

Identificação de cultivares de alho por marcadores AFLP.

Rafael Gustavo Ferreira Morales¹; Juliano Tadeu Vilela de Resende²; Paulo Roberto Da-Silva²; Carla Andrea Delatorre³; Francisco Vilela Resende⁴; Alex Sandro Torre Figueiredo¹.

¹Universidade Federal de Lavras, Lavras (UFLA), MG: moralescefet@yahoo.com.br; ²Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, PR: jresende@unicentro.br; pabloprs@hotmail.com; ³Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS; ⁴Pesquisador da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, fresende@cnph.embrapa.br.

RESUMO

O sistema de propagação assexuado, que ocorre no alho, faz com que as cultivares disponibilizadas sejam oriundas do acúmulo de mutações em cultivares já existentes. Esta peculiaridade faz com que algumas cultivares que são clones, por apresentarem pequenas diferenças fenotípicas, sejam consideradas cultivares distintas com denominação diferente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a divergência genética entre 20 cultivares de alho, por meio de marcadores moleculares AFLP, identificando possíveis cultivares duplicadas. O DNA de 20 cultivares de alho, pertencente a dois grupos (nobre e semi-nobre) foi analisado pela técnica de AFLP utilizando seis combinações de primers. A divergência genética entre as cultivares foi determinada utilizando o coeficiente de Jaccard e o agrupamento, para formação do dendograma, pelo método das médias aritméticas não ponderadas (UPGMA). O Dendograma obtido apresentou dois grupos, sendo um formado pelas cultivares pertencentes ao grupo dos alhos nobres e o outro dos alhos semi-nobres. As cultivares Gigante Roxão e Chinês Real apresentaram similaridade genética de 100%, podendo ser consideradas clones. Outras cultivares com elevado parentesco foram Quitéria e Jonas. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os marcadores

AFLP são eficientes na identificação das cultivares dentro e entre grupos.

Palavras-chave: *Allium sativum* L., clone, divergência genética.

ABSTRACT

Identification of garlic cultivars by AFLP markers

The asexual propagation system, which occurs in garlic, causes the available cultivars are derived from the accumulation of mutations in existing cultivars. This peculiarity makes some cultivars that are clones, because they have small phenotypic differences, are considered distinct cultivars with different name. The objective of this study was to evaluate the genetic divergence among 20 garlic cultivars through AFLP molecular markers, identifying possible duplicate cultivars. The DNA of 20 garlic cultivars, belonging to two groups noble and semi-noble, were analyzed using six AFLP primer combinations. Genetic divergence among cultivars was determined using the Jaccard coefficient and clustering, to form the dendrogram, the method of unweighted arithmetic averages (UPGMA). The Dendrogram obtained showed two groups, one formed by the cultivars belonging to the group of noble garlic and other semi-nobles garlic. The cultivars Gigante Roxão and

Chinês Real showed 100% of genetic similarity and may be considered clones. Other cultivars with high relatedness were Quitéria and Jonas. The results of this study showed that

the AFLP markers are efficient in the identification of cultivars within and between groups.

Keywords: *Allium sativum* L., clone, genetic divergence.

A multiplicação do alho (*Allium sativum* L.) ocorre apenas por propagação vegetativa, existindo reprodução sexual apenas no seu centro de origem. Assim, fora do centro de origem não há recombinação meiótica e conseqüentemente, a criação de recombinantes, dificultando o desenvolvimento de cultivares que se adaptem às diferentes regiões de cultivo (Vieira e Nodari, 2007). Desta forma, os materiais plantados atualmente advêm do acúmulo de mutações somáticas do material básico de plantio, desconhecendo-se, na maioria dos casos, a procedência das cultivares. Esse fato colaborou para a grande quantidade de clones encontrados no mercado brasileiro os quais apresentam diferentes denominações regionais ou populares, acarretando dificuldades e caracterizações dúbias dos materiais (Mota et al., 2006). Como resultado, muitas cultivares podem ser semelhantes geneticamente, ainda que tenham nomes diferentes.

Muitas metodologias possibilitam a identificação e caracterização de cultivares, diferenciando-se pela praticidade, custos e repetibilidade dos resultados (Milach, 1998). Na cultura do alho foram encontradas metodologias que podem ser divididas em três grupos de marcadores: os baseados em caracteres morfoagronômicos, os bioquímicos e os moleculares (RFLP, RAPD e AFLP). Dentre os marcadores moleculares supracitados, que são baseados na análise direta do DNA, o AFLP (Amplified Restriction Fragment Polymorphism) vem sendo utilizado com sucesso no estudo de diversidade genética (Buso et al., 2008) e na identificação de clones de alho (Ovesna et al., 2007).

A utilização de marcadores AFLP permite maior cobertura do DNA, acessando diferentes regiões do genoma simultaneamente, possibilitando inferências precisas sobre duplicatas de cultivares. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a divergência genética entre 20 cultivares de alho por meio de marcadores AFLP e fazer inferências sobre possíveis cultivares duplicadas.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal neste trabalho constitui-se de 20 cultivares de alho, sendo oito classificadas como nobres (Caçador, San Valentim, Bergamota, Ito, Jonas, Roxo caxiense, Quitéria e Chonan) e doze como seminobres (Chinês Real, Amarante, Hozan, Caturra, Gravatá, Gigante do Núcleo, Chinês São Joaquim, Cateto Roxo, Gigante Lavínia, Peruano, Gigante Roxo e Gigante Roxão), todas provenientes da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF.

A extração do DNA genômico ocorreu a partir de bulbilhos *in natura* descascados e triturados em nitrogênio líquido, utilizando para tanto o método CTAB. Para as análises moleculares o DNA de cada cultivar foi amplificado com seis combinações de primers de AFLP. As reações de AFLP foram conduzidas de acordo com Vos et al. (1995), com pequenas modificações. Duzentas nanogramas de DNA de cada cultivar foram digeridos separadamente

com duas enzimas de restrição, 5U MseI e 5U PstI. Os fragmentos gerados pela restrição foram ligados nos adaptadores PstI e MseI (25 uM do adaptador MseI e 2.5 uM do adaptador PstI), usando um tampão de ligação contendo ATP, 1U de T4 DNA ligase e água ultrapura para completar 50 ul. A pré-amplificação foi conduzida utilizando primers complementares aos adaptadores PstI e MseI contendo uma base seletiva. A amplificação seletiva foi conduzida também com primers complementares aos adaptadores PstI e MseI, no entanto com três bases seletivas e utilizando como molde o produto da pré-amplificação. Para amplificação seletiva foram utilizadas seis combinações de primers. Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 6% e visualizados por coloração com nitrato de prata.

A partir da leitura dos géis gerou-se uma matriz binária em que os indivíduos foram genotipados quanto à presença (1) e ausência (0) de loci. Com essa matriz calculou-se a divergência genética, estimada pelo coeficiente de Jaccard, utilizando o Software NTSYSpc 2.1. As 20 cultivares de alho foram agrupadas com base na matriz de dissimilaridade genética usando o método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA). A análise de Bootstrap com 1000 repetições aleatórias foi usada para verificar a confiabilidade das bifurcações do dendograma. A correlação cofenética também foi utilizada para os marcadores AFLP, conforme metodologia descrita acima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As seis combinações de primers AFLP revelaram um total de 87 bandas, sendo 77 polimórficas, com tamanho entre 100 e 1500 pb. A divergência genética média foi de 43%, variando de 0% (Chinês Real e Gigante Roxão) a 79% (Ito e Chinês São Joaquim). Elevados níveis de similaridade também foram encontrados entre as cultivares Quitéria, Jonas e Bergamota (Figura 1). Estes valores evidenciam alta variação na divergência, corroborando com os valores encontrados por Lampasona et al. (2003), que encontraram divergência que variou de 3 a 76% entre clones de alho. Valores semelhantes foram obtidos por Ipek e Simon (1998), que constatou divergência em clones de alho variando entre 5 e 70%. Considerando que a cultura do alho apresenta sistema reprodutivo assexuado e, portanto, sem capacidade para recombinação genética, tal polimorfismo pode ser considerado alto quando comparado com outras culturas. A superioridade no grau de polimorfismo é compreensível em espécies com sistema reprodutivo de fecundação cruzada, o que possibilita maior nível de heterozigose nessas plantas.

O coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de dissimilaridade de Jaccard e a matriz cofenética foi de $r = 0,96$, revelando um ótimo ajuste entre a representação gráfica das distâncias e a sua matriz original, possibilitando a realização de inferências precisas por meio da avaliação visual do dendograma.

O dendograma alocou as cultivares nobres e seminobres em dois grupos, sendo o grupo I formado por cultivares nobres, com exceção da cultivar Peruano, classificada comercialmente como seminobre (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Buso et al. (2008), onde os marcadores RAPD dividiram as cultivares nos grupos nobre e seminobre. Outro fator comum entre os trabalhos é a alta similaridade entre as cultivares Quitéria e Jonas, que possuem 96% de similaridade genética. Outras dez similaridades foram superiores a 90%, incluindo as cultivares Chinês Real e Gigante Roxão, que apresentaram 100% de similaridade.

Esses valores reforçam a hipótese da existência de genótipos duplicados, com denominações diferentes, semelhante ao observado por Augustin e Garcia (1993), que estudando as características isoenzimáticas e morfoagronômicas de genótipos de alho encontraram elevada similaridade genética entre as cultivares e possíveis clones entre as mesmas.

Os marcadores AFLP demonstraram ser eficientes na classificação das cultivares dentro e entre grupos, como já mencionado por outros autores (Ipek e Simon, 1998; Ipek et al., 2003; Lampasona et al., 2003; Volk et al., 2004). Com base nesses dados é possível concluir que as cultivares Chinês Real e Gigante Roxão são clones somáticos, existindo também elevado parentesco entre as cultivares Quitéria, Jonas e Bergamota.

As cultivares Gigante Roxão e Chinês Real apresentaram similaridade genética de 100%. Outras cultivares com elevado parentesco foram Quitéria e Jonas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária e FAPEMIG pelo auxílio financeiro e concessão de bolsas; a UNICENTRO, UFLA e UFRGS pela infra-estrutura.

REFERÊNCIAS

AUGUSTIN, E.; GARCIA, A. Classificação isoenzimática, morfológica e agrônômica de genótipos de alho. *Horticultura Brasileira* 11:10-131, 1993.

BUSO, G.S.C.; PAIVA, M.R.; TORRES, A.C. RESENDE, F.V.; FERREIRA, M.A.; BUSO, J.A.; DUSI, A.N. Genetic diversity studies of Brazilian garlic cultivars and quality control of garlic-clover production. *Genetics and Molecular Research* 7:534-541, 2008.

IPEK, M.; SIMON, P.W. *Genetic diversity in garlic (Allium sativum L.) as assessed by amplified fragment length polymorphism (AFLP)*. Proceedings of the 1998 National Onion (and other *Allium*) Research Conference, Sacramento, California, USA: p.110–120. 1998.

IPEK, M.; IPEK, A.; SIMON, P.W. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128:246-252, 2003.

LAMPASONA, S.G.; MARTÍNEZ, L.; BURBA, J.L. Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (amplified fragment length polymorphism). *Euphytica* 132:115-119, 2003.

MILACH, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

MOTA, J.H.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J. Similaridade genética de cultivares de alho pela comparação de caracteres morfológicos, físico-químicos, produtivos e moleculares. *Horticultura Brasileira* 24:156-160, 2006.

OVESNA, J.; LUCERA, L.; KRALOVA, J.; LEISOVA, L.; STAVELIKOVA, H.; VELISEK, J. Genetic diversity among garlic clones as revealed by AFLP, phenotypic descriptors and S-aminoacid level. *Vegetable Crop Res. Bull.* 66:105-116, 2007.

VIEIRA, R.L.; NODARI, R.O. Diversidade genética de cultivares de alho avaliada por marcadores RAPD. *Ciência Rural*, 37:1, 2007.

VOLK, G.M.; HENK, A.D.; RICHARDS, C.M. Genetic diversity among U.S. garlic clones as detected using AFLP methods. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:559-569, 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M; FRIJTERS, A.; POT, J.; JPELEMAN; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, London, v.23, p. 4407-4414, 1995.

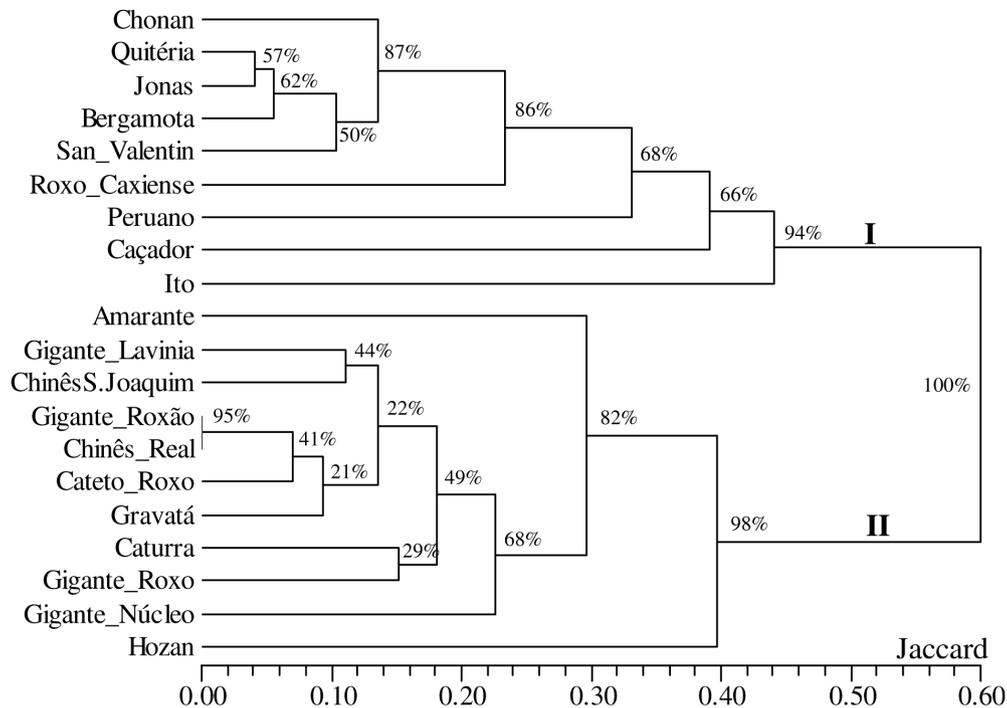


Figura 1. Dendrograma de dissimilaridade genética entre as 20 cultivares de alho, obtido a partir de marcadores AFLP, utilizando o método de agrupamento UPGMA. Guarapuava, UNICENTRO, 2010.

