

Diversidade Genética de Plantas Daninhas Revelada por AFLP

I – Proso Millet (*Panicum miliaceum*, L.)

Décio Karam¹

Sarah M. Ward²

Philip Westra³

Scott J. Nessen³

José Edson Fontes Figueiredo¹

Introdução

AFLP (Amplified fragment length polymorphism) é uma técnica para estudar polimorfismo genético em populações que reúne algumas estratégias empregadas pelas técnicas de RFLP e RAPD, com as vantagens de detectar múltiplos locos por reação e apresentar alta repetibilidade (Jain *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1996). O polimorfismo gerado por AFLP apresenta herança mendeliana e pode ser usado para estudar parentesco e a diversidade genética dentro e entre populações, para desenvolver marcadores moleculares e para o mapeamento de genes de interesse. Contudo, a utilização de AFLP para fingerprinting de DNA genômico foi bastante limitada inicialmente, devido à necessidade de se usar marcação com fluoresceína ou com isótopos radioativos.

Posteriormente, foram desenvolvidos protocolos de coloração com prata, possibilitando dispensar o emprego de radioatividade e sem prejuízo para o poder de resolução da técnica.

Este estudo foi conduzido com a finalidade de padronizar a técnica de AFLP, empregando o método de coloração com prata. O ajuste dessa metodologia visou principalmente a realização de estudos posteriores sobre a diversidade genética de plantas invasoras importantes para as culturas do milho e do sorgo.

Material e Métodos

O material biológico consistiu de 12 populações de proso millet (*Panicum miliaceum*, L.) depositadas no Banco de Germoplasma da *Colorado State University*, Fort Collins, CO, USA. As populações

¹ Eng. Agr., PhD, Embrapa Milho e Sorgo – Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil

³ Eng. Agr., PhD, Department of Soil Crop Science, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523

² Eng. Agr., PhD, Department of Bioagricultural Sciences and Pest Management, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523

analisadas consistiram de três biótipos cultivados (South Dakota domestic brown, Colorado domestic white e Colorado domestic orange) e nove biótipos selvagens (Minnesota-Cambridge wild olive, Canada-Rosemount wild black, Oregon-Grand Island wild olive, Ontario-Canada Huron County wild black, Nebraska-Panhandle Center wild tan, Wyoming-Platte County wild brown, Colorado-weld County wild black, Colorado-Weld County wild tan e Colorado wild white). Para cada população de proso millet, foram utilizadas oito plantas desenvolvidas de sementes selecionadas aleatoriamente.

O DNA usado nas reações foi extraído de folhas frescas, com o kit Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA 91355), e a qualidade do DNA foi analisada em espectrofotômetro (UV 260/280 nm) e em géis de agarose a 1%, corados com brometo de etídio. A otimização da metodologia de AFLP para estudos em proso millet foi baseada em dois kits de reagentes, AFLP Analysis System I e AFLP Starter Primer Kit, comercializados pela empresa GIBCO/BRL. Após os testes iniciais sugeridos pelo fabricante, os resultados das amplificações não foram satisfatórios e, portanto, ajustes tiveram que ser feitos na metodologia original. As modificações foram: a) para a pré-amplificação, a concentração do DNA genômico foi de 500 ng e a temperatura de anelamento foi de 52 °C; b) o produto da pré-amplificação foi diluído 1:4 (v/v) em tampão TE e; c) para a amplificação seletiva do DNA, foram utilizados 2 µL da diluição do produto pré-amplificado (1:4), 1 U de *Taq* DNA polymerase e o volume final da reação foi de 20 µL. A amplificação seletiva foi feita usando oito combinações de pares de iniciadores por reação, dois/três (EcoR-TC / Mse-CAA; EcoR-TG / Mse-CTC), e três/três (EcoR-AAG / Mse-CAA; EcoR-AGG / Mse-CTT; Eco-AAG / Mse-CAG; EcoR-AGG / Mse-CTA; EcoR-AAC / Mse-CTT; EcoR-ACT / Mse-CAA). O programa utilizado para o PCR foi aquele indicado pelo fabricante (GIBCO/BRL). A pré-amplificação e

a amplificação seletiva foram realizadas no termociclador PTC-100™ programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc). A reação final foi analisada em gel de acrilamida a 5,3% corado com prata, que consistiu em incubar os géis com ácido acético a 10%, sob agitação durante 5 min, seguido de duas lavagens com água por dois minutos. A coloração com prata foi desenvolvida em solução contendo 2 g de nitrato de prata; 3 mL de formamida a 37%, em dois litros de água por 30 min. Em seguida, os géis foram lavados com água por 10 s e a coloração desenvolvida em solução contendo 60 g de carbonato de sódio (Fisher Chemical); 3 mL de formamida e 400 µL tiosulfato de sódio (Fisher Chemical). O processo de coloração foi interrompido com ácido acético a 10%, tão logo as bandas foram visualizadas.

Resultados e Discussão

Gel de acrilamida com alta resolução sem uso de isótopos radioativos é uma técnica eficiente para visualizar fragmentos de DNA amplificados por PCR. O método de coloração com prata também é preferível em relação ao protocolo para AFLP descrito originalmente, pois elimina a necessidade e os riscos de trabalhar com radioatividade.

Foram testadas oito combinações de pares de iniciadores com dois/três e três/três nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. As combinações de iniciadores com dois/três nucleotídeos seletivos foram as que produziram maior quantidade de fragmentos amplificados de DNA (Figura 1), mas as combinações de iniciadores com três/três nucleotídeos seletivos foram as que geraram maior número de fragmentos de DNA polimórficos (Figura 2). Blears *et al.* (1998), em uma revisão sobre a técnica de AFLP e suas aplicações, afirmaram que genomas pequenos (10^6 - 10^7 pares de bases) necessitam de apenas um ou dois nucleotídeos seletivos na extremidade 3' de cada iniciador para que o polimorfismo de DNA seja revelado, enquanto genomas mais complexos (10^8 - 10^{10} pares de bases) requereriam nucleotídeos

seletivos adicionais. Em proso millet, que é uma espécie com genoma pequeno (10^6 pares de bases), combinações de iniciadores com dois nucleotídeos seletivos não foram capazes de revelar o polimorfismo genético existente entre os biótipos (dados não mostrados), enquanto a combinação de primers com três nucleotídeos seletivos foi efetiva, produzindo cada combinação, em média, oito fragmentos de DNA polimórfico (Figura 1). No total de 450 fragmentos amplificados, 339 foram bem separados nos géis e, entre eles, 39 bandas polimórficas foram identificadas. As combinações de iniciadores, Mse-CTT / EcoR-ACC and Mse-CAA / EcoR-ACT foram as mais informativas, produzindo, cada uma, em média, oito fragmentos de DNA polimórficos.

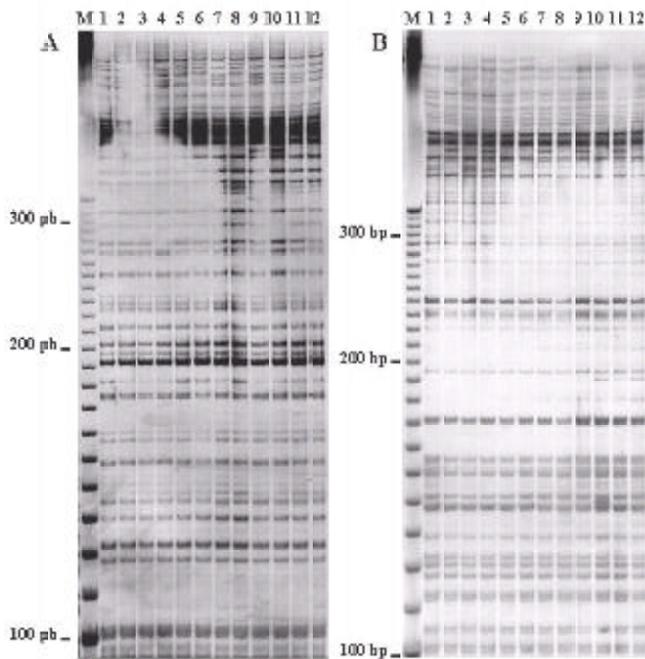


Figura 1. Padrão AFLP de DNA genômico de biótipos de proso millet. Foram usadas as combinações de iniciadores Mse-CAA / EcoR-TC (A) e Mse-CTC/EcoR-TG (B). Os números de 1 a 12 correspondem, respectivamente, aos biótipos: Minnesota-Cambridge wild olive; Canada-Rosemount wild back; Oregon-Grand Island wild olive; Ontario, Canada-Huron County wild black; Nebraska-Panhandle Center wild tan; Wyoming-Platte County wild brown; Colorado-Weld County wild black; Colorado-Weld County wild tan; South Dakota domestic brown; Colorado domestic white; Colorado domestic orange, and Colorado wild white. **M** = marcador de peso molecular 10pb.

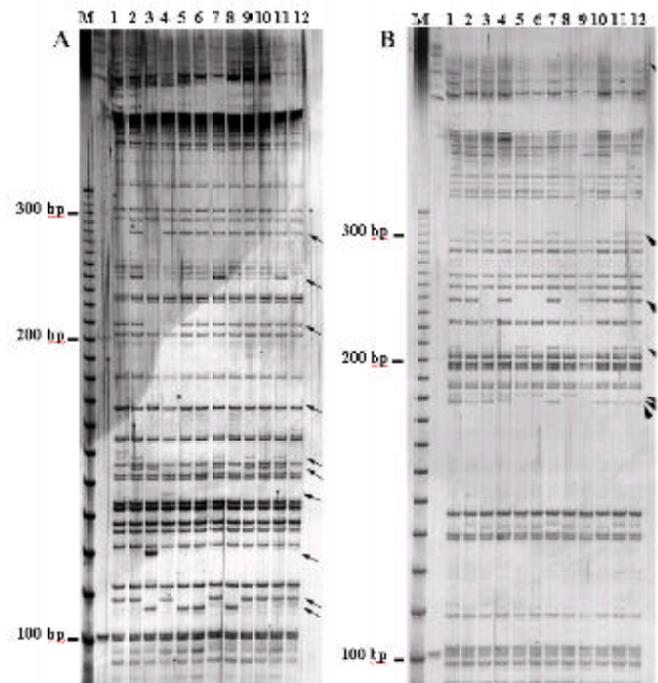


Figura 2. Padrão AFLP de DNA genômico de biótipos de proso millet. Foram usadas as combinações de iniciadores Mse-CTT / EcoR-AAC (A) e Mse-CAA / EcoR-ACT (B). Os números de 1 a 12 correspondem, respectivamente, aos biótipos: Minnesota-Cambridge wild olive; Canada-Rosemount wild back; Oregon-Grand Island wild olive; Ontario, Canada-Huron County wild black; Nebraska-Panhandle Center wild tan; Wyoming-Platte County wild brown; Colorado-Weld County wild black; Colorado-Weld County wild tan; South Dakota domestic brown; Colorado domestic white; Colorado domestic orange, and Colorado wild white. **M** = marcador de peso molecular 10pb.

As bandas de DNA polimórficas foram escrutinadas pela presença (computada como 1) e ausência (computada como 0) e analisadas pelo método UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical averages) do software NTSYS-PC, versão 2.02j (Exeter Software). O programa "tree" gerou um dendograma mostrando a relação filogenética entre os diferentes biótipos de proso millet (Figura 3). Esse procedimento possibilitou a separação dos biótipos de proso millet em dois grupos distintos, sendo um formado apenas por biótipos selvagens típicos (Nebraska-Panhandle Center wild tan, Wyoming-Platte County wild brown e Colorado-Wed County wild tan) e o segundo grupo composto por formas domesticadas (South Dakota domestic brown, Colorado domestic white e Colorado domestic orange) e biótipos selvagens, que apresentam algumas características fenotípicas de biótipos

cultivados (Minnesota-Cambridge wild olive, Canada-Rosemount wild black, Oregon-Grand Island wild olive, Canada-Huron County wild black, Colorado-weld County wild black e Colorado wild white), tais como, ausência de dormência das sementes e taxa relativamente elevada de crescimento radicular durante a germinação da semente.

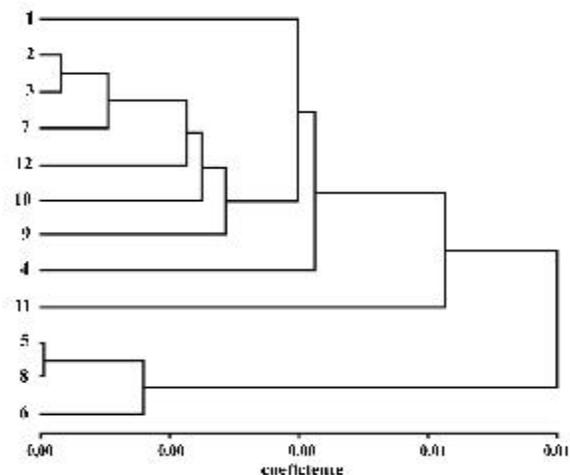


Figure 3. Dendrograma de doze biótipos de proso millet revelado por "UPGMA cluster analysis", baseado em algoritmo NEI72. Os números no dendrograma correspondem aos biótipos: 1 – Minnesota-Cambridge wild olive, 2 – Canada-Rosemount wild black, 3 – Oregon-Grand Island wild olive, 4 – Canada-Huron County wild black, 5 – Nebraska-Panhandle Center wild tan, 6 – Wyoming-Platte County wild brown, 7 - Colorado-Weld County wild black, 8 - Colorado-Weld County wild tan, 9 - South Dakota domestic brown, 10 - Colorado domestic white, 11 - Colorado domestic orange, 12 - Colorado wild white.

Vos *et al.* (1995) afirmaram que a técnica de AFLP permite detectar entre 50 e 100 fragmentos amplificados por reação. No presente estudo, foram observados, em média, 56 fragmentos de DNA por gel, indicando que a resolução dos fragmentos de DNA corados com prata está dentro da faixa observada quando isótopos radioativos são empregados. A percentagem de polimorfismo genético (11%) revelada pela técnica de AFLP em proso millet e a resolução satisfatória dos

fragmentos de DNA nos géis de acrilamida corados pela prata mostraram que a técnica de AFLP poderá ser muito útil para estudar a variabilidade genética e estabelecer relações filogenéticas em populações de plantas daninhas às culturas do milho e do sorgo. Esses estudos possibilitarão melhor entendimento sobre a dinâmica populacional e o manejo mais adequado no uso de herbicidas.

Referências Bibliográficas

Bleas MJ, De Grandis SA, Lee H and Trevors JT (1998) Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its application. *J Ind Microb Biotec* 21:99-114.

Hill M, Witsenboer H, Zabeau M and Vos P (1996) PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93:1202-1210.

Jain A, Bhatia S, Banga SS, Prakash S and Lakshmikumaran M (1994) Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theor Appl Genet* 88:116-122.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.

Zabeau M (1992) European Patent Application, publication no. EP 0534858.

Zabeau M and Vos P (1993) European Patent Application, publication no. EP 0534858.

Comunicado Técnico, 71

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Caixa Postal 151 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: 0xx31 3779 1000
Fax: 0xx31 3779 1088
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

1ª edição
1ª impressão (2003) Tiragem: 200

Comitê de Publicações

Presidente: Ivan Cruz
Secretário-Executivo: Frederico Ozanan Machado Durães
Membros: Antônio Carlos de Oliveira, Arnaldo Ferreira da Silva, Carlos Roberto Casela, Fernando Tavares Fernandes e Paulo Afonso Viana

Expediente

Supervisor editorial: José Heitor Vasconcellos
Revisão de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa