



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Thiago Fellipe Nunes de Mendonça

**Dissimilaridade Genética entre Linhagens de Quiabeiro: caracteres
morfológicos e moleculares**

Monte Carmelo – MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Thiago Fellipe Nunes de Mendonça

**Dissimilaridade Genética entre Linhagens de Quiabeiro: caracteres
morfológicos e moleculares**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Agronomia,
campus Monte Carmelo, da
Universidade Federal de Uberlândia,
como parte dos requisitos necessários
para obtenção do grau de Engenheiro
Agrônomo.

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Silva Siquieroli

Monte Carmelo – MG

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Thiago Fellipe Nunes de Mendonça

**Dissimilaridade Genética entre Linhagens de Quiabeiro: caracteres
morfológicos e moleculares**

Monte Carmelo, 06 de julho de 2018

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Silva Siquieroli
Orientadora

Prof. Dr. Gabriel Mascarenhas Maciel
Membro da Banca

MSc. Igor Forigo Beloti
Membro da Banca

Monte Carmelo - MG
2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus que tem me guiado e aconselhado por toda a minha vida.

À professora Ana Carolina Silva Siquieroli pela paixão em ensinar, pelos conselhos e ensinamentos durante a graduação e que sem sua ajuda, tal trabalho não seria possível.

Ao professor Gabriel Mascarenhas Maciel pelos ensinamentos de um grande melhorista, pelo qual tenho grande apreço.

As pessoas que ajudaram na realização deste trabalho, em especial ao José Marques “Seu Zé”, que cuida com tanta dedicação e amor dos experimentos na estação experimental de hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia.

À minha mãe, por ser meu porto seguro e meu grande amor.

Aos meus avós por serem verdadeiros anjos na terra que contribuem muito para o meu crescimento humano.

Aos meus tios Manuel e Lázaro, e a minha tia Deile que acreditaram em mim, e acima de tudo sempre me apoiaram.

Aos meus primos, em especial Vinicius e demais amigos pelas palavras de amizade e apoio incondicional.

À minha irmã Thauany, que tenho fé será grande.

À minha família por seu apoio em todos os momentos difíceis.

À todas as pessoas que depositaram sua fé em mim.

À Universidade Federal de Uberlândia e seu corpo docente que me proporcionou enxergar um novo mundo a partir do conhecimento.

À todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse trabalho, obrigado.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

— Carl Sagan

RESUMO

O conhecimento da diversidade genética de uma espécie é muito importante para a conservação do germoplasma e sua utilização em programas de melhoramento genético. A caracterização molecular oferece um conjunto de informações detalhadas a respeito da variabilidade genética das linhagens estudadas, em adição a caracterização morfológica. Em conjunto, se tornam uma poderosa ferramenta na determinação das melhores linhagens acerca de uma determinada população. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de vinte linhagens de quiabeiro, (*Abelmoschus esculentus*) oriundos do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo, utilizando o método estatístico de Tocher e o método UPGMA. Marcadores moleculares do tipo RAPD e análise morfológica dos materiais foram utilizadas para a coleta de dados, fornecendo dados qualitativos e quantitativos respectivamente. Assim, foi possível identificar dissimilaridade dos caracteres morfológicos e moleculares entre as 20 linhagens avaliadas, tornando-se possível a utilização deste germoplasma para subsidiar futuros programa de melhoramento genético de quiabeiro na região.

Palavras-chave: *Abelmoschus esculentus*, RAPD, variabilidade genética.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	2
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1 Diversidade Morfológica.....	3
2.2 Diversidade Molecular	4
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	7
3.1 Diversidade Morfológica.....	7
3.2 Diversidade Molecular	8
4. CONCLUSÃO	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12

1. INTRODUÇÃO

O quiabeiro (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) é uma planta cujo fruto é consumido e apreciado no Brasil desde o período colonial, sendo cultivado nas áreas tropicais da Ásia, Américas e África. No estado de Minas Gerais ocupa lugar de destaque no setor devido ao volume comercializado e ao seu elevado valor em determinadas épocas do ano (SEDIYAMA et al., 2009).

O Brasil está entre os maiores produtores de quiabo sendo os estados de Minas Gerais, São Paulo, Sergipe, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Goiás os maiores produtores do país com cerca de 85% da safra nacional no ano de 2014 (IBGE, 2015).

O clima do Brasil, em sua maior parte, é propício para o cultivo do quiabeiro. Essa cultura expressa-se como um alimento popular de alto valor nutricional, com grande aceitação no mercado, sendo os pequenos produtores os maiores responsáveis por toda a sua produção e comercialização (PAES et al., 2012).

As características do quiabeiro são bastante distintivas. Apresenta-se como uma hortaliça-fruto com produção anual, porte ereto, arbustiva e caule semilenhoso. A raiz é profunda e pivotante, atingindo quase dois metros de profundidade, contudo a maior parte delas localiza-se por volta de 20 cm (MOTA et al., 2001; FILGUEIRA, 2013). As flores são amareladas e grandes, e a floração inicia-se entre 40-60 dias após a sementeira, ocorrendo primeiro na haste principal e três semanas após, nas ramificações da planta (FILGUEIRA, 2013).

No intuito de se estimar a diversidade genética presente em uma coleção de germoplasma, os acessos devem ser caracterizados e avaliados (COSTA et al., 2008). Uma estratégia bastante utilizada por melhoristas para seleção de linhagens para seus programas de melhoramento compreende a obtenção de linhagens a partir da segregação de híbridos de quiabeiro com características de interesse agrônomo (MACIEL et al., 2018). Os marcadores moleculares são ferramentas poderosas na geração de informações úteis em diferentes etapas, desde a coleta, caracterização e uso de recursos genéticos, passando por atividades de pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento. Vários autores têm discutido as aplicações práticas dos

marcadores moleculares em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma (FALEIRO, 2007; FALEIRO et al., 2009; SOUZA, 2015;).

A caracterização molecular pode ser feita por meio de diferentes técnicas, entre elas, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) ou seja, DNA polimórfico amplificado ao acaso. São fragmentos de DNA amplificados pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando *primers* curtos (geralmente dez nucleotídeos) de sequência aleatória. Como o *primer* possui sequência aleatória, o alvo da amplificação é desconhecido, sendo a expressão gênica dominante. Suas principais aplicações são *Fingerprinting*, diversidade genética e mapeamento genético (FALEIRO et al., 2011), mas apesar de ser um marcador que apresenta baixa repetibilidade dos resultados, suas principais vantagens são o baixo custo, simplicidade de utilização e rapidez na obtenção de dados, se tornando assim, um marcador eficiente e apropriado para ser utilizado em estudos de diversidade genética, em coleções de germoplasma, na distinção de linhagens e no reconhecimento de materiais duplicados (COSTA et al, 2008).

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a divergência genética entre linhagens de quiabo pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo, por meio de marcadores moleculares do tipo RAPD e caracteres morfológicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Diversidade Morfológica

O experimento foi realizado na Estação Experimental de Hortaliças da Universidade Federal de Uberlândia, campus Monte Carmelo (altitude 873 m, 18°42'43,19" S e 47°29'55,8" WGr). As plantas foram cultivadas em vasos com 10 litros com substrato a base de fibra de coco (PLANTMAX®). Os acessos consistiram de 20 linhagens pré-comerciais de quiabeiro pertencentes ao Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Uberlândia. Durante todo o experimento foram realizadas as práticas culturais recomendadas para a cultura, como controle de pragas, doenças e plantas daninhas para a cultura do quiabeiro segundo Filgueira (2013).

O experimento foi realizado com o posicionamento de cinco linhagens por parcela, totalizando 100 plantas dispostas em forma sequencial espaçadas com 0,4 x 1,0 m. As avaliações morfológicas começaram a ser executadas a partir do florescimento, procedendo inicialmente com a quantificação do teor de clorofila usando o medidor portátil CLOROFILOG CFL1030 da marca FALKER®, posteriormente a colheita e contagem dos frutos, no ponto comercial. Nos intervalos entre as colheitas a quantificação do peso dos frutos colhidos foi realizada.

Os dados quantitativos discretos e contínuos foram submetidos ao método de otimização de Tocher e aos métodos hierárquicos de Ward, pelo método da ligação média não ponderada (UPGMA), sendo a validação determinada pelo coeficiente de correlação cofenética (CCC), calculada pelo teste de Mantel (1967). A análise multivariada foi conduzida para determinar a dissimilaridade entre as linhagens de quiabeiro, obtendo uma matriz de dissimilaridade pela distância generalizada de Mahalanobis D^2 . As contribuições relativas para os dados quantitativos foram analisadas pelo software GENES v. 2015.5.0 (CRUZ, 2013).

2.2 Diversidade Molecular

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética, Bioquímica/Biotecnologia (LAGEB), UFU, Campus Monte Carmelo, sendo avaliados vinte linhagens de quiabeiro (UFU QB-01 ao UFU QB-20).

Folhas jovens das diversas linhagens foram colhidas em *bulk*, sendo este composto por cinco plantas/genótipo, totalizando cem plantas. As folhas correspondentes a cada acesso foram imediatamente reunidas, enroladas em papel alumínio, identificadas e mergulhadas em N₂ líquido para não ocorrer degradação do DNA. Uma vez no laboratório, este material foi acondicionado em freezer a uma temperatura de -18 °C.

A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações. Cerca de 300 mg de tecido macerado foram transferidos para tubos de 2,0 mL nos quais adicionaram-se 700 µL de tampão CTAB (NaCl 1,4M; Tris HCl pH 8,0 100 mM; EDTA 20 mM; CTAB 2%; β-Mercaptoetanol 0,2% e água Milli-Q) pré-aquecido a aproximadamente 65°C.

O material foi incubado em banho-maria a essa temperatura, entre 30 minutos e uma hora, agitando-se a cada 10 minutos. Ao homogeneizado foram adicionados 600 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) sob agitação manual por cinco minutos; em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por dez minutos a 5.220 x g. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para novos tubos previamente identificados.

Nesta solução foram adicionados 400 µL de isopropanol gelado (-20°C) misturando-se suavemente por inversão dos tubos, várias vezes. As amostras foram então submetidas à temperatura de -20°C por 30 minutos ou mais, para formação do sedimentado. As amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 11.750 x g e descartado o sobrenadante. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70%, por cinco a dez minutos e uma vez com etanol absoluto, por três minutos. Ocasionalmente pode aparecer contaminantes no pellet extraído, o que dificulta o processo de separação do DNA de possíveis contaminantes. Com isso a remoção de polissacarídeos e proteínas pode ser realizada adicionando-se NaCl a 1 M, aquecendo o tudo com o material em banho-maria a 60-65°C por alguns minutos, com isso todo o DNA encontrará em suspensão, sendo o restante da solução apenas contaminantes (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Para secagem, os tubos contendo o precipitado foram deixados em câmara de fluxo laminar. O DNA extraído foi ressuspensionado em 150 µL de TE (TrisHCl 1M, EDTA 500 mM) pH 8,0 com RNase (10 µg/mL) e incubada a 37°C, por 30 minutos a duas horas.

A quantidade de DNA extraído foi determinada por meio de leitura em espectrofotômetro a 260 nm. As amostras de DNA foram visualizadas em luz ultravioleta e as imagens foram documentadas em um sistema de fotodocumentação de géis para posterior análise dos resultados. A integridade das amostras de DNA obtidas foi observada através da análise comparativa da intensidade das bandas formadas por eletroforese em géis de agarose (1,5%) em tampão TBE 1X (Tris base 1M, Ácido Bórico e EDTA 500mM), corado com corantes fluorescentes.

As reações de amplificação foram realizadas conforme Williams et al. (1990), modificadas, num volume final de 25 µL e contendo os reagentes nas seguintes concentrações: 2,4 Mmol/L de MgCl₂; 100 µM dATP, dCTP, dGTP e

dTTP; 0,3 μ M de primer; 20 ng de DNA genômico; 1 unidade de Taq DNA polimerase e tampão de PCR 1X.

A primeira parte do trabalho consistiu na triagem dos *primers*, tendo como critérios de escolha, em ordem decrescente de prioridade, um grande número de bandas totais, um grande número de bandas polimórficas e polimorfismo interespecífico. Assim, selecionaram-se os nove melhores *primers* (série Operon Technologies - Alameda, CA, USA – Tabela 1).

Tabela 1. Relação dos nove *primers* RAPD (Operon Technologies, USA) utilizados, com seus respectivos códigos e sequências.

ORDEM	PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')
1	OPA15	TTCCGAACCC
2	OPB08	GGACCCTTAC
3	OPB20	TGGACCGGTG
4	OPC08	GTCCACACGG
5	OPC11	AAAGCTGCGG
6	OPD03	TGAGCGGACA
7	OPD05	GTCGCCGTCA
8	OPE10	CCTCTAGACC
9	OPF19	CACCAGGTGA

Mendonça *et al* (2018)

As reações de PCR foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: 95 °C por 1 minuto, seguido de 45 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 36 °C e 2 minutos a 72 °C, e uma etapa final para extensão de 7 minutos a 72 °C, utilizando o modo de transição de temperatura mais rápida, 1 °C/seg.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE 1X (Tris base 1M, Ácido Bórico e EDTA 500 mM), corado com corantes fluorescentes na concentração 1:1. Para estimar o tamanho dos fragmentos será utilizado marcador de 100 pares de base DNA Ladder. Os géis foram submetidos à luz ultravioleta em fotodocumentador para visualização e as imagens capturadas para posterior análise.

Foi elaborada uma matriz de dados binários em que o número 1 correspondeu à presença da banda, o zero, ausência, e quando não for possível determinar se a banda estava presente ou não em função da não amplificação de um dado acesso para aquele iniciador, foi computado como número 2.

Para estas análises foram utilizados os métodos hierárquicos de Ward e UPGMA e o método de otimização de Tocher. Foi realizada ainda a projeção das distâncias no plano. Todos os dados foram analisados pelo programa R (2018).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diversidade Morfológica

O método de otimização de Tocher reuniu as linhagens em quatro grupos. O grupo I reuniu a maioria das linhagens, representando 70% das linhagens. As linhagens UFU-02 e UFU-07 completaram o grupo II, e o grupo III foi representado pelas linhagens UFU-08, UFU-18 e UFU-03. Por fim, a linhagem UFU-13 manteve-se isolado no grupo IV (Tabela 2).

Tabela 2. Formação dos grupos das 20 linhagens de quiabeiro, segundo o método de otimização de Tocher.

Grupo	Linhagens
I	UFU-06 UFU-16 UFU-01 UFU-11 UFU-05 UFU-20 UFU-10 UFU-15 UFU-04 UFU-09 UFU-14 UFU-17 UFU-12 UFU-19
II	UFU-02 UFU-07
III	UFU-08 UFU-18 UFU-03
IV	UFU-13

Fonte: Mendonça (2018)

O agrupamento das linhagens pelo método hierárquico UPGMA formou dois grupos (Figura 1), com o ponto de corte estabelecido na distância de 50% de similaridade, estabelecida no local de ocorrência da mudança abrupta nas ramificações presentes no dendrograma (SUDRÉ et al., 2005). O primeiro grupo representou 82,35% das linhagens avaliadas, mostrando similaridade entre os mesmos. Por este método as linhagens UFU-08, UFU-18 e UFU-03

também apresentaram serem divergentes dos demais, semelhante ao resultado obtido pelo método de otimização de Tocher.

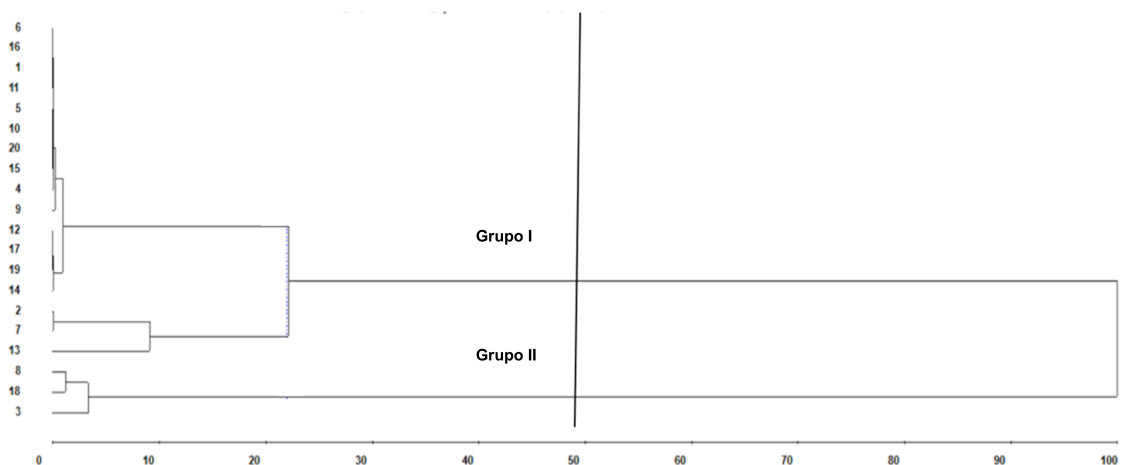


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método UPGMA a partir das medidas de dissimilaridade genética entre 20 linhagens de *Abelmoschus esculentus* caracterizados por marcadores RAPD. UFU, campus Monte Carmelo – MG, 2018. Corte a 50% de similaridade formando três grupos.

O coeficiente de correlação cofenético foi de 0,90 ($p < 0,01$) e distorção de 11,89%, o que evidencia uma adequada relação entre a matriz de distância e o dendrograma. Maciel et al. (2015) estudando o potencial agronômico de quiabeiro para obtenção de genitores encontraram coeficiente de correlação cofenética de 0,79 ($p < 0,01$), o que evidencia a correlação da matriz de distância e consequentemente a formação do agrupamento.

Martinello et al. (2003) também avaliaram a utilização de marcadores RAPD para estimar a diversidade em linhagens de quiabeiro. Empregaram as técnicas de análise multivariada e demonstraram haver diversidade genética entre as linhagens de quiabeiro avaliadas.

3.2 Diversidade Molecular

Visando avaliar a diversidade molecular entre as linhagens, realizou-se análise estatística pelo método de otimização de Tocher, que reuniram as linhagens em três grupos. O grupo I obteve a maioria das linhagens, representando 80% das linhagens. As linhagens UFU-10, UFU-15 e UFU-11

completaram o grupo II e o acesso UFU-07 manteve-se isolado no grupo III (Tabela 3).

Tabela 3. Formação dos grupos das 20 linhagens de quiabeiro, segundo o método de otimização de Tocher.

Grupo	Linhagens
I	UFU-09 UFU-18 UFU-04 UFU-17 UFU-19 UFU-03 UFU-13 UFU-05 UFU-20 UFU-02 UFU-12 UFU-16 UFU-01 UFU-06 UFU-08 UFU-14
II	UFU-10 UFU-15 UFU-11
III	UFU-07

Fonte: Mendonça (2018)

O agrupamento das linhagens pelo método hierárquico UPGMA formou três grupos (Figura. 2), com o ponto de corte estabelecido na distância de 50% de similaridade, estabelecida no local de ocorrência da mudança abrupta nas ramificações presentes no dendrograma (SUDRÉ et al., 2005). O primeiro grupo representou 40% das linhagens avaliadas, mostrando similaridade entre eles. Por este método as linhagens UFU-20, UFU-19, UFU-16, UFU-13 e UFU-09 também formaram o grupo com o menor número de representantes, dados que não foram coerentes com resultado obtido pelo método de otimização de Tocher.

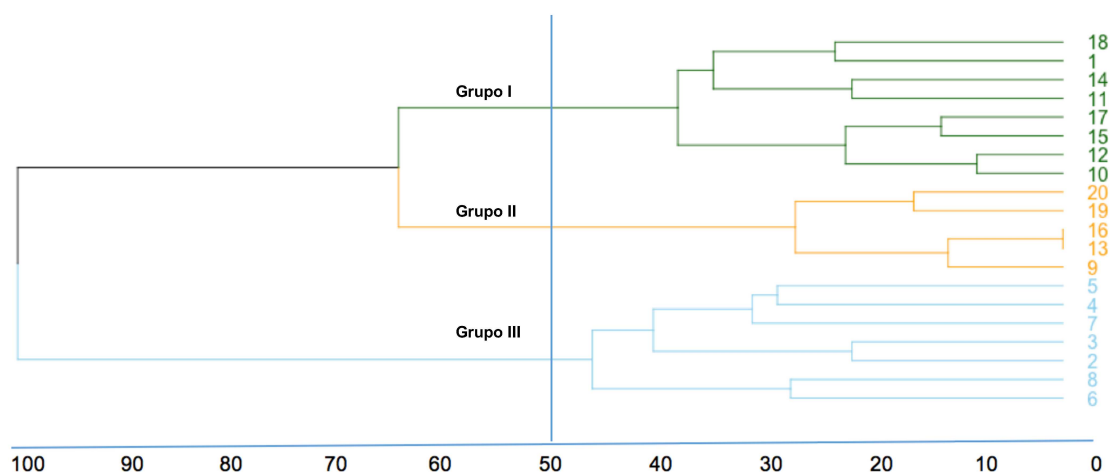


Figura 2. Dendrograma obtido pelo método UPGMA baseados no coeficiente de *Jaccard* e a partir das medidas de dissimilaridade genética entre 20 linhagens de *Abelmoschus esculentus* caracterizados por marcadores RAPD. UFU, *campus* Monte Carmelo – MG, 2018. Corte a 50% de similaridade formando três grupos

O coeficiente de correlação cofenético foi de 0,84 ($p < 0,01$) e distorção de 7,16%, o que evidencia uma adequada relação entre a matriz de distância e o dendrograma. Cada iniciador produziu bandas com um número variável de intensidade, de forma que foram possíveis a sua identificação, e no caso de bandas inespecíficas, estas foram descartadas. Foram utilizados nove *primers*, cujas sequências podem ser visualizadas na Tabela 1.

Dos *primers* utilizados no experimento, apenas o identificador OPE10 não se anelou à fita de DNA. Assim, oito *primers* produziram um total de 35 bandas, dessas 25 foram polimórficas (71,43%) e 10 foram monomórficas (28,57%). Em média, cada *primer* gerou 4,37 bandas, sendo 1,25 monomórficas e 3,13 polimórficas. Com isso podemos observar que existe um número superior de linhagens com *loci* tendendo a heterozigose ou homozigose dominante, já que trata-se de um marcador dominante ou heterozigoto (AA ou Aa).

Tabela 4. Lista de iniciadores utilizados, a sua sequência e o número de bandas total (monomórficas e polimórficas) amplificadas por PCR.

ORDEM	PRIMER	SEQUÊNCIA (5'-3')	NÚMERO DE BANDAS			% POLIMORFISMO
			TOTAL	MONOMÓRFICA	POLIMÓRFICA	
1	OPA15	TTCCGAACCC	4	1	3	75,00
2	OPB08	TGGACCGGTG	5	1	4	66,66
3	OPB20	TGGACCGGTG	4	1	3	75,00
4	OPC08	TGGACCGGTG	3	1	2	50,00
5	OPC11	AAAGCTGCGG	6	2	4	80,00
6	OPD03	GTCGCCGTCA	4	1	3	80,00
7	OPD05	TGAGCGGACA	4	2	2	66,66
8	OPF19	CCTCTAGACC	5	1	4	75,00
TOTAL			35	10	25	
MÉDIA DE BANDA POR PRIMER			4,37	1,25	3,13	
% POLIMORFISMO				71,43		

Com os resultados apresentados na Tabela 4, pode-se observar que os *primers* OPD03 e OPC11 obtiveram os maiores valores de polimorfismo (80%), seguido pelo primer OPA15, OPB20 e OPF19 (75%).

Da mesma forma o identificador OPC08 demonstrou o menor índice para polimorfismo (50%). Martinello et al. (2003) avaliaram a divergência de 42 acessos do gênero *Abelmoschus* sp. e um de *Hibiscus* sp. confirmando a existência de uma heterogeneidade entre os acessos analisados identificada por marcadores RAPD. O marcador OPA15 foi capaz de produzir uma média de quatro fragmentos de DNA e obter 75% de polimorfismo pelo método RAPD (Figura 3).

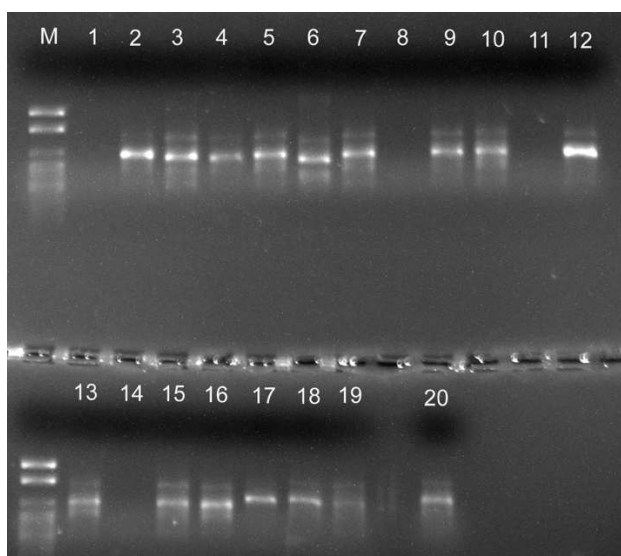


Figura 3: Produtos de amplificação gerados pelo *primer* OPA15 (M) Marcador 100 pb DNA Ladder; (UFU-01 ao UFU-20) linhagens analisadas. UFU, Campus Monte Carmelo – MG, 2018.

Ikran-ul-Haq et al. (2016) estudaram a diversidade de 39 acessos de quiabeiro obtidos de várias fontes no Paquistão, usando 20 *primers*, onde o método utilizado foi eficiente para avaliar a diversidade entre os acessos estudados. Patel et al. (2018), utilizando 13 *primers* baseados na informação de polimorfismo providos em trabalhos anteriores, obtiveram um grau de 93,36% de polimorfismo na avaliação de 10 genótipos, analisando a resistência para o vírus YVMV em quiabeiro utilizando-se a técnica de RAPD, o que comprova a eficiência do método utilizado.

As análises de agrupamento estão entre as técnicas mais utilizadas para estudo da divergência genética. A eficiência dos métodos hierárquicos foi

estudada por alguns autores. Panero et al. (2009) estudaram a aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco, onde a análise de agrupamentos hierárquicos foi eficiente para separar os materiais de acordo com a sua origem geográfica. Puiatti et al. (2014) estudaram a comparação dos métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA entre acessos de alho, onde os resultados foram próximos para os genótipos mais divergentes. No presente trabalho, os resultados foram próximos para as avaliações morfológicas, porém divergiram para as análises moleculares.

Segundo Cruz (1990), as técnicas de estatística multivariada que permitem a quantificação da dissimilaridade pela distância genética, assim como análises de agrupamentos, constituem-se em instrumentos adequados para a avaliação de acessos em bancos de germoplasma, onde o número de genótipos pode ser elevado e muitos descritores são utilizados. Assim, essa metodologia mostrou-se eficiente na avaliação da dissimilaridade entre as linhagens de quiabeiro, sendo realizada uma análise quantitativa baseada em descritores morfológicos e outra qualitativa, baseada em ausência e presença de bandas de DNA.

4. CONCLUSÃO

Foi possível identificar dissimilaridade dos caracteres morfológicos e moleculares entre as 20 linhagens avaliadas, tornando-se possível a utilização deste germoplasma para subsidiar futuros programa de melhoramento genético de quiabeiro na região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COSTA, F. R. *et al.* **Marcadores RAPD e caracteres morfoagronômicos na determinação da diversidade genética entre acessos de pimentas e pimentões.** Campos dos Goytacazes: Ciência Rural, 2008.

CRUZ, C.D. **a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics.** *Acta scientiarum.* 35. 514p. Viçosa: UFV, 2001. 648p.

CRUZ, C.D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas.** Piracicaba: USP/ESALQ, 1990. 188 p. (Tese doutorado).

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados aos programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FALEIRO, F. G.; REIS JÚNIOR, F. B.; FRAGOSO, R. R.; CORDEIRO, M. C. R.; PINTO, J. F. N.; OLIVEIRA, F. **Biotecnologia, transgênicos e biossegurança: Demandas para a pesquisa**. In: FALEIRO, F. G.; FARIAS NETO, A. L. Savanas: demandas para a pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; R. JÚNIOR, F. B. dos. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2011.

FERREIRA, M.E; GRATTAPLAGIA, D. **Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 221 p.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**, 3a ed. Viçosa: UFV, 2013. 421 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário 2015. Brasil, **Grandes Regiões e Unidades da Federação**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2015.pdf>. Acesso em: 05 de abril de 2017.

IKRAN-UL-HAQ. **ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY IN OKRA (*Abelmoschus esculentus* L.) USING RAPD MARKERS**. Pakistan Journal Of Agricultural Sciences, Sargodha, p.656-662, abr. 2016.

MACIEL, Gabriel M et al. **Agronomic potential and selection of okra hybrids to obtain potential genitors**. Horticultura Brasileira, Jaguariúna, v. 36, n. 1, p.112-117, mar. 2018.

MANTEL, N. 1967. **The detection of disease clustering and a generalized regression approach**. *Cancer Research* 27: 209-220.

MARTINELLO, G.E.; LEAL, N.R.; AMARAL JÚNIOR, A.T.; PEREIRA, M.G.; DAHER, R.F. **Diversidade genética em quiabeiro baseada em marcadores RAPD**. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 21, n. 1, p. 20-25, março 2003.

PAES, H. M.F; ESTEVES, B.S; SOUSA, E. F. **Determinação da demanda hídrica do quiabeiro em Campos dos Goytacazes, RJ**. Revista Ciência Agrônômica, v. 43, n. 2, p. 256-261, 2012.

PANERO, F. S. et al. **Aplicação da análise exploratória de dados na discriminação geográfica do quiabo do Rio Grande do Norte e Pernambuco**. Eclética Química, Boa Vista, v. 34, n. 3, p.33-40, out. 2009.

PATEL, Jalpesh. **Assessment of Genetic Diversity of Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) For YVMV Using RAPD and SSR Markers.** International Journal of Advanced Biological Research, Nagar, v. 8, n. 2, p.217-223, jun. 2018.

PUIATTI, Guilherme Alves et al. **Comparação dos métodos de agrupamento de Tocher e UPGMA no estudo de divergência genética em acessos de alho.** Revista de Estatística UFOP, Viçosa, v. 3, n. 3, p.275-279, nov. 2014.

R CORE TEAM (2017). **R: A language and environment for statistical computing.** RFoundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

SEDIYAMA, Maria AparecidaNogueira et al. **Produtividade e Estado Nutricional do Quiabeiro em Função da Densidade Populacional e do Biofertilizante Suíno.** Bragantia, Campinas, v. 68, n. 4, p.913-920, abr. 2009.

SOUZA, D.C.I. **Técnicasmoleculares para caracterização e conservação de plantasmedicinais e aromáticas: umarevisão.** RevistaBrasileira de PlantasMedicinais, Botucatu, v. 17, n. 3, p.495-503, set. 2015.

SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E.M.; KARASA, W.A.M. et al. **Divergência genética entre acessos de pimenta e pimentão utilizando técnicas multivariadas.**Horticultura Brasileira,v. 23, p. 22-27, 2005.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. **DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.***NucleicAcids Res.*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.