



## VARIABILIDADE GENÉTICA E IMPORTÂNCIA RELATIVA DE CARACTERES EM ACESSOS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) TIPO BROAD LEAF POR MEIO DE MARCADORES FENOTÍPICOS

Antonio Leandro da Silva Conceição<sup>1</sup>, Maurício dos Santos da Silva<sup>1</sup>, Clailto Carvalho dos Santos<sup>2</sup>, Gilmara de Melo Araujo<sup>3</sup>, Ricardo Franco Cunha Moreira<sup>4</sup>.

1. Mestrando em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. \*E-mail: [leandrosilvaufbr@hotmail.com](mailto:leandrosilvaufbr@hotmail.com)
2. Engenheiro Agrônomo da Ermor Tabarama Tabacos do Brasil Ltda.
3. Graduanda em Engenharia Agrônoma da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
4. Professor Doutor do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP 44380-000, Cruz das Almas - BA, Brasil.

Recebido em: 30/09/2014 – Aprovado em: 15/11/2014 – Publicado em: 01/12/2014

### RESUMO

A caracterização de acessos de juntamente com adequados métodos estatísticos, permitem a identificação de genitores divergentes. Apesar dos avanços no melhoramento do tabaco, para a eficiente obtenção de ganhos genéticos no desenvolvimento de novos cultivares, é necessário o conhecimento da constituição genética da espécie. O presente estudo teve por objetivo caracterizar a diversidade genética de nove acessos de Tabaco por meio de descritores agronômicos e avaliar a importância relativa desses caracteres na determinação da diversidade genética. Foram utilizados nove acessos de tabaco, onde esses foram caracterizados por meio de nove descritores quantitativos com auxílio de técnicas multivariadas. A partir dos resultados pode-se concluir que as características que proporcionaram maiores contribuições relativas segundo o critério de SINGH (1981), foram a largura da base da 7ª folha (LBF) e número de folhas (NF), sendo essas com maior contribuição na distinguibilidade dos grupos formados. O método de agrupamento utilizado para distinção dos genótipos na formação dos grupos foi o UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). O coeficiente de correlação cofenético (CCC) foi de 0.60\*\*, indicando um moderado ajuste com alta significância da análise de agrupamento em relação à matriz de dissimilaridade a partir da matriz de distância Mahalanobis ( $D^2$ ), onde foi possível a formação de três grupos pelo índice índice pseudo- $t^2$ , obtido a partir do Pacote NbClust do software R. As medidas de dissimilaridade genética estimadas apresentaram uma magnitude de 7,41 a 327,89, indicando a presença de variabilidade genética. Os acessos mais divergentes foram o BL593 com BL598. As técnicas estatísticas aplicadas neste estudo foram capazes de identificar claramente os grupos formados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Descritores agronômicos, melhoramento vegetal, *Nicotiana tabacum* L., similaridade.

# GENETIC VARIABILITY AND RELATIVE IMPORTANCE OF CHARACTERS IN ACCESS TO TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) TYPE BROAD LEAF THROUGH MARKERS PHENOTYPIC

## ABSTRACT

The characterization of accessions along with appropriate statistical methods allow the identification of divergent parents. Despite significant advances in the improvement of tobacco, for efficiently obtaining genetic development of new cultivars gains, the knowledge of the genetic makeup of the species is necessary. The present study aimed to characterize the genetic diversity of nine accessions of Tobacco through agronomic descriptors and evaluate the relative importance of these characters in determining genetic diversity. Nine accessions of tobacco, where these were characterized by nine quantitative with the aid of multivariate techniques were used descriptors. From the results it can be concluded that the characteristics that provided the highest relative contributions at the discretion of Singh (1981) were the base width of the 7th leaf (LBF) and number of leaves (NL), and those with the largest contribution distinctness of the groups formed. The clustering method used to distinguish the genotypes in the groups was the UPGMA (unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Cofenético correlation coefficient (CCC) was 0.60 \*\* indicates a moderate fit with highly significant cluster analysis in relation to the dissimilarity matrix from the matrix Mahalanobis distance (D2), where the formation of three groups was possible index by index pseudo-t2, obtained from NbClust software package R. the measures of genetic dissimilarity estimated had a magnitude 7.41 to 327.89, indicating the presence of genetic variability. The most divergent accessions were with the BL593 BL598. The statistical techniques applied in this study were able to clearly identify the groups formed.

**KEYWORDS:** plant breeding, agronomic descriptors, dissimilarity, *Nicotiana tabacum* L.

## INTRODUÇÃO

O tabaco é a principal cultura não alimentícia, amplamente cultivada em todos os continentes, se constituiu uma cultura de mão de obra intensiva e envolvendo em torno de 33 milhões de empregos na lavoura, aproximando-se de 100 milhões as pessoas ocupadas direta e indiretamente com a atividade fumageira (SANTOS, 2002). No Brasil, em 2011, a atividade movimentou mais de 17 bilhões de reais e envolveu cerca de 2,5 milhões de pessoas. Entre elas estão às fábricas, varejistas, além dos próprios fumicultores (BENNO et al., 2012).

A diversidade genética entre e dentro de populações encontradas em suas condições naturais, em bancos de germoplasma ou desenvolvidas nos programas de melhoramento genético pode ser predita pelas diferenças entre os valores fenotípicos mensurados em suas unidades (indivíduos, famílias, etc.) (CRUZ & REGAZZI, 2001).

A análise da dissimilaridade genética entre indivíduos é fundamental para programas de melhoramento genético. Essa dissimilaridade permite cruzamentos entre genitores geneticamente divergentes, o que viabiliza a produção de acessos com maior efeito heterótico (MACHADO et al., 2013).

Na caracterização da diversidade genética das espécies vegetais, animais e de microrganismos, os pesquisadores têm o interesse em agrupar genótipos similares, de maneira que as maiores diferenças ocorram entre os grupos formados.

Neste aspecto técnicas multivariadas, como análise discriminante, componentes principais, análise de coordenadas e de agrupamento, podem ser aplicadas neste tipo de estudo. A adoção de uma, entre as técnicas citadas, varia de acordo com o padrão de resultado desejado e com a informação disponível, seja ela característica morfológica, fisiológica, ecológica ou genético-molecular (CRUZ et al., 2011). Dentre estas, pode ser destacada a análise de agrupamento que é muito utilizada pelos pesquisadores tanto da área de melhoramento genético vegetal quanto na caracterização morfológica de novos acessos, ou seja, na caracterização morfológica de coleções de constituições genéticas geralmente mantidas em bancos de germoplasma e ainda pouco conhecidas pelos melhoristas (KOOB et al., 2007).

Apesar dos avanços significativos no melhoramento do fumo, para a eficiente obtenção de ganhos genéticos no desenvolvimento de novos cultivares, é necessário o conhecimento da constituição genética da espécie. A caracterização da variabilidade genética é fundamental para o conhecimento do germoplasma disponível e planejamento dos programas de melhoramento da cultura. O conhecimento dos genótipos permite a escolha adequada de genitores visando a ampliação da variância genética nas populações segregantes (SANTOS, 2002). Desta forma, torna-se imprescindível a caracterização genética por meio de marcadores fenotípicos de forma a contribuir com informações para o programa de conservação e melhoramento genético da cultura.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a diversidade genética de nove acessos de Tabaco por meio de descritores agrônômicos e avaliar a importância relativa desses caracteres na determinação da diversidade genética.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 9 acessos de tabaco da espécie *Nicotiana tabacum* L., tipo Broad Leaf (BL590; BL591; BL592; BL593; BL594; BL595; BL596; BL597; BL598). Por ocasião do florescimento, avaliou-se as seguintes características: Número de folhas (NF); Altura da planta (ALT) em cm; Comprimento da 3ª folha (CTF) em cm; Largura da 3ª folha (LTF) em cm; Comprimento da 7ª folha (CSF) em cm; Largura da 7ª folha (LSF) em cm; Largura da base da 7ª folha (LBF) em cm; Comprimento do internódio entre 6ª e 8ª folha (CI) em cm e Dias do transplante ao florescimento (DFL).

A área experimental possui as seguintes características: altitude de 208m acima do nível do mar, clima Aw a Am, tropical quente e úmido, segundo a classificação de Köppen. A pluviosidade média anual é de 1220 mm, com maior incidência de chuvas no período compreendido entre março e junho. A umidade relativa do ar é de aproximadamente 80 % e a temperatura média anual é de 24,1°C.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados com quatro repetições. Cada parcela foi constituída de cinco linhas de 10 plantas e cada linha teve 4,5 metros de comprimento com espaçamento de 1,0 metro entre linhas e 0,42 metro entre plantas.

O Agrupamento hierárquico das análises foi realizado a partir das matrizes de distância genética onde 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 de acordo com SOKAL & ROHLF (1962). A contribuição relativa das variáveis quantitativas para divergência entre os acessos foi obtida conforme o critério de 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 (2014) 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). Para definição do número ótimo de grupos foi utilizado o índice pseudo-t<sup>2</sup> através do Pacote NbClust (CHARRAD et al., 2011) do software R.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os valores descritivos para os caracteres quantitativos avaliados na caracterização de genótipos de Tabaco, tipo Broad Leaf, em Cruz das Almas, Bahia. Os coeficientes de variação foram de 2,85% a 17,94%, correspondente ao caracter dias do transplante ao florescimento (DFL) e comprimento do internódio (CI) respectivamente. O caractere altura da planta (ALT) apresentou maior contribuição para os valores mínimo, máximo, média e desvio padrão de 92,20 cm, 161,00cm, 129,37 cm e 12,40 respectivamente. Enquanto o caractere comprimento de internódio (CI) apresentou menores variações 3,00 cm, 6,68 cm, 4,73 cm e 0,85 para mínimo, máximo, média e desvio padrão respectivamente.

**TABELA 1.** Estatísticas descritivas para os caracteres quantitativos utilizadas na avaliação de nove acessos de Tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) tipo Brod Leaf, Cruz das Almas - BA.

Variáveis	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	CV%
NF	13,00	22,20	16,45	2,28	13,85
ALT	92,20	161,00	129,37	12,40	9,58
CTF	40,60	59,80	51,39	3,54	6,89
LTF	29,80	39,80	33,76	2,04	6,04
CSF	52,30	72,40	62,56	4,16	6,65
LSF	28,10	44,20	35,29	3,59	10,17
LBF	8,50	15,00	11,18	1,78	15,96
CI	3,00	6,65	4,73	0,85	17,94
DFL	52,00	56,00	54,33	1,55	2,85

Número de folhas (NF); Altura da planta (ALT) em cm; Comprimento da 3ª folha (CTF) em cm; Largura da 3ª folha (LTF) em cm; Comprimento da 7ª folha (CSF) em cm; Largura da 7ª folha (LSF) em cm; Largura da base da 7ª folha (LBF) em cm; Comprimento do internódio entre 6ª e 8ª folha (CI) em cm e Dias do transplante ao florescimento (DFL).

A importância relativa dos caracteres foi estimada por meio da participação dos componentes de D<sup>2</sup>, relativos a cada característica, no total da dissimilaridade observada (SINGH, 1981). Na Tabela 2, são apresentadas as estimativas de cada característica para divergência genética entre os acessos estudados. De acordo com os resultados obtidos as características que proporcionaram maiores contribuições relativas foram a largura da base da 7ª folha (LBF), responsável por 43,82% de contribuição na distinguibilidade dos grupos formados, seguida pela variável número de folhas (NF), com 24,36%. Essas duas características contribuíram com 68,18% da distribuição total. Já o caracter que apresentou menor contribuição foi a altura da

planta (ALT) com 0,28%. As variáveis de menor contribuição são pouco informativas na caracterização da variabilidade genética existente. Onde algumas dessas variáveis podem ser descartadas em futuros estudos de divergência, pois de acordo com RÊGO et al. (2003) caracteres que contribuíram com um percentual muito baixo ou não contribuíram para a variabilidade detectada podem ser descartadas.

**TABELA 2.** Contribuição das variáveis para a dissimilaridade genética entre nove acessos de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) tipo Brod Leaf, Cruz das Almas - BA.

VARIÁVEL	S.j	VALOR (%)
NF	991,70	24,36
ALT	11,34	0,28
CTF	45,53	1,12
LTF	199,23	4,89
CSF	345,78	8,49
LSF	95,18	2,34
LBF	1784,06	43,82
CI	439,86	10,80
DFL	158,61	3,90

Número de folhas (NF); Altura da planta (ALT) em cm; Comprimento da 3ª folha (CTF) em cm; Largura da 3ª folha (LTF) em cm; Comprimento da 7ª folha (CSF) em cm; Largura da 7ª folha (LSF) em cm; Largura da base da 7ª folha (LBF) em cm; Comprimento do internódio entre 6ª e 8ª folha (CI) em cm e Dias do transplante ao florescimento (DFL).

As medidas de dissimilaridade genética (Tabela 3), estimadas a partir da distância de Mahalanobis, apresentaram uma magnitude de 7,41 a 327,89, indicando presença de variabilidade genética entre os acessos em relação as 9 variáveis estudadas. Na Tabela 3, é possível inferir que dentre os genótipos avaliados, os genótipos BL593 com BL598 e BL596 com BL598 e apresentaram maiores distâncias respectivamente. Enquanto os genótipos BL592 com BL595 e o genótipo BL593 com BL594 apresentaram as menores distâncias.

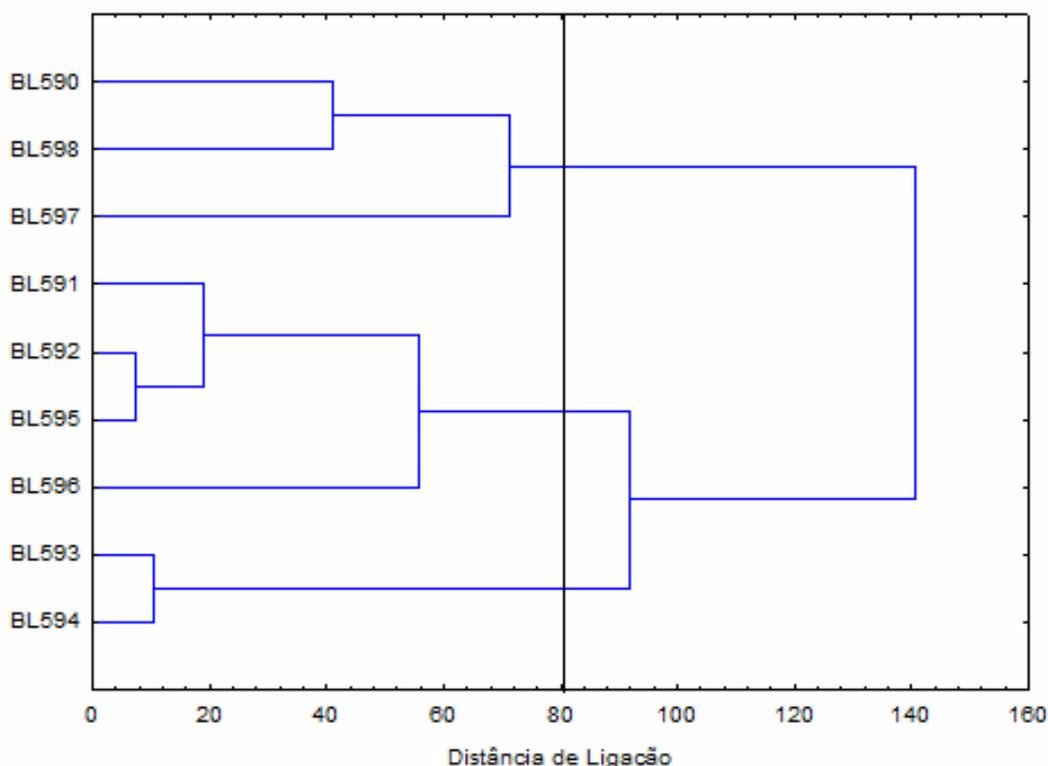
Os estudos de distância têm sido de grande importância em programas de melhoramento, por fornecerem informações sobre parâmetros de identificação de genitores que possibilitem grande efeito heterótico e maior probabilidade de recuperar genótipos superiores nas progênies (CRUZ & REGAZZI, 1997).

**TABELA 3.** Matriz de dissimilaridade estimadas a partir da distância de Mahalanobis entre os 9 acessos de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) tipo Brod Leaf por meio de 9 variáveis quantitativas, Cruz das Almas, BA.

Acessos	BL590	BL591	BL592	BL593	BL594	BL595	BL596	BL597
BL591	89,58							
BL592	87,16	18,51						
BL593	208,03	63,23	116,76					
BL594	146,59	47,62	92,48	10,29				
BL595	54,02	19,24	7,41	116,81	88,19			
BL596	202,77	43,11	47,23	109,25	101,11	77,24		
BL597	42,67	55,05	72,87	91,39	56,50	45,42	160,15	
BL598	41,25	158,82	122,35	327,89	261,51	86,81	303,37	100,15

No agrupamento dos acessos pelo método UPGMA (Figura 1), o ponto de corte foi definido por meio do índice pseudo- $t^2$ , obtido a partir do Pacote NbClust (CHARRAD et al., 2011) do software R, onde foi detectado a formação de 3 grupos: O grupo I é formado por três acessos, (BL590, BL598 e BL597). O grupo II é constituído por quatro acessos (BL591, BL592, BL595 e BL596). Geralmente os grupos maiores são formados por grande número de acessos, agrupam os pares que apresentam menores distâncias, uma vez que o tamanho do grupo é delimitado por uma distância média entre os pares de indivíduos (OLIVEIRA et al., 2009). Já o grupo III é representado por apenas dois acessos (BL593 e BL594). Esses resultados mostram a existência de variabilidade genética entre os acessos em estudo, onde os mais divergentes foram os acessos BL598 do grupo I e o BL593 do grupo III.

Os dados quantitativos apresentaram coeficiente de correlação cofenética de 0,60\*\*, revelando moderado ajuste com alta significância em relação a consistência da análise de agrupamento com matriz de dissimilaridade. Conforme sugerem BUSSAB et al., (1990), análises de agrupamento são aceitáveis se produzirem um coeficiente de correlação cofenético a partir de 0,80. Entretanto VAZ PATTO et al., (2004) consideram que coeficientes de correlação cofenética maiores ou iguais a 0,56 refletem boa concordância com os valores de similaridade genética. Alguns autores justificam que coeficientes com valores compreendidos entre 0,60 e 0,80 são provenientes do pequeno número de variáveis utilizadas. Segundo SANTOS (2010), 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.



**FIGURA 1.** Dendrograma de dissimilaridade genética entre 9 acessos de tabaco resultante do agrupamento pelo método UPGMA obtido pela distância de Mahalanobis ( $D^2$ ) estimados em 9 variáveis quantitativas. Cruz das Almas- BA.

Os descritores utilizados na formação dos agrupamentos foram eficientes em quantificar a variabilidade existente. Foi possível observar maior homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre eles.

### CONCLUSÕES

Os caracteres que mais contribuíram para a divergência genética foram a largura da base da 7ª folha (LBF) e o número de folhas (NF).

Os acessos mais divergentes foram o BL598 e o BL593, sendo possíveis alternativas para o melhoramento da cultura.

As técnicas estatísticas aplicadas neste estudo foram capazes de identificar claramente os grupos formados.

### REFERÊNCIAS

BENNO, B. K. **Anuário brasileiro do tabaco 2012**. Santa cruz do Sul: editora Gazeta Santa cruz, 164 p. 2012.

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.

CHARRAD, M.; GHAZZALI, N.; BOITEAU, V.; NIKNAFS, A. (2011) NbClust: **An examination of indices for determining the number of clusters**. R package version 1.4. Disponível em: <<http://cran.r-project.org/web/packages/NbClust/index.html> >.

CRUZ, C.D. Programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística. 2014. Disponível em: <[www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm](http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm)>.

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

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Divergência Genética. In: **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.-2. Ed.rev.- Viçosa: UFV, 2001. p. 287-323.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011. 620p.

KOPP, M. M.; SOUZA, V.Q.; COIMBRA, J.L.M. ; LUZ, V.K. ; MARINI, N. ; OLIVEIRA, A.C. Melhoria da correlação cofenética pela exclusão de unidades experimentais na construção de dendrogramas. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia** (Uruguaiana), v. 14, p. 46-53, 2007.

MACHADO, E. L.; SILVA; S. A.; SANTOS; A. de S.; BASTOS, L. A.; PESTANA, C. N.; SANTOS; K. S. dos; FERREIRA; C. F.; DIAMANTINO, M. S. A. S. Dissimilaridade genética entre cultivares de mamoneira por meio de marcadores

RAPD. Notas Científicas. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.48, n.3, p.342-345, 2013.

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

OLIVEIRA, M. G.; OLIVEIRA, J. G. de; GOMES FILHO, A.; PEREIRA, M. G.; VIANA, A. P.; SOUZA FILHO, G. A. de; LOPES, G. E. M. Diversidade genética de aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.), utilizando marcadores moleculares RAPD e características morfoagronômicas. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 1, Mar. 2009.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

REGO, E.R. do; REGO, M.M. do; CRUZ, C.D.; CECON, P.R.; AMARAL, D.S.S.L.; FINGER, F. Genetic diversity analysis of peppers: a comparison of discarding variable methods. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 19-26, 2003.

SANTOS, D. B. **Procedimentos Multivariados no Agrupamento de Genótipos de Maracujazeiro com Base em Matriz de Distância Conjunta e em Separado para Características Quantitativas e Categóricas**. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, Brasil. Maio, 2010.

SANTOS, M. **Caracterização fenotípica e molecular de genótipos de fumo no Sul do Brasil**. Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. 122p. Abril, 2002.

SINGH, D. **The relative importance of characters affecting genetic divergence**. The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding, New Delhi, v. 41, 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**, Berlin, v.11, p.30-40, 1962.

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

VAZ PATTO, M.C.; SATOVIC, Z.; PÊGO, S.; FEVEREIRO, P. Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germoplasm using microsatellite markers. **Euphytica**, Wageningen, v.137, n.1, p.63-72, 2004.