

Similaridade genética de cultivares de alho pela comparação de caracteres morfológicos, físico-químicos, produtivos e moleculares

José H Mota¹; Jony E Yuri²; Geraldo M Resende³; Rovilson José de Souza⁴

¹UFGD, Depto. Ciências Agrárias, C. Postal 533, 79804-970 Dourados-MS; ²UNINCOR, Av. Castelo Branco, 82, Centro, 37410-000 Três Corações-MG; ³Embrapa Semi-Árido, C. Postal 23, 56300-970 Petrolina-PE; ⁴UFLA-Dep^o. Agricultura, C. Postal 37, 37200-000 Lavras-MG; E-mail: hortenciomota@terra.com.br;

RESUMO

Caracteres morfológicos (altura da planta, largura da folha, número de folhas e ângulo de folhas), físico-químicos (sólidos solúveis, acidez total titulável e pH), produtivos (produção comercial e massa média de bulbos) e molecular (por meio de marcadores moleculares RAPD) foram estudados em alho (*Allium sativum* L.). Doze cultivares, seis seminobre (Gigante Curitiba, Gigante Roxo, Gigante Roxão, Gravata, Amarante e Cateto Roxo) e seis nobre (Caçador, Chonan, Contestado 12, Caçador 30, Caçador 40 e Quitéria 595) foram utilizadas. Os resultados da análise de similaridade entre as cultivares foram equivalentes, quando utilizadas características morfológicas, físico-químicas e produtivas ou moleculares, indicando que os métodos de caracterização tiveram o mesmo poder de resolução na distinção das cultivares, formando dois grupos: o das cultivares seminobres e o das nobres.

Palavras-chave: *Allium sativum* L., RAPD, caracterização morfológica, diversidade genética.

ABSTRACT

Genetic similarity of garlic cultivars when compared with the morphologic, physical-chemical, productive and molecular characteristics

Morphological (plant height, number of green leaves, width of leaves, and the insertion angle of the leaves), physical-chemical (soluble solids, the total titratable acidity, and the pH), productive (commercial production and medium weight of the bulbs) and molecular (with RAPD markers) characteristics of garlic were studied. Twelve cultivars, six semi-noble (Gigante Curitiba, Gigante Roxo, Gigante Roxão, Gravata, Amarante and Cateto Roxo) and six noble (Caçador, Chonan, Contestado 12, Caçador 30, Caçador 40 and Quitéria 595) were analyzed. The results of the similarity analysis among cultivars were equivalent, when morphologic, physical-chemical and productive or molecular characteristics were evaluated, indicating that the methods presented the same resolution to distinguish cultivars, generating two groups: one formed by seminoble and other formed by the noble cultivars.

Keywords: *Allium sativum* L., RAPD, morphological characterization, genetic diversity.

(Recebido para publicação em 1 de março de 2005; aceito em 24 de abril de 2006)

O alho (*Allium sativum* L.) é uma das hortaliças mais importantes no Brasil, sendo cultivado na maioria das regiões brasileiras e muito utilizado no preparo de refeições, em função de seu aroma e sabor serem muito apreciados.

Segundo Puiatti & Ferreira (2005), o alho é a segunda cultura mais cultivada no mundo, sendo superada apenas pela cultura da cebola. No Brasil, a cultura ocupa o quarto lugar em importância econômica dentre as hortaliças, superado apenas pelas culturas da batata, tomate e cebola (Filgueira, 2003). Segundo dados do AgriAnual (2004), o Brasil importou em 2001, cerca de 78 mil toneladas de alho, o que confere ao país o título de segundo maior importador mundial, somente superado pela Indonésia que importou no mesmo ano cerca de 206 mil toneladas de alho. Segundo Resende (2004), o consumo mensal do Brasil chegou a 10 mil toneladas, além de mais 30 mil toneladas anuais para

alho-semente, o que gera um consumo médio anual de cerca de 150 mil toneladas para o mercado interno brasileiro.

A preferência do consumidor é por alhos do grupo nobre, que são caracterizados como aqueles que possuem cabeça redonda com bulbos uniformes, bulbilhos grandes e ausência de palitos. Os bulbos têm túnica branca e película de cor rósea ou roxa e os bulbilhos têm película rósea escura, necessitando de vernalização para plantio e apresentando sensibilidade ao pseudoperfilhamento.

Um segundo grupo, cultivado em Minas Gerais, é o grupo seminobre. Esse grupo caracteriza-se por possuir alhos de cabeça irregular, bulbos desuniformes, túnica branca com película branca a levemente arroxeadada, presença de palitos, não necessitando de vernalização para a formação do bulbo e quase não apresentando pseudoperfilhamento.

O Brasil apresenta-se como um grande consumidor de alho, e é observado no mercado brasileiro, uma enorme quantidade de clones, os quais apresentam diferentes denominações regionais ou populares, acarretando dificuldades e, muitas vezes, caracterizações dúbias do mesmo material. Tal fato faz com que, na maioria das vezes, os alhicultores adquiram material para plantio de baixa produtividade e/ou baixa conservação pós-colheita.

A separação entre e dentro dos grupos ocorre, na maioria das vezes, baseada em características morfológicas da planta, e isso requer o plantio e certo período de tempo para que as características de cada fenótipo sejam manifestadas.

A caracterização, separação e agrupamento das cultivares de alho por meio de características morfológicas, anatômicas, isoenzimáticas ou moleculares apresenta grande importância na indicação daquelas mais adapta-

das às diferentes regiões brasileiras, ou na avaliação de bancos de germoplasma, com economia de tempo e de recursos econômicos (Mota, 2003).

Técnicas multivariadas têm sido eficientes na descrição e seleção de múltiplos caracteres simultaneamente, resultando em economia de tempo e recursos financeiros, uma vez que muitas variáveis são redundantes por serem correlacionadas, ou dispensáveis, por representarem uma fração desprezível da variação total (Alves *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2004).

A análise de agrupamento é um dos recursos da análise multivariada que permite dividir um grupo original de observações em vários grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre grupos, seguindo algum critério de similaridade ou dissimilaridade (Cruz *et al.*, 2004). Assim, permite uma avaliação comparativa de todas as características estudadas, pela formação de grupos homogêneos por meio de uma medida de similaridade entre indivíduos em relação ao conjunto de variáveis.

Nesse contexto, esse estudo foi realizado com o objetivo de avaliar as variações físico-químicas, produtivas, morfológicas e genéticas, por meio da análise de similaridade, de doze cultivares de alho dos grupos seminobre e nobre.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Olericultura da UFLA, Minas Gerais, a 21°14' de latitude sul e a 45°00' de longitude oeste, a uma altitude de 918 m. A temperatura média anual da região é de 19,4°C, e a precipitação média anual fica em torno de 1529,7 mm com umidade relativa média anual de 76,2°C.

Foram utilizadas doze cultivares de alho (*Allium sativum* L.), sendo seis classificadas como nobres e seis classificadas como seminobres. As cultivares nobres utilizadas foram: Chonan, Roxo Pérola de Caçador, Caçador 30, Quitéria 595, Contestado 12 e Caçador 40, todas provenientes do Estado de Santa Catarina. No grupo das seminobres, utilizaram-se as cultivares Gigante Roxo,

Gigante Roxão, Amarante, Cateto Roxo e Gravata, cultivadas em Minas Gerais. Outra cultivar seminobre utilizada foi a cultivar catarinense Gigante Curitibaense que, pelas características morfológicas, apresenta exigência climática semelhante às cultivares tradicionalmente plantadas em Minas Gerais, não necessitando de vernalização.

Para plantio, os bulbos foram debulhados e selecionados para eliminação dos bulbilhos chochos, com sintoma de praga ou doença. Posteriormente os bulbilhos foram classificados em peneira 2 (malha de 1,5 x 1,5 cm) para uniformizar o desenvolvimento da cultura.

A fim de avaliar as características morfológicas, físico-químicas e produtivas das cultivares de alho foram instalados, dois experimentos. Um com o grupo seminobre e o outro com o grupo nobre, onde foi utilizado o delineamento em blocos casualizados com três repetições e seis cultivares. Cada bloco tinha 6,0 m de comprimento por 1,2 m de largura, dividido em 6 parcelas de 1,0 m.

Os caracteres vegetativos analisados foram: altura da planta, com o auxílio de uma régua graduada ao nível do solo até a folha superior; largura da folha, medida no terço médio da folha superior totalmente desenvolvida; número de folhas, sendo contadas todas as folhas que apresentaram atividade fotossintética e ângulo de folhas, com o auxílio de um transferidor determinando-se o ângulo da folha inferior fotossinteticamente ativa com o pseudocaule da planta. Todas as medições foram realizadas aos 70 dias após o plantio.

Após a colheita, as plantas foram submetidas à pré-cura ao sol por três dias, que consistiu em deixar as plantas expostas ao sol, sendo que as folhas das cultivares protegiam os bulbos para evitar a queima pelos raios do sol, após esse período as plantas foram avaliadas quanto às características físico-químicas (sólidos solúveis, acidez total titulável e pH). Para sólidos solúveis, acidez titulável e pH, foram utilizadas normas da Association of Official Agricultural Chemists (AOC, 1990).

Após a pré-cura ao sol, as plantas foram armazenadas em galpão ventilado por 30 dias, sendo posteriormente

realizada a toaleta que consistiu em cortar as raízes e o cabo com 2 cm e avaliada as características de produtividade (produção comercial e massa média de bulbos).

A extração do DNA, utilizado no estudo dos caracteres moleculares, foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo localizada em Sete Lagoas/MG. O DNA genômico foi obtido de bulbilhos *in natura* descascados e triturados em N₂ líquido com polivinilpirrolidona (PVP). Adicionaram-se, em seguida, 10 ml de tampão de extração (1 M de Tris pH 7,5; 0,5 M EDTA pH 8,0; 5 M NaCl; 1% CTAB; 2% b-Mercaptoetanol). Os tubos foram agitados e colocados em banho-maria a 65°C, durante 60 minutos. O extrato foi misturado com 10 ml de clorofórmio-octanol (24:1), para formar uma emulsão. A separação das fases orgânica e aquosa foi realizada por centrifugação a 3.000 rpm por 10 min, sendo que o sobrenadante foi transferido para outro tubo e, com a adição de 6 ml de isopropanol gelado (-5°C), houve a precipitação dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose 1% por comparação com padrão de DNA de concentração conhecida. A eletroforese foi realizada a 100 V em tampão TAE (1 mM EDTA pH 8,0; 40 mM Tris pH 8,0; 20 mM de ácido acético) e o gel tratado com brometo de etídio (10%) durante 20 minutos sob agitação, sendo posteriormente visualizado sob luz ultravioleta; a imagem do gel foi captada pelo sistema de documentação "Eagle Eye". Foram utilizados quatro kits de Primers Operon (A, B, F e W), totalizando 80 primers, sendo que a análise foi realizada somente para as bandas polimórficas.

A análise dos dados morfológicos, físico-químicos e produtivos foi realizada com base em Steel & Torrie (1960). Foram empregadas, a média das parcelas e as diferenças entre as médias dos tratamentos foram comparadas por meio do teste Tukey a 5% de probabilidade. A análise dos dados moleculares foi baseada na presença ou ausência de bandas (1 ou 0, respectivamente) com o mesmo peso molecular. A partir dos géis obtidos foram construídas matrizes binárias.

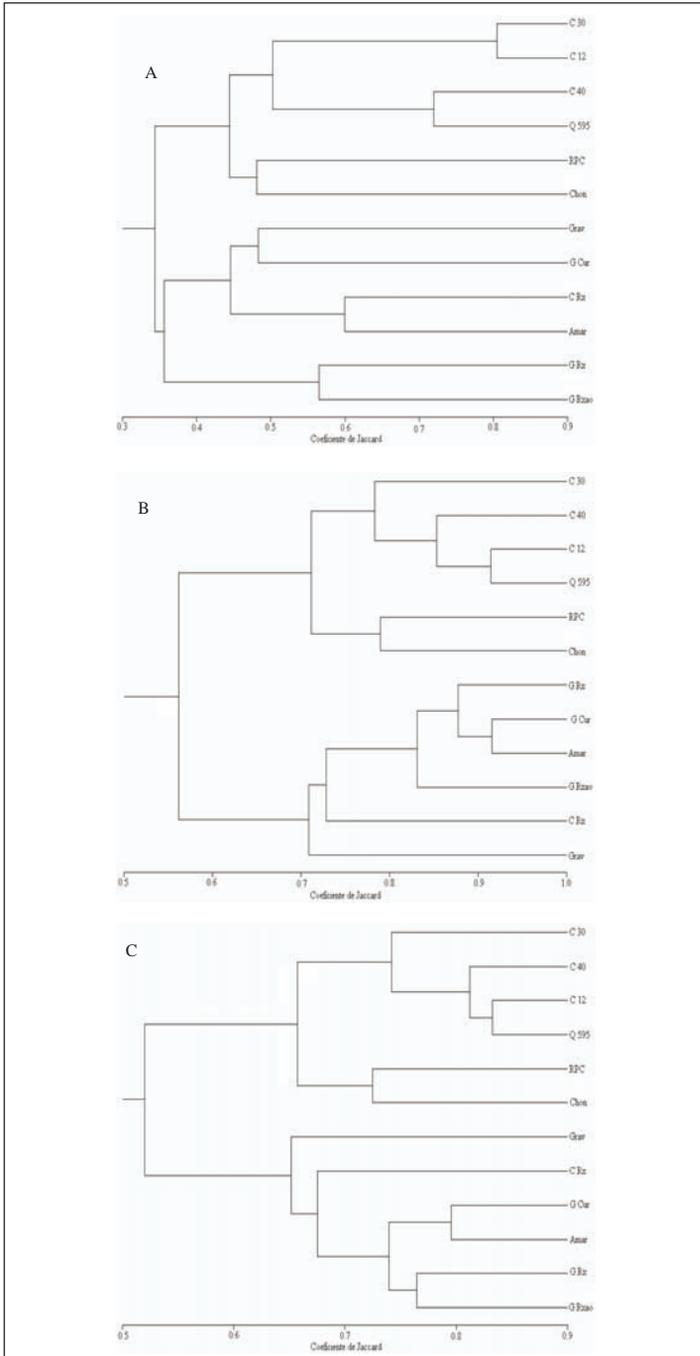


Figura 1. Dendrograma de similaridade entre as doze cultivares de alho. **a)** Agrupamento morfológico, físico-químico e produtivo; **b)** Agrupamento molecular; **c)** Agrupamento morfológico, físico-químico, produtivo e molecular. Em que: G. Rxão = Gigante Roxão; Amar. = Amarante; G. Rx. = Gigante Roxo; Grav. = Gravatá; G. Cur. = Gigante Curitibaanos; C. Rx. = Cateto Roxo; C. 12 = Contestado 12; C. 30 = Caçador 30; Q. 595 = Quitéria 595; RPC= Roxo Pérola Caçador; C. 40 = Caçador 40; Chon. = Chonan. Lavras, UFLA, 2003.

Os dados quantitativos obtidos da análise das características morfológicas, físico-químicas e produtivas foram transformados em matrizes binárias conforme o proposto por Bussab *et al.* (1990). Para a estimativa da similaridade entre as cultivares, foi usado o coeficiente de Jaccard, por meio da similaridade de dados qualitativos (SIMQUAL) e para a análise de agrupamento, o método da média aritmética não ponderada (UPGMA), por meio do agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo (SHAN), conforme Sneath & Sokal (1973), empregando-se o “numerical taxonomy and multivariate analysis for personal computers”, V. 2.02k (NTSYS) (Rohlf, 1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três dendrogramas foram organizados, um com os dados morfológicos, físico-químicos e produtivos (Figura 1a), outro com os dados moleculares (Figura 1b) e o terceiro com os dados morfológicos, físico-químicos, produtivos e moleculares agrupados (Figura 1c). Pode-se observar que os dendrogramas gerados separaram as cultivares nobres e semionobres em dois grupos distintos.

Os coeficientes de similaridade da análise dos dados morfológicos, físico-químicos e produtivos indicaram que as cultivares Contestado 12 e Caçador 30 são as mais semelhantes (80,5% de similaridade), o que confirma que a separação de cultivares dentro de um mesmo grupo é difícil, pois as características são muito semelhantes.

Fato corroborado por Augustin & Garcia (1993), que estudaram padrões eletroforéticos (malato desidrogenase, esterase, proteína, fosfatase ácida e glutamato-oxaloacetato transaminase) de alho, para as cultivares Gaúcho, seleção Gaúcho, Caçador, Chonan, Quitéria, Quitéria 83, Seleção Quitéria, Contestado, e outras do grupo nobre, mostrando que não houve diferença para os padrões acima citados, mas foram alocadas em um mesmo grupo, indicando que há muita semelhança entre cultivares de alho no Brasil, o que torna difícil a separação entre cultivares.

Com relação às similaridades genéticas apresentadas pelo marcador

Tabela 1. Coeficientes de similaridade entre cultivares com base em dados morfológicos, físico-químicos e produtivos (abaixo da diagonal) e moleculares (acima da diagonal). Lavras, UFLA, 2003.*

Cultivares	C30	C40	RPC	Chon	C12	Q595	GRx	Grav	GCur	CRx	Amar	GRxao
C30		0,779	0,659	0,667	0,788	0,783	0,583	0,621	0,581	0,535	0,598	0,541
C40	0,473		0,700	0,730	0,877	0,83	0,602	0,667	0,6	0,531	0,598	0,556
RPC	0,429	0,491		0,790	0,729	0,749	0,536	0,547	0,527	0,546	0,494	0,539
Chon	0,463	0,443	0,481		0,736	0,723	0,518	0,561	0,51	0,513	0,502	0,527
C12	0,805	0,566	0,440	0,446		0,915	0,589	0,627	0,587	0,521	0,584	0,547
Q595	0,453	0,720	0,442	0,400	0,519		0,584	0,609	0,583	0,543	0,561	0,569
GRx	0,321	0,234	0,283	0,351	0,309	0,230		0,748	0,902	0,712	0,852	0,81
Grav	0,339	0,373	0,397	0,364	0,308	0,397	0,473		0,739	0,634	0,728	0,695
GCur	0,300	0,339	0,310	0,328	0,333	0,297	0,267	0,483		0,711	0,916	0,835
CRx	0,418	0,381	0,267	0,393	0,455	0,277	0,310	0,436	0,527		0,708	0,783
Amar	0,370	0,361	0,309	0,328	0,357	0,362	0,309	0,441	0,379	0,600		0,849
GRxao	0,480	0,339	0,309	0,350	0,462	0,339	0,565	0,371	0,356	0,429	0,333	

*Onde: G. Rxão = Gigante Roxão; Amar. = Amarante; G. Rx. = Gigante Roxo; Grav. = Gravatá; GCur. = Gigante Curitibaños; CRx. = Cateto Roxo; C. 12 = Contestado 12; C. 30 = Caçador 30; Q595 = Quitéria 595; RPC= Roxo Pérola Caçador; C. 40 = Caçador 40; Chon. = Chonan.

Tabela 2. Coeficientes de similaridade entre cultivares com base em dados morfológicos, físico-químicos, produtivos e de moleculares. Lavras, UFLA, 2003.*

Cultivares	C30	C40	RPC	Chon	C12	Q595	GRx	Grav	GCur	CRx	Amar	GRxao
C30	1											
C40	0,718	1										
RPC	0,617	0,659	1									
Chon	0,626	0,668	0,725	1								
C12	0,791	0,815	0,673	0,675	1							
Q595	0,717	0,809	0,687	0,652	0,833	1						
GRx	0,537	0,529	0,491	0,488	0,539	0,515	1					
Grav	0,564	0,605	0,519	0,520	0,560	0,567	0,692	1				
GCur	0,527	0,548	0,487	0,474	0,538	0,525	0,757	0,683	1			
CRx	0,512	0,500	0,486	0,488	0,509	0,485	0,628	0,592	0,676	1		
Amar	0,558	0,553	0,462	0,469	0,544	0,525	0,739	0,667	0,795	0,690	1	
GRxao	0,533	0,514	0,497	0,493	0,534	0,525	0,765	0,623	0,727	0,708	0,736	1

*Onde: G. Rxão = Gigante Roxão; Amar. = Amarante; G. Rx. = Gigante Roxo; Grav. = Gravatá; G. Cur. = Gigante Curitibaños; C. Rx. = Cateto Roxo; C. 12 = Contestado 12; C. 30 = Caçador 30; Q595 = Quitéria 595; RPC= Roxo Pérola Caçador; C. 40 = Caçador 40; Chon. = Chonan.

molecular, RAPD (Tabela 1), observou-se que as cultivares Gigante Curitibaños e Amarante foram as mais semelhantes (91,6% de similaridade). Acredita-se que a cultivar catarinense seminobre Gigante Curitibaños, pertence ao grupo das cultivares tradicionalmente plantadas em Minas Gerais devido as características apresentadas, sendo introduzida no Sul do Brasil.

Com relação as características avaliadas (Tabela 2), as cultivares mais similares foram Contestado 12 e Quitéria 595 (83,3% de similaridade), ambas do grupo nobre, sendo as mais distantes as cultivares Roxo Pérola Caçador e Amarante (46,2% de similaridade), ambas de grupo nobre e seminobre, respectivamente.

Em todas as análises observou-se que houve relação entre a região de cultivo e a formação dos grupos. Esse fato pode estar associado a seleção das cultivares, pelos produtores. Observou-se que as cultivares do grupo nobre se adaptam melhor em regiões de clima frio, enquanto as seminobres não são tão exigentes em frio. As cultivares nobres (Chonan, Roxo Pérola de Caçador, Caçador 30, Quitéria 595, Contestado 12, Caçador 40) em todos os dendrogramas foram agrupadas um só grupo, o mesmo ocorreu para as cultivares seminobres (Gigante Roxo, Gigante Roxão, Amarante, Cateto Roxo, Gravatá e Gigante Curitibaños).

Os descritores morfológicos, físico-químicos e moleculares foram eficien-

tes na discriminação dos acessos, classificando corretamente as cultivares conforme o grupo.

A disposição das cultivares foi semelhante em todos os dendrogramas obtidos (Figura 1), só diferindo pelos valores de similaridade, indicando que os métodos de caracterização tiveram o mesmo poder de resolução na distinção das cultivares.

Tal comportamento também foi observado por Conti *et al.* (2000) ao avaliar caracteres morfológicos, agrônômicos e moleculares de morangueiros (*Fragaria xananassa*) cultivados no Brasil. Os autores também realizaram análise conjunta dos dados, reunindo todos os métodos e o dendrograma obtido manteve a mesma formação de grupos.

Veiga et al. (2001), caracterizando morfológicamente e analisando geneticamente acessos de germoplasma de amendoim do gênero *Arachis*, também verificaram concordância do agrupamento genético com a caracterização baseada em descritores morfológicos.

Verificou-se que as técnicas de estatística multivariada empregadas neste estudo foram capazes de estabelecer padrões e classificações da diversidade, identificando claramente os grupos, independente dos descritores utilizados.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL. 2004. *Anuário da Agricultura Brasileira*. FNP Consultoria e Comércio: São Paulo. 536p.
- ALVES RM; GARCIA AAF; CRUZ DE; FIGUEIRA A. 2003. Seleção de descritores botânico-agronômicos para caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38:807-818.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. 1990. *Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. 15 ed. Washington: 2:1017.
- AUGUSTIN E; GARCIA A. 1993. Classificação isoenzimática, morfológica e agrônômica de genótipos de alho. *Horticultura Brasileira* 11:110-131.
- BUSSAB WO; MIAZAKI ES; ANDRADE DF. 1990. *Introdução à análise de agrupamentos*. 1. ed. São Paulo: 105p.
- CONTI JH; MINAMI K; TAVARES FCA. 2002. Comparação de caracteres morfológicos e agrônômicos com moleculares em morangueiros cultivados no Brasil. *Horticultura Brasileira* 20:419-423.
- CRUZ CD; REGAZZI AJ; CARNEIRO PCS. 2004. *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. 3. ed. Viçosa: UFV, 480p.
- FILGUEIRA FAR. *Novo manual de olericultura*. 2. ed. Viçosa: UFV, 2000. 412p.
- MOTA JH. 2003. *Diversidade genética e características morfológicas, físico-químicas e produtivas de cultivares de alho (Allium sativum L.)*. Lavras: UFLA. 122p. (Tese doutorado).
- PUIATTI M; FERREIRA FA. 2005. Cultura do alho. In: FONTES PCR. (eds.). *Olericultura: teoria e prática*. 1. ed. Viçosa: UFV. p. 299-322.
- RESENDE FV. 2004. Mercado promissor. *Cultivar* 28:6.
- ROHLF FJ. 1998. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 2.02k, New York: Applied Biostatistics, (software).
- SNEATH PEA; SOKAL R. 1973. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. 1. ed. San Francisco: W.H. Freeman & Co. 573p.
- STEEL RGD; TORRIE JR. 1960. *Principles and procedures of statistics with special references to the biological sciences*. 1. ed New York: Mc. Graw Hill book Co. Inc. 481p.
- VEIGA RFA; QUEIROZ-VOLTAN RB; VALLS JFM. 2001. Caracterização morfológica de acessos de germoplasma de quatro espécies brasileiras de amendoim-silvestre. *Bragantia* 60:167-176.