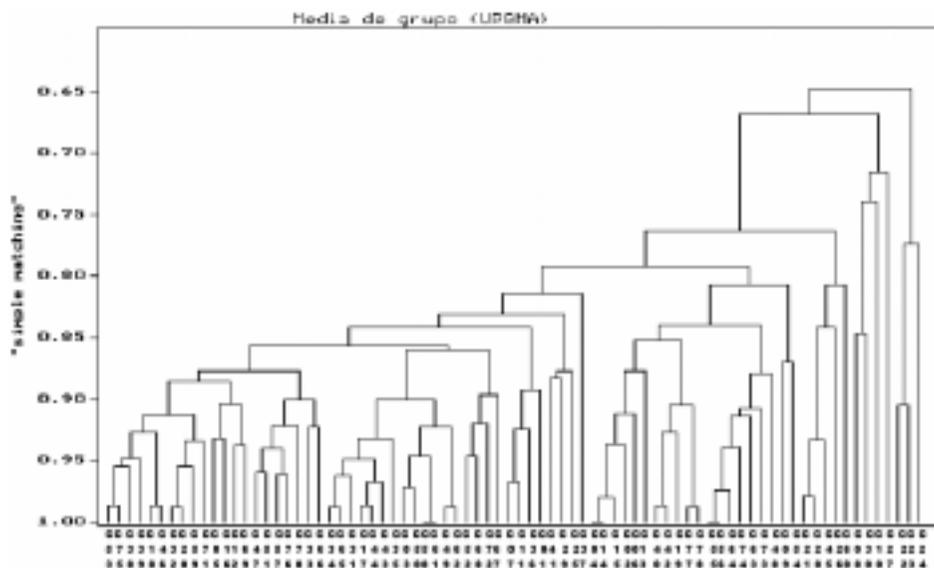


Figura 2 – Fenograma de agrupamento de 78 clones de pimenta-do-reino calculado pelo coeficiente de semelhança simples e pelo método UPGMA. Coeficiente de correlação cofenético: 0,8713. Em função da homogeneidade dos clones, o fenograma foi dividido em apenas dois grupos; um à esquerda (do acesso C53 ao acesso C25) e outro à direita (do acesso C37 ao acesso C24). Belém (PA), 1998/99.

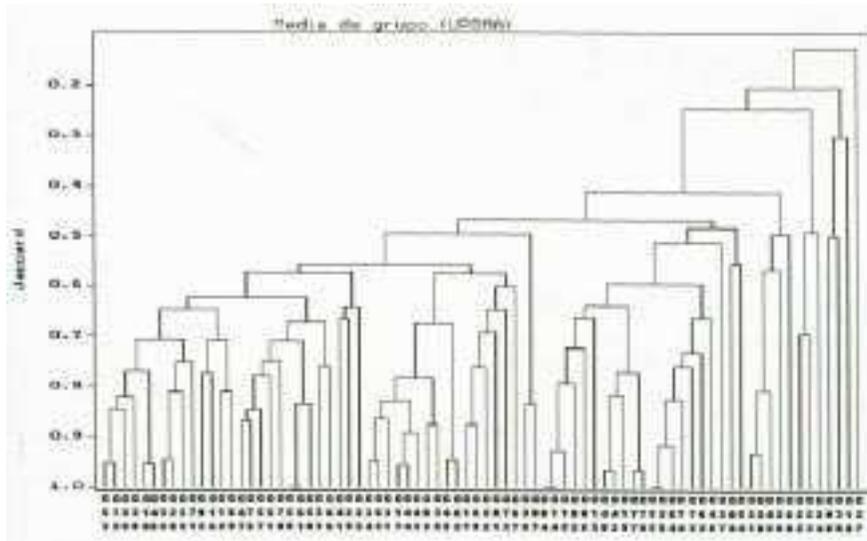


Figura 3 – Fenograma de agrupamento de 78 clones de pimenta-do-reino calculado pelo coeficiente de similaridade de Jaccard e pelo método UPGMA. Coeficiente de correlação cofenético: 0,8908. Em função da homogeneidade dos clones, o fenograma foi subdividido em apenas três grupos ou divisões: um à esquerda (do acesso C53 ao acesso C67); um grupo central constituído por dois acessos: C36 e C07, e uma à direita do fenograma (do acesso C04 ao acesso C7).

A faixa de similaridade, utilizando o coeficiente de Jaccard, variou de cerca de 8% a 100%, sendo, portanto, bem mais ampla que a observada pela utilização do coeficiente de semelhança simples, e isto pode ser devido à definição matemática de cada coeficiente, uma vez que o coeficiente de jaccard não considera as concordâncias negativas, reduzindo, desta maneira as chances de se encontrar semelhanças entre os pares. Apesar disto, somente seis acessos foram observados na faixa de 8% a 50%, 16 acessos na faixa de 50% a 75% e 56 acessos, na faixa de 75% a 100%, concordando, neste sentido, com as informações geradas pelo cálculo da média de grupo através do coeficiente de semelhança simples, onde a grande maioria

dos acessos igualmente tendeu para assumir elevados valores de similaridade (68 acessos entre 87% e 100%).

Tal resultado é semelhante ao obtido por Faraldo (1994) em mandioca, que observou, igualmente, faixa de similaridade um pouco mais ampla pelo coeficiente de Jaccard e são consistentes com o que foi descrito para a espécie por Zeven (1974) e Pillay (1995), segundo os quais a pimenta-do-reino é uma espécie que possui uma base genética reduzida e cujos clones cultivados são muitos semelhantes entre si. Dentre os acessos mais divergentes, em relação aos subgrupos em que ficaram, pelo coeficiente de semelhança simples pode-se destacar *P. Columbrinum* Link (C27), com 72% de similaridade, *P. Attenuatum* (C10), com 74%

de similaridade, P. betle (C24) com 77% de similaridade. Os acessos mais dissimilares em relação ao conjunto estão no último subgrupo à direita do fenograma, constituído pelos acessos S-1 (C22), G-1 (C23) e P. betle (C24).

Pelo fenograma calculado pelo coeficiente de semelhança simples, os acessos dos clones denominados Bragantina (C38, C18 e C46) e os clones denominados Guajarina (C11 e C68) ficaram situados no grupo à esquerda do fenograma, em subgrupos dissimilares, sendo que os acessos Bragantina (C18 e C46) apresentaram identidade fenética em nível de, aproximadamente, 98% de similaridade. Tais clones Bragantina estão constituindo, juntamente com outros, o agrupamento dos acessos mais similares do grupo da esquerda e do conjunto dos acessos. Dentre os clones denominados Guajarina, dois se situaram nos últimos grupos, um no antepenúltimo (C68) e outro no penúltimo (C11) subgrupo do grupo da esquerda, com valores de similaridade variando de, aproximadamente, 94% (C68) a 97% (C11). Também de denominação Guajarina, há o acesso C74, que figurou no grupo da direita.

Os clones denominados Cingapura (C02 e C19) também figuraram no grupo da direita, no segundo agrupamento, de fronteira com o grupo da esquerda. Tal agrupamento pode ser dividido em quatro subgrupos, estando os acessos Cingapura presentes no primeiro (C02) e no segundo (C19) subgrupos. No terceiro subgrupo deste referido agrupamento figura o acesso

Guajarina-Inatam (C74), sendo o mais dissimilar dentre os acessos dos clones mais cultivados no estado do Pará (Bragantina, Guajarina e Cingapura), seguido dos de denominação Cingapura. O que pode ter contribuído para esta diversidade dos acessos Guajarina é a origem geográfica destes clones (Índia) que é o centro de origem da pimenta-do-reino, presumivelmente, o centro de maior dissimilaridade entre grupos, o subgrupo dos clones Bragantina se liga em nível de, aproximadamente, 84% e 86% com os clones Guajarina (respectivamente com C11 e C68) e estes se ligam em nível de cerca de 77% aos clones Cingapura (C02 e C19) e ao acesso Guajarina-Inatam (C74).

Pelo fenograma calculado pelo coeficiente de Jaccard observa-se, praticamente, a mesma localização dos clones Bragantina no fenograma e o mesmo agrupamento e localização para os clones Cingapura, reforçando, deste modo, a similaridade dos clones Bragantina e Cingapura.

Em relação aos cultivares Guajarina, houve uma aproximação, com identidade fenética, dos clones C11 e C68 no último agrupamento do grupo da esquerda, mas o acesso C74 permaneceu no segundo agrupamento do grupo da direita. Deste modo, o coeficiente de Jaccard reforça a similaridade entre os clones C11 e C68 e confirma a diversidade do acesso C74.

Em nível de dissimilaridade entre grupos, os clones Bragantina ligaram-se aos

clones Guajarina (C11 e C68) em nível de, aproximadamente, 56% de similaridade e, estes, se ligam aos clones Cingapura e Guajarina-Inatam (C74) em nível de, aproximadamente, 47% de similaridade.

Vinte e três pares de acessos apresentaram identidade fenética (mesmo nível de ligação determinado pelo algoritmo de agrupamento) no fenograma calculado pelo coeficiente de Jaccard e 24 pelo coeficiente de semelhança simples, sendo que, destes, 19 foram coincidentes nas duas análises e, destes, sete pares apresentaram semelhança na denominação, podendo tratar-se de acessos iguais. Os pares que apresentaram semelhança de nomes foram Bragantina (C18 e C46); Iaçará (C20 e C32); Balankotta (C05 e C16); Karimunda (C12 e C69); Diemberg (C03 e C35); Guajarina (C11 e C68) e *P. attenuatum* (C08 e C30). Os acessos Cingapura (C02 e C19), apesar de mostrarem semelhança na denominação, não apresentaram identidade fenética em ambos fenogramas.

Alguns acessos atingiram identidade fenética em nível de 100% de similaridade, tanto pelo coeficiente de semelhança simples como pelo coeficiente de Jaccard, porém, isto não significa que estes acessos sejam precisamente iguais, pois os marcadores isoenzimáticos cobrem uma pequena parte do genoma, quando comparados com marcadores de maior precisão, como os marcadores de DNA (DUDLEY, 1994), sendo mais seguro a utilização destes marcadores para o caso da necessidade de descarte de acessos repetidos, mormente

quando a base genética é muito estreita, como é o caso da pimenta-do-reino. Estes acessos foram, tanto pelo coeficiente de semelhança simples quanto pelo coeficiente de Jaccard, 45 (C55) e 132 (C56); Djambi (C04) e Belantung (C14), pertencentes ao grupo da direita e; P3 (C58) e 239 C(61), pertencente ao grupo da esquerda.

Considerando ambos os fenogramas, os acessos que apresentaram maior dissimilaridade em relação ao conjunto foram, além daqueles pertencentes a espécies silvestres, Kottanadan-1 (C26), Kotavally (C60), S-1 (C22) e G-1 (C23), podendo ser utilizados para a produção de híbridos.

A incidência dos clones de diferentes origem geográfica no mesmo grupo, mas em subgrupos distintos, pode constituir indício de paralelismo entre diversidade geográfica e divergência genética observado em muitas plantas autógamas (PEREIRA, 1989; BARROS, 1991).

Outra informação que pode ser útil para obtenção de novos clones com melhores características agrônomicas é a de que os clones de denominação Bragantina serem os mais dissimilares em relação aos clones Cingapura, já que estes clones se incluem dentre os mais cultivados no estado do Pará.

Uma outra informação bastante importante revelada pela análise dos fenogramas é a estreita faixa de similaridade gerada pelo coeficiente de semelhança simples (65% a 100%), e o fato da maior

parte dos agrupamentos formados pelo coeficiente de Jaccard apresentar similaridade próxima ou superior a 50%, indicando a necessidade da introdução de novos acessos para aumentar a variabilidade da coleção.

A distribuição dos clones nos fenogramas foi muito semelhante, sendo que a grande maioria deles ocorreu no mesmo subgrupo ou em subgrupos próximos, o que foi também observado por Faraldo (1994) ao comparar fenogramas utilizando os mesmos coeficientes e o mesmo algoritmo de agrupamento em mandioca. Isto significa que a desconsideração de bandas isoenzimáticas ausentes entre pares de acessos (concordâncias negativas), pelo coeficiente de Jaccard, praticamente não influenciou sobre os agrupamentos formados, portanto eles podem ser considerados estáveis, gerando informações confiáveis sobre a diversidade genética da coleção. Neste caso, podem ser utilizados tanto um quanto outro fenograma para caracterizar os indivíduos em grupos, de onde resultam informações para o melhoramento genético.

A comparação entre estes dois fenogramas ajuda a evidenciar a existência/influência das concordâncias negativas na formação dos grupos. As bandas relativas a estas concordâncias podem ter importância tanto para os indivíduos em que elas estão ausentes, como para os indivíduos em que elas estão presentes, na hipótese de entre elas poder haver alguma relacionada a algum caráter agrônomo desejável, via ligação gênica, tornando-se um importante fenótipo marcador, que, neste caso, não seria

considerado pelo fenograma gerado pelo coeficiente de Jaccard.

Há casos, no entanto, em que é mais recomendado o coeficiente de Jaccard, como é o caso dos marcadores RAPD, devido ao grande número e diversidade de bandas gerado por esta técnica e pelo fato da seqüência alvo ser aleatória, podendo esta ser ou não uma seqüência codificante (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; RAMALHO et al., 2000).

As seqüências não-codificantes podem ser importantes quando se objetiva avaliar a variação ao longo da maior parte do genoma (TELLES et al., 2001). Neste caso, pode-se usar o fenograma gerado pelo coeficiente de semelhança simples e compará-lo ao de Jaccard, para avaliar a influência das concordâncias negativas na formação dos grupos, apesar de, na possibilidade de haver locos codificantes ausentes em um par qualquer, estes estarão misturados aos locos não-codificantes ausentes de outros pares. Em outras palavras, as concordâncias negativas poderão ser tanto de locos não-codificantes como de locos codificantes.

Tais locos codificantes ausentes em um dado par podem conter uma importante seqüência gênica para o melhoramento deste e/ou de outros pares em que ela se encontra ausente e isto de forma independente da proporção entre as seqüências codificantes e não-codificantes existente nos genomas dos eucariontes.

Em ambos os fenogramas gerados neste trabalho, os coeficientes de correlação

cofenético (CCC) tiveram valores superiores a 0,80, portanto, os agrupamentos formados podem ser considerados satisfatórios.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados sumariados nos fenogramas pode-se concluir que:

- a) pela utilização dos coeficientes de semelhança simples e do coeficiente de Jaccard, os agrupamentos formados podem ser considerados estáveis;
- b) as informações geradas sobre a diversidade da coleção podem ser utilizadas para o melhoramento genético de espécie e da coleção.

AGRADECIMENTOS

À JICA (Japan International Cooperation Association) pelos materiais, equipamentos e reagentes doados durante o convênio de cooperação científica e tecnológica com a EMBRAPA Amazônia Oriental e ao FUNTEC, que complementou este projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL, Rio de Janeiro, v.57, p.3, 1997.

BARROS, L. de M. *Caracterização morfológica e isoenzimática do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), tipos comum e anão precoce, por meio de técnicas multivariadas.* 1991. 256p. Tese (Doutorado)- ESALQ, Piracicaba, 1991.

CAMIN, J.H.; SOKAL, R.R. A method for deducing branching sequences in phylogeny. *Evolution*, v.19, p.311-326, 1965.

CHELIAK, W.M.; PITEL, J.A. *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species.* S.l.: Petawawa National Forestry Institute: Canadian Forestry Service, 1984. 49p. (Information Report PI-X-42).

CURN, V. Acid phosphatase and leucine aminopeptidase isozymes as biochemical markers of homogeneity in oil seed rape androgenetic lines. *Plant Growth Regulation*, v. 16, p.59-63, 1995.

DIAS, L. A. dos S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins; fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos.* Viçosa (MG): UFV, 1998. 574p.

DOEBLEY, J.W. Isozymic evidence and the evolution of crop plants. In: SOLTIS, D.E. ; SOLTIS, P.S. (Ed.). *Isozymes in plant biology.* Portland: Dioscorides Press, 1989. 268p. p.165-191.

DUDLEY, J.W. Comparison of genetic distance estimators using molecular marker data. In: SIMPOSIUM ANALYSIS OF MOLECULAR DATA, 1994, Cornwallis, *Proceedings...* Cornwallis: American Society for Horticultural Science: Crop Science Society of America, 1994. p.3-7.

- FARALDO, M.I.F. Caracterização isoenzimática e diversidade de etnovariedades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.). 1994. 91p. Dissertação (Mestrado)-ESALQ, Piracicaba, 1994.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documento, 20).
- GARVIN, D.F.; WEEDEN, N.F. Genetic linkage between isozyme, morphological and DNA markers in tepary bean. *Journal of Heredity*, v. 85, p.273, 1994a.
- _____, _____. Isozyme evidence supporting a single geographic origin for domesticated tepary bean. *Crop Science*, v.34, p.1390-1395, 1994b.
- HUANG, Q.Q.; TOMARU, N.; WANG, L.H. Variation in masson pine, *Pinus massoniana* Lamb. *Silvae Genetica*, v. 43, n. 5/6, p.285-293, 1994.
- KING, B.J.; LEE, L.S.; SCOTT, P.T. Identification of triploid citrus by isozyme analysis. *Euphytica*, v.90, p.223-231, 1996.
- KUSMENOGLU, I.; MUEHLBAUER, F.J.; KAZAN, K. Inheritance of isozyme variation in ascochyta blight-resistant. *Crop Science*, Madison, v.32, p.121-127, 1992.
- MARTIN, F.W.; GREGORY, L.E. Mode of pollination and factors affecting fruit set in *Piper nigrum* L. in Puerto Rico. *Crop Science*, Madison, v.2, n.4, p.295-299, 1962.
- MARTINS, C. da S.; POLTRONIERI, M. C.; KANASHIRO, M.; ALVES, R. M.; GAIA, J.M.; IKETANI, H.; KAJITA, T. Caracterização bioquímica de germoplasma de fruteiras. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental. *Geração de tecnologia agroindustrial para o desenvolvimento do trópico úmido*. Belém: EMBRAPA-CPATU/JICA, 1996. 305p. p. 161-172. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 85).
- PEREIRA, A.V. *Utilização de análise multivariada na caracterização de germoplasma de mandioca (Maniot esculenta Crantz)*. 1989. 180p. Tese (Doutorado)-ESALQ, Piracicaba, 1989.
- PERONI, N. *Taxonomia folk e diversidade intraespecífica de mandioca (Maniot esculenta Crantz)*. Em roças de área de agricultura tradicional em áreas de Mata Atlântica do sul do Estado de São Paulo. 1998. 168p. Dissertação (Mestrado)-ESALQ, Piracicaba, 1998.
- PILLAY, V.S. *Project report on research and development of black pepper (Piper nigrum L.) in the humid tropics of the Brazil*. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1995. 27p.
- RAHMAN, M.M.; NITO, N. Phylogenetic relationships among the true citrus fruits trees” by glutamate oxaloacetate transaminase isozymes analysis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, v.62, n.4 p.755-760, 1994.

- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B. dos; PINTO, C.A.B.P. *Genética na agropecuária*. 2. ed. Lavras: UFLA, 2000. 472p.
- ROMERO, G.O.; AMANTE-BORDEOS, A.D.; DALMACIO, R.D.; ELLORAN, R.; SITCH, L.A. Comparative studies of isozymes in *Oriza sativa*, *O. minuta* and their interspecific derivatives: evidence for homeology and recombination. *Theoretical and Applied Genetics*, v.87, p.609-615, 1993.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R. *Numerical taxonomy*. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.
- SOKAL, R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas Science Bulletin*, n.38, p.1409-1438, 1958.
- TAHIR, M.; MUEHLBAUER, F.J. Gene mapping in lentil with recombinant inbred lines. *The Journal of Heredity*, v. 85, n. 4, p.306-310, 1994.
- TELLES, M.P.de C.; MONTEIRO, M.S.R.; RODRIGUES, F.M.; SOARES, T.N.; RESENDE, L.V.; AMARAL, A. das G.; MARRA, P.R. Marcadores RAPD na análise da divergência genética entre raças de bovinos e número de locos necessários para a estabilidade da divergência estimada. *Ciência Animal Brasileira*, v.2, n.2, p.87-95, 2001.
- TSUMURA, Y.; TOMARU, N.; SUYAMA, Y.; NA'EIM, M.; OHBA, K. Laboratory manual of isozyme analysis. *Bull. Univ. Forest.*, Tsukuba, v.6, p. 63-95, 1990.
- WAARD, P.F.W. de; ZEVEN, A.C. Pepper: *Piper nigrum* L. In: FERRWERDA, F.P.; WIT, F. (Ed.). *Outlines of perenial crop breeding in the tropics*. Wageningen: Agricultural University Wageningen the Netherlands, 1969. p. 409-426. (Miscellaneous Paper, 4).
- ZEVEN, A.C. Black pepper, *Piper nigrum* (Piperaceae). In: SIMMONDS, N.W. (Ed.). *Evolution of crop plants*. New York: Logman, 1974. 339p. p.234-235.