



DÉA A. M. NETTO, ISABEL R. P. SOUZA E RAMIRO V. ANDRADE <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, 35.701-970, Sete Lagoas, MG,  
[dea@cnpmc.embrapa.br](mailto:dea@cnpmc.embrapa.br), [isabel@cnpmc.embrapa.br](mailto:isabel@cnpmc.embrapa.br), [ramiro@cnpmc.embrapa.br](mailto:ramiro@cnpmc.embrapa.br)

## INTRODUÇÃO

Dada a necessidade de otimizar a relação entre custos e manutenção de uma coleção de germoplasma, Frankel (1984), citado por Brown (1995), propôs o termo coleção núcleo que deveria representar, com um mínimo de repetitividade, a diversidade genética de uma espécie e seus parentes. Essa coleção núcleo consiste em ser o conjunto mais importante de acessos de toda a coleção base (Brown, 1989). O tamanho da coleção núcleo, segundo a teoria de amostragem de alelos neutros em populações finitas, deve ser de cerca de 10% de acessos tomados aleatoriamente da coleção base tendo a eficiência de reter a variação genética total em aproximadamente 70% (Brown, 1995). Os acessos da coleção núcleo são escolhidos por ser primariamente representativos, ecologicamente e geneticamente distintos entre si, permitindo que se maximize a diversidade genética e minimize a similaridade entre os acessos. A coleção núcleo de milho da Embrapa Milho e Sorgo foi desenvolvida utilizando a estratégia de estratificação da coleção, uma vez que este procedimento possibilita a amostragem dos alelos localizados e comuns (Brown, 1995; Crossa et al., 1995; Spagnoletti Zeuli e Qualset, 1995; Abadie et al., 2000). Foram utilizadas as informações de origem do germoplasma, origem ecogeográfica e tipo de grão das variedades autóctones, e para cada grupo, a representação na coleção núcleo foi relativa ao logaritmo do número de acessos da coleção base (Abadie, 1997; Abadie et al., 2000). Assim, pode-se estabelecer uma coleção núcleo com 235 variedades autóctones, 35 materiais melhorados e 30 materiais introduzidos resultando em uma amostra de 300 acessos, considerada de tamanho adequado para ser manejada pelos curadores a baixo custo. A utilização de métodos de ordenação em estudos de divergência genética também vem sendo aplicada em várias espécies de plantas. As medidas feitas entre pares de acessos são chamadas de associação por considerarem que há uma distância que pode ser quantificada entre eles (Crossa et al., 1995; Cruz e Regazzi, 1997). Essas medidas podem ser de similaridade, como o coeficiente de Jaccard, que mede o quanto os acessos são similares num conjunto de atributos, ou de dissimilaridade, como a distância euclidiana, que verifica o quanto os acessos diferem entre si. Uma das aplicações de curto prazo do marcador molecular é o estudo da diversidade. Cada marcador é analisado como sendo um caráter fenotípico distinto e independente dos demais cuja interpretação é feita da

seguinte forma: alelos (bandas - fragmentos de DNA) em comum entre acessos representam similaridades genéticas, enquanto os não comuns representam diferenças genéticas. A informação molecular da diversidade genética pode auxiliar na avaliação de redundância e deficiências das coleções de germoplasma, bem como no estabelecimento e comparações de coleções nucleares (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Dentre as técnicas moleculares mais utilizadas atualmente, a de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, destaca-se por ser precisa e interessante para o estudo da variabilidade genética. Marcadores AFLP amostram de maneira ampla o genoma gerando um grande número de bandas (alelos) por gel, aumentando o rendimento de informações que podem ser resolvidas em um único gel (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Este trabalho teve por objetivo verificar a variabilidade genética da coleção núcleo de milho, subgrupo endosperma dentado, do Banco Ativo de Germoplasma de Milho da Embrapa utilizando-se marcadores AFLP.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a caracterização molecular dos acessos de milho da coleção núcleo foi utilizada a técnica de AFLP. **Isolamento e quantificação do DNA genômico:** O DNA foi extraído de um *bulk* de 100 folhas de cada acesso utilizando-se o método descrito por Saghai-Marooft et al. (1984). A quantificação da concentração de DNA foi realizada em espectrofotômetro através de leituras a 260 nm. **Marcadores AFLP:** Para o desenvolvimento desta técnica foram empregados *kits* da GIBCO (Rockville, MD, EUA) para a etapa de restrição do DNA genômico com as enzimas *EcoRI* e *MseI* e ligação dos adaptadores. Para as etapas de amplificação pré-seletiva e seletiva utilizaram-se os *kits* da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). A reação de AFLP foi preparada de acordo com o manual de AFLP (AFLP, 1997), com modificações, e utilizadas seis combinações de conjuntos de *primers*: *MseI* CAT e *EcoRI* ACA (6-FAM), *MseI* CAT e *EcoRI* AAG (HEX), *MseI* CAT e *EcoRI* AGC (NED); *MseI* CAG e *EcoRI* ACT (6-FAM), *MseI* CAG e *EcoRI* AGG (HEX), *MseI* CAG e *EcoRI* ACC (NED). Os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de policacrilamida utilizando-se o seqüenciador automático ABI PRISM 377 e a extração dos dados obtidos pelos programas *GeneScan* 2.1 e *GenoTyper* 2.0 para a montagem das tabelas binárias. Simulações do número ótimo de marcadores foram feitas utilizando o programa GQMol (Cruz, 2001). As estimativas de similaridades genéticas foram obtidas com a utilização do programa NTSyspc 2.02k (Rohlf, 1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tamanhos de fragmentos AFLP variaram de 52 a 499 pares de base (pb) (Tabela 1). As análises dos 45 acessos com seis combinações de *primers* revelaram um total de 218 fragmentos ou bandas, com média de 36,3 bandas por combinação de *primer*. O número de fragmentos variou de 30 para a combinação *MseI* CAG + *Eco* RI AGG até 44 para a combinação *MseI* CAG + *Eco* RI ACC. Padilha (2002) avaliando 35 linhagens de milho, com marcadores AFLP obteve uma média de 14 bandas polimórficas por combinação de *primers*. Em 114 genótipos da coleção núcleo de feijão e duas combinações de *primers*, Tohme et al. (1996) encontraram em média 102 bandas sendo que 90% eram polimórficas. O nível de polimorfismo encontrado no presente trabalho também foi superior ao relatado por Pejic et al. (1998), os quais obtiveram 38,7 bandas polimórficas de AFLP utilizando seis combinações de *primers* em linhagens de milho. Já Barrett et al. (1998) encontraram 229 bandas polimórficas de AFLP em 43 cultivares de trigo e Zhu et al. (1999) encontraram um total de 569 fragmentos com oito pares de *primers*, com média de 71 fragmentos por combinação de *primer* em 61 acessos de soja cultivada e silvestre, sendo que 48% dos fragmentos eram polimórficos. O procedimento de simulações sobre o número de marcadores usados em estudos de diversidade genética tem sido executado para se determinar a confiabilidade e a precisão do agrupamento produzido (Pejic et al., 1998).

Tabela 1. Combinação de *primers* utilizados na técnica de AFLP e número de fragmentos encontrados na amostra da coleção núcleo.

Combinação de <i>Primers</i>	Amplitude Alélica (pb)	Total	Polimorfismo (%)
1) <i>MseI</i> CAT + <i>Eco</i> RI ACA	55 – 337	37	78,4
2) <i>MseI</i> CAT + <i>Eco</i> RI AAG	69 – 322	37	97,3
3) <i>MseI</i> CAT + <i>Eco</i> RI AGC	56 – 324	39	89,7
4) <i>MseI</i> CAG + <i>Eco</i> RI ACT	55 – 499	31	71,0
5) <i>MseI</i> CAG + <i>Eco</i> RI AGG	57 – 444	30	66,7
6) <i>MseI</i> CAG + <i>Eco</i> RI ACC	52 – 460	44	79,5
Total	52 – 499	218	-
Média	57 – 398	36,33	80,4

Da mesma forma, foram realizadas simulações utilizando matrizes de distâncias calculadas pelo coeficiente de Jaccard com base em um número crescente de marcadores AFLP, verificando-se uma diminuição no desvio padrão e um aumento na correlação entre as matrizes de distâncias genéticas (Figura 1).

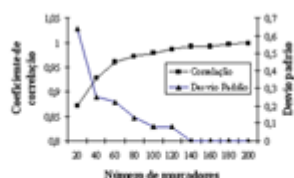


Figura 1: Correlação entre matrizes de distâncias utilizando o índice de Jaccard e desvio padrão obtidos por simulações de número de marcadores AFLP para os acessos de milho da amostra da coleção núcleo.

A partir de 120 marcadores de AFLP, o desvio padrão foi inferior a 0,08 e a correlação superior a 0,99 para os acessos da amostra da coleção núcleo. Estes valores corresponderiam à utilização de quatro combinações de *primers* mais polimórficos para o AFLP, baseados nos resultados da amostra da coleção núcleo. Tais resultados indicam que as 218 bandas foram suficientes para definir, com confiabilidade, a divergência genética entre os acessos. Isto pôde ser verificado por Johns et al. (1997) que encontraram o mesmo agrupamento utilizando 50 e 106 bandas entre 69 genótipos de feijão do Chile. Dias (1998) comentou que a utilização de, pelo menos, 30 locos polimórficos são suficientes para a construção de dendrogramas de elevada precisão. O dendrograma obtido pelo método UPGMA mostra que os distintos acessos não formaram grupos homogêneos definidos até uma distância correspondente a aproximadamente 25% da maior distância (Figura 2).

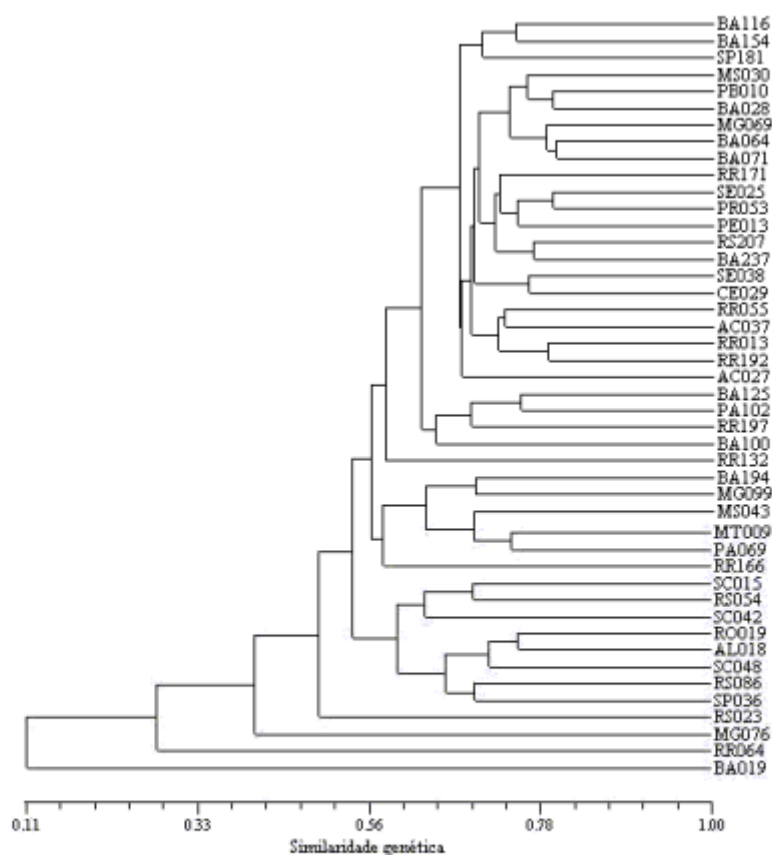


Figura 2. Dendrograma das similaridades genéticas entre os acessos da amostra da coleção núcleo subgrupo dentado pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento por UPGMA.

## LITERATURA CITADA

- ABADIE, T.; CORDEIRO, C. M.; ANDRADE, R. V. de; MAGALHÃES, J. R.; PARENTONI, S. N. A coleção nuclear de germoplasma de milho no Brasil. In: UDRY, C. V.; DUARTE, W. **Uma história brasileira do milho** – o valor dos recursos genéticos. Brasília: Paralelo 15, 2000. p. 65-78.
- ABADIE, T.; MAGALHÃES, J. R.; CORDEIRO, C. M. T.; PARENTONI, S. N.; ANDRADE, R. V. **Obtenção e tratamento analítico de dados para organizar coleção nuclear de milho**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1997. 8 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 20).
- AFLP. **Plant mapping: protocol**. The Perkin-Elmer Corporation, California, 1997.

- BARRETT, B. A.; KIDWELL, K. K.; FOX, P. N. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. **Crop Science**, Madison, v. 38, n. 5, p. 1271- 1278, Sept./Oct. 1998.
- BROWN, A. H. D. The case for core collections. In: BROWN, A. H. D.; FRANKEL, O. H.; MARSHALL, R. D.; WILLIAMS, J. T. (Ed.) **The use of plant genetic resources**. Cambridge, UK: Cambridge University, 1989. p. 136-156.
- BROWN, A. H. D. The core collections at the crossroads. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; VAN HINTUM, TH. J. L.; MORALES, E. A. V. (Ed.). **Core collections of plant genetic resources**. Chichester: J. Wiley, 1995. p. 3-19.
- CROSSA, J.; DeLACY, I. H.; TABA, S. The use of multivariate methods in developing a core collection. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; VAN HINTUM, TH. J. L. ; MORALES, E. A. V. (ed.). **Core collections of plant genetic resources**. Chichester: J. Wiley, 1995. p. 77-92.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES- versão windows**: aplicativo computacional em genética e estatística - Versão 2001. 0. 0. Viçosa, MG: UFV, 2001. 642 p. 2001.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 390 p.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- JOHNS, M. A.; SKROCH, P. N.; NIENHUIS, J.; HINRICHSEN, P. BASCUR, G.; MUÑOZ-SCHICK, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 2, p. 605-613, Mar./Apr. 1997.
- PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 8, p. 1248-1255, Dec. 1998.
- ROHLF, F. J. Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version2. 02k. New York, 1998.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 81, n. 24, p. 8014-8019, 1984.
- SPAGNOLETTI ZEULI, P. L.; QUALSET, C. O. The durum wheat core collection and the plant breeder. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; VAN HINTUM, TH. J. L. ; MORALES, E. A. V. (ed.). **Core collections of plant genetic resources**. Chichester: J. Wiley, 1995. p. 213-228.
- TOHME, J.; GONZALEZ, D. O.; BEEBE, S.; DUQUE, M. C. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, Madison, v. 36, n. 5, p. 1375-1384, Sept./Oct. 1996.
- ZHU, S. L.; MONTI, L. M.; AVITABILE, A.; RAO, R. Evaluation of genetic diversity in Chinese soyabean germplasm by AFLP. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Rome, n. 119, p. 10-14, 1999. Supplement.

