

VALIDAÇÃO DA COLEÇÃO NÚCLEO DE MILHO BRASILEIRA SUBGRUPO ENDOSPERMA DENTADO

DÉA ALECIA MARTINS NETTO, ISABEL REGINA PRAZERES DE SOUZA e ANTÔNIO
CARLOS DE OLIVEIRA¹

¹*Pesquisadores, Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 65, 35701-970 Sete Lagoas, MG,
E-mail: dea@cnpmis.embrapa.br, isabel@cnpmis.embrapa.br, oliveira@cnpmis.embrapa.br*

Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.8, n.3, p. 283-296, 2009

RESUMO – Este trabalho teve por objetivo validar a representatividade da variabilidade genética do subgrupo endosperma dentado da coleção núcleo de milho da Embrapa Milho e Sorgo. Foram avaliadas seis combinações de *primers* de AFLP, em amostras de 45 acessos de cada coleção, núcleo e base. Empregou-se o coeficiente de Jaccard para a similaridade genética e o método UPGMA para agrupamento dos acessos. A diversidade gênica para cada loco foi calculada pelo índice de Shannon e a diversidade total (H_T), pelo índice de diversidade de Nei (dentro (H_S) e entre populações (D_{ST})). A proporção da diversidade genética devido à diferença entre coleções foi calculada pelo índice G_{ST} . As frequências alélicas foram estimadas admitindo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Considerando os 90 acessos de ambas coleções, foram obtidas 209 bandas, com média de 34,8 bandas polimórficas por combinação de *primers*. O número efetivo médio de alelos foi 1,5994 e a heterozigosidade (h) usada para avaliar índice de conteúdo polimórfico de cada loco foi 0,349. A proporção da diversidade (G_{ST}) entre coleções foi 20,52%. Esses resultados mostraram que 79,48% da variabilidade genética ocorre dentro das coleções de milho. A identidade genética de Nei foi alta (0,8061), mostrando frequências alélicas semelhantes entre as coleções. Por esses resultados, conclui-se que a coleção núcleo de milho subgrupo dentado é um subconjunto representativo da variabilidade genética da coleção total mantida pelo banco de germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo.

Palavras-chave: *Zea mays*, AFLP, variabilidade genética, caracterização molecular

VALIDATION OF BRAZILIAN MAIZE CORE COLLECTION, SUBGROUP DENT ENDOSPERM

ABSTRACT – The objective of the study was to evaluate the representativity of the genetic variability of the maize core collection subgroup dent endosperm, belonging to the Brazilian Agricultural Corporation Maize and Sorghum. A sample of 45 accessions from each collection was used, core and base, and six AFLP primer combinations were applied to generate the genetic profiles. Jaccard coefficient was applied for genetic similarities studies and UPGMA method for access grouping. The genetic diversity for each locus was calculated by Shannon index, and the total diversity (H_T) by Nei diversity index, which was partitioned in component of the diversity inside (H_S) and between (D_{ST}) collections. The proportion of genetic diversity due to the difference between collections was calculated by G_{ST} index. Allelic frequencies were estimated admitting the Hardy-Weinberg equilibrium. Considering 90 accessions from both collections, 209 fragments were obtained with an average of 34.8 polymorphic fragments per primer combination. The mean effective number of alleles was 1.5994 and the heterozygosity (h) used for evaluation of the polymorphic index content (PIC) of each locus was 0.349. The proportion of diversity between collections in relation to total diversity (G_{ST}) was 0.2052 or 20.52%. These results showed that 79.48% of the genetic variability occurs inside maize collections. The Nei genetic identity was high (0.8061) showing similar allelic frequencies between collections. From these results it can be concluded that maize core collection subgroup dent is a representative subset of the genetic variability of whole collection maintained in the active germplasm bank of the Brazilian Agricultural Corporation.

Key words: *Zea mays* L., AFLP, genetic variability, molecular characterization

Uma coleção núcleo deve representar, com um mínimo de repetitividade, a diversidade genética de uma espécie e ser de baixo custo a sua manutenção (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, ecológica e geneticamente distintos entre si, permitindo que se maximize a diversidade genética e minimize a similaridade entre os acessos.

O desenvolvimento de uma coleção núcleo é basicamente um exercício de amostragem que tenta assegurar a máxima

conservação dos alelos presentes na coleção base. A amostragem estratificada aleatória é um procedimento recomendado por vários autores, para se obter a conservação dos alelos comumente dispersos, raramente dispersos e comumente localizados (Brown, 1995; Crossa et al., 1995; Spagnoletti Zeuli e Qualset, 1995; Abadie et al., 2000).

A coleção núcleo de milho da Embrapa Milho e Sorgo foi desenvolvida a partir da estratificação da coleção base, uma vez que esse procedimento possibilita a amostragem dos alelos localizados e comuns. Para a estratificação, 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 300 acessos, considerada de tamanho adequado para ser manejada pelos curadores a baixo custo.

Outro exemplo de coleção núcleo foi a formada a partir do banco de germoplasma de milheto (*Pennisetum glaucum*). A coleção total formada desde 1995 é composta de linhagens, populações e materiais silvestres que foram classificados, resultando em uma coleção núcleo de 212 acessos. Netto et al. (2008) verificaram a variabilidade fenotípica e a diversidade geográfica encontrada.

Quando uma coleção núcleo é definida, sua representatividade pode ser avaliada por

comparação de sua diversidade com a da coleção base, em cada descritor individual (Galwey, 1995; Hintum et al., 1999). Assim, pode-se quantificar quão próxima é a variação presente na coleção núcleo em relação à coleção base e se os padrões de variação da núcleo se assemelham aos da base. As medidas de diversidade genética, como o índice de diversidade de Nei, índice de Shannon, bem como o G_{st} , que é a diferenciação genética entre populações, são propostas por Galwey (1995) para validar a coleção núcleo.

A utilização de métodos de ordenação em estudos de divergência genética 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., 1995b; Cruz e Regazzi, 1997). Elas 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.

Outras medidas da diversidade genética têm sido utilizadas, como o índice de diversidade de Nei e o índice de informação de Shannon (Hintum, 1995; Galwey, 1995; Robinson, 1998).

Para o estudo da diversidade a curto prazo, o uso do marcador molecular tem sido aplicado. 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 de 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 das informações que podem ser resolvidas em um único gel e é uma técnica essencialmente dominante (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Este trabalho teve por objetivo validar o subgrupo endosperma dentado da coleção núcleo de milho do Banco Ativo de Germoplasma de Milho da Embrapa, utilizando-se marcadores moleculares AFLP.

Material e Métodos

Os materiais genéticos utilizados foram 45 acessos de milho do tipo de grão dentado, pertencentes à coleção nuclear, e 45 acessos da coleção base. Esses materiais pertencem

ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Milho e Sorgo, localizada em Sete Lagoas, MG, onde se realizou a pesquisa, nos anos de 2004 a 2006.

Utilizou-se a estratégia logarítmica na amostragem dos acessos das coleções núcleo e base e selecionaram-se os materiais por região de coleta.

Para a caracterização molecular dos acessos de milho, foi utilizada a técnica de AFLP.

Etapa 1: Obtenção do material vegetal

O plantio das sementes dos acessos foi realizado em canteiros e amostrados 100 indivíduos de cada acesso, sendo a terceira folha de cada plântula coletada 20 dias após a semeadura.

Etapa 2: Isolamento e quantificação de DNA genômico

O DNA foi extraído de um *bulk* de 100 folhas de cada acesso, utilizando-se o método de Saghai-Marooof et al. (1984). A quantificação da concentração de DNA foi realizada em espectrofotômetro, utilizando leituras a 260 nm. A solução estoque de DNA foi armazenada a -20°C . O DNA diluído para a concentração de trabalho de $25\text{ ng}\mu\text{l}^{-1}$ foi mantido a 4°C .

Etapa 3: Marcadores AFLP

Para o desenvolvimento dessa técnica, foram empregados *kits* da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, 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 Perkin-Elmer (Fostercity, CA, EUA). Na amplificação seletiva, os *primers* *EcoRI* foram marcados com os fluorocromos 6-FAM, HEX e NED.

A reação de AFLP foi preparada de acordo com o manual de AFLP (Applied, 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).

A eletroforese dos fragmentos de DNA foi realizada no sequenciador automático ABI PRISM 377 da Perkin Elmer. A extração dos dados foi automática, utilizando os programas GeneScan 2.1 e GenoTyper 2.0, em que foram analisados os tamanhos de fragmentos e geradas as tabelas binárias para cada conjunto de primers.

O índice de eficiência da técnica de AFLP (ET_{AFLP}) foi calculado conforme Pejic et al. (1998):

$$ET_{AFLP} = \frac{nlocos \cdot ne}{cp}$$

em que:

nlocos é o número total de locos;

ne é o número efetivo de alelos;

cp é o número de combinações de primers AFLP utilizado.

Análise dos dados moleculares

Os dados moleculares foram computados como binários, atribuindo-se o valor 0 (zero)

para a ausência do fragmento e 1 (um) para a sua presença. A tabela binária foi utilizada para o cálculo do índice de similaridade genética e análise de agrupamento. Para tanto, foi utilizado o índice de similaridade genética estimado pelo coeficiente de Jaccard. O agrupamento dos acessos foi realizado pelo método da média aritmética não ponderada entre grupos (UPGMA). A informatividade dos locos AFLP foi avaliada pela heterozigosidade esperada (h) ou Polymorphic Information Content (PIC), admitindo-se que a população está em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esse índice varia de 0,05 a 0,5 (Hedrick, 1999).

Foram utilizados os programas GENES (Cruz, 2001) e NTSYS 2.02pc (Rohlf, 1998), para a análise dos dados binários.

Nei (1987) menciona a partição hierárquica da diversidade genética em seus componentes entre e dentro das populações. A diversidade total será H_T e é constituída por:

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

em que:

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^m \bar{p}_i^2$$

em que:

$$\bar{p}_i = (N_1 p_{i1} + N_2 p_{i2}) / (N_1 + N_2)$$

H_S é o componente de diversidade dentro da população ou coleção de acessos dado pela fórmula:

$$H_S = \frac{[(N_1 \cdot H_1) + (N_2 \cdot H_2)]}{(N_1 + N_2)}$$

sendo:

N_1, N_2 o número de acessos da população (coleção) 1 e 2;

H_1, H_2 a diversidade estimada em cada população;

D_{ST} é o componente entre coleções, dentro da espécie estudada, dado pela diferença entre

H_T e H_S .

A proporção da diversidade genética, que é atribuída ao componente entre coleções, é estimada por G_{ST} :

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

Para o marcador AFLP, cada fragmento de DNA foi considerado como um loco (banda) independente no genoma do milho, ou seja, é um marcador dominante.

A distância genética de Nei (D_N) é a mais conhecida das medidas de distância genética e leva em conta tanto os locos polimórficos como monomórficos. Os valores de D_N são calculados a partir de uma amostra da população; portanto, eles variam entre amostras. Alguns fatores podem influenciar D_N , como o tamanho de amostras, número de locos estudados e a quantidade de divergência genética entre as populações. É definida como:

$$D_N = -\ln(I_N)$$

em que:

I_N é a identidade genética de Nei, que expressa a probabilidade de que um dado alelo de um loco, tomado ao acaso em duas

diferentes populações, seja idêntico em relação à probabilidade de que dois alelos do mesmo loco, tomados também ao acaso em cada população, sejam também idênticos. É usada para quantificar a semelhança genética entre duas populações e mede a correlação entre frequências alélicas em cada loco, em duas populações. É definida como:

$$I_N = \frac{J_{12}}{\sqrt{(J_1 J_2)}}$$

em que:

$$J_{12} = \sum_{i=1}^m p_{i1} p_{i2}; J_1 = \sum_{i=1}^m p_{i1}^2; J_2 = \sum_{i=1}^m p_{i2}^2$$

em que:

p_{i1}^2 e p_{i2}^2 são as frequências do alelo i nas coleções 1 e 2, respectivamente.

I_N varia de 0 a 1, enquanto que D_N varia de 0 a infinito.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada de modo a se determinar a variância entre e dentro das coleções, conforme o método proposto por Excoffier et al. (1992). Dentro desse programa, o tipo de dado foi o conjunto de bandas de AFLP. O índice de fixação de alelos foi estimado (Estatística Φ), o qual é equivalente à estatística F (F_{ST}), no quadro da AMOVA. Neste estudo, Φ_{ST} refere-se à correlação de alelos dentro das coleções. Utilizou-se o programa Arlequin versão 2.000 (Schneider et al., 2000). Também com valores entre 0 e 1, para se verificar a correlação de locos entre diferentes indivíduos na mesma população ou coleção, sendo uma medida de diferenciação genética.

TABELA 1. Combinação de *primers* utilizados na técnica de AFLP e número de fragmentos obtidos nas coleções núcleo (CN) e base (CB) de milho (*Zea mays*) subgrupo dentado. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2005.

| Combinação de <i>primers</i> | Amplitude alélica (pb) | Nº. de bandas CN | Nº. de bandas CB |
|--------------------------------------|------------------------|------------------|------------------|
| | | Total | Total |
| <i>MseI</i> -CAT + <i>Eco</i> RI-ACA | 55 – 337 | 37 | 33 |
| <i>MseI</i> -CAT + <i>Eco</i> RI-AAG | 57 – 323 | 37 | 40 |
| <i>MseI</i> -CAT + <i>Eco</i> RI-AGC | 56 – 324 | 39 | 38 |
| <i>MseI</i> -CAG + <i>Eco</i> RI-ACT | 55 – 499 | 31 | 27 |
| <i>MseI</i> -CAG + <i>Eco</i> RI-AGG | 52 – 477 | 30 | 29 |
| <i>MseI</i> CAG + <i>Eco</i> RI ACC | 52 – 495 | 44 | 42 |
| Total | 52 – 499 | 218 | 209 |
| Média | 54,5 – 409,2 | 34,5 | 34,8 |

Resultados e Discussão

O tamanho dos fragmentos gerados por meio da técnica de AFLP variou 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 bandas, com média de 36,3 por combinação de *primer* para a coleção núcleo. E um total de 209 bandas, com média de 34,8 por combinação de *primer* para a coleção base. Beyene et al. (2005), estudando a diversidade genética em 62 acessos de milho da Etiópia, encontraram 650 bandas, utilizando oito combinações de *primers* AFLP.

O número de fragmentos variou de 27, para a combinação *MseI*-CAG + *Eco* RI-ACT, até 44, para a combinação *MseI*-CAG + *Eco* RI-ACC. Padilha (2002) estudou, em 35 linhagens de milho, 11 combinações de *primers* AFLP, gerando 260 fragmentos, sendo 158 polimórficos e média de 14 bandas polimórficas por combinação de

primers. Interessante notar que o número total de bandas encontrado por Beyene et al. (2005) foi bem grande, de 69 a 109 bandas por combinação de *primers* em acessos de milho. Isso pode ser devido à pré-seleção de *primers* efetuada e à escolha de oito combinações de *primers* com o mais alto polimorfismo.

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). 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. Essa é a chamada eficiência da técnica de AFLP. A partir de 120 marcadores de AFLP, a correlação foi superior a 0,99, com desvio-padrão

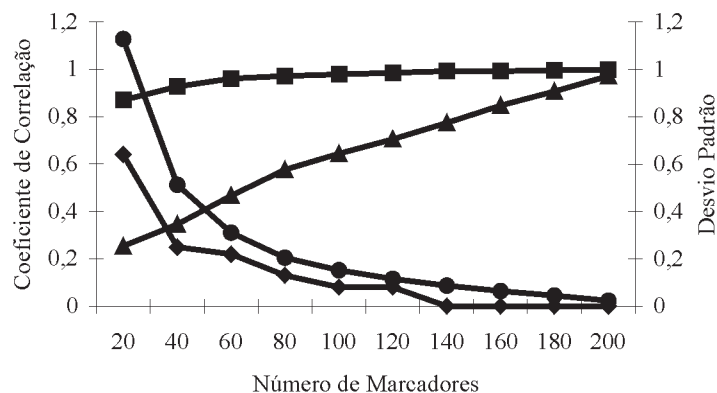


FIGURA 1. Correlação entre matrizes de distâncias utilizando o índice de Jaccard e desvio-padrão obtidas por simulações de número de marcadores AFLP, para os acessos de milho da amostra da coleção núcleo e coleção base subgrupo dentado. dp: desvio-padrão.

inferior a 0,08, para os acessos da amostra da coleção núcleo (Figura 1) e, para a amostra da coleção base, o uso de 180 marcadores AFLP apresentou uma correlação de 0,91 e desvio-padrão de 0,04. Esses valores corresponderiam à utilização de quatro e cinco combinações de *primers* mais polimórficos para o AFLP, baseados nos resultados das amostras das coleções núcleo e base, respectivamente. Esses resultados indicaram que as 218 bandas polimórficas avaliadas na amostra da coleção núcleo e as 209 bandas para a coleção base foram suficientes para definir, com confiabilidade, a divergência genética entre os acessos. Dias (1998) comentou que a utilização de, pelo menos, 30 locos polimórficos é suficientes para a construção de dendrogramas de elevada precisão.

Os dendrogramas obtidos pelo método UPGMA mostram que os distintos acessos não formaram grupos homogêneos definidos até

uma distância correspondente a 0,79 (Figura 2) e 0,58 (Figura 3), para as coleções núcleo e base, respectivamente. As linhas de corte nessas figuras representam o valor máximo significativo de similaridade, determinado pelo teste de t, em nível de 1% de probabilidade, sendo considerado como ponto de referência para discriminação ou agrupamento dos acessos.

Os resultados da análise da variação genética usando os marcadores AFLP quanto à frequência alélica, número efetivo de alelos, diversidade genética de Nei e informação sobre o índice de Shannon estão apresentados na Tabela 2. O número médio de alelos observado foi de 2,00 e o número médio efetivo de alelos que contribuiu para a diversidade genética foi de 1,59. A heterozigosidade (*h*) ou PIC, também chamada de índice de diversidade genética de Nei, foi usada para avaliar o

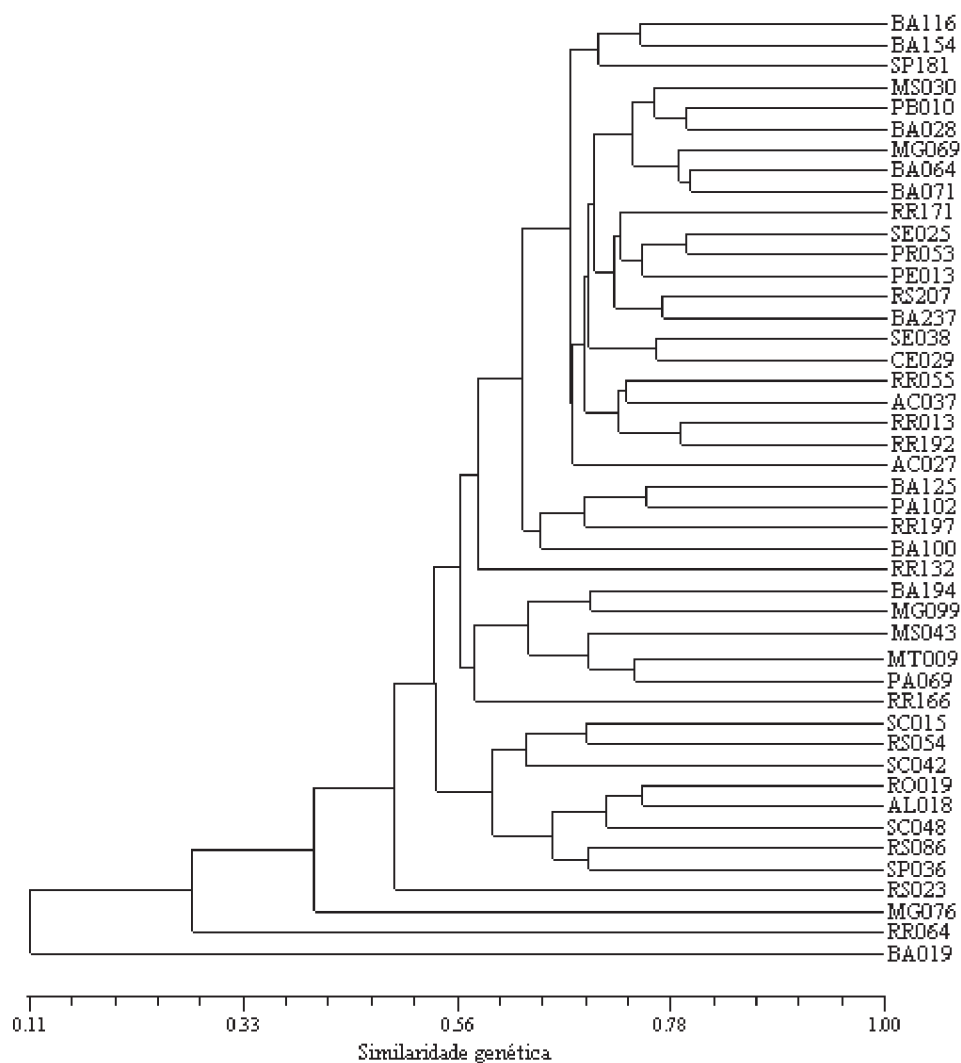


FIGURA 2. Dendrograma das similaridades genéticas entre os acessos da amostra da coleção de núcleo subgrupo dentado, pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento por UPGMA.

conteúdo polimórfico de cada loco e obteve-se um valor de 0,34. Esse valor indica baixo conteúdo polimórfico, quando comparado com valores de h de 0,63 e 0,72, para RFLP e SSR, respectivamente (Pejic et al., 1998). Por outro lado, o valor de PIC de 0,34 está coerente com o valor de 0,31 encontrado por Chen e Nelson (2005), uma vez que eles usaram a

técnica RAPD, que também detecta a presença ou ausência do fragmento, sendo que o valor máximo desse índice é de 0,50. Beyene et al. (2005) também encontraram o valor de h de 0,33. O baixo conteúdo de informação genética por loco é uma das limitações do AFLP, por ser uma técnica essencialmente dominante (Guimarães, 2001).

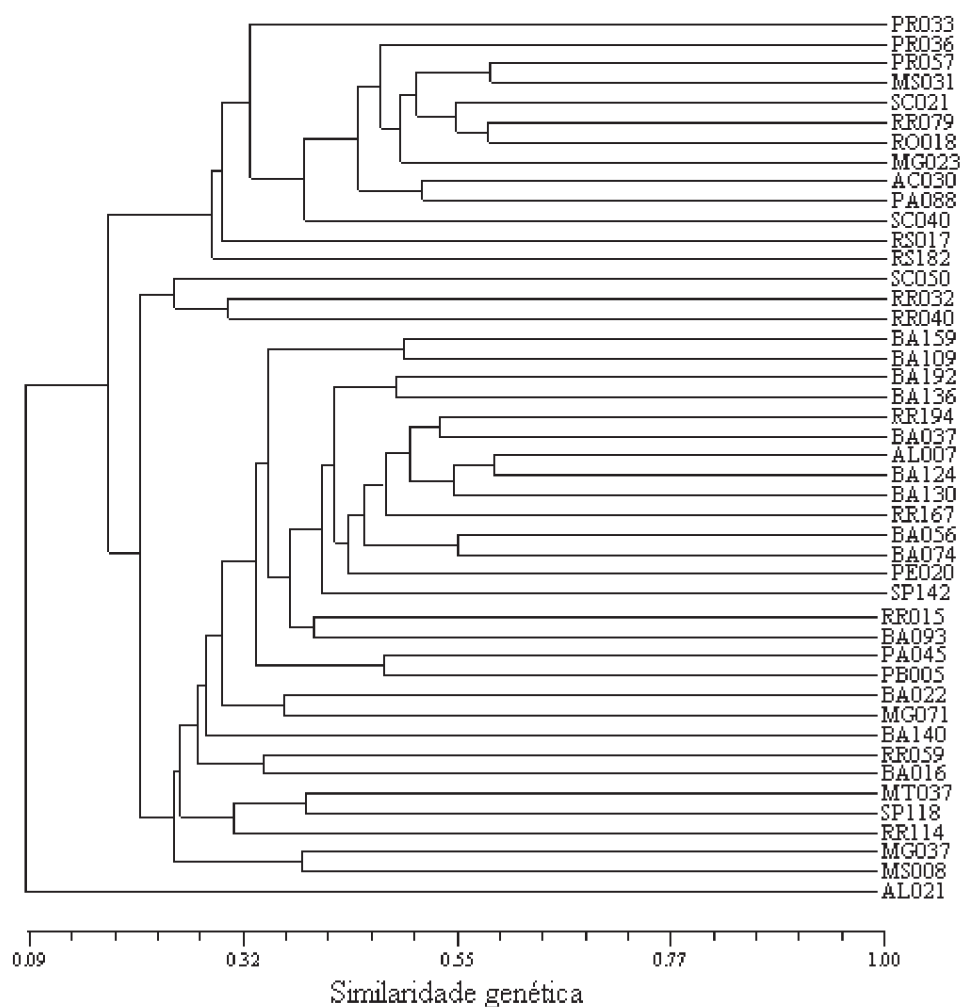


FIGURA 3. Dendrograma das similaridades genéticas entre os acessos da amostra da coleção de base subgrupo dentado, pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento por UPGMA.

O índice de Shannon (H') também é empregado para medir a diversidade genotípica em populações. Esse índice é usado em estudos de recursos genéticos, como uma medida de riqueza e uniformidade alélica, cujo baixo H' indica frequência de classes desbalanceadas para uma determinada característica e falta de diversidade genética (Perry e McIntosh, 1991). No presente trabalho, o índice de Shannon

normalizado médio foi de 0,52, para as coleções núcleo e base. Considerando que o valor do índice de H' é entre 0 e 1, pode-se dizer que ambas coleções possuem diversidade genotípica e riqueza alélica média.

A análise de variância molecular (AMOVA) foi usada como um outro critério para se determinar o grau de diferenciação genética entre as duas coleções. Pelos resultados

TABELA 2. Estimativas do número de alelos e diversidade genética para os 209 marcadores AFLP, na amostra da coleção base e coleção núcleo de milho (*Zea mays*), subgrupo dentado. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2005.

| Parâmetro | CB e CN ¹ | |
|---|----------------------|---------------|
| | Média | Desvio-padrão |
| Número de alelos observados | 2,0000 | 0,0000 |
| Número de alelos efetivos (Ne) | 1,5994 | 0,3101 |
| Heterozigosidade (h) | 0,3490 | 0,1352 |
| Índice de Shannon (H') | 0,5224 | 0,1619 |
| Diversidade total das duas coleções (H _T) | 0,3468 | 0,0177 |
| Diversidade dentro das coleções (H _s) | 0,2756 | 0,0109 |
| Diversidade entre as coleções (D _{ST}) | 0,0712 | - |
| Proporção da diversidade entre as coleções (Gst) | 0,2052 | - |

¹CB e CN significam coleção base e coleção núcleo.

da AMOVA (Tabela 3), observa-se que a maior porcentagem de variação ocorreu dentro das coleções (80,35%), evidenciando a alta variabilidade genética entre os acessos. Como os parâmetros G_{ST} , Φ_{ST} e F_{ST} são equivalentes em seu significado, comprovou-se que houve menor diversidade entre coleções pelo resultado de G_{ST} (0,21) e F_{ST} (0,20). Os resultados confirmam que a fração da variância exposta pela variação dentro das coleções é quatro vezes maior que a devido a diferenciação entre

coleções, não havendo diferença significativa para a variância devido a diferenças entre as duas coleções, com um valor de P menor que 0,0001, pelo teste permutacional. Resultado semelhante foi encontrado por Reif et al. (2003), cuja análise de variância molecular em populações de milho tropical revelou que 89,8% da variação foi encontrada dentro das populações e somente 10,2% entre populações, nas quais se verificaram as distâncias genéticas por meio de marcadores SSR.

TABELA 3. Análise de variância molecular empregando-se os dados de AFLP de 45 acessos da coleção núcleo e 45 acessos da coleção base de milho (*Zea mays*) subgrupo dentado. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2005.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Soma de quadrados | Componentes de variância | Porcentagem de variação | Estatística Φ |
|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------|
| Entre coleções | 1 | 137,933 | 2,80983 | 19,65 | 0,1965 |
| Dentro de coleções | 88 | 1011,200 | 11,49091 | 80,35 | |
| Total | 89 | 1149,133 | 14,30074 | | |

Φ : Estatística phi ou Índice de Fixação de Alelos (F_{ST})= 0,1965, pela estatística F.

Com relação às frequências alélicas entre as duas coleções, a identidade genética de Nei (I_N) foi alta (0,8061), uma vez que I_N varia de 0 a 1, significando que as coleções possuem frequências alélicas semelhantes. A distância genética de Nei (D_N) foi de 0,2156, considerada pequena, pois D_N varia de 0 a infinito.

A caracterização molecular por meio de marcadores moleculares AFLP permitiu avaliar a diversidade genética entre coleções e, com os resultados das análises, deduz-se que a coleção núcleo de milho, subgrupo endosperma dentado, representa a variabilidade genética encontrada na coleção base.

Conclusões

- 1) Os altos coeficientes de correlação entre o número de marcadores usados e as distâncias genéticas entre os acessos indicam alta confiabilidade e precisão do agrupamento produzido.
- 2) A heterozigosidade e o índice de Shannon indicam diversidade média nas coleções.
- 3) A identidade genética de Nei foi alta e a distância genética de Nei foi pequena, significando que as coleções núcleo e base possuem frequências alélicas semelhantes.
- 4) Pela análise de variância molecular, conclui-se que a maior variação ocorreu dentro das coleções, não havendo diferença significativa entre as amostras das duas coleções.
- 5) A caracterização molecular por meio de marcadores moleculares AFLP validou a coleção

núcleo de milho, subgrupo endosperma dentado, em relação à coleção base.

Agradecimentos

Este projeto foi executado com o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG CAG Modalidade: "Programa de Infra-Estrutura Para Jovens Pesquisadores" Edital: nº 07/2003, Processo Nº : EDT 2289/03, à qual agradecemos.

Literatura Citada

ABADIE, T.; CORDEIRO, C. M.; ANDRADE, R. V. de A.; 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, DF: 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, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1997. 8 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Comunicado Técnico, 20).

APPLIED BIOSYSTEMS. **AFLP Plant Mapping Protocol**. FosterCity: Perkin Elmer Corporation, 1997. 45p.

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.

- BEYENE, Y.; BOTHA, A. M.; MYBURG, A. A. Genetic diversity in traditional Ethiopian highland maize accessions assessed by AFLP markers and morphological traits. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 1, p. 1-17, 2005.
- 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: Cambridge University, 1989. p. 136-156.
- BROWN, A. H. D. The core collections at the crossroads. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; HINTUM, TH. J. L. van; 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.; HINTUM, TH. J. L. van ; MORALES, E. A. V. (Ed.). Chichester: J. Wiley, 1995b. p. 77-92.
- CRUZ, C. D. **Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística.- versão windows** Viçosa, MG: UFV, 1997. 642 p
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 390 p.
- DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 405-475.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Baltimore, v. 131, n. 2, p. 479-491, June 1992
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.
- GALWEY, N. W. Verifying and validating the representativeness of a core collection. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; HINTUM, TH. J. L. van ; MORALES, E. A. V. (Ed.). **Core collections of plant genetic resources**. Chichester: J. Wiley, 1995. p. 187-198.
- GUIMARÃES, C. T. Técnicas moleculares aplicadas ao melhoramento do milho. In: SIMPÓSIO DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS: GENÉTICA E MELHORAMENTO DO MILHO. 5., 2001, Lavras. **Anais ...** Lavras: UFLA, 2001. p. 39-50.
- HINTUM, T. J. L. Van. Hierarchical approaches to the analysis of genetic diversity in crop plants. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; HINTUM, T. J. L. van ; MORALES, E. A. V. (Ed.). **Core collections of plant genetic resources**. Chichester: J. Wiley, 1995. p. 23-34.
- HINTUM, T. J. L. Van. The general methodology for creating a core collection. In: JOHNSON, R. C.; HODGKIN, T. **Core collections for today and tomorrow**. Rome: IPGRI, 1999. p. 10-17.
- 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.
- NETTO, D. A. M.; OLIVEIRA, A. C. de; SANTOS, F. G. dos; TEIXEIRA, F. F. **Coleção núcleo de milho da Embrapa Milho e Sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 36 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 74).
- PADILHA, L. **Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical**. 2002. 85 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK, V.; CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, 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.
- PERRY, M. C.; MCINTOSH, M. S. Geographical patterns of variation in the USA soybean germplasm collection: I. Morphological traits. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 5, p. 1350-1355, Sept./Oct. 1991.
- REIF, J. C.; MELCHINGER, A. E.; XIA, X. C.; WARBURTON, M. L.; HOISINGTON, D. A.; VASAL, S. K.; SRINIVASAN, G.; BOHN, M.; FRISCH, M. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 4, p. 1275-1282. 2003.
- ROBINSON, I. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 359-376.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**: version 2. 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.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin**: version 2.000: a software for population genetics data analysis. Geneva: University of Geneva, 2000.
- SPAGNOLETTI ZEULI, P. L.; QUALSET, C. O. The durum wheat core collection and the plant breeder. In: HODGKIN, T.; BROWN, A. H. D.; HINTUM, TH. J. L. van ; 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.