

# AValiação Agronômica e Molecular de Acessos da Coleção Núcleo de Milho, Subgrupo Endosperma Duro

DÉA ALECIA MARTINS NETTO<sup>1</sup>, ISABEL REGINA PRAZERES DE SOUZA<sup>1</sup>, ANTÔNIO CARLOS DE OLIVEIRA<sup>1</sup>, CÉSAR AUGUSTO BRASIL PEREIRA PINTO<sup>2</sup>, RAMIRO VILELA DE ANDRADE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pesquisadores, Embrapa Milho e Sorgo. Caixa Postal 151, CEP. 35701-970 Sete Lagoas, MG. E-mail: dea@cnpms.embrapa.br (autor para correspondência).

<sup>2</sup>Professor, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras. Caixa Postal 37, CEP. 372000-000 Lavras, MG

*Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.3, n.1, p.92-107, 2004*

**RESUMO** - Coleção núcleo é uma subamostra de acessos, composta por 10% da coleção ativa de germoplasma e representatividade de, pelo menos, 70% da diversidade genética. A eficiência de utilização dos acessos de germoplasma de milho que compõem a coleção núcleo pode ser incrementada ao se agregar valores de caracterização morfo-agronômica e molecular, fornecendo informações mais detalhadas sobre esses acessos. Este trabalho teve por objetivo valorar a coleção núcleo de milho, subgrupo endosperma duro da Embrapa Milho e Sorgo, por meio de descritores morfo-agronômicos e marcadores moleculares AFLP. Para isso, utilizaram-se 58 acessos, para os quais foram avaliados 32 caracteres morfo-agronômicos e seis combinações de *primers* AFLP para obtenção dos perfis genéticos. Os caracteres que mais contribuíram para divergência genética da coleção núcleo foram o peso de mil grãos (31,0%), a altura da espiga (21,7%) e o peso de espiga (16,4%). Pela análise dos componentes principais dos acessos da coleção núcleo, 70,57% da variância total pode ser explicada com três componentes, não havendo a formação de grupos entre os acessos. Foram geradas 207 bandas AFLP, com média de 32,8 bandas polimórficas por combinação de *primer*. Os dendrogramas, resultantes das distâncias genéticas morfo-agronômicas e molecular, foram semelhantes e apresentaram a formação de grupos a partir de 25% da maior distância entre grupos. O número médio de alelos observado foi 1,95, o número médio efetivo de alelos foi 1,47 e a heterozigosidade (*h*), (índice de diversidade genética de Nei), usada para avaliar o conteúdo polimórfico de cada loco, foi 0,28. A caracterização molecular propiciou uma nova informação acerca da estrutura genética da coleção núcleo, verificando-se alta variabilidade entre os acessos.

**Palavras-chave:** germoplasma, caracterização morfo-agronômica, AFLP, diversidade genética.

## AGRONOMICAL AND MOLECULAR EVALUATION OF ACCESSIONS FROM MAIZE CORE COLLECTION, SUBGROUP FLINT ENDOSPERM

**ABSTRACT** - The utilization efficiency of maize germplasm accessions that consist of a core collection can be incremented using molecular and morpho-agronomical characteristics, getting more detailed descriptions about these accessions. The objective of this work was to valorize maize core collection, sub-group endosperm flint of the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa), through the use of morphological descriptors and AFLP molecular markers. Fifty-eight accessions from the core collection were used, thirty-two morpho-

agronomical descriptors considered, and six AFLP primers combinations were tested to obtain the genetic patterns. The most contributions of morpho-agronomical variables for core collection genetic divergence were grain thousand weight (31.0%), ear height (21.7%) and ear weight (16.4%). The core collection principal component analysis was done with 14 morpho-agronomical variables and indicated that variance accumulated by the first three components was 70.57%. The six primers AFLP combinations used in 58 accessions generated 207 bands, with 32.8 polymorphic bands average. Dendrograms of core collection showed similar general structure and did not indicate homogeneous group formation. The observed allele number average was 1.95, allele effective number average was 1.47 and the heterosigosity ( $h$ ), (Nei's index of genetic diversity) used for polymorphic information content evaluation was 0.28. Molecular characterization allowed valorization of each accession, indicating new information on the core collection genetic structure, and confirming high variability among accessions.

**Key words:** germplasm, morpho-agronomical characterization, AFLP, genetic diversity.

A coleção de germoplasma de milho é mantida em banco ativo na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG. As sementes são armazenadas a médio prazo, em câmaras de conservação, com temperatura de 10<sup>o</sup> C e umidade relativa de 30%, com o objetivo de atender aos programas de pesquisa nacionais e internacionais. A coleção de germoplasma de milho é uma das maiores do Brasil, possuindo mais de 3.500 acessos. O termo coleção núcleo é empregado a um subconjunto de acessos da coleção ativa, desenvolvido com 10 – 20% dos materiais genéticos da coleção original e representa 70 – 80% da sua diversidade genética (Brown, 1995). A coleção núcleo de milho da Embrapa Milho e Sorgo foi criada em 1997, por meio de ações conjuntas de melhoristas, curadores e estatísticos, com o objetivo principal de intensificar a utilização do germoplasma. Essa coleção é constituída por 300 acessos, correspondendo a 13% da coleção ativa, contendo diferentes categorias, raças, tipos de grão e características morfo-agronômicas do milho, sendo considerada uma amostra de tamanho adequado para ser manejada pelos curadores a baixo custo. A coleção núcleo de milho foi desenvolvida utilizando a estratégia de estratificação da coleção, para possibilitar a amostragem dos alelos localizados e comuns (Brown, 1995; Crossa *et al.*, 1995;

Spagnoletti Zeuli & Qualset, 1995; Abadie *et al.*, 2000). Segundo Abadie *et al.* (1997, 2000), a coleção núcleo brasileira de milho deverá ser caracterizada e avaliada para outros caracteres, visando aumentar o conhecimento de cada material e também utilizar técnicas moleculares que permitirão refinamentos e adição de valor à coleção ativa. Outros autores (Hamon *et al.*, 1995; Brown, 1995; Brown & Spillane, 1999; Nass, 2001) enfatizam o uso de marcadores moleculares, juntamente com os morfo-agronômicos, na caracterização de germoplasma como forma de aumentar o conhecimento dos acessos armazenados em coleções para melhor utilização das informações nos programas de melhoramento.

Embora haja o reconhecimento dos melhoristas de que os recursos genéticos são estratégicos quanto à variabilidade genética apresentada, verifica-se, na literatura que existe uma demanda de genótipos com características desejáveis para fundamentar as pesquisas (Morales *et al.*, 1995; Vilela-Morales *et al.*, 1997; Nass, 2001). Porém, existem alguns aspectos que impedem a maior utilização dos recursos genéticos, fazendo com que a taxa de uso de germoplasma conservado nos bancos, de uma maneira global, esteja em torno de 2% (Morales & Valois, 1996). Na realidade brasileira,

Nass *et al.* (1993) verificaram que 14,7% dos pesquisadores utilizam regularmente os acessos do banco ativo de germoplasma (BAG). Mencionam, também, que a maioria das coleções de trabalho de milho, que é a coleção particular do melhorista, tem um tamanho aproximado de 100 acessos, e que, apesar da qualidade das informações dos acessos nos BAGs ser considerada boa (24,1% para o milho; 43,8% para a soja), a quantidade de informações, segundo os usuários pesquisados, foi considerada insuficiente para a cultura do milho (66,7%) e suficiente para soja (68,8%).

Com o rápido desenvolvimento da biotecnologia, foram otimizados diversos métodos de detecção de polimorfismo diretamente no DNA. Dentre as técnicas mais utilizadas atualmente, a de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados destaca-se por ser uma técnica precisa e interessante para o estudo da variabilidade genética. Marcadores AFLP amostram, de maneira ampla, o genoma gerando um grande número de bandas por gel, aumentando o rendimento das informações que podem ser resolvidas em um único gel (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Tohme *et al.* (1996) analisaram a diversidade genética em coleção núcleo de feijão, utilizando AFLP e dados morfológicos. Um total de 110 bandas foi encontrado em 114 genótipos, utilizando 16 combinações de *primers*. A análise com marcadores AFLP produziu grande quantidade de informações em curto período de tempo, permitindo discernimento sobre a estrutura genética da coleção núcleo de feijão silvestre. Barrett *et al.* (1998) compararam a diversidade genética obtida por marcadores AFLP e a obtida com informações de pedigree em 43 cultivares de trigo. A diversidade genética foi calculada pelo complemento do coeficiente de similaridade de Jaccard e a análise de agrupamento pelo método UPGMA. A diversidade genética baseada no

pedigree e a baseada nos marcadores tiveram padrões hierárquicos semelhantes entre as 43 cultivares. Avaliando a diversidade genética entre 61 acessos chineses de soja utilizando oito pares de *primers* de AFLP que geraram 569 fragmentos, Zhu *et al.* (1999) observaram que a diversidade genética da coleção chinesa de germoplasma é maior que aquela encontrada na coleção americana. Usando duas combinações de *primers* AFLP, Cervera *et al.* (1998) encontraram 108 locos polimórficos, em 67 acessos de *Vitis vinifera* L. Esses resultados permitiram identificar, com elevada segurança, cultivares que pertenciam à mesma variedade dentro da coleção, o que reduziu tempo e custo na sua conservação.

Tanto em bancos de germoplasma, como em programas de melhoramento genético de plantas, são avaliados diversos caracteres morfo-agronômicos e fisiológicos, muitas vezes de maneira subjetiva. Uma forma adequada de análise dos caracteres é a utilização de técnicas de análise multivariada que permite agrupar e/ou descrever um grupo de indivíduos, considerando todo o conjunto de descritores. Análises multidimensionais, utilizando os coeficientes de distância genética, têm proporcionado importantes contribuições ao melhoramento genético, à conservação de recursos genéticos e aos estudos de evolução das espécies (Cossa *et al.*, 1995; Dias, 1998; Pinto-Coelho, 2000). As medidas feitas entre pares de acessos são chamadas de associação por considerarem que há uma distância que pode ser quantificada entre eles (Cossa *et al.*, 1995; Cruz & 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.

Este trabalho teve por objetivo caracterizar os acessos da coleção núcleo de milho subgrupo

endosperma duro, por meio do emprego de descritores morfo-agronômicos e marcadores moleculares AFLP agregando valores e informações sobre os acessos.

### Material e Métodos

**Material genético.** Foram utilizados 58 acessos de milho do tipo endosperma duro da coleção núcleo da Embrapa Milho e Sorgo, sendo esses, variedades locais provenientes de várias regiões ecogeográficas do Brasil. Esse grupo foi selecionado por se constituir de materiais de grande importância para o melhoramento genético do milho. Apesar da coleção núcleo ser constituída por 63 acessos do tipo de endosperma duro, apenas 58 apresentavam quantidade suficiente de sementes para a sua caracterização morfo-agronômica e molecular.

**Caracterização morfo-agronômica.** O experimento foi realizado na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas, MG, com época de semeadura em outubro de 2001. Para cada acesso, foi formada uma parcela com duas linhas de cinco metros e cinco plantas por metro linear. A irrigação suplementar foi realizada quando necessária, e os controles de pragas, doenças e ervas daninhas foram feitos de acordo com o manejo recomendado para a cultura. Foram avaliados, em delineamento inteiramente casualizado, os dados de 10 plantas de cada acesso. Foram considerados 32 descritores morfo-agronômicos (Tabela 1), dos quais oito ainda não tinham sido avaliados, valorando, assim, os acessos da coleção núcleo, tipo de grão duro. São eles (IBPGR, 1991; Brasil, 1999): número de entrenós; cor do endosperma; ângulo entre a lâmina da folha, logo acima da espiga superior, e o caule; comportamento da 5ª lâmina foliar acima da espiga superior; comprimento da folha; cor da folha; comprimento da haste principal do pendão; cor da coroa do grão na espiga.

### Análise dos dados morfo-agronômicos.

Para os caracteres morfo-agronômicos, foram estimadas médias, variâncias, desvios-padrão, coeficientes de variação, máximo e mínimo de um conjunto de dados. Essas análises foram realizadas, utilizando o programa Genes vs 2001.0.0 (Cruz, 2001). A divergência genética entre acessos foi estimada pelo procedimento de distância Euclidiana média ( $d_{ii'}$ ) (Cruz & Regazzi, 1997) dada por:

$$d_{ii'} = \sqrt{\frac{x_{ij} - x_{i'j}}{s(X_j)}}^2 \text{ em que: } d_{ii'} \text{ é a distância}$$

euclidiana média entre o  $i$ -ésimo e o  $i'$ -ésimos acces-

sos;  $x_{ij} = \frac{X_{ij}}{s(X_j)}$  sendo:  $x_{ij}$  a observação no  $i$ -ésimo

acesso ( $i = 1, 2, \dots, m$ ); em referência ao  $j$ -ésimo descritor estudado ( $j = 1, 2, \dots, n$ );  $s(X_j)$  é o desvio-padrão dos dados do  $j$ -ésimo descritor.

O método de agrupamento utilizado foi o UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic average*), sendo as análises executadas no programa NTSyspc 2.02k (Rohlf, 1998). A análise de componentes principais, feita com dados padronizados, considerou que  $x_{ij}$  é a média padronizada do  $j$ -ésimo descritor ( $j = 1, 2, \dots, v$ ) avaliado no  $i$ -ésimo acesso ( $i = 1, 2, \dots, g$ ) e  $R$  a matriz de covariâncias ou de correlação entre esses descritores (ou matriz de correlação fenotípica entre os descritores baseada nos dados originais). Utilizou-se o critério de contribuição relativa para divergência genética, segundo Singh (1981), citado pelo programa Genes, para descartar as variáveis. Para avaliar o método de agrupamento, verificou-se o grau de concordância entre o dendrograma e a matriz de distâncias Euclidianas médias. Essa avaliação é dada pelo coeficiente de correlação cofenética, cujos valores acima de 0,80 indicam um bom ajuste entre as duas matrizes. Para realizar essa análise, utilizou-se

**TABELA 1.** Caracteres morfo-agronômicos avaliados em acessos com tipo de grão duro da coleção núcleo de milho, Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG, 2003.

<b>Caráter</b>	<b>Descrição do Caráter</b>
Floração masculina	Número de dias após semeadura com 50% de espiguetas abertas
Floração feminina	Número de dias após semeadura com 50% dos estigmas liberados
Ramificação do pendão	Número de ramificações primárias e secundárias do pendão
Altura da planta	Medida em cm do nível do solo à ponta do pendão
Altura da espiga	Medida em cm do nível do solo à base da 1ª espiga
Folhas acima da espiga	Número de folhas acima da 1ª espiga
Total de folhas	Número total de folhas da planta
Diâmetro do colmo	Medida em mm do colmo tomada a 10 cm do solo
Comprimento da folha	Medida em cm da 5ª folha a partir do solo
Comprimento da haste	Medida em cm da haste principal do pendão
Número de espiga por planta	Número de espigas por planta
Comprimento da espiga	Medida em cm da base à ponta da espiga despilhada
Diâmetro da espiga	Medida em mm na porção intermediária da espiga
Número de fileira de grãos	Número de fileiras de grãos na porção intermediária da espiga
Número de grãos por fileira	Número de grãos por fileira, tomada ao acaso, por espiga
Peso de espiga	Peso em gramas da espiga
Peso de grãos por espiga	Peso em gramas de grãos por espiga
Diâmetro do sabugo	Medida em mm na porção intermediária do sabugo
Número de colmos	Número de colmos, ou entrenós, da planta
Ângulo da folha/colmo	Ângulo tomado da 5ª folha em relação ao colmo
Peso de mil grãos	Peso em gramas de mil grãos tomados ao acaso
Cor da folha	Observação visual da cor predominante da folha (verde claro, verde médio, verde escuro)
Qualidade da espiga	Observação visual numa escala de 1 a 9 onde 1= péssima, 9= excelente
Sanidade da espiga	Observação visual numa escala de 1 a 9 onde 1= completamente doente, 9=completamente sadia
Tipo de espiga	Observação visual: Cônica, cilíndrica ou cilíndrica cônica
Cor do endosperma	Observação visual: branco, amarelo, laranja, vermelho
Cor da coroa	Observação visual: branco, amarelo, laranja, vermelho
Plantas quebradas	Porcentagem de plantas quebradas (estande de 50 plantas)
Plantas acamadas	Porcentagem de plantas acamadas (estande de 50 plantas)
Comportamento da folha	Observação visual da 5ª folha (reta, recurvada, fortemente recurvada)
Forma da primeira folha	Observação visual no 10º dia de plantio (pontaguda, arredondada, espatulada)
Arranjo dos grãos	Observação visual do arranjo dos grãos (reto, levemente curvado, espiral, irregular)

o módulo *Clustering/Coph* do programa NTSyspc 2.02k (Rohlf, 1998).

**Caracterização molecular.** Utilizou-se a técnica de AFLP (Vos *et al.*, 1995). Para obtenção do material vegetal, foram amostrados 100 indivíduos de cada acesso e o DNA foi extraído de um *bulk* de folhas, utilizando-se o método de Saghai-Marooif *et al.* (1984). A quantificação da concentração de DNA genômico dos diferentes acessos foi determinada em espectrofotômetro.

**Marcadores AFLP.** Para o desenvolvimento desta técnica, foram adicionados 10 µl da solução de trabalho de DNA na concentração de 25ng/µl aos reagentes constituintes dos *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, Califórnia, EUA) preparadas de acordo com o manual de AFLP (AFLP, 1997) com modificações. Na etapa de amplificação seletiva, foram avaliadas seis combinações de conjuntos de *primers MseI-EcoRI*, estando o *primer EcoRI* marcado com uma das três fluorescências 6-FAM, HEX ou NED: *MseI CAG* e *EcoRI ACA*, *MseI CAG* e *EcoRI ACG*, *MseI CAG* e *EcoRI ACC*; *MseI CAG* e *EcoRI ACT*, *MseI CAG* e *EcoRI AGG*, *MseI CAG* e *EcoRI AGC*.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 5% a 1.688 volts por sete horas. O marcador padrão de peso molecular, Rox 500, foi adicionado a cada amostra. O equipamento utilizado foi o sequenciador automático ABI PRISM 377 da Perkin Elmer. A extração dos dados obtidos na corrida eletroforética foi automática pelos programas *GeneScan 2.1* e *GenoTyper 2.0*. A montagem das tabelas binárias para cada conjunto de *primer* foi semi-automática com conferência manual dos tamanhos de fragmentos amplificados no gel.

**Análise dos dados moleculares.** A análise dos marcadores AFLP foi realizada por meio da construção de uma matriz, considerando os dados binários, em que o valor 1 (um) foi atribuído para a presença do fragmento polimórfico (banda) e o valor 0 (zero) para a sua ausência. O coeficiente de similaridade genética de Jaccard ( $S_j$ ) foi calculado pela expressão:  $S_j = a / (a + b + c)$ , em que  $a$  corresponde a presença da banda nos acessos  $i$  e  $j$ ;  $b$  a presença da banda em  $i$  e ausência em  $j$ ; e  $c$  a ausência da banda em  $i$  e presença em  $j$ .

Para a construção dos dendrogramas, foi utilizado o método da média aritmética entre pares não ponderados (UPGMA), sendo cada acesso denominado uma unidade taxonômica operacional. A comparação dos dendrogramas foi feita pelo índice de ramificação de consenso (CIc) obtido a partir de dendrogramas comparados dois a dois. Esse índice fornece uma estimativa relativa da semelhança dos dendrogramas e foi usada a opção *Clustering/Consen* com a interpretação de acordo com Rohlf (1998).

Os erros associados a cada similaridade ( $s_{sg}$ ) foram estimados de acordo com a expressão (Skroch *et al.*, 1992):

$$s_{sg} = \frac{sg_{ij} - 1}{n - 1} \cdot \frac{1}{2} \text{ em que:}$$

$sg_{ij}$ : é a similaridade genética entre os acessos  $i$  e  $j$   
 $n$ : é o número total de combinações  $a$ ,  $b$  e  $c$  utilizadas na estimativa da similaridade genética

Os acessos geneticamente diferentes foram identificados no dendrograma, a partir da estimativa do valor mínimo de similaridade, acima do qual os acessos são considerados semelhantes, ou o valor máximo significativo de similaridade ( $sg_{max}$ ). O  $sg_{max}$  foi estimado por meio do teste de  $t$ , em nível de 1% de probabilidade pela expressão (Hagiwara *et al.*, 2001):

$$sg_{max} = 1 - t \cdot \bar{s}_{sg} \text{ em que:}$$

$t$ : é o valor tabelado de  $t$  com  $n-2$  graus de liberdade

$\bar{s}_{sg}$ : é o erro médio das similaridades genéticas consideradas no dendrograma.

O índice de diversidade genética de Nei, frequência alélica, número efetivo de alelos e índice de Shannon foram obtidos por meio do programa PopGene versão 1.31 (Yeh, 1999).

### Resultados e Discussão

As análises descritivas dos caracteres morfo-agronômicos quantitativos permitem analisar a variabilidade genética encontrada nos acessos de milho tipo de endosperma duro da coleção núcleo (Tabela 2). Os caracteres morfo-agronômicos com maior coeficiente de variação foram peso de grãos por espiga, peso de espiga, ramificação do pendão e altura da espiga. As menores variações foram observadas nos descritores número de folhas acima da espiga, diâmetro do colmo, altura da planta e comprimento da folha.

Os caracteres que mais contribuíram para divergência genética da coleção núcleo, segundo o critério de Singh (1981), foram peso de mil grãos (31,0%), altura da espiga (21,7%) e peso de espiga (16,4%). Os caracteres número de espigas por planta, número de folhas acima da espiga, número total de folhas, número de fileiras de grãos, número de entrenós, comprimento da espiga e diâmetro do colmo contribuíram com menos de 0,04% para a divergência genética e foram descartados para se fazer a análise de componentes principais. A prática de descarte de variáveis também foi usada por Santos *et al.* (1995) para selecionar descritores de germoplasma de guandu e por Veasey *et al.* (2001) ao caracterizar acessos de *Sesbania*.

Quanto aos caracteres morfo-agronômicos qualitativos, alguns não tiveram variação na avaliação das plantas dos acessos da coleção núcleo. Por exemplo, a arquitetura da planta foi normal em todos

os acessos em detrimento da opção de ser anã; a cor da folha foi considerada verde médio para todas; o comportamento da folha foi sempre recurvado; a forma da primeira folha foi sempre reta; e o arranjo dos grãos foi reto, levemente curvo para todas as espigas. O caráter cor da coroa do grão também foi avaliado, sendo que 40% apresentou cor laranja, 43% amarela e 17% branca. Observou-se que a qualidade e sanidade da espiga foram elevadas com predominância de notas 7 a 9 que correspondem a espigas boas, bem formadas e sadias, com poucos grãos doentes a completamente sadias (Tabela 3). Nota-se que houve maior ocorrência do formato cilíndrico quanto ao tipo de espiga. As maiores porcentagens de plantas quebradas e acamadas apareceram na classe até 25 plantas. Desses caracteres, os que mais variaram foram qualidade e sanidade da espiga, evidenciando que essas variáveis são muito subjetivas, principalmente devido à amplitude das escalas (1 a 9), difícil classificação e dependentes das influências dos genótipos, ambientes e suas interações, o que infere em maior variação.

A análise dos componentes principais dos acessos foi realizada com 14 variáveis morfo-agronômicas que apresentaram contribuições significativas para a divergência genética entre os acessos da coleção núcleo. O primeiro componente concentrou 33,65% da variância total, o segundo, 27,57% e o terceiro 9,35%, sendo esses três vetores principais capazes de explicar 70,57% da variância total observada. O resultado aproxima-se dos valores citados por Dias (1998), em que 75% a 85% da variância total deve ser explicada pelos dois ou três primeiros componentes principais. Para Cruz & Regazzi (1997), o valor deve ser acima de 80% da variância total em estudos de divergência genética. Veasey *et al.* (2001) encontraram uma variância acumulada nos dois primeiros componentes principais de 74,38%, utilizando 17 caracteres morfo-agronômicos em 19 acessos de *Sesbania* spp. Em

**TABELA 2.** Estatísticas descritivas de 21 caracteres morfo-agronômicos avaliados em 58 acessos do germoplasma da coleção núcleo de milho tipo de grão duro. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2001/2002.

Descritores	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação
Floração masculina (dias)	64,08	54,00	79,00	5,80	9,05
Floração feminina (dias)	68,24	58,00	82,00	6,33	9,28
Ramificação do pendão	24,22	16,60	34,70	3,91	16,15
Altura da planta (cm)	323,60	263,50	362,50	24,02	7,42
Altura da espiga (cm)	193,09	132,00	237,50	29,43	15,24
Folhas acima da espiga	5,78	5,10	6,50	0,35	6,09
Total de folhas	15,49	12,90	24,70	1,66	10,76
Comprimento da folha (cm)	103,21	88,30	132,00	7,93	7,69
Comprimento da haste (cm)	40,00	31,50	77,90	5,60	14,02
Número de espigas por planta	1,05	1,00	1,60	0,12	11,52
Comprimento de espiga (cm)	13,49	9,90	17,10	1,38	10,29
Diâmetro de espiga (cm)	38,77	29,50	46,80	3,03	7,82
Número de fileiras de grãos	13,00	10,60	16,60	1,27	9,81
Número de grãos por fileira	32,53	21,30	41,10	4,23	13,03
Peso de grãos por espiga (g)	91,13	38,80	150,50	22,91	25,14
Diâmetro do sabugo (cm)	23,76	18,60	31,70	2,61	11,00
Número de entrenós	15,75	12,60	19,50	1,31	8,33
Ângulo folha/colmo	46,16	30,10	60,60	6,58	14,25
Peso de mil grãos (g)	242,34	168,80	319,30	35,15	14,50
Diâmetro do colmo (cm)	22,95	18,80	27,30	1,58	6,88
Peso de espiga (g)	109,62	51,30	175,50	25,60	23,35

um estudo com 18 populações de coco e 19 descritores morfo-agronômicos, Zibumbo & Colunga (2001) explicaram 76% da variância total dos caracteres considerados com dois componentes principais. A análise de componentes principais para os acessos da coleção núcleo mostrou que eles estão dispersos de maneira aleatória, sem a formação de grupos definidos mostrando que fazem parte de um mesmo conjunto.

Observou-se que o dendrograma construído a partir da distância euclidiana média (Figura 1) não apresentou a formação de grupos homogêneos até a uma distância correspondente a 25% da maior distância entre grupos de acessos, evidenciando a não ocorrência de redundância de acessos. As estimativas das distâncias genéticas obtidas para a coleção

núcleo variaram de 0,45 a 2,27. As menores distâncias verificadas foram para os pares de acessos BA003 e SE014, e MS019 e PA089. Ao traçar uma linha de corte no dendrograma da Figura 1, a uma distância genética de 1,14 observou-se que são formados três agrupamentos. O agrupamento 1 constituído de 17 acessos diferenciou-se dos demais por apresentar florescimento feminino médio precoce (62,1 dias), menor altura média de planta (297,4 cm) e de espiga (162,3cm), menor comprimento médio de folha (97,9 cm). Os 21 acessos do agrupamento 2 apresentaram características médias de ciclo tardio, pelo florescimento feminino (70,4 dias), maior altura de planta (336,9 cm) e de espiga (208,5 cm), comprimento de folha intermediário (103,4 cm). Os acessos desses dois agrupamentos tiveram peso



**TABELA 3.** Caracteres morfo-agronômicos avaliados qualitativamente nos acessos da coleção núcleo de milho, tipo de grão duro. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 2003.

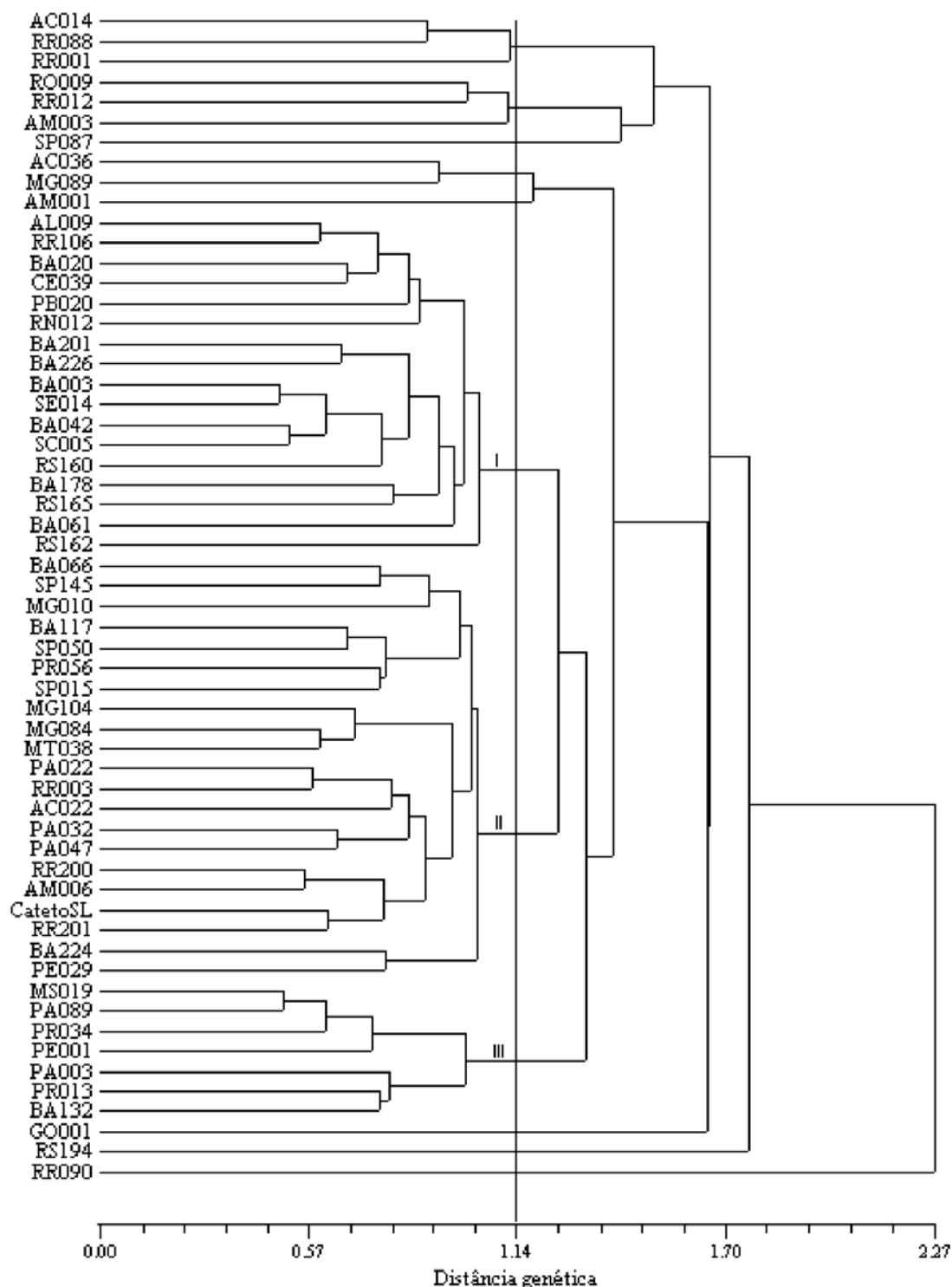
<b>Caracter</b>	<b>Escala*</b>	<b>Coleção Núcleo (%)</b>
Qualidade da espiga	9	13
	8	53
	7	16
	6	15
Sanidade da espiga	9	19
	8	40
	7	29
	6	12
Tipo de espiga	Cônica	0
	Cilíndrica	66
	Côn/Cil	34
Plantas Quebradas (%)	0-25	78
	26-50	3
	51-75	12
	76-100	7
Plantas Acamadas (%)	0-25	64
	26-50	14
	51-75	14
	76-100	8

\*9: completamente bem formada e sadia; 8: 85% bem formada e sadia; 7: 70% bem formada e sadia; 6: 55% bem formada e sadia.

de espiga (106,8 g e 105,5 g) e de mil sementes (242,5 g e 244,7 g) com valores próximos. Já o agrupamento 3, constituído de sete acessos, apresentou característica de florescimento feminino intermediário (66,7 dias), altura de planta de 323,9 cm e de espiga de 186,6 cm, porém com maiores peso de espiga (158,8 g), peso de grãos por espiga (133,5 g) e peso de mil grãos (280,9 g). Pela grande variabilidade fenotípica apresentada nesse grupo de endosperma, confirma-se o potencial desses acessos tanto para o melhoramento quanto para a formação de novos materiais. Andrade *et al.* (2002) também encontraram grande variabilidade em acessos de milho de endosperma duro, sendo que 80% deles apresentaram valores medianos para a maioria das oito características avaliadas.

Para verificar o grau de concordância entre o dendrograma e a matriz de distâncias euclidiana média, foram realizadas as análises de correlação cofenética. A matriz cofenética foi comparada com a matriz baseada no agrupamento dos dados originais. A correlação entre as matrizes normalizada pela estatística de Mantel foi de 0,78. Esse valor, segundo a escala proposta por Mantel (Rohlf, 1998), significa que o grau de ajustamento entre as matrizes foi considerado bom para os acessos da coleção núcleo.

Os tamanhos dos 207 fragmentos (ou bandas) AFLP amplificados variaram de 52,43 a 498,79 pares de base (pb), com média de 32,8 bandas polimórficas por combinação de *primer* (Tabela 4). O número de fragmentos variou de 24 para a



**FIGURA 1.** Dendrograma de 58 acessos da coleção núcleo de milho, tipo de grão duro, obtido pelo método de agrupamento de UPGMA, utilizando a distância Euclidiana média. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, 2003.

combinação *MseI* CAG + *EcoRI* ACG até 50 para a combinação *MseI* CAG + *EcoRI* ACT. Com esta última combinação de *primers*, 45 fragmentos polimórficos foram amplificados. As combinações *MseI* CAG + *EcoRI* ACA e *MseI* CAG + *EcoRI* ACC apresentaram 100% de polimorfismo nos acessos da coleção núcleo. Em 114 genótipos da coleção núcleo de feijão e duas combinações de *primers* AFLP, Tohme *et al.* (1996) encontraram, em média, 102 bandas, sendo que 90% eram polimórficas.

Pelo índice de ramificação de consenso, verificou-se que os coeficientes de Jaccard e Dice conduzem a dendrogramas idênticos. Levando-se em consideração a base genética binária dos marcadores AFLP aplicados aos acessos, observa-se que a ausência de amplificação de uma determinada banda em dois acessos não representa, necessariamente, semelhança genética entre eles, o que faz com que aqueles coeficientes que excluem as ocorrências negativas de sua expressão de similaridade (Jaccard, Dice, Ochiai), a princípio, sejam mais adequados para o uso com este tipo de marcador (Williams *et al.*, 1990). Optou-se, portanto, em usar o coeficiente de Jaccard por ser um coeficiente simples, largamente utilizado e preferido em estudos de biologia e, segundo Dias (1998), é melhor empregado

para comparar genótipos dentro da mesma espécie, em que concordâncias são mais frequentes.

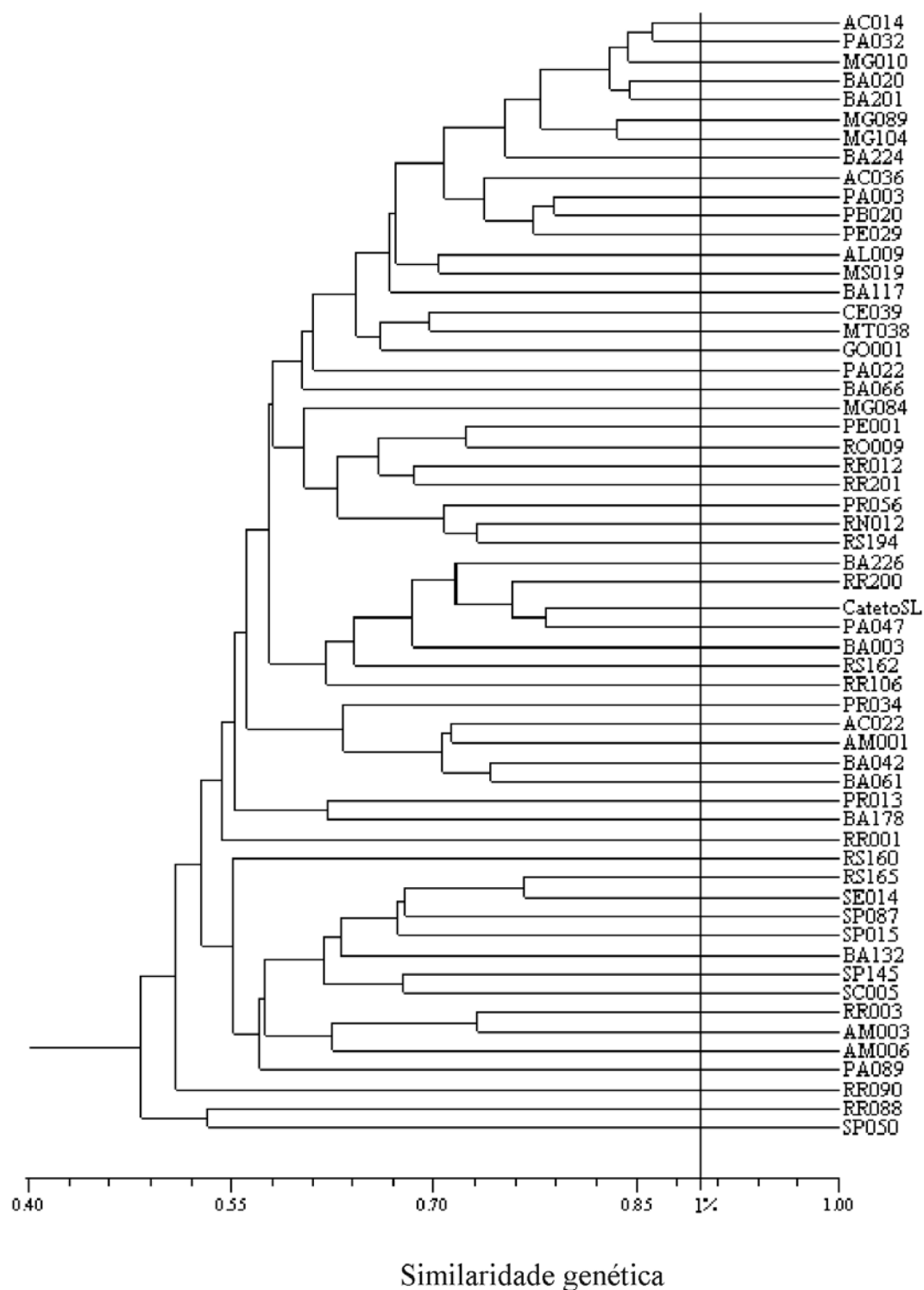
De maneira semelhante aos resultados obtidos com os descritores morfo-agronômicos, no dendrograma obtido a partir dos marcadores AFLP (Figura 2), os acessos de milho não formaram grupos homogêneos até uma distância aproximada de 25% da maior distância. A linha de corte nessa figura representa o valor máximo significativo de similaridade ( $sg_{max}$ ), determinado pelo teste de t em nível de 1% de probabilidade, sendo considerado como ponto de referência para discriminação ou agrupamento dos acessos.

O grau de concordância entre o dendrograma e a matriz de similaridades pelo coeficiente de Jaccard foi verificada pela análise de correlação cofenética. A correlação de matrizes, normalizada pela estatística de Mantel (Rohlf, 1998), foi de 0,76, significando que o grau de ajustamento entre as matrizes se aproximou do valor de um bom ajustamento para os acessos da coleção núcleo.

A 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 (Tabela 5) permitiu observar que o número médio de alelos foi de 1,95 e o número médio efetivo de alelos que contribuiu para

**TABELA 4.** Combinação de *primers*, utilizados na técnica de AFLP, intervalo de variação alélica, número de fragmentos e polimorfismo, observados nos acessos da coleção núcleo (CN) de milho tipo de grão duro. Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG, 2002.

Combinação de <i>Primers</i>	Intervalo de variação alélica (pb)	Nº. de Bandas CN		
		Total	Polimórfica	Polimorfismo (%)
<i>MseI</i> CAG + <i>EcoRI</i> ACA	59,76 – 488,69	29	29	100
<i>MseI</i> CAG + <i>EcoRI</i> ACG	57,53 – 426,06	24	23	95,8
<i>MseI</i> CAG + <i>EcoRI</i> ACC	81,02 – 460,15	31	31	100
<i>MseI</i> CAG + <i>EcoRI</i> ACT	52,43 – 498,79	50	45	90,0
<i>MseI</i> CAG + <i>EcoRI</i> AGG	57,76 – 444,30	35	32	91,4
<i>MseI</i> CAG + <i>EcoRI</i> AGC	68,92 – 474,48	38	37	97,4
Total	52,43 – 498,79	207	197	-
Média	62,90 – 465,41	34,5	32,8	95,8



**FIGURA 2.** Dendrograma dos 58 acessos da coleção núcleo de milho, tipo de grão duro, obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2003.

**TABELA 5.** Estimativas do número de alelos e diversidade genética para os 207 marcadores AFLP na coleção núcleo de milho, tipo de grão duro. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2003.

Parâmetro	Coleção Núcleo (CN)	
	Média	Desvio Padrão
Número de alelos observados (na)	1,9517	0,2149
Número de alelos efetivos (ne)	1,4677	0,3410
Heterozigosidade (h)	0,2807	0,1668
Índice de Shannon (H')	0,4303	0,2184

a diversidade genética foi de 1,47. A heterozigosidade (h), também chamada de índice de diversidade genética de Nei, foi usada para avaliar o conteúdo polimórfico de cada loco e obteve-se um valor de 0,28. Esse valor indica baixo conteúdo polimórfico quando comparados com valores de h para RFLP de 0,63 e 0,72 para SSR (Pejic *et al.*, 1998). O baixo conteúdo de informação genética por loco é uma das limitações do AFLP, por ser essencialmente dominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

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 medida de riqueza e uniformidade alélica, cujo baixo H' indica frequência de classes desbalanceadas para determinada característica e falta de diversidade genética (Perry & McIntosh, 1991). No presente trabalho, o índice de Shannon normalizado médio foi de 0,43 para a coleção núcleo. O valor de H' para cada loco da coleção núcleo variou de 0,0877 a 0,6930, mostrando uma grande amplitude de diversidade.

### Conclusões

A inclusão e obtenção de dados de mais oito descritores morfo-agronômicos contribuíram para aumentar a quantidade e a qualidade de informações sobre os acessos que compõem a coleção núcleo de milho subgrupo endosperma duro.

O uso do marcador molecular AFLP foi um instrumento eficiente em detectar o polimorfismo e útil nos estudos de diversidade genética dos acessos.

A caracterização molecular proporcionou uma nova informação acerca da estrutura genética da coleção núcleo de milho, mostrando alta variabilidade entre os acessos.

### Agradecimentos

A colaboração dos funcionários José da Silva, Adilson Barcelos e Gilberto Pontelo nos trabalhos de campo.

### 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. (Org.). **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. Perkin-Elmer Corporation, California, 1997. 45 p.

ANDRADE, R. V.; SANTOS, M. X. dos; FERREIRA, A. da S.; OLIVEIRA, A. C. Avaliação de acessos de milho crioulo coletados na região central do Brasil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 1, n. 2, p. 67-74, 2002.

- 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Rural. Serviço Nacional de Proteção de Cultivares. **Descritores mínimos do milho (*Zea mays* L.)**. Brasília, 1999. Páginação irregular.
- 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.
- BROWN, A. H. D.; SPILLANE, C. Implementing core collections – principles, procedures, progress, problems and promise. In: JOHNSON, R. C.; HODGKIN, T. **Core collections for today and tomorrow**. Rome: IPGRI, 1999. p. 1-9.
- CERVERA, M. T.; CABEZAS, J. A.; SANCHA, J. C.; TODA, F. M.; MARTINEZ-ZAPATER, J. M. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. genetic resources. A case study with accessions from Rioja (Spain). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, n. 1/2, p. 51-59, July 1998.
- 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.). **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. Viçosa: UFV, 2001. 642 p.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 390 p.
- DIAS, L. A. S. Análises multidimensionais. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**. Viçosa: UFV, 1998. p. 405-475.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1998. 220 p. (Embrapa-CENARGEN. Documentos, 20).
- HAGIWARA, W. E.; SANTOS, J. B. dos; CARMO, S. L. M. do. Use of RAPD to aid selection in common bean backcross breeding programs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 1, n. 4, p. 355-362, 2001.
- HAMON, S.; DUSSERT, S.; NOIROT, M.; ANTHONY, F.; HODGKIN, T. Core collections - accomplishments and challenges. **Plant Breeding Abstracts**, Cambridge, v. 65, n. 8, p. 1125-1133, 1995.
- INTERNATIONAL BOARD PLANT GENETIC RESEARCH (Rome, Italy). **Descriptors for Maize**. Mexico: CIMMYT; Rome: IBPGR, 1991. 88 p.
- MORALES, E. A. V.; VALOIS, A. C. C. Princípios para conservação e uso de recursos genéticos. In: PUIGNAV, A. C. C. (Ed.). **Conservacion de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA, 1996. p. 13-34. (IICA-PROCISUR. Dialogo, 45).
- MORALES, E. A. V.; VALOIS, A. C. C., COSTA, I. R. S. Core collections for gene banks with limited resources. 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. 241-249.
- NASS, L. L. Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 30-55.
- NASS, L. L.; PELLICANO, I. J.; VALOIS, A. C. C. Utilization of genetics resources for maize and soybean in Brasil. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 16, n. 4, p. 983-988, Dec. 1993.
- 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, 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, p. 1350-1355, 1991.
- PINTO COELHO, R. M. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2000. 252 p.
- ROHLF, F. J. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2**. New York: Applied Biostatistics, 1998. Não paginado.
- 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, p. 8014-8019, 1984.
- SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, C. A. V.; MENEZES, E. A. Seleção de descritores na caracterização e avaliação preliminar de germoplasma de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 7, p. 971-975, 1995.
- 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.
- SKROCH, P. W.; TIVANG, J.; NIENHUIS, J. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. In: APPLICATIONS OF RAPD TECHNOLOGY TO PLANT BREEDING, 1992. Minneapolis. **Proceedings...** Minneapolis: Crop Science Society of America, 1992. p. 26-30.
- 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.
- VEASEY, E. A.; SCHAMMASS, E. A.; VENCOVSKY, R.; MARTINS, P. S.; BANDEL, G. Germplasm characterization of *Sesbania* accessions based on multivariate analyses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 48, p. 79-90, 2001.
- VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa- SPI; Embrapa- Cenargen, 1997. 78 p.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.;

- ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- YEH, F. C. **Popgene** version 1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta: Dept. of Renewable Resources, 1999.
- 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.
- ZIBUMBO, D. V.; COLUNGA, P. G. Morphophysiological variation and phenotypic plasticity in Mexican populations of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 48, n. 6, p. 547-554, Dec. 2001.