



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE MESTRADO

PROCEDIMENTOS MULTIVARIADOS NO AGRUPAMENTO DE
GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM BASE EM MATRIZ DE
DISTÂNCIA CONJUNTA E EM SEPARADO PARA
CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS E CATEGÓRICAS

DARLAN BISPO DOS SANTOS

CRUZ DAS ALMAS - BA

JUNHO - 2010

PROCEDIMENTOS MULTIVARIADOS NO AGRUPAMENTO DE
GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM BASE EM MATRIZ DE
DISTÂNCIA CONJUNTA E EM SEPARADO PARA
CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS E CATEGÓRICAS

DARLAN BISPO DOS SANTOS

Administrador de Empresas com Habilitação em Análise de Sistemas

Faculdade Santíssimo Sacramento, 2004.

Dissertação submetida ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração em Fitotecnia.

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS ALBERTO DA SILVA LEDO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. EDER JORGE DE OLIVEIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CRUZ DAS ALMAS - BA – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

S237

Santos, Darlan Bispo dos.

Procedimentos multivariados no agrupamento de genótipos de maracujazeiro com base em matriz de distância conjunta e em separado para características quantitativas e categóricas. / Darlan Bispo dos Santos. _ Cruz das Almas-Ba: CETEC-UFRB, 2010.

59 f.; il.

Orientador: Prof^o Carlos Alberto da Silva Ledo.

Co-Orientador: Prof^o Eder Jorge de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Área de Concentração: Fitotecnia.

1. Genética vegetal. 2. Melhoramento genético. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CETEC. II. Título.

CDD: 634.425

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
DARLAN BISPO DOS SANTOS**

Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo
Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical
(Orientador)

Prof. Dr. Antonio Texeira do Amaral Júnior
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação homologada pelo Colegiado de Curso de Mestrado em Ciências
Agrárias em

Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em

Dedico...

Aos meus pais Maria da Guia Santos (*in memorian*) e Gerônimo Bispo dos Santos (*in memorian*), pela constante energia espiritual;

Aos meus irmãos Silvio, Jucinézio, Adelson (*in memorian*), Genildo, Edilza, Jairo e de maneira singular a minha irmã Iraíldes que acreditou veementemente na diferença que a educação poderia proporcionar em minha vida pessoal e profissional;

A Jocélia Novaes Gonçalves, pelo incentivo, compreensão e confiança empreendidos.
...sem dúvida, as pessoas mais importantes do meu mundo!

Agradecimentos

A Deus, por todas as graças concebidas, sem as quais nada seria possível;

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano – *Campus* Catu, pela oportunidade de ingresso no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia e consequente realização do curso;

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior;

A UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia;

Ao Professor Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo, pela sua **singularidade e competência** na orientação, dedicação, incentivo e amizade;

Ao Prof. Dr. Eder Jorge de Oliveira, pelo apoio técnico, compreensão, exigência, amizade, enfim, por ter sido essencial em momentos decisivos;

À Prof. Dra. Ana Cristina Vello Loyola Dantas, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Mestrado, pela atenção, simplicidade e comprometimento;

À Prof. Dra. Ana Cristina Fermino Soares, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Mestrado na modalidade MINTER junto a CAPES;

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Mestrado Minter, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por terem me auxiliado no crescimento intelectual e prático durante o curso;

Ao Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, bolsista na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pelas orientações referentes às metodologias utilizadas;

Aos colegas de turma pelo apoio e solidariedade;

Aos colegas de trabalho do Instituto Federal Baiano – *Campus* Catu pelo apoio, compreensão e solidariedade;

A Dra. Cláudia Fortes Ferreira da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pela atenção e orientações prestadas;

A Tiago Borges Nunes Motta, estagiário da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, pelo apoio na obtenção dos dados experimentais.

PROCEDIMENTOS MULTIVARIADOS NO AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM BASE EM MATRIZ DE DISTÂNCIA CONJUNTA E EM SEPARADO PARA CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS E CATEGÓRICAS

Autor: Darlan Bispo dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

RESUMO: A identificação de genótipos com características importantes para o programa de melhoramento genético é fundamental para o desenvolvimento de materiais superiores. Entretanto, para o melhoramento interespecífico é necessário o conhecimento da variabilidade genética presente nas populações base visando à otimização dos ganhos genéticos. O presente trabalho objetivou a caracterização de 24 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro (BAG - Maracujá) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, por meio da análise de agrupamento utilizando a distância de Mahalanobis para os dados quantitativos, a distância de Cole-Rodgers para os dados multicategóricos, a distância de Jaccard para os dados moleculares e a análise simultânea de todos os dados com o uso do algoritmo de Gower. Entre as análises realizadas isoladamente, a dos dados moleculares apresentou maior fidedignidade no agrupamento dos genótipos com base no coeficiente de correlação cofenético. A análise simultânea dos dados com o uso do algoritmo de Gower demonstrou eficiência nos resultados, pois expressou a relação de influência existente entre os tipos de características avaliadas no agrupamento dos acessos. As variáveis quantitativas que mais contribuíram para divergência entre os acessos foram: peso de fruto, peso da casca e peso da polpa sem semente.

Palavras-chave: Genótipos, Variabilidade, Melhoramento Genético, Caracterização.

MULTIVARIATE PROCEDURES IN THE CLUSTERING OF PASSION-FRUIT GENOTYPES BASED ON COMBINED DISTANCE MATRIX AND IN SEPARATE FOR QUANTITATIVE AND CATEGORIC CHARACTERISTICS

Author: Darlan Bispo dos Santos

Advisor: Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Ledo

ABSTRACT: The identification of genotypes with important characteristics for genetic breeding programs is fundamental to the development of superior materials. However, in interspecific breeding, the knowledge of the genetic variability present in base populations aiming optimizing genetic gains is key. The objective of the present work was to characterize 24 accessions of the Passion-fruit Germplasm Bank at Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, by cluster analysis using the Mahalanobis distance for quantitative data, the Cole-Rogers distance for the multicategoric data and Jaccard's distance for the molecular data and combined analysis of the combined data using Gower's algorithm. Among the separate analysis, the molecular data presented greater reliability for the grouping of the genotypes according to the cophenetic correlation value. The combined analysis of the data using Gower's algorithm demonstrated to be efficient since it expressed the relationship of influence existing between the types of characteristics evaluated in clustering. The quantitative variables which most contributed to the dissimilarity between accessions were: fruit weight, peel weight and weight of pulp without seed.

Key-words: Genotypes, Variability, Genetic Breeding, Characterization.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	08
REFERÊNCIAS	12
CAPÍTULO I - AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM O USO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, AGRONÔMICAS E MOLECULARES ISOLADAMENTE.	
RESUMO	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO II - AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM O USO DE VARIÁVEIS DISCRETAS E CONTÍNUAS SIMULTANEAMENTE.	
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54
CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	59

INTRODUÇÃO

A família *Passifloraceae* é predominantemente tropical, reunindo cerca de 19 gêneros e 530 espécies, sendo *Passiflora* o gênero mais diverso com aproximadamente 400 espécies descritas (Bernacci, 2003). O Brasil e a Colômbia, grandes produtores de maracujá, são os países com maior diversidade de *Passifloraceae*. Entretanto, *P. edulis Sims* (formas amarelo e roxa), é a espécie que ocupa 95% dos pomares brasileiros cultivados com esta fruteira (Meletti *et al.*, 2005).

Segundo Araújo (1980), no Brasil, a cultura do maracujá começou a ganhar importância econômica a partir da década de 1970. Atualmente, essa fruteira é plantada em quase todos os estados brasileiros, proporcionando melhorias na economia e renda em inúmeros municípios (Ferreira, 2005). Vale ressaltar que a região Nordeste do Brasil é a principal produtora, responsável por 68% da produção, com uma área cultivada de 33.405 ha e cerca de 465.925 t anuais, destacando-se os Estados da Bahia, Ceará e Sergipe como os maiores produtores (IBGE, 2010).

O nome maracujá, uma denominação geral dada ao fruto e à planta de várias espécies do gênero *Passiflora*, é derivada do nome indígena tupi **marajú-yá**, que corresponde ao fruto de **marahú**, que é, por sua vez, derivado de **ma-rã-ú**, que significa coisa de sorver ou que se toma de sorvo (Medina, 1980). A denominação do gênero *Passiflora*, ou flor da paixão, tem origem religiosa devido à semelhança da flor com os símbolos da Paixão de Jesus Cristo (Oliveira, 1980).

Com base em Ferreira (2005), apesar do grande destaque da cultura no “ranking” mundial, as pesquisas no Brasil não têm acompanhando esse crescimento de forma adequada, principalmente, em relação ao melhoramento e a obtenção de variedades resistentes a pragas e doenças.

Vários fatores afetam a produção do maracujá, tanto em qualidade quanto em quantidade, sendo que os principais são: cultivo de variedades inadequadas; mudas de baixa qualidade e/ou com problemas fitossanitários; ausência de irrigação nas regiões sujeitas a déficit hídrico e de um esquema adequado de adubação, o mesmo

se verificando em relação à correção inicial de acidez do solo; falta de tecnologia para o manejo adequado de pragas e doenças e para utilização de polinização manual (Sousa, 2005).

De acordo com Meletti *et al.* (1992), o gênero *Passiflora* apresenta ampla variabilidade genética para ser explorada, em termos de florescimento, produtividade, características do fruto e resistência a pragas e doenças. Também, é relevante ressaltar, baseado em Junqueira *et al.* (2005), que algumas espécies de *Passiflora* silvestres têm grande potencial para contribuir com o melhoramento genético do maracujazeiro comercial, por apresentarem, além da resistência a doenças e a algumas pragas, outras características interessantes, como longevidade, autocompatibilidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, androginóforo mais curto, que facilita a polinização por insetos menores, e maior concentração de componentes químicos funcionais.

Bruckner & Otoni (1999), consideram que os principais métodos e estratégias de melhoramento genético utilizados em *Passiflora* são a introdução de plantas, a seleção massal, a hibridação sexual interespecífica, a hibridação sexual intervarietal e a seleção por teste de progênies. Para implementação destas ações, é preciso que haja variação genética e nessa perspectiva surgem os bancos de germoplasma que são locais onde se mantém a conservação *ex situ* de material genético representativo da diversidade genética de espécies de interesse. Além de manter os genótipos de interesse, um banco de germoplasma realiza também atividades de prospecção, coleta, introdução, intercâmbio, quarentena, caracterização, conservação, inspeção, multiplicação e regeneração do germoplasma (Ramalho *et al.*, 2004).

O sucesso de um programa de melhoramento reside na existência de variabilidade e neste sentido, é recomendado para formação de população-base o intercruzamento entre genótipos superiores e divergentes. Essa divergência pode ser avaliada a partir de características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras. As informações múltiplas de cada cultivar são expressas em medidas de dissimilaridade, que representam a diversidade que há no conjunto de genótipos estudados.

Para Dias *et al.* (1997), a divergência entre acessos, avaliada por estatística multivariada, pode proporcionar uma descrição sintética da afinidade genética entre acessos e populações. Assim, a quantificação da dissimilaridade genética é um dos mais importantes parâmetros estimados pelos melhoristas de plantas, principalmente quando o objetivo é a obtenção de segregantes transgressivos e populações de ampla variabilidade genética como proposto por Benin *et al.* (2003).

O uso de técnicas multivariadas é um dos fatores que tem impulsionado o aumento nos estudos sobre divergência genética entre acessos de banco de germoplasma. Elas são baseadas em algoritmos ou medidas de distância que consideram simultaneamente inúmeras características selecionadas nos experimentos de caracterização e avaliação de germoplasma (Vilela *et al.*, 2008). Entre as técnicas disponíveis, a análise por componentes principais, por variáveis canônicas e os métodos aglomerativos são os mais utilizados. O método aglomerativo tem como princípio reunir os genótipos em grupos, de tal forma que haja homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos. Esta metodologia depende do cálculo das medidas de dissimilaridade provenientes de variáveis quantitativas e qualitativas.

Para decidir até que ponto dois elementos de um mesmo conjunto podem ser considerados como semelhantes ou não, é necessário considerar as medidas que descrevam a similaridade entre os elementos amostrais de acordo com as características que neles foram avaliadas. Essas medidas podem ser estimadas com base na avaliação morfológica do fenótipo da planta (Cruz e Regazzi, 1997), por meio de dados moleculares através do polimorfismo de DNA (Oliveira, 1998; Diniz Filho, 2000), ou ainda mediante informações disponíveis da genealogia (Van Beuningen e Buseh, 1997; Kim e Ward, 1997). Cruz (2008), apresenta os procedimentos para estimar medidas de dissimilaridade com base em variáveis quantitativas (distâncias Euclidianas ou Mahalanobis), binárias (índice de Jaccard, Nei e Li, etc.) e multicategóricas (Cole-Rodgers).

Sokal e Rohlf (1962) relatam que, dos métodos hierárquicos aglomerativos, o UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetic averaging*), é o que apresenta os dendrogramas com coeficiente de correlação cofenético (CCC) máximo. Segundo os referidos autores, a adequação do método hierárquico é feita por meio do CCC, que é calculado entre os elementos da matriz de dissimilaridade e

os elementos da matriz cofenética. É, pois, uma medida de concordância entre os valores originais de dissimilaridade e aqueles representados no dendrograma, usando-se somente os valores encontrados acima da diagonal das referidas matrizes.

A análise conjunta de diferentes tipos de variáveis pode fornecer uma melhor indicação da potencialidade quanto à variabilidade existente em bancos de germoplasma. Entretanto, poucos trabalhos têm utilizado esta metodologia para quantificação da dissimilaridade genética, com a cultura do maracujazeiro, em virtude da falta de conhecimento de técnicas estatísticas que permitem essa abordagem e a falta de programas computacionais livres que possam analisar tal procedimento. Contudo, Gower (1971) propôs uma técnica que permite a análise simultânea das distâncias entre características quantitativas e qualitativas. Este método permite que valores da matriz de distância fiquem compreendidos entre 0 e 1. Alguns trabalhos que utilizaram esta abordagem são relatados, como por exemplo, os estudos feitos com *Brassica napus* L. por Rodriguez *et al.* (2005), com *Triticum aestivum* L. por Vieira *et al.* (2007), com *Solanum lycopersicum* por Gonçalves *et al.* (2009), e com genótipos de maracujazeiro por Godoy *et al.* (2007).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a variabilidade genética entre 24 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de maracujazeiro (BAG - Maracujá) da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), por meio da análise de agrupamento com a utilização de dados quantitativos, qualitativos e de marcadores moleculares, separados e simultaneamente.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, B. C. Maracujá em Sergipe – situação atual e perspectivas. In: Encontro Estadual da Cultura do Maracujá, 1. Aracaju, SE, 1980. **Anais...** Aracaju: EMATER-SE, p. 67 - 76, 1980.

BENIN, G. *et al.* Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatística multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. **Ciência Rural**, v. 33, p. 657 - 662, 2003.

BERNACCI, L. C. *Passifloraceae*. In: WANDERLEY, M. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETT, A. M.; MELHEM, T. S. (Coord.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, v. 3, p. 247 – 248, 2003.

BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. H. Hibridação em maracujá. In: BORÉM, A. (Ed). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, p. 379 - 399, 1999.

CRUZ, C. D. **Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Divergência genética**. In: Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. Métodos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, v. 6, p. 287 – 324, 1997.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, G. C. T. Divergência genética multivariada na preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao L.*). **Agrotropica**, v. 9, p. 29 - 40, 1997.

DINIZ FILHO, J. A. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 2, p. 41 - 51.

GODOY, R. C. B. *et al.* Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos frutos. **Revista Ceres**, v. 54, n. 316, p. 541 - 547, 2007.

GONÇALVES, L. S. A. *et al.* Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1, p. 364 - 374, 2009.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**. v. 27, n. 4, p. 857 - 874, 1971.

IBGE. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 05 de jan. 2010.

JUNQUEIRA, N. T. V. *et al.* Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 4, p. 81 - 107, 2005.

KIM, H. S.; WARD, R. W. Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) based on RFLPs and coefficient of parentage. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 3/4, p. 472 - 479, 1997.

MEDINA, J. C. *et al.* **Maracujá: da cultura ao processamento e comercialização**. Secretaria da Agricultura e Abastecimento/ ITAL. Campinas. 207 p. 1980.

MELETTI, L. M. M. *et al.* Caracterização de germoplasma de maracujazeiro (*Passiflora* sp). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 14, n. 2, p. 157 - 162, 1992.

MELETTI, L. M. M. *et al.* Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 3, p. 55 - 78.

OLIVEIRA, A. C. Construção de Mapas Genéticos em Plantas. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

OLIVEIRA J. C. **Melhoramento genético de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. visando ao aumento de produtividade**. 1980. 113f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3 ed. Lavras: UFLA, 2004. p. 25 - 30.

RODRÍGUEZ, V. M. *et al.* The nabicol: A horticultural crop in northwestern Spain. **Euphytica**, v. 142, n. 3, p.237 - 246, 2005.

SOKAL, R. R. e ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods **Taxon**, v. 11, p. 33 - 40, 1962.

SOUSA, J. S. I. **Poda das plantas frutíferas**. São Paulo: Nobel, 2005, 191p.

VAN BEUNINGEN, L. T.; BUSEH, R. H. Genetic diversity among North American spring wheat cultivars: I. Analysis of the coefficient of parentage matrix. **Crop Science**, v. 37, p. 570 - 579, 1997.

VIEIRA, E. A. *et al.* Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 392 - 399, 2007.

VILELA, F. O. *et al.* Effect of recurrent selection on the genetic variability of the UNB-2U popcorn population using RAPD markers. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 25 - 30, 2008.

CAPÍTULO I

AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM O USO DE
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, AGRONÔMICAS E MOLECULARES
ISOLADAMENTE

AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM O USO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, AGRONÔMICAS E MOLECULARES ISOLADAMENTE

RESUMO: O conjunto de informações relacionadas aos descritores qualitativos, quantitativos de interesse agrônômico e aos marcadores moleculares é de fundamental importância na determinação da variabilidade genética de bancos de germoplasma e no planejamento de programas de melhoramento genético. O objetivo deste capítulo foi realizar a análise de agrupamento para variáveis qualitativas, quantitativas e de marcadores moleculares binários e posterior agrupamento para definição da diversidade genética entre genótipos de maracujazeiro utilizando as Distâncias de Cole-Rodgers, Mahalanobis e Jaccard. Foram avaliadas 18 características quantitativas, 16 qualitativas e 18 marcadores moleculares do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), em 24 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de maracujazeiro (BAG – Maracujá), da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF). As análises dos dados demonstraram que dentre os acessos estudados, o BGM44r, BGM123r, BGM180 e BGM221 apresentaram maior divergência com base nos dados quantitativos; o BGM049r e BGMRJ baseado nos dados moleculares e, com relação aos dados multicategóricos o BGM183. A análise molecular apresentou a maior eficiência na caracterização dos acessos com base nos coeficientes de correlação cofenético. Foram identificadas as características quantitativas: peso do fruto, peso da casca e peso da polpa sem semente, como sendo as que mais contribuíram para a divergência entre os acessos.

Palavras-chave: *Passiflora*, Germoplasma, diversidade genética.

CLUSTER ANALYSIS OF PASSION-FRUIT GENOTYPES USING MORPHOLOGIC, AGRONOMIC AND MOLECULAR CHARACTERISTICS SEPARATELY

ABSTRACT: The data related to qualitative, quantitative with agronomic interest and molecular markers is fundamental in the determination of the genetic variability in germplasm banks and for strategies of genetic breeding programs. The objective of this chapter was to carry out the cluster analysis for qualitative, quantitative and binary molecular marker data and further cluster for the defining of the genetic diversity between passion-fruit genotypes using the Cole-Rogers, Mahalanobis and Jaccard's distance. Eighteen quantitative, 16 qualitative and 18 ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) molecular markers were used in 24 accessions of the Passion-Fruit Germplasm Bank at Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF). The data analysis demonstrates that among the accessions studied, BGM44r, BGM123r, BGM180 and BGM221 were more divergent based on the quantitative data; BGM049r and BGMRJ based on molecular data and in regard to multicategoric data, BGM183. The molecular analysis presented greater efficiency in the characterization of the accessions. The following quantitative characteristics that mostly contributed for the divergence between accessions were: fruit weight, peel weight and weight of pulp without seeds.

Key-words: *Passiflora*, Germplasm, genetic diversity.

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence à família *Passifloraceae* e ao gênero *Passiflora*, constituído por mais de 400 espécies distribuídas pelos trópicos, principalmente no Brasil, centro de origem de pelo menos 1/3 das espécies. A área cultivada com maracujá no país evoluiu de 25.390 ha, em 1990, para 48.752 ha, em 2008, o que representa aumento de 92% segundo o IBGE (2010). Em termos de produção, a região Nordeste produz 68% do total ofertado no mercado interno, e a Bahia lidera a produção nacional, com 40,25% do volume total, que é destinada ao consumo *in natura* e à industrialização (IBGE, 2010).

Por ser considerado centro de origem do maracujá, o Brasil possui ampla variabilidade genética, que é o ponto de partida para qualquer programa de melhoramento genético e cuja caracterização e avaliação são ferramentas indispensáveis aos trabalhos de fitomelhoramento visando o desenvolvimento de novas variedades.

O melhoramento genético possibilita a geração de cultivares com caracteres superiores. Neste caso, o desafio do melhorista é reunir em uma só constituição genética, o maior número possível de caracteres favoráveis. Entretanto, para que um programa de melhoramento genético tenha êxito, com economia de recursos e tempo, é necessário que os cruzamentos sejam efetuados entre genitores com elevada capacidade de combinação, conforme Allard (1999). Dessa forma, o melhorista tende a concentrar seus esforços nos cruzamentos entre indivíduos contrastantes para que sejam obtidas populações segregantes com elevada frequência de indivíduos transgressivos, especialmente nos caracteres relacionados à produtividade, qualidade e resistência a pragas e doenças.

Estudos que envolvem a divergência em plantas têm sido realizados frequentemente, com base em descritores botânicos, morfológicos e agronômicos, por não apresentarem custos elevados de acordo com Dias *et al.*

(1997). No entanto, as interpretações desses dados têm, habitualmente, sido feitas por análises univariadas, o que gera dificuldades na obtenção das estimativas de divergência e, conseqüentemente, na seleção de indivíduos desejáveis para intercruzamentos, pois diferenças existentes entre grupos ou populações não é dependente de uma única variável e sim de um conjunto delas. Assim, as técnicas multivariadas têm se mostrado úteis, por avaliar o indivíduo em vários aspectos e proporcionar uma visão holística de cada acesso como consideram Cruz *et al.* (2004).

Na predição da divergência genética, vários métodos multivariados podem ser aplicados, como componentes principais, variáveis canônicas e métodos aglomerativos. O método aglomerativo depende do cálculo das medidas de dissimilaridade provenientes de variáveis quantitativas e qualitativas, pois cada genótipo constitui-se como um grupo inicial, que se unem em etapas posteriores, segundo suas similaridades, em grupos de tal forma que haja homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos (Crossa e Franco, 2004).

As medidas de distância podem ser estimadas com base na avaliação morfológica do fenótipo da planta (Cruz e Regazzi, 1997), por meio de dados moleculares através do polimorfismo de DNA (Oliveira, 1998; Diniz Filho, 2000), ou ainda mediante informações disponíveis da genealogia (Van Beuningen e Buseh, 1997; Kim e Ward, 1997). Cruz (2008) apresenta os procedimentos para estimar medidas de dissimilaridade com base em variáveis quantitativas (distâncias euclidianas ou de Mahalanobis), binárias (índice de Jaccard, Nei e Li, etc.) e multicategóricas (Cole-Rodgers *et al.*, 1997).

A avaliação da divergência genética, como critério para a escolha de genitores em programas de melhoramento, foi relatada por diversos autores a exemplo de Maluf *et al.* (1983), Miranda *et al.* (1988), Dias *et al.* (1997), Vidigal *et al.* (1997), Ribeiro *et al.* (1999) e Ferrão *et al.* (2002).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a variabilidade genética entre genótipos de maracujazeiro por meio da análise de agrupamento de dados quantitativos, qualitativos e de marcadores moleculares, isoladamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados e caracterizados 24 acessos de maracujazeiro, conforme apresentados na Tabela 1. Estes acessos pertencem ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (BAG - Maracujá), localizado em um latossolo amarelo distrófico a moderado, com textura franco argilo-arenosa, declive de 0 a 3%, a precipitação pluviométrica anual média da região é de 1.224 mm, a temperatura média anual é de 23,80°C, a umidade relativa do ar de 80% e a altitude de 220m. Todos os acessos avaliados pertencem à espécie *Passiflora edulis*, variedade amarela ou roxa.

Tabela 1. Relação dos acessos de maracujazeiro pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (BAG - Maracujá), avaliados no presente trabalho.

Nº	Acessos	Espécie	Origem
1	BGM007	<i>Passiflora edulis</i>	Minas Gerais
2	BGM028	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
3	BGM032	<i>Passiflora edulis</i>	Parana
4	BGM044r	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
5	BGM049r	<i>Passiflora edulis</i>	Brasília
6	BGM121	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
7	BGM123r	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
8	BGM164	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
9	BGM180	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
10	BGM181	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
11	BGM183	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
12	BGM185	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
13	BGM189	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
14	BGM190	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
15	BGM205	<i>Passiflora edulis</i>	Rio Grande do Sul
16	BGM207	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
17	BGM210	<i>Passiflora edulis</i>	Minas Gerais
18	BGM221	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
19	BGM222	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
20	BGM223a	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
21	BGM224	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
22	BGM225	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
23	BGMRBa	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
24	BGMRJ	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia

Para a caracterização e avaliação dos acessos, foram analisadas 18 variáveis quantitativas (Tabela 2), 16 variáveis qualitativas (Tabela 3) e 18 marcadores moleculares do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

Tabela 2. Relação das variáveis quantitativas estudadas.

Variáveis quantitativas	Medida expressa em
Peso do fruto (PFr)	g
Peso da casca (PCas)	g
Formato do fruto (FFr) = razão entre comprimento e largura	cm
Comprimento do fruto (CFr)	cm
Largura do fruto (LFr)	cm
Peso da polpa sem semente (Ppol-Sem)	g
Peso da polpa com semente (Ppol+sem)	g
Espessura da casca (Ecas)	cm
Rendimento da polpa com as sementes (Rpol+Sem)	%
Rendimento da polpa sem as sementes (Rpol-Sem)	%
Diâmetro do caule (Dcau)	cm
Largura da folha (Lfo)	cm
Comprimento da folha (Cfo)	cm
Comprimento do pecíolo (Cpec)	cm
Diâmetro do pecíolo (DP)	cm
Acidez total titulável (ATT)	%
Sólidos solúveis totais (SST)	° brix
Razão entre SST e ATT (Rátio)	-

Tabela 3. Relação das variáveis qualitativas avaliadas, com suas respectivas classificações.

Variáveis qualitativas	Classificação					
	1	2	3	4	5	6
Formato do fruto (Forfr)	Oval	Oblonga	Arredondada	Oblata	Elipsóide	Oboval
Coloração do fruto (Cfru)	Amarelo	Amarelo avermelhado	Roxo	-	-	-
Pigmentação da casca (Pgcas)	Amarela	Vermelha	Roxa	-	-	-
Cor da polpa (Cpol)	Amarelo avermelhado	Amarelo	Amarelo pálido	-	-	-
Forma da semente (Fsem)	Redonda	Oval	Angulosa			
Superfície da semente (Ssem)	Rugosa	Lisa	Intermediária			
Coloração da semente (Csem)	Cinza	Marrom	Preta	-	-	-
Superfície do caule (Scaule)	Áspera	Média	Macia	-	-	-
Vigor da planta (Vpl)	Reduzido	Médio	Elevado	-	-	-
Coloração do pecíolo (Cpec1)	Verde	Roxo	Esverdeado	Rosado	-	-
Folha madura: formato da folha (Ffolh)	Cordata	Elíptica	Lanceolada	Ovalada	Palmada	Trifoliada

(Continuação Tabela 3)

Folha madura: formato da base da folha (Fbf1)	Auriculata	Cordata	Oblíqua	-	-	-
Folha madura: formato do ápice da folha (Fpf1)	Mucronado	Agudo	Obtuso	Acuminado	-	-
Coloração da folha madura (Cflm)	Verde claro	Verde	Verde escuro	-	-	-
Consistência da folha (Cfl)	Coriácea	Membranosa	-	-	-	-
Rugosidade da superfície da folha (Rgp1)	Fraca	Média	Forte	-	-	-

Para as análises moleculares, o DNA foi extraído das plantas de acordo com o protocolo sugerido por Doyle & Doyle (1990). As concentrações do DNA foram estimadas em gel de agarose 1% por meio da comparação com uma série diluição de DNA comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA) de concentração conhecida, corado com brometo de etídio (1,0 mg/mL).

Quarenta e sete iniciadores de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) foram testados em acessos fenotipicamente contrastantes e 18 demonstraram polimorfismo e boa resolução os quais foram selecionados para análises posteriores.

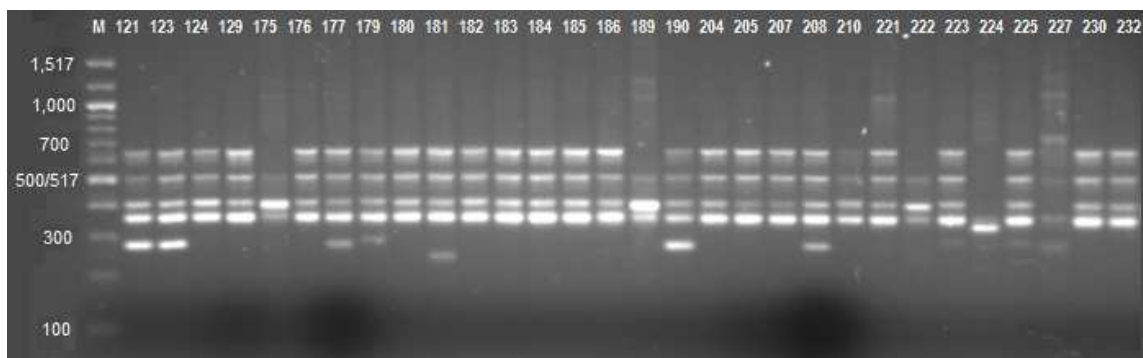


Figura 1 – Padrões de gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com o primer DiGA3'T. M representa a escala de 100 bp (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA).

O mix de PCR (25 μ L) para a análise de ISSR foi composto por: 20 ng de DNA genômico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$,

0,2 mM de cada dNTPs, 0,3 μ M do iniciador e 1,0 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA).

A amplificação foi feita em termociclador PTC-100 (MJ Reaerch, Inc., Watertown, MA) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 40 segundos, 48° C por 40 segundos, e 72° C por 1 min, com extensão final a 72° C por 2 min.

Após a PCR as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2%, tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio. O "ladder" de 100 pb (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) foi utilizado como padrão molecular para tamanhos de bandas. A eletroforese foi realizada a 120V por 2 horas. Após a corrida, os géis foram visualizados e gravados em equipamento Lourmat (Viber lourmat Bio-Technology, Marne lê Valle, France).

As bandas de ISSR reprodutíveis foram avaliadas como ausente (0) ou presente (1) para cada um dos 24 acessos. O loco foi considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais presente não era superior a 0,99. As diferenças qualitativas na intensidade das bandas não foram consideradas.

Uma medida de distância foi utilizada para cada tipo de variável sendo que para as variáveis quantitativas, após a padronização, calculou-se a distância generalizada de Mahalanobis segundo Cruz & Regazzi (2001), pois além das variâncias de cada variável, ela considera a covariância entre elas. Para as variáveis multicatóricas a distância de Cole-Rodgers (Cole-Rodgers *et al.*, 1997) e para as moleculares a distância de Jaccard (Dias,1998).

Agrupamentos hierárquicos das análises a partir das matrizes de distância genética foram obtidos pelos métodos de UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (Sneath e Sokal, 1973). A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético de acordo com Sokal & Rohlf (1962). Para a análise de agrupamento dos dados quantitativos foi realizada uma análise de variância intergrupos através do teste t e obtida a contribuição relativa das variáveis quantitativas para divergência entre os genótipos conforme Singh (1981). A significância dos coeficientes de correlação cofenético foi calculada pelo teste de Mantel (1967) com 10.000 permutações, utilizando o programa Genes como sugerido por Cruz (2008) bem

como, a obtenção das matrizes de distância genética e o cálculo dos coeficientes de correlação cofenético. Os dendrogramas foram obtidos pelo programa Statistica (Statsoft, 2005). A análise de variância foi realizada através do programa SAS (SAS Institute, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das variáveis moleculares realizada com a distância de Jaccard apresentou o maior coeficiente de correlação cofenético entre as matrizes de agrupamento, com valor de correlação de 0,92. As análises para as variáveis quantitativas e multicategóricas apresentaram valores de 0,78 e 0,65, respectivamente (Tabela 4).

Conforme sugerem Bussab *et al.* (1990), análises de agrupamento são aceitáveis se produzirem um coeficiente de correlação cofenético a partir de 0,80. Entretanto, outros autores como Rohlf & Fisher (1968), consideram como bons resultados para os coeficientes valores superiores a 0,91. Assim, infere-se que os resultados obtidos pelos coeficientes de correlação cofenético para as variáveis quantitativas e qualitativas foram os de menor fidedignidade de associação.

Tabela 4. Coeficientes de correlação cofenético e número de grupos formados em função das matrizes de distâncias genéticas estimadas para os dados quantitativos, qualitativos e moleculares provenientes da análise em 24 acessos de maracujazeiro.

Matriz de distância	Coeficiente de correlação Cofenético	Números de grupos formados
Quantitativos	0,78**	6 ¹
Multicategóricos	0,65**	5
Moleculares	0,92**	5

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel com 10.000 permutações. ¹ Fundamentado na média da matriz de agrupamento.

Alguns autores justificam que coeficientes com valores compreendidos entre 0,60 e 0,80 são provenientes do pequeno número de variáveis utilizadas. Contudo, sabe-se que existem outros fatores que também podem influenciar nos valores dos coeficientes como tipo e quantidade das variáveis e a qualidade dos dados obtidos. Deve-se ressaltar também, que não existe tão somente o

coeficiente de correlação cofenético para avaliar a qualidade da análise de agrupamento. Cormack (1971) enumera as medidas de distorção de Sokal e Rohlf, Guttman, Gower, Jardine, Hartigan, Anderson, Shepard e Sammon. Barroso e Artes (2003), por sua vez exibem a utilização de métodos de avaliação que utilizam Gráfico de Silhueta, Gráfico de Perfil e Gráfico de Radar.

Os pontos de corte, definidos pela média da matriz de agrupamento (0,45 0,58 e 26,79), promoveu a formação de 5, 5 e 6 grupos para as análises baseadas nos dados multicategóricos, moleculares e quantitativos, respectivamente, apresentados nas Figuras 2, 3 e 4.

No ponto de corte com base na média das distâncias da matriz de agrupamento dos dados quantitativos (26,79), foi definida a formação de 6 grupos, apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Relação dos grupos definidos pela matriz de agrupamento dos dados quantitativos.

GRUPOS					
I	II	III	IV	V	VI
BGM044r	BGMRJ, BGMRBa	BGM123r	BGM180	BGM221	BGM007, BGM028, BGM121, BGM190, BGM032, BGM049r, BGM164, BGM181, BGM183, BGM185, BGM189, BGM205, BGM207, BGM210, BGM222, BGM223a, BGM224, BGM225.

Com base na Figura 2, é possível inferir que dentre os acessos avaliados, o BGM044r apresentou maior dissimilaridade. Esta divergência pode estar associada à diferença significativa entre os valores dos dados obtidos das variáveis quantitativas: Pfru, Lfr, Cfr, Ecas, Pcas, Ppol+Sem, Ppol-Sem, Rpol+Sem, ATT, SST e Rácio. Entretanto, os acessos BGM123r, BGM180 e o BGM221 também apresentaram considerável divergência quanto as variáveis: Dp, Ppol+Sem, SST, Cfr, Ffr, Rpol+Sem, Rpol-Sem, Rácio, Dcau, Pfr, Lfr, Ecas, Pcas e Ppol-Sem formando também grupos distintos. Verifica-se que não houve uma estruturação geográfica em relação à similaridade entre acessos de mesmo Estado ou Região, já que os outros acessos de mesma origem foram alocados em grupo diferente.

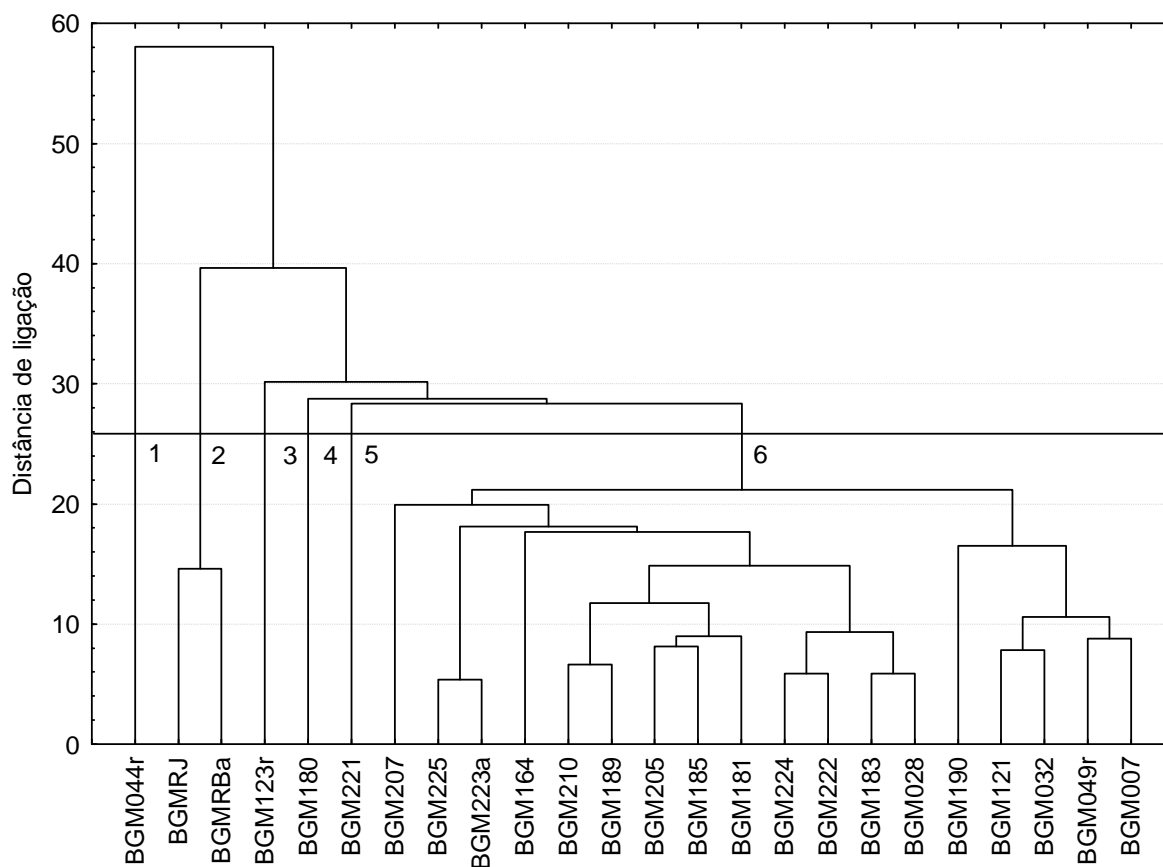


Figura 2 – Dendrograma de dissimilaridades genéticas de dados quantitativos de 24 acessos de maracujazeiro do BAG - Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, obtido pelo método UPGMA fundamentado na distância generalizada de Mahalanobis.

Na Tabela 6, são apresentados os resultados da análise de variância intergrupos onde se observa que 100% das variáveis analisadas contribuíram de forma significativa para divergência entre os grupos do ponto de vista estatístico pelo teste F, porém, em magnitudes diferentes com destaque para peso do fruto e peso da casca.

Tabela 6. Análise de variância intergrupo para as variáveis quantitativas.

Variáveis	Quadrado Médio do Erro
Diâmetro do caule (Dcau)	0,7340**
Largura da folha (Lfo)	79,3856**
Comprimento da folha (Cfo)	15,6055**
Comprimento do pecíolo (Cpec)	1,9121**
Diâmetro do pecíolo (DP)	0,0172**
Peso do fruto (PFr)	45244,0447**
Largura do fruto (LFr)	21,5006**

(Continuação Tabela 6)

Comprimento do fruto(CFr)	29,4035**
Formato do fruto = razão entre comprimento e largura (FFr)	0,1327**
Espessura da casca (Ecas)	1474,1625**
Peso da casca (PCas)	15835,0420**
Peso da polpa com semente (Ppol+sem) em g	5591,0996**
Peso da polpa sem semente (Ppol-sem) em g	9792,2882**
Rendimento da polpa com as sementes (Rpol+Sem)	623,6167**
Rendimento da polpa sem as sementes (Rpol-Sem)	530,1607**
Acidez total titulável (ATT)	8,0509**
Sólidos solúveis totais (SST)	66,5006**
Razão entre SST e ATT (Ratio)	43,1508**

** e * significativo em 1 e 5% de probabilidade pelo teste de F.

Na Figura 3, o ponto de corte referente à média das distâncias da matriz de agrupamento dos dados multicategóricos (0,45), delimitou a formação de 5 grupos listados na Tabela 7.

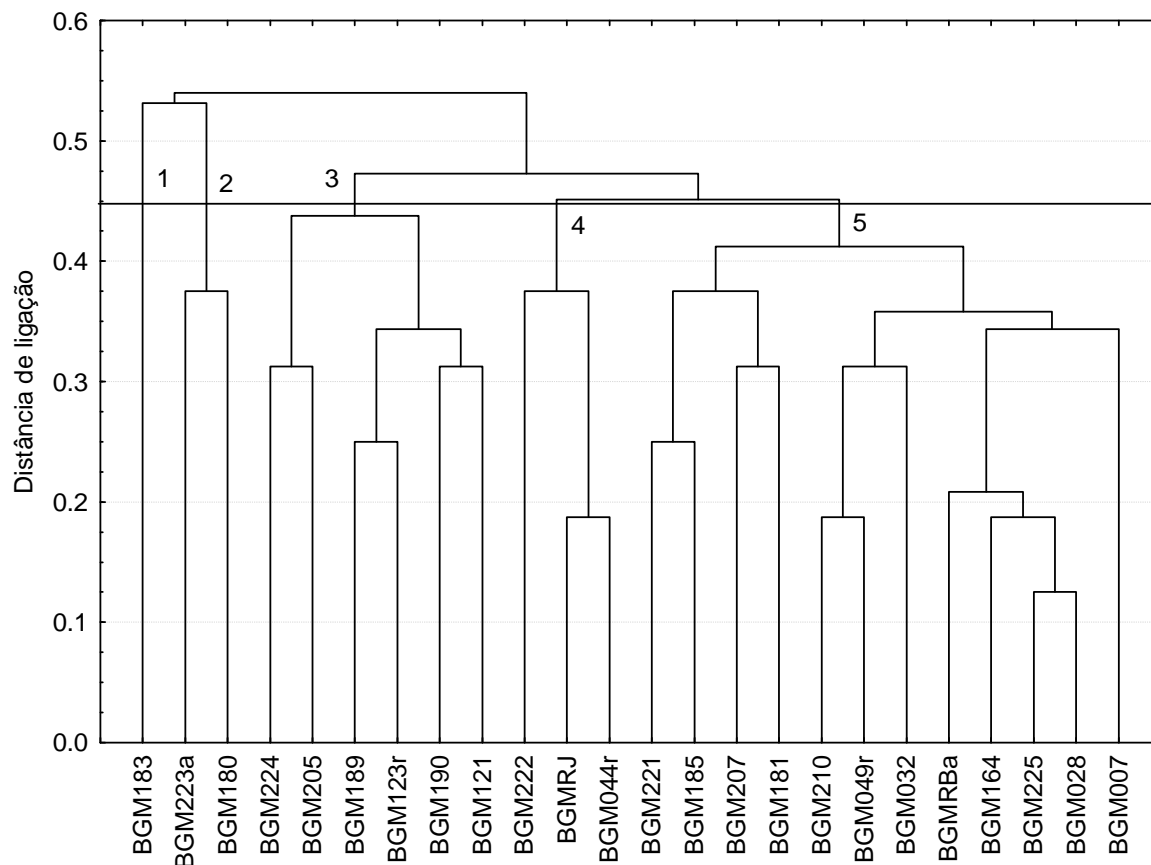


Figura 3 – Dendrograma de dissimilaridades genética de dados multicategóricos de 24 acessos de maracujazeiro do BAG - Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, obtido pelo método UPGMA baseado na distância de Cole-Rodgers.

Tabela 7. Relação dos grupos obtidos pela matriz de agrupamento dos dados multicategóricos.

GRUPOS				
I	II	III	IV	V
BGM183	BGM180, BGM223a	BGM121, BGM190, BGM189, BGM205, BGM224, GM123r.	BGM222, BGM044r, BGMRJ	BGM007, BGM028, BGM225, BGM164, BGMRBa, BGM032, BGM049r, BGM210, BGM181 BGM207, BGM185, BGM221.

Com relação à Figura 3, o acesso BGM183 apresentou maior dissimilaridade com relação aos dados das variáveis qualitativas descritas na Tabela 3.

A Figura 3 proporciona deduzir que o grupo I foi constituído apenas pelo acesso BGM183, o qual apresentou considerável distinção aos demais acessos com relação às variáveis: Scaule e Fpfl. No grupo II, os 2 acessos que o constituiu tiveram a mesma classificação para: Ffolh e Fsem. No grupo III, formado por 6 indivíduos, a similaridade foi com a classificação obtida para: Cfru, Pgcas, Cpol, Csem, Ffolh e Fpfl. O grupo IV, com 3 acessos, apresentou similaridade para: Pgcas, Cpol, Fsem, Ssem, Vpl, Scaule, Ffolh e Rgp1. Por fim, o grupo V foi formado por 12 genótipos que apresentaram similaridade quanto à classificação para Ssem e Vpl.

Segundo Lopes (1991), o gênero *Passiflora* é originário da América do Sul, com o Centro-Norte do Brasil sendo seu maior centro de dispersão geográfica, fato que pode explicar a divergência expressa nos grupos obtidos com base nos dados qualitativos, principalmente com relação ao acesso BGM183. Entretanto, observa-se uma variabilidade genética dentro dos grupos, a qual pode ser resultante da seleção prévia dos acessos baseada em dados fenotípicos, como formato dos frutos, constatado por Junqueira e Braga (2005).

Na Tabela 9, verifica-se que as variáveis peso de fruto, peso da casca e peso da polpa sem semente foram as que mais contribuíram para divergência genética entre os genótipos. Neste sentido, é notória a relevância dos resultados obtidos em programas de melhoramento genéticos da cultura.

Tabela 9. Contribuição relativa dos caracteres para divergência genética entre os genótipos avaliados – Singh (1981)

Variável	S. J	Valor (%)
Diâmetro do caule (Dcau)	940,60	0,09
Largura da folha (Lfo)	281,34	0,27
Comprimento da folha (Cfo)	304,74	0,29
Comprimento do pecíolo (Cpec)	229,51	0,22
Diâmetro do pecíolo (DP)	136,05	0,13
Peso do fruto (PFr)	518734,80	49,43
Largura do fruto (LFr)	3610,42	0,34
Comprimento do fruto (CFr)	2148,00	0,20
Formato do fruto = razão entre comprimento e largura (FFr)	1601,34	0,15
Espessura da casca (Ecas)	305,62	0,29
Peso da casca (PCas)	279025,94	26,59
Peso da polpa com semente (Ppol+sem) em g	128,63	0,12
Peso da polpa sem semente (Ppol-sem) em g	240087,19	22,88
Rendimento da polpa com as sementes (Rpol+Sem)	280,49	0,27
Rendimento da polpa sem as sementes (Rpol-Sem)	183,17	0,17
Acidez total titulável (ATT)	107,41	0,10
Sólidos solúveis totais (SST)	50,60	0,05
Razão entre SST e ATT (Ratio)	1259,13	0,12

Dos dezoito Primes ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) selecionados foram gerados um total de 227 bandas das quais 98% foram consideradas polimórficas, com uma média de 12,61 bandas por primer. O número de bandas polimórficas geradas por primer variou de 4 a 22.

No dendrograma apresentado na Figura 4, o ponto de corte referente à média das distâncias da matriz de agrupamento dos dados moleculares (0,58), possibilitou a formação de 5 grupos descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Relação dos grupos delimitados pela matriz de agrupamento dos dados moleculares.

GRUPOS				
I	II	III	IV	V
BGM049r	BGMRJ	BGM121, BGM123r, BGM181, BGM183, BGM185, BGM190, BGM205, BGM221, BGM225, BGM222, BGM223a, BGM224, BGM207, BGM189, BGM210, BGM180.	BGM032, BGMRBa, BGM164.	BGM007, BGM028, BGM044r.

O coeficiente de correlação cofenética referente aos dados moleculares (0,92) apresentado na Tabela 4, revelou elevado ajuste entre a representação gráfica das distâncias genéticas e a matriz de distância genética original, o que assegura as inferências realizadas por meio da avaliação visual da Figura 4.

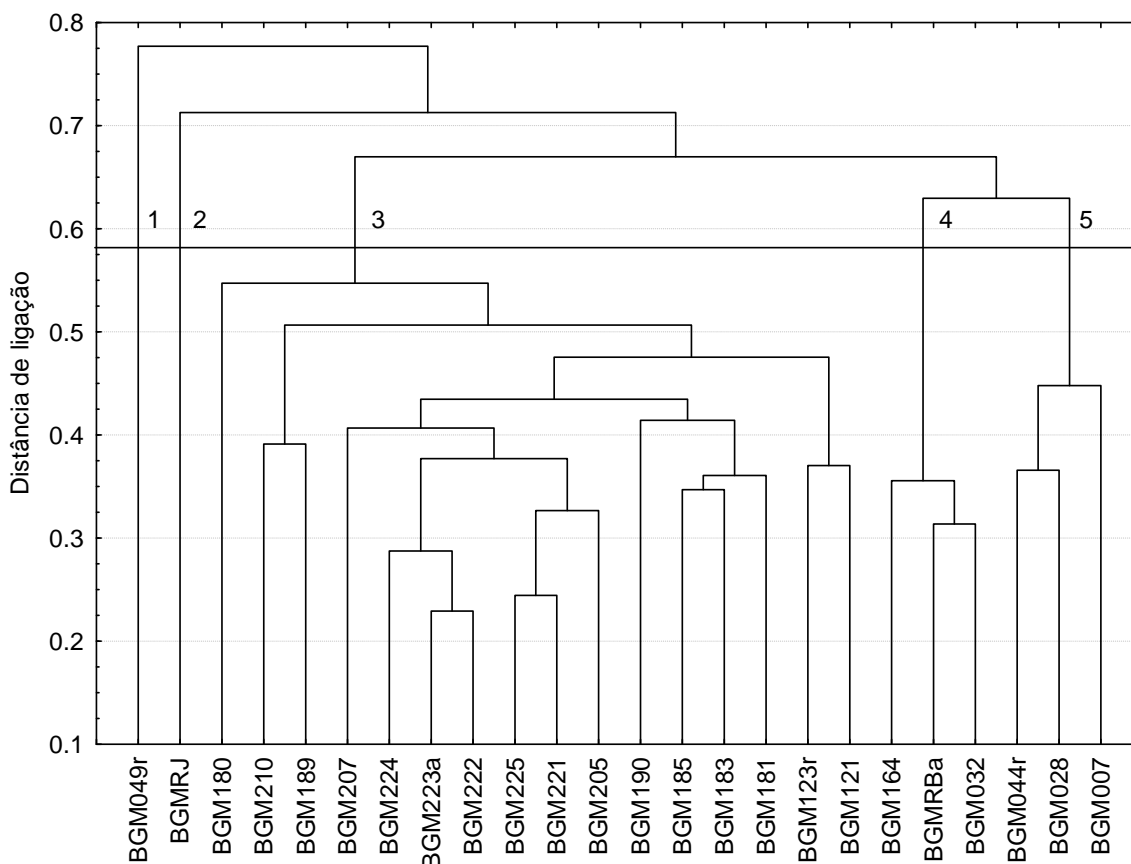


Figura 4 – Dendrograma de dissimilaridades genéticas de dados moleculares de 24 acessos de Maracujazeiro do BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), obtido pelo método UPGMA baseado na distância de Jaccard (Dias, 1998).

Conforme Souza *et al.* (2008), os marcadores moleculares permitem fazer distinção entre indivíduos diretamente ao nível de DNA e têm permitido acessar a variabilidade genética dentro de um pool gênico de espécies perenes. Nesta perspectiva, foi possível constatar a eficiência na análise molecular, com base em Bussab *et al.* (1990) e Rohlf e Fisher (1968), que demonstrou a existência de dissimilaridade para os acessos BGMRJ e BGM049r os quais foram alocados em grupos distintos.

Gouvêa (2009) considera os marcadores moleculares de grande utilidade, pois eles podem ser utilizados em qualquer etapa de desenvolvimento da planta o que resulta em ganho de tempo na obtenção de resultados e, além disso, não sofrem influência ambiental, o que reforça a necessidade de utilizá-los nas análises.

De acordo com Maldonado *et al.* (2003), a variabilidade é uma característica do gênero *Passiflora* considerando que algumas das espécies são alógamas, autoincompatíveis e se cruzam com facilidade. Assim, os marcadores têm um papel de cunho estratégico nos trabalhos de melhoramento genético na identificação de genótipos superiores.

Alguns trabalhos desenvolvidos com o intuito de determinar a divergência genética entre genótipos, utilizando caracteres morfoagronômicos e marcadores moleculares, apresentaram resultados relevantes no âmbito do trabalho de melhoramento genético, a exemplo de Silva (2006) e Zuin (2006). Porém, levando em consideração a importância sócio-econômica da cultura do maracujazeiro no Brasil, o uso da análise multivariada como metodologia de trabalho deveria ser mais explorada.

CONCLUSÕES

Com base nas análises de agrupamento para caracteres morfológicos, agronômicos e de marcadores moleculares, pode-se afirmar que existe variabilidade genéticos entre os acessos estudados os quais, apresentaram potencial significativo para programas de melhoramento genético da cultura do maracujazeiro.

A análise dos dados moleculares apresentou a maior fidedignidade na caracterização dos acessos com base nos coeficientes de correlação cofenético.

As variáveis quantitativas que mais contribuíram para divergência genética entre os acessos foram: peso do fruto, peso da casca e peso da polpa sem semente.

REFERÊNCIAS

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 254p.

BARROSO, L. P.; ARTES, R. **Análise multivariada**. Lavras: UFLA, 2003. 151p.

BUSSAB, W. de O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à Análise de Agrupamentos**. In: 9º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, São Paulo. Associação Brasileira de Estatística, 105p.,1990.

COLE-RODGERS, P.; SMITH, D. W.; BOSLAND, P. W. A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations using *Capsicum* as an example. **Crop Science**, v. 37, p. 1000 - 1002, 1997.

CORMACK, R. A review of classification. **Journal of the Royal Statistical Society (Series A)**, v. 134, p.321 - 367, 1971.

CROSSA, J.; FRANCO, J. Statistical methods for classifying genotypes. **Euphytica**, v. 137, n.1, p. 19 - 37, 2004.

CRUZ, C. D. **Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Divergência genética**. In: CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2001. p. 287 - 324.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Divergência genética**. In: Cruz, C. D.; Regazzi, A. J. Métodos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 1997. v. 6, p. 287 - 324.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Divergência genética**. In: CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. (Ed.). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 2004. v. 1, p. 377 - 413.

DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In. ALFENAS, A. C. Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, p. 405 - 473, 1998.

DIAS, L. A. dos S.; KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, G. C. T. Divergência genética multivariada na preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao L.*) **Agrotropica**, v. 9, p. 29 - 40, 1997.

DINIZ FILHO, J. A. **Métodos filogenéticos comparativos**. Ribeirão Preto: Holos, 2000.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 27:13-15, 1990.

FERRÃO, M. A. G. *et al.* Divergência genética em feijoeiro em condições de inverno tropical. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 1089 - 1098, 2002.

GOUVÊA, L. R. L. **Divergência genética em seringueira estimada através de técnicas multivariadas e marcadores moleculares microsatélites**. 2009, 100f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônomo IAC, Campinas.

IBGE. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 05 de jan. 2010.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 2, p. 41 - 51.

KIM, H. S.; WARD, R. W. Genetic diversity in Eastern U.S. soft winter wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) based on RFLPs and coefficient of parentage. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 3/4, p. 472 - 479, 1997.

LOPES, S. C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A. R. **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 201 - 209.

MALDONADO, J. F. M. *et al.* Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinada por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 489 - 493, 2003.

MALUF, W. R.; FERREIRA, P. E. Análise multivariada da divergência genética em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.). **Horticultura Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 31 - 34. 1983.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, n. 2, p. 209 - 220, 1967.

MIRANDA, J. E. C.; COSTA, C. P.; CRUZ, C. D. Predição do comportamento de híbridos de pimentão (*Capsicum annum* L.) pela divergência genética dos progenitores. **Revista Brasileira de Genética**, v.11, p. 929 - 937, 1988.

NEI, M.; LI, W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 5256 - 5273, 1979.

OLIVEIRA, A. C. Construção de Mapas Genéticos em Plantas. In: MILACH, S. C. K. **Marcadores de DNA em Plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

RIBEIRO, F. E.; SOARES, A. R.; RAMALHO, M. A. P. Divergência genética entre populações de coqueiro-gigante-do-Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p.1615 - 1622, 1999.

ROHLF, F. J.; FISHER D. L. Test for hierarchical structure in random data sets. **Systematic Zoology**, v.17, p. 407 - 412. 1968.

SAS INSTITUTE. **SAS Technical Report**. SAS/STAT software: Changes and Enhancement, Release 9.1. 3, Cary NC: SAS Institute. 2006.

SILVA, P. P. **Divergência Genética em Genótipos de Cana de Açúcar (*Saccharum* spp), através de caracteres morfoagronômicos e por marcadores moleculares**. 2006, 96 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alagoas.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.41, n.1, p.237 - 245, 1981.

.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v.11, p. 33 - 40, 1962.

SOUZA, I. G. B.; DINIZ, F. M.; SOUZA, V. A. B.; VALENTE, S. E. S.; BARROS, F. B.; LIMA, P. S. C. Similaridade genética entre genótipos de manga com base em marcadores RAPD. **XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**. Vitória/ES, 2008.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (data analysis software system), version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA), 2005.

VAN BEUNINGEN, L. T.; BUSEH, R. H. Genetic diversity among North American spring wheat cultivars: I. Analysis of the coefficient of parentage matrix. **Crop Science**, v. 37, p. 570 - 579, 1997.

VIDIGAL, M. C. G. *et al.* Divergência genética entre cultivares de mandioca por meio de estatística multivariada. **Revista Caatinga**, v. 56, p. 263 - 271, 1997.

ZUIN, G. C. **Divergência genética entre cultivares de mandioca-de-mesa (*Manihot Esculenta* Crantz), coletadas no município de Cianorte - PR, por meio de descritores morfoagronômicos e marcadores moleculares RAPD.** 2006. 105f. Dissertação (Mestrado). Maringá: Universidade Estadual de Maringá

CAPÍTULO II

AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM O USO DE VARIÁVEIS QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS SIMULTANEAMENTE

¹Artigo que será submetido ao Comitê Editorial do periódico científico revista Euphytica

AGRUPAMENTO DE GENÓTIPOS DE MARACUJAZEIRO COM O USO DE VARIÁVEIS QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS SIMULTANEAMENTE

RESUMO: Para que um programa de melhoramento genético tenha êxito, com economia de recursos e tempo, é necessário que os cruzamentos sejam efetuados entre genitores com elevada capacidade de combinação geralmente associada à maior divergência dos parentais. A análise simultânea de características qualitativas, quantitativas e de marcadores moleculares tem sido apontada como uma ferramenta útil na estimativa da divergência genética entre acessos em bancos de germoplasmas. Este capítulo teve como objetivo realizar a análise de agrupamento utilizando variáveis qualitativas, quantitativas e marcadores moleculares simultaneamente em acessos de maracujazeiro pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de maracujazeiro (BAG – Maracujá), da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), por meio do Algoritmo de Gower. Foi constatada a eficiência da análise simultânea dos dados com o uso do algoritmo de Gower, pois expressou a relação de influência existente entre os tipos de características avaliadas no agrupamento dos acessos bem como, a grande influência das características quantitativas: PFr, LFr, CFr, Ecas, PCas, Rpol-Sem e Rpol+Sem na formação dos grupos.

Palavras Chave: melhoramento genético, distância genética, algoritmo de Gower.

CLUSTERING OF PASSION-FRUIT GENOTYPES USING QUANTITATIVE AND QUALITATIVE VARIABLES SIMULTANEOUSLY

ABSTRACT: In order for a genetic breeding program to succeed, saving resources and time, it is necessary that crosses be made between progenitors with high combination capacity usually associated to greater divergence between them. The simultaneous analysis of qualitative, quantitative variables and molecular marker has been pointed out as a useful tool in estimating genetic divergence between accessions in germplasm banks. The objective of this chapter is to carry out the cluster analysis using qualitative, quantitative variables and molecular marker data simultaneously in passion-fruit accessions from the Passion-fruit Germplasm Bank at Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), using Gower's algorithm. The simultaneous analysis of the data using Gower's algorithm was efficient and expressed the relationship of influence between the types of characteristics evaluated in the cluster analysis as well as the great influence of the quantitative characteristics: PFr, LFr, CFr, Ecas, PCas, Rpol-Sem and Rpol+without cluster formation.

Key-words: genetic breeding, genetic distance, Gower's algorithm.

INTRODUÇÃO

A família *Passifloraceae* compreende cerca de 19 gêneros e 530 espécies, com distribuição tropical e subtropical, particularmente na América e África. O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial dessa cultura segundo Ferreira (2005) e, por tradição, os cultivos comerciais em quase todo o país, conforme Meletti *et al.* (2005), são realizados com o maracujazeiro-azedo ou maracujazeiro-amarelo, ambos pertencentes à espécie *Passiflora edulis* Sims (Bernacci *et al.*, 2008).

O conhecimento da divergência genética é fundamental para o direcionamento dos cruzamentos visando à obtenção de populações segregantes com potencial para seleção de novas variedades. Neste sentido, a caracterização e avaliação do germoplasma é uma das estratégias mais utilizadas, primeiramente para que se conheçam as características de cada material e em segundo plano para estruturar a diversidade genética. Para isso, comumente são utilizados diversos descritores morfológicos e agronômicos.

O emprego de cruzamentos permite a incorporação de material genético, a produção de heterose e a manipulação da complementariedade, associando-se características desejáveis de dois ou mais genótipos. Segundo Fonseca *et al.* (2000), a heterose obtida em características reprodutivas geralmente é maior que nas características de produção. Esse fato é particularmente importante, uma vez que características reprodutivas têm baixa herdabilidade e são difíceis de ser melhoradas por seleção.

O sucesso da exploração da heterose e da complementariedade depende, fundamentalmente, da divergência genética dos progenitores. A utilização de progenitores com altos índices de produtividade e de grande divergência genética poderá gerar indivíduos mais produtivos e com grande variabilidade genética (Piassi *et al.*, 1995).

A utilização da distância genética por meio de caracteres fenotípicos representa uma técnica auxiliar de grande importância nos programas de

melhoramento genético de plantas, fornecendo informações úteis na caracterização, conservação e utilização dos recursos genéticos disponíveis.

Considerando-se que as características de importância econômica são correlacionadas e que essas correlações possuem magnitude e sentido variáveis, a utilização de técnicas multivariadas é mais apropriada em virtude das características serem consideradas simultaneamente obtendo-se interpretações que não seriam possíveis com o uso da estatística univariada como proposto por James & McCulloch (1990) e Freitas *et al.* (1998). Além disso, a utilização dessas técnicas possibilita a estimação mais precisa de parâmetros genéticos pela inclusão de um maior número de informações nas análises, o que seria interessante para as características de baixa herdabilidade (Fonseca *et al.*, 2000).

Moura *et al.* (1999), considera muito vantajosa na determinação da dissimilaridade entre acessos a utilização simultânea de diversos caracteres para identificar a variabilidade genética.

Sudré *et al.* (2007) e Vilela *et al.* (2008), afirmam que o uso de técnicas multivariadas é um dos fatores que tem impulsionado o aumento dos estudos sobre divergência genética entre diferentes espécies. Análises multivariadas são baseadas em algoritmos, ou medidas de distância, que consideram simultaneamente inúmeras características consideradas nos experimentos de caracterização e avaliação de germoplasma. Entre as técnicas disponíveis, a análise por componentes principais, por variáveis canônicas e os métodos aglomerativos são os mais utilizados de acordo com Mohammadi e Prasanna (2003). O método aglomerativo tem como princípio reunir os genótipos em grupos, de tal forma que haja homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre os grupos. Esta metodologia depende do cálculo das medidas de dissimilaridade provenientes de variáveis quantitativas e qualitativas.

A geração de um grande número de dados de diferentes tipos (categóricas e quantitativas) pode ser um fator que dificulta a análise e a interpretação dos resultados de caracterização e avaliação do germoplasma, muitas vezes resultando na incompleta distinção entre os acessos. Porém, a análise conjunta das variáveis pode fornecer uma melhor indicação quanto à potencialidade da variabilidade existente em bancos de germoplasma. Contudo, poucos trabalhos têm utilizado esta estratégia para quantificação da dissimilaridade genética. Isso pode ser resultante

da falta de conhecimento das técnicas estatísticas que permitem essa abordagem e a falta de programas computacionais livres que possam analisar tal procedimento.

Uma técnica que permite a análise simultânea de dados quantitativos e qualitativos foi proposta por Gower (1971). Este método permite que valores da matriz de distância fiquem compreendidos entre 0 e 1.

Alguns trabalhos que se utilizam desta abordagem são relatados, como por exemplo, os estudos feitos com *Brassica napus* L. (Rodriguez *et al.*, 2005), com *Triticum aestivum* L. (Vieira *et al.*, 2007), com *Solanum lycopersicum* (Gonçalves *et al.*, 2008), com batata (Silva *et al.*, 2009), com bananeira (Mattos *et al.*, 2010) e com maracujazeiro (Godoy *et al.*, 2007). Porém, foram poucos os estudos encontrados com a cultura do maracujazeiro utilizando a análise de agrupamento simultânea de características qualitativas e quantitativas.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a variabilidade genética entre acessos de maracujazeiro por meio da análise de agrupamento, simultânea, de dados morfoagronômicos e de marcadores moleculares utilizando o algoritmo de Gower (1971).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram caracterizados e avaliados 24 acessos de maracujazeiro no BAG - Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMPF), conforme apresentado na Tabela 1, localizado em um latossolo amarelo distrófico a moderado, com textura franco argilo-arenosa, declive de 0 a 3%, a precipitação pluviométrica anual média da região é de 1.224 mm, a temperatura média anual é de 23,80 °C, a umidade relativa do ar de 80% e a altitude de 220 m.

Tabela 1. Relação dos acessos de maracujazeiro pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (BAG - Maracujá), avaliados no presente trabalho.

Nº	Acessos	Espécie	Origem
1	BGM007	<i>Passiflora edulis</i>	Minas Gerais
2	BGM028	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
3	BGM032	<i>Passiflora edulis</i>	Parana
4	BGM044r	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia

(Continuação Tabela 1)

5	BGM049r	<i>Passiflora edulis</i>	Brasília
6	BGM121	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
7	BGM123r	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
8	BGM164	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
9	BGM180	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
10	BGM181	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
11	BGM183	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
12	BGM185	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
13	BGM189	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
14	BGM190	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
15	BGM205	<i>Passiflora edulis</i>	Rio Grande do Sul
16	BGM207	<i>Passiflora edulis</i>	São Paulo
17	BGM210	<i>Passiflora edulis</i>	Minas Gerais
18	BGM221	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
19	BGM222	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
20	BGM223a	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
21	BGM224	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
22	BGM225	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
23	BGMRBa	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia
24	BGMRJ	<i>Passiflora edulis</i>	Bahia

Na caracterização e avaliação dos acessos foram analisadas 18 variáveis quantitativas (Tabela 2), 16 variáveis qualitativas (Tabela 3) e 18 marcadores moleculares do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*).

Tabela 2. Relação das variáveis quantitativas avaliadas.

Variáveis quantitativas	Medida expressa em
Peso do fruto (PFr)	g
Peso da casca (PCas)	g
Formato do fruto (FFr) = razão entre comprimento e largura	cm
Comprimento do fruto (CFr)	cm
Largura do fruto (LFr)	cm
Peso da polpa sem semente (Ppol-Sem) em g	g
Peso da polpa com semente (Ppol+sem) em g	g
Espessura da casca (Ecas)	cm
Rendimento da polpa com as sementes (Rpol+Sem)	%
Rendimento da polpa sem as sementes (Rpol-Sem)	%
Diâmetro do caule (Dcau)	cm
Largura da folha (Lfo)	cm
Comprimento da folha (Cfo)	cm
Comprimento do pecíolo (Cpec)	cm
Diâmetro do pecíolo (DP)	cm
Acidez total titulável (ATT)	%
Sólidos solúveis totais (SST)	° BRIX
Razão entre SST e ATT (Ratio)	-

Tabela 3. Relação das variáveis qualitativas estudadas com suas respectivas classificações.

Variáveis qualitativas	Classificação					
	1	2	3	4	5	6
Formato do fruto	Oval	Oblonga	Arredondada	Oblata	Elipsóide	Oboval
Coloração do fruto	Amarelo	Amarelo avermelhado	Roxo	-	-	-
Pigmentação da casca	Amarela	Vermelha	Roxa	-	-	-
Cor da polpa	Amarelo avermelhado	Amarelo	Amarelo pálido	-	-	-
Forma da semente	Redonda	Oval	Angulosa			
Superfície da semente	Rugosa	Lisa	Intermediária			
Coloração da semente	Cinza	Marrom	Preta	-	-	-
Superfície do caule	Áspera	Média	Macia	-	-	-
Vigor da planta	Reduzido	Médio	Elevado	-	-	-
Coloração do pecíolo (Cpec1)	Verde	Roxo	Esverdeado	Rosado	-	-
Folha madura: formato da folha	Cordata	Elíptica	Lanceolada	Ovalada	Palmada	Trifoliada
Folha madura: formato da base da folha	Auriculata	Cordata	Oblíqua	-	-	-
Folha madura: formato do ápice da folha	Mucronado	Agudo	Obtuso	Acuminado	-	-
Coloração da folha madura	Verde claro	Verde	Verde escuro	-	-	-
Consistência da folha	Coriácea	Membranosa	-	-	-	-
Rugosidade da superfície	Fraca	Média	Forte	-	-	-

Para as análises moleculares, o DNA foi extraído das plantas de acordo com o protocolo sugerido por Doyle & Doyle (1990). As concentrações do DNA foram estimadas em gel de agarose 1% por meio da comparação com uma série diluição de DNA comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA) de concentração conhecida, corado com brometo de etídio (1,0 mg/mL).

Quarenta e sete iniciadores de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) foram testados em acessos fenotipicamente contrastantes e 18 demonstraram polimorfismo e boa resolução os quais foram selecionados para análises posteriores.

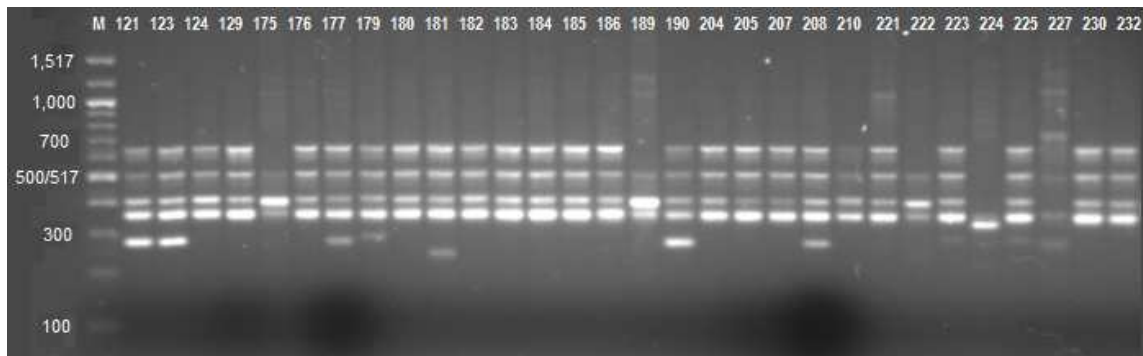


Figura 1 – Padrões de gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com o primer DiGA3'T. M representa a escala de 100 bp (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA).

O “mix” de PCR (25 μ L) para a análise de ISSR foi composto por: 20ng de DNA genômico 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,3 μ M do iniciador e 1,0 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA).

A amplificação foi feita em termociclador PTC-100 (MJ Reaerch, Inc., Watertown, MA) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94° C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94° C por 40 segundos, 48° C por 40 segundos, e 72° C por 1 min, com extensão final a 72° C por 2 min.

Após o PCR as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2%, tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio. O ladder de 100 pb (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) foi utilizado como padrão molecular para tamanhos de bandas. A eletroforese foi realizada a 120V por 2 horas. Após a corrida, os géis foram visualizados e gravados em equipamento Lourmat (Viber lourmat Bio-Technology, Marne lê Valle, France).

As bandas de ISSR bem reprodutíveis foram avaliadas como ausente (0) ou presente (1) para cada um dos 24 acessos. O loco foi considerado polimórfico se a frequência do alelo mais presente não fosse superior a 0,99. As diferenças qualitativas na intensidade das bandas não foram consideradas.

A análise conjunta dos dados qualitativos, quantitativos e dos marcadores moleculares foi realizada para determinação da distância genética, com base no algoritmo de Gower (1971), expresso por:

$$S_{ij} = \frac{\sum_{k=1}^p W_{ijk} \cdot S_{ijk}}{\sum_{K=1}^p W_{ijk}}$$

em que K é o número de variáveis ($k = 1, 2, \dots, p =$ número total de características avaliadas); i e j dois indivíduos quaisquer; W_{ijk} é um peso dado a comparação ijk , atribuindo valor 1 para comparações válidas e valor 0 para comparações inválidas (quando o valor da variável está ausente em um ou ambos indivíduos); S_{ijk} é a contribuição da variável k na similaridade entre os indivíduos i e j , ele possui valores entre 0 e 1. Para uma variável nominal, se o valor da variável k é a mesma para ambos os indivíduos, i e j , então $S_{ijk} = 1$, caso contrário, é igual a 0; para uma variável contínua $S_{ijk} = 1 - |x_{ik} - x_{jk}| / R_k$ onde x_{ik} e x_{jk} são os valores da variável k para os indivíduos i e j , respectivamente, e R_k é a amplitude de variação da variável k na amostra. A divisão por R_k elimina as diferenças entre escalas das variáveis, produzindo um valor dentro do intervalo $[0, 1]$ e pesos iguais.

Os agrupamentos hierárquicos dos acessos foram obtidos pelos métodos de UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (Sneath & Sokal, 1973). A validação dos agrupamentos foi determinada pelo coeficiente de correlação cofenético (CCC) como proposto por Sokal & Rohlf (1962).

A significância da correlação cofenética foi calculada pelos testes t conforme Box (1987) e Mantel (1967), com 10.000 permutações. Para a obtenção das matrizes de distância genética da análise conjunta foi utilizado o programa R (R Development Core Team, 2006) e o cálculo dos coeficientes de correlação cofenético foi utilizado o programa Genes (Cruz, 2008). O dendrograma foi obtido pelo programa Statistica (Statsoft, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para os coeficientes de correlação cofenéticos referentes às variáveis quantitativas, multicategóricas e moleculares, são apresentados na Tabela 4, com os respectivos valores: 0,78, 0,65, 0,92. Entretanto, Bussab *et al.* (1990), só consideram aceitável a análise de agrupamento com coeficiente de correlação cofenético a partir de 0,80. Assim, infere-se que o resultado obtido pelo coeficiente de correlação cofenético para as variáveis qualitativas avaliadas revelou a menor fidedignidade. É relevante ressaltar que são encontrados trabalhos aceitos apresentando coeficiente de correlação cofenético com valores a partir de 0,60, pois alguns autores consideram que o tipo e a quantidade de variáveis bem como, a qualidade dos dados obtidos, podem influenciar os resultados. Com relação ao coeficiente de correlação cofenético obtido através da análise simultânea, obteve-se um valor eficiente de correlação (0,90). Neste sentido, é relevante destacar que o respectivo valor de correlação é superior ao valor aceitável que foi proposto por Bussab *et al.* (1990) de 0,80, o que reflete em uma maior fidedignidade da análise.

Tabela 4. Coeficientes de correlação cofenético e o número de grupos formados em função das matrizes de distâncias provenientes da análise simultânea e individuais das variáveis quantitativas, multicategóricas e marcadores moleculares de 24 acessos de maracujazeiro.

Matriz de distância	Coeficiente de correlação Cofenético	Números de grupos formados
Simultânea	0,90**	5 ¹
Quantitativa	0,78**	6
Multicategórica	0,65**	5
Molecular	0,92**	5

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel com 10.000 permutações. ¹ Baseado na média da matriz de agrupamento.

A análise simultânea pelo algoritmo de Gower também foi utilizada para identificar a variabilidade entre os genótipos de maracujazeiro (Godoy *et al.*, 2007) e de bananeira (Mattos *et al.*, 2010) pela sua maior eficiência em expressar a divergência. No ponto de corte, referente à média das distâncias da matriz de agrupamento dos dados analisados de forma simultânea (0,28), foram formados 5 grupos (Tabela 5).

Tabela 5. Relação dos grupos definidos pela matriz de agrupamento dos dados analisados de forma simultânea.

GRUPOS				
I	II	III	IV	V
BGMRJ	BGM180	BGM121, BGM123r, BGM190, BGM181, BGM207, BGM183, BGM205, BGM185, BGM221, BGM225, BGM222, BGM224, BGM223a, BGM189, BGM210.	BGM032, GMRBa, BGM164.	BGM007, BGM049r, BGM044r, BGM028.

De acordo com a Figura 1, os acessos BGMRJ, BGM180 foram alocados em grupos isolados (I e II). Este resultado pode estar relacionado ao fato dos respectivos acessos apresentarem valores bastante divergentes dos demais com relação às características quantitativas: PFr, LFr, CFr, Ecas, PCas, Rpol-Sem e Rpol+Sem. É importante destacar que dentre os 24 acessos avaliados, o BGMRJ apresentou os menores valores para as variáveis: PFr, LFr, CFr, Ecas, PCas e o BGM180 os maiores valores para: Rpol-Sem e Rpol+Sem, expressando informações importantes na avaliação dos acessos em trabalhos de melhoramento genético. Com relação às variáveis multicategóricas, não foi observado nenhuma influência no agrupamento dos acessos.

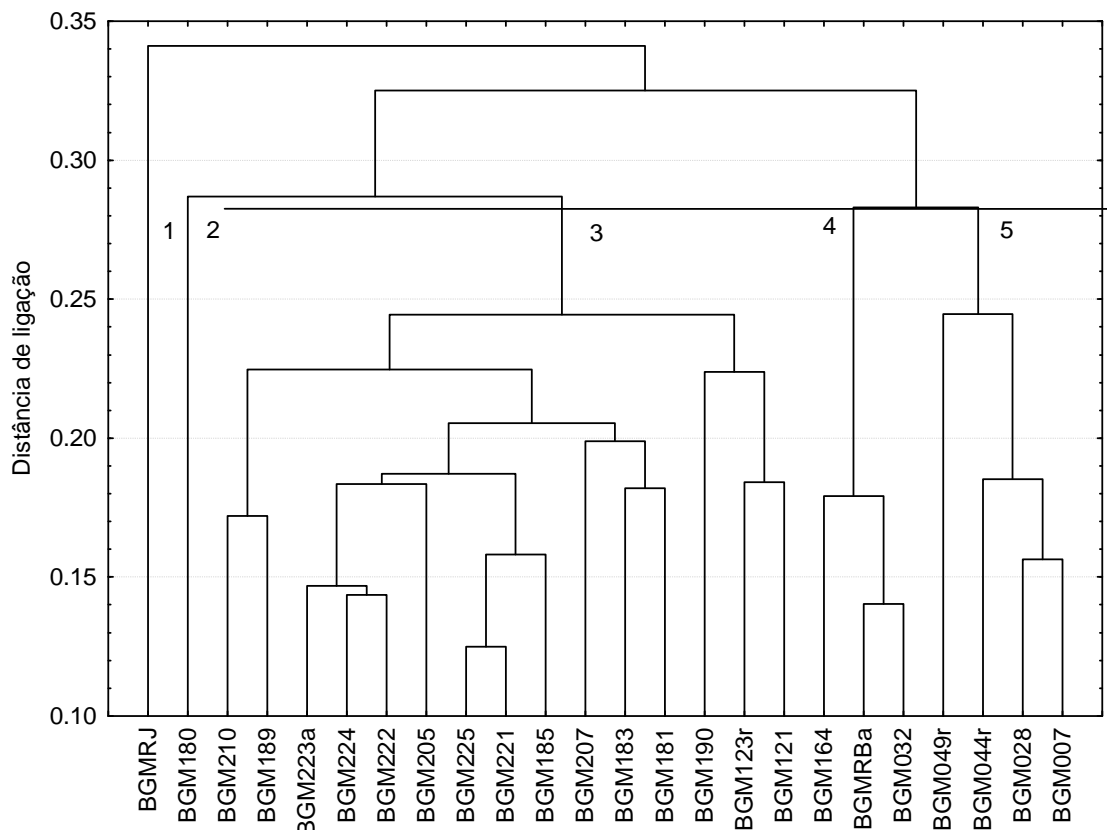


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridades genética entre 24 acessos de maracujazeiro, obtido pelo método UPGMA baseado no algoritmo de Gower a partir de variáveis quantitativas, qualitativas e de marcadores moleculares.

A utilização de variáveis qualitativas e quantitativas separadamente segmenta as inferências e conclusões sobre a divergência genética entre os acessos, limitando, às vezes, a utilização posterior dos indivíduos selecionados em programas de melhoramento genético. Nesta perspectiva, conforme Sudré *et al.* (2007) e Vilela *et al.* (2008), a análise simultânea realizada demonstrou a relação de influência entre os dados multicategóricos, quantitativos e de marcadores moleculares expressa através do valor ponderado do Coeficiente de Correlação Cofenético obtido.

Singh *et al.* (1991), ao relatarem que a melhor forma de se identificar divergência entre genótipos é o uso combinado de marcadores moleculares e descritores agromorfológicos por promoverem um complemento nos resultados, comprovando a eficiência dos resultados com a análise simultânea.

A distância proposta por Gower também foi utilizada por Rodríguez *et al.* (2005), para estudar em conjunto variáveis qualitativas e quantitativas oriundas de

28 caracteres morfológicos e agronômicos em *Brassica napus* L. Com o estudo, os autores determinaram a adequação do germoplasma estudado para o cultivo de verão e estimaram a divergência genética entre as populações locais.

A análise simultânea permite que, além de variáveis agronômicas e morfológicas, sejam utilizadas variáveis provenientes de marcadores moleculares. Nesta perspectiva é relevante ressaltar que, segundo Gonçalves *et al.* (2008), o tipo e a quantidade podem comprometer a eficiência da análise, pois algumas variáveis podem apresentar maior influência na divergência, conforme constatado por Godoy *et al.* (2007). Gonçalves *et al.* (2008), também sugere a utilização dos coeficientes de correlação por serem adimensionais para avaliar as características utilizadas.

Entretanto, segundo Gouvêa (2009), a utilização de caracteres fenotípicos e de marcadores moleculares pode fornecer uma visão mais completa acerca da diversidade genética dos materiais avaliados. Neste sentido, é imprescindível a prévia definição das variáveis que serão utilizadas para aumentar o grau de precisão dos resultados das análises. Essa associação vem sendo proposta por diversos autores no estudo de diversas culturas, a exemplo Silva *et al.* (2009) e Arriel *et al.* (2006) apresentando as suas vantagens.

Priyadarshan e Clement-Demange (2004), também constataram a relevância do uso da análise simultânea de variáveis discretas e contínuas através da antecipação no tempo de identificação das características desejáveis para a cultura da seringueira.

Na cultura do feijão, Chioratto (2004) ao caracterizarem a diversidade existente entre 220 acessos do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo (IAC), concluíram que descritores agromorfológicos e marcadores moleculares devem ser usados juntos em estudos de diversidade de germoplasma e caracterização de feijão comum, pois contribuem para confiabilidade dos resultados e correta compreensão da relação entre os acessos. Assim, é notória a importância quanto o uso da análise simultânea no estudo da diversidade genética nos trabalhos de pesquisa que visam o melhoramento da cultura do maracujá em virtude do seu considerável papel sócio-econômico na economia no Brasil.

CONCLUSÕES

Foi verificada divergência genética entre os acessos selecionados no BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMT), em Cruz das Almas - BA, com relação às características avaliadas, podendo ser úteis em programas de melhoramento que visem à obtenção de plantas que atendam às expectativas ambientais e comerciais.

Foi verificada a grande influência das características quantitativas: PFr, LFr, CFr, Ecas, PCas, Rpol-Sem e Rpol+Sem na formação dos grupos.

O método de Gower foi eficiente na discriminação dos grupos considerando a análise conjunta dos descritores estudados, demonstrando que a análise simultânea de dados qualitativos, quantitativos e de marcadores moleculares é viável e pode permitir uma maior eficiência no conhecimento da divergência genética entre acessos de bancos de germoplasma por considerar a influência resultante da interdependência entre as respectivas características.

REFERÊNCIAS

ARRIEL, N. H. C. *et al.* Técnicas multivariadas na determinação da diversidade genética em gergelim usando marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.5, p.801-809, 2006.

BERNACCI, L.C. *et al.* *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p. 566-576, 2008.

BOX, F. J. Guinness, Gosset, fisher, and small samples. **Journal Statistical Science**. v. 2, n 1, p. 45 - 52, 1987.

BUSSAB, W. O.; MIAZAKI, E. S.; ANDRADE, D. F. **Introdução à Análise de Agrupamentos**. In: 9º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística, São Paulo. Associação Brasileira de Estatística, 105p.,1990.

CHIORATO, A. F. **Análise da divergência genética de acessos do banco de germoplasma de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)** do IAC. 2004. 85p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico IAC.

CRUZ, C. D. **Programa Genes (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 27:13 - 15, 1990.

FERREIRA, F. R. Recursos Genéticos de Passiflora. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 2, p. 41 - 51.

FONSECA, *et al.* Estudo da divergência genética entre raças suínas utilizando técnicas de análise multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 390 - 395, 2000.

FREITAS, R. T. F. *et al.* Análise dialéctica de características de leitegada de suínos usando-se variáveis canônicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, p. 700 - 7006, 1998.

GODOY, R. C. B. *et al.* Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos frutos. **Revista Ceres**, v. 54, n. 316, p. 541 - 547, 2007.

GONÇALVES, L. S. A. *et al.* Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multicategóricos. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 362 – 368, 2008.

GOUVÊA, L. R. L. **Divergência genética em seringueira estimada através de técnicas multivariadas e marcadores moleculares microssatélites**. 2009, 100f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agrônômico IAC.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, v. 27, n. 4, p. 857 - 874. 1971.

JAMES, F. C.; McCULLOCH, C. E. Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or Pandora's box? **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 43, p. 129 - 166, 1990.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, n. 2, p. 209 - 220, 1967.

MATTOS, L. A. *et al.* Agronomical and molecular characterization of banana germplasm. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 2, p.146 - 154, 2010.

MELETTI, L. M. M. *et al.* Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 3, p. 55 - 78.

MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants- salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, v. 43, n. 4, p.1235–1248, 2003.

MOURA, W. M. *et al.* Divergência genética em linhagens de pimentão em relação à eficiência nutricional de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 2, p. 217-224, 1999.

PIASSI, M. *et al.* Estudo da divergência entre oito grupos de aves de postura, por meio de técnicas de análise multivariada. **Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 24, p. 715 - 727, 1995.

PRIYADARSHAN, P. M.; CLEMENT-DEMANGE, A. Breeding Hevea Rubber: Formal and Molecular Genetics. **Advances in Genetics**, v. 52, p. 51 - 105, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2006.

RODRÍGUEZ, V. M. *et al.* The nabicol: A horticultural crop in northwestern Spain. **Euphytica, Wageningen**, v. 142, n. 3, p. 237 - 246, 2005.

SILVA, G. O. *et al.* Distâncias genéticas entre genótipos de batata a partir de dados morfológicos, moleculares e genealógicos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, suplemento 1, p. 983 - 992, 2009.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.41, n.1, p.237 - 245, 1981.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 573p, 1973.

SOKAL, R. R. & ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, p. 33 - 40, 1962.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (data analysis software system), version 7.1. Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA), 2005.

SUDRÉ, C. P *et al.* Genetic resources of vegetable crops: a survey in the Brazilian germplasm collections pictured through papers published in the journals of the Brazilian Society for Horticultural Science. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 496 - 503, 2007.

VIEIRA, E. A. *et al.* Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 392 - 399, 2007.

VILELA, F. O. *et al.* Effect of recurrent selection on the genetic variability of the UNB-2U popcorn population using RAPD markers. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 1, p. 25 - 30, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem ganhos na produtividade devem ser fomentados, pois são fundamentais para fortalecer a economia proveniente do setor agrícola brasileira. O Brasil tem um grande potencial de recursos naturais que deve ser explorado de forma racional e sustentável onde destaca-se a diversidade genética de plantas cultivadas para o consumo como o maracujazeiro.

O uso de técnicas multivariadas é um dos fatores que tem impulsionado o aumento nos estudos sobre divergência genética entre acessos de banco de germoplasma. Elas são baseadas em algoritmos ou medidas de distância que consideram simultaneamente inúmeras características selecionadas nos experimentos de caracterização e avaliação de germoplasma. A estratégia de análise depende basicamente do tipo de variável a ser utilizada. Cruz (2008) apresenta os procedimentos para estimar medidas de dissimilaridade com base em variáveis quantitativas (distâncias Euclidianas ou de Mahalanobis), binárias (índice de Jaccard, Nei e Li etc.) e multicategóricas (Cole-Rodgers). Nesse sentido, observam-se várias discrepâncias em relação aos agrupamentos e às inferências em relação à quantificação da variabilidade entre acessos de um banco de germoplasma.

O desenvolvimento de novos algoritmos computacionais tem permitido a realização de procedimentos multivariados, relacionados à análise de dados qualitativos e quantitativos, de forma conjunta. Dentre eles, pode-se citar o algoritmo de Gower (1971) e o algoritmo de Ward-MLM (Franco *et al.*, 1998). Esses procedimentos têm apresentado resultados eficientes quando comparados com os procedimentos univariados, auxiliando o pesquisador no estudo da diversidade genética. Segundo Gonçalves *et al.* (2009), a escolha das variáveis e o número de variáveis a serem usadas podem comprometer a eficiência da análise conjunta, principalmente no caso de se utilizar um grande número de variáveis binárias, provenientes de marcadores moleculares, na quantificação da diversidade genética.

REFERÊNCIAS

CRUZ, C. D. **Programa genes** (versão Windows): aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2008.

FRANCO, J. *et al.* Classifying genetic resources by categorical and continuous variables. **Crop Science**, v. 38, p.1688–1696, 1998.

GONÇALVES, L. S. *et al.* Heirloom tomato gene bank: assessing genetic divergence based on morphological, agronomic and molecular data using a Ward-modified location model. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 364-374. 2009.

GOWER, J. C. A general coefficient of similarity and some of its properties. **Biometrics**, Arlington, v. 27, n. 4, p. 857-874. 1971.