

ANÁLISE DE AGRUPAMENTO EM GENÓTIPOS DE MAMOEIRO UTILIZANDO CARACTERES MORFO-AGRONÔMICOS E MOLECULARES SIMULTANEAMENTE

Eder Jorge de Oliveira¹, Diego Souza de Lima², Juliana Leles Costa³, Lucas Ferraz dos Santos⁴, Marlos Dourado Machado⁵, Rangel Sales Lucena⁶, Tiago Borges Nunes Motta⁷, Jorge Luiz Loyola Dantas⁸, Carlos Alberto da Silva Ledo⁹ e Leandro Simões Azeredo Gonçalves¹⁰

Resumo

O objetivo deste trabalho foi promover a análise simultânea de variáveis morfo-agronômicas e moleculares e posterior agrupamento para definição da diversidade genética do germoplasma de mamoeiro. Foram avaliadas 12 características morfológicas discretas, 20 agronômicas contínuas e 383 marcas discretas de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), em 17 acessos de germoplasma. Utilizou a distância de Gower para obtenção da matriz de distância genética e quatro técnicas de agrupamento. O método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*) apresentou a melhor correlação cofenética (0,77) e, portanto, foi utilizado para a interpretação dos dados. Foram formados seis grupos principais de diversidade, sendo que as variedades comerciais Golden, Sunrise o híbrido Calimosa e os acessos CMF070 e CMF028 foram agrupados. Ampla variabilidade foi encontrada na análise destes 17 genótipos de mamoeiro, passíveis de utilização no melhoramento genético.

Introdução

No Brasil, utiliza-se um número restrito de variedades e híbridos de mamoeiro, em função das exigências do consumidor por frutos com tamanho, formato, sabor e coloração bem definidos, além da restrita disponibilidade de genótipos para os produtores. Isso provoca limitações à expansão do cultivo, bem como aumento da vulnerabilidade genética dos plantios.

É premente o aumento dessa variabilidade genética por meio da incorporação de novo germoplasma aos programas de melhoramento genético, visando a adaptação ou desenvolvimento de novas variedades ou híbridos. Contudo, a caracterização e o estudo da variabilidade genética das coleções de germoplasma é o primeiro passo a ser conduzido nessa direção. A quantificação dessa variabilidade genética pode ser feita com o uso de características discretas (morfológicas e moleculares) e contínuas (agronômicas). Em muitos casos, a análise e interpretação destas características são feitas separadamente em virtude da falta de modelos matemáticos que associem as informações dos dados discretos e contínuos em uma única matriz de dados. Com isso, observam-se várias discrepâncias em relação aos agrupamentos e às inferências em relação à similaridade dos genótipos.

¹ Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: eder@cnmpf.embrapa.br

²Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, CEP 44380-000, E-mail: diegodelima10@yahoo.com.br

³Estudante de Biologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: julianaleles_17@hotmail.com

⁴ Estudante de Engenharia Florestal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: lufts@hotmail.com

⁵Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, CEP 44380-000, E-mail: marlosdourado@yahoo.com.br

⁶Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, CEP 44380-000, E-mail: rangel_lucena@yahoo.com.br

⁷Estudante de Agronomia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, CEP 44380-000, E-mail: tico_motta@hotmail.com

⁸ Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: loyola@cnmpf.embrapa.br

⁹ Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas, BA, CEP 44380-000, E-mail: ledo@cnmpf.embrapa.br

¹⁰ Doutorando da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, CEP 28.013-600, E-mail: lsagrural@yahoo.com.br

Apoio financeiro: CNPq.

Gower (GOWER, 1971), propôs uma metodologia para análise simultânea de variáveis contínuas e categóricas, utilizando uma escala de 0 a 1, independente do número de variáveis como ponto base para padronização dos dados, o que facilita a construção dos dendogramas. Recentemente, esta metodologia foi implementada no “SAS” e no “R”. Assim, o objetivo deste trabalho é utilizar os diferentes dados da caracterização de acessos do Banco Ativo de Germoplasma do Mamoeiro (BAG-Mamão) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMF) para promover o estudo conjunto sobre a variabilidade genética de 17 acessos.

Material e Métodos

Dezessete acessos do BAG-Mamão do CNPMF foram avaliados para as seguintes variáveis categóricas: 1) cor do caule; 2) cor do pecíolo; 3) pigmentação do caule; 4) forma das folhas; 5) forma bordos foliares; 6) cera nas folhas; 7) tipo de florescimento; 8) cor fruto imaturo; 9) formato de frutos; 10) cor da polpa; 11) formato da base do fruto e 12) formato da cavidade do fruto. Com relação às variáveis contínuas avaliaram-se as seguintes: 1) diâmetro do caule (20 cm do solo); 2) comprimento do pecíolo da folha; 3) comprimento da folha madura; 4) largura da folha madura; 5) altura da planta; 6) número de flores por pedúnculo; 7) número de frutos por axila; 8) número de frutos por planta; 9) comprimento do pedúnculo; 10) firmeza do fruto; 11) peso do fruto; 12) comprimento do fruto; 13) diâmetro do fruto; 14) diâmetro da cavidade do fruto; 15) espessura da casca; 16) espessura da polpa; 17) acidez (gramas de ácido cítrico/100g); 18) brix (%); 19) ratio e 20) pH.

Os dados moleculares foram obtidos com o uso da técnica de AFLP (VOS et al., 1995). O DNA genômico foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *MseI*, corte raro e freqüente, respectivamente. O DNA foi pré-amplificado com o uso de uma base seletiva, conforme a combinação: E+A/M+C, onde E = adaptador *EcoRI*; M = adaptador *MseI*; A = adenina e C = citosina. A amplificação seletiva foi feita utilizando os iniciadores com três bases seletivas para as enzimas de corte raro (E+ACT, E+AAC) e três para *MseI* (M+CAA, CAC, CAT, CTA, CTC, CTG e CTT). A visualização dos resultados foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e coloração com prata (CRESTE et al., 2001).

A análise simultânea dos caracteres morfo-agronômicos e moleculares foi realizada para determinação

da matriz de distância genética com base no algoritmo de Gower dado por: $S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} S_{ijk}}{\sum_{k=1}^p W_{ijk}}$, onde K

é o número de variáveis ($k = 1, 2, \dots, p$); i e j dois indivíduos quaisquer; W_{ijk} são os pesos atribuídos para a comparação ijk , anotando-se 1 se a comparação é válida e 0 se é inválida (se o valor da variável está ausente em um ou ambos os indivíduos); S_{ijk} é a contribuição da variável K para a similaridade entre os indivíduos i e j , com valores entre 1 e 0. Se o valor da variável K é o mesmo para ambos os indivíduos para uma variável nominal, então S_{ijk} é igual a 1, caso contrário é 0. Para uma variável contínua $S_{ijk} = 1 - \frac{|X_{ik} - X_{jk}|}{R_k}$, onde X_{ik} and X_{jk} são valores da variável K para os indivíduos i e j , respectivamente, e R_k é o valor da amplitude para a variável K na amostra. A divisão por R_k elimina a diferença entre a escala das variáveis e produz um valor que varia entre 0 e 1 com igual peso.

Após a obtenção da matriz de distância, os acessos foram agrupados pelos métodos de Ligação Simples, Ligação Completa, Método de Ward e pelo UPGMA. Também foram obtidos os coeficientes de correlação cofenética, que foram testados pelo teste t . Os dados foram analisados pelo programa R (<http://www.r-project.org>).

Resultados e Discussão

O método de agrupamento UPGMA foi o que apresentou a maior correlação entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma gerado, com valor da correlação cofenética de 0,77. Os métodos de ligação simples, ligação completa e de Ward apresentaram valores significativos de 0,68; 0,66 e 0,69, respectivamente (Tabela 1). Portanto, o método UPGMA foi utilizado para representar a variabilidade dos genótipos de mamoeiro, pela sua maior eficiência em representar graficamente os contrastes entre genótipos.

Table 1. Correlação cofenética entre a matriz de dissimilaridade e os quatro métodos de agrupamento utilizados para estimar a divergência genética entre 17 acessos de mamoeiro do BAG-Mamão do CNPMF.

Distância	Métodos de agrupamento			
	Ligação simples	Ligação Completa	Ward	UPGMA
Gower*	0,68**	0,66**	0,69**	0,77**

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

Considerando o valor médio da distância de Gower como ponto de corte para definição dos agrupamentos, foram obtidos seis grupos de dissimilaridade com base na técnica de UPGMA (Figura 1). O grupo **A** foi formado pelos acessos CMF-L48-08, Calimosa, Golden, CMF-L30-08 e Sunrise; o grupo **B** pelos acessos CMF065 e CMF074; o grupo **C** pelo acesso CMF024; o grupo **D** pelo acesso CMF040; o grupo **E**, pelos acessos CMF021, CMF088, CMF230 e CMF232; e o grupo **F** pelos acessos CMF234, CMF008, CMF018 e CMF020.

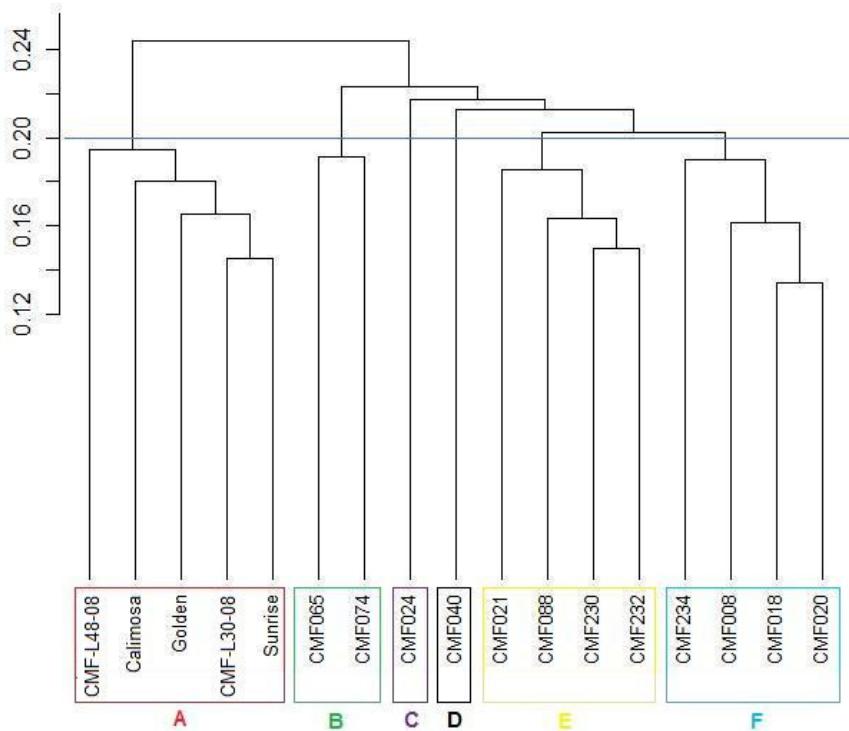


Figura 1. Dendrograma construído pelo método UPGMA com base na análise de 17 acessos de mamoeiro utilizando a distância de Gower (caracteres morfo-agronômicos e moleculares)

No grupo A foram agrupadas as principais variedades comerciais (Golden e Sunrise) e o híbrido do tipo Formosa (Calimosa), juntamente com duas linhagens oriundas do Programa de Melhoramento

Genético do Mamoeiro do CNPMF, selecionadas pela produtividade, porte da planta e alta adequação mercadológica dos frutos. Embora, estes cinco genótipos estejam presentes no mesmo grupo, ainda é possível observar considerável diversidade genética dentro do grupo.

O grupo B é formado pelos genótipos CMF065 e CMF074, representantes dos grupos Solo e Formosa, respectivamente. Apesar, de pertencerem a tipos agronômicos diferentes, observa-se considerável similaridade, sobretudo em relação ao perfil molecular com marcadores AFLP, o que permitiu seu agrupamento.

Os genótipos CMF024 e CMF040, pertencentes aos grupos C e D, respectivamente, são tipicamente do grupo Formosa, com frutos de peso médio de 1200 gramas e brix médio de 12,5%. Porém, altamente divergentes em termos moleculares.

Os grupos E e F cada um com quatro indivíduos, são representados por genótipos pertencentes ao BAG-Mamão com alto potencial para geração de híbridos comerciais. A alocação destes genótipos em diferentes grupos, sobretudo em relação ao grupo A, é extremamente interessante do ponto de vista agronômico haja vista que o desenvolvimento de novas variedades/híbridos a partir dos mesmos poderá acrescentar nova variabilidade genética aos plantios comerciais.

A distância genética pelo método de Gower variou de 0,14 a 0,30, com média de 0,20, o que indica uma variabilidade genética elevada. Esta informação contrasta com a realidade da cultura, em que são plantadas basicamente três variedades/híbridos e poucas variedades estão disponíveis para uso. Este trabalho demonstrou que a análise de apenas 17 variedades, híbridos, linhagens e acessos de germoplasma revelaram alta variabilidade passível de exploração nos programas de melhoramento.

A distância de Gower como medida de dissimilaridade foi bastante eficiente para expressar o grau de diversidade genética entre os genótipos avaliados, utilizando caracteres morfo-agronômicos e moleculares. A divergência observada terá importância fundamental na escolha de genótipos a serem utilizados como progenitores, já que a divergência genética entre os parentais é um indicativo da expressão heterotípica nas progênies. Novos acessos de mamoeiro estão sendo avaliados e serão incorporados nas análises genéticas propostas no presente trabalho. O passo seguinte à definição da variação genética existente num grupo maior de genótipos será a definição dos cruzamentos a serem realizados, de forma a combinar o critério da dissimilaridade com o desempenho dos candidatos. Ou seja, os genitores deverão possuir bom desempenho agronômico “per se”, serem geneticamente divergentes e, preferencialmente, apresentarem complementaridade quanto a caracteres importantes.

Conclusões

A distância de Gower, obtida pela análise simultânea de caracteres morfo-agronômicos e moleculares, relativos à caracterização de genótipos de mamoeiro, possibilitou a estruturação conjunta da diversidade genética, o que facilita a implementação de ações ligadas ao melhoramento da cultura.

Referências

- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19, p.299-306, 2001.
- GOWER, J.C. General coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics*, v.27, p.857-874, 1971.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T.; HORNES, M.; FRITJERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 4407-4414, 1995.