

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



**Dissertação**

**Avaliação de populações de azevém anual quanto à  
tolerância ao alumínio tóxico e estimativa de tamanho de  
amostra para estudos de diversidade genética com  
marcadores AFLP**

**Adriana Pires Soares Bresolin**

**Pelotas, 2007**

**Adriana Pires Soares Bresolin**  
**Engenheira Agrônoma (FAEM/UFPel)**

**Avaliação de populações de azevém anual quanto à tolerância ao alumínio tóxico e estimativa de tamanho de amostra para estudos de diversidade genética com marcadores AFLP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Fitomelhoramento).

Orientadora: Caroline Marques Castro, Dr<sup>a</sup>. Pesquisadora Embrapa /CPACT  
Co-orientador: Antônio Costa de Oliveira, PhD. – FAEM/UFPel

Pelotas, 2007

## Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

B842a Bresolin, Adriana Pires Soares

Avaliação de populações de azevém quanto à tolerância ao alumínio tóxico e estimativa de tamanho de amostra para estudos de diversidade genética com marcadores AFLP / Adriana Pires Soares Bresolin. - Pelotas, 2007.

76f. : il.

Dissertação ( Mestrado em Fitomelhoramentos ) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2007, Caroline Marques Castro, Orientador; co-orientador Antônio Costa de Oliveira.

1. *Lolium multiflorum* 2. Variabilidade genética 3. Bulks de DNA. I. Castro, Caroline Marques (orientador) II .Título.

CDD 633.2

**Banca Examinadora:**

Dr<sup>a</sup>. Caroline Marques Castro - Embrapa /CPACT (presidente)

Prof. PhD. José Fernandes Barbosa Neto - UFRGS

Dr<sup>a</sup>. Andréa Mittelman - Embrapa /CNPGL

Prof. PhD. Fernando Irajá Félix de Carvalho - FAEM/UFPel

Aos meus pais

Antonio e Maria de Lourdes,

e ao meu esposo

Normando Ramsés Bresolin

sempre presentes em todos os momentos.

**Dedico**

## **Agradecimentos**

A Deus pela vida, e proteção.

A minha família pelo apoio e compreensão, em especial ao meu esposo pelo companheirismo e amor, que foram o combustível nesta minha jornada.

Ao prof. Fernando Luís Caprio da Costa, pelos valiosos ensinamentos no início de minha jornada acadêmica, grande responsável por despertar minha paixão por genética. Além da confiança em mim depositada, através da indicação ao prof. Antonio Costa de Oliveira, o que me possibilitou vir a fazer parte deste competente grupo de trabalho do Centro de Genômica e Fitomelhoramento.

A prof. Vera Lúcia Bobrowski pela orientação e ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.

A Dr<sup>a</sup>. Caroline Marques Castro, pela orientação, aprendizado e amizade, profissional extremamente competente e dedicada, conduta na qual me espelho para desenvolver minha jornada profissional.

Ao prof. Antonio Costa de Oliveira pela oportunidade e pela confiança depositada em mim permitindo que viesse a fazer parte de seu seleto grupo de orientados, o que para mim será sempre um motivo de orgulho, pela co-orientação, dedicação e amizade.

Ao Professor Fernando Irajá Felix de Carvalho, pela oportunidade de fazer parte deste competente grupo de trabalho do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, por todo aprendizado compartilhado no decorrer destes dois anos de convivência, além do grande apoio, dedicação e amizade.

Ao prof. Jefferson Luís Meirelles Coimbra pela confiança, ensinamentos e amizade.

Ao prof. José Antonio Gonzáles, pelo aprendizado e dedicação.

A Dr<sup>a</sup>. Andréa Mittelman pelo aprendizado e colaboração.

As colegas e amigas do CGF, Claudete Mistura, Juliana Castelo Branco, Emília Malone, Albina Bernardes e Naciele Marini pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas do CGF, Velci Queiroz de Souza e Enrique Moliterno pela valiosa contribuição no desenvolvimento deste trabalho. E a todos os demais colegas,

estagiários, bolsistas de iniciação científica, mestrandos e doutorandos do Centro de Genômica e Fitomelhoramento, pela amizade e valiosa contribuição nos trabalhos.

Aos grandes amigos do laboratório de biologia molecular da Embrapa Clima Temperado, em especial ao Denílson Anthonisen, Graziela da Silva Nolasco e Vanessa Neumann da Silva pela contribuição e amizade. E aos demais amigos da Embrapa, Patrícia, Raquel, Isadora, Marília, Gladis, Juliana e Luzia pela acolhida e amizade.

A CAPES, pela viabilização financeira deste projeto.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

BRESOLIN\_SOARES, ADRIANA PIRES. **Avaliação de populações de azevém anual quanto à tolerância ao alumínio tóxico e estimativa de tamanho de amostra para estudos de diversidade genética com marcadores AFLP.** 2007. 76f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é a espécie forrageira de maior utilização no Rio Grande do Sul, assim como na maior parte das regiões temperadas e subtropicais do mundo, destacando-se entre as mais difundidas no mundo. Devido à grande importância desta forrageira no Brasil, no ano de 1999, iniciaram-se na Embrapa Clima Temperado atividades voltadas ao melhoramento do azevém anual, inicialmente com a realização de coletas de germoplasma. No entanto, a simples coleta e a conservação de recursos genéticos, sem as informações sobre suas características, torna os bancos de germoplasma simples depósitos de materiais. É de fundamental importância que se conheçam os recursos genéticos disponíveis, tanto em termos da variabilidade presente, como em termos de qualidade destes materiais, para que uma apropriada definição das estratégias de conservação e uso seja empregada. A pesquisa teve como principais objetivos avaliar populações de azevém anual quanto à tolerância ao alumínio tóxico e definir o tamanho de amostras de *bulks* de DNA mais apropriado para estudos de diversidade genética entre populações de azevém anual com marcadores AFLP. Foram desenvolvidos dois trabalhos: o primeiro avaliou populações de azevém sob condições de hidroponia quanto à sensibilidade e tolerância ao alumínio. Os resultados encontrados mostram que o emprego de solução nutritiva combinada com as diferentes doses de  $Al^{3+}$  (0; 7 e 21  $mg.L^{-1}$ ) foi eficiente na discriminação dos genótipos em estudo, indicando a existência de variabilidade genética e destacando as populações CNPGL 178 e CNPGL 136 como constituições genotípicas com maior tolerância ao alumínio e estabilidade nos dois períodos de avaliação. O segundo tratou de definir o tamanho de *bulk* mais apropriado para estimar a diversidade genética entre populações de azevém com uso de marcadores AFLP. Foram avaliadas duas populações de azevém, sendo analisados 30 indivíduos de cada população e seus respectivos *bulks*: seis *bulks* constituídos por 5 indivíduos cada; três *bulks* de 10 indivíduos; dois *bulks* de 15 indivíduos; um *bulk* de 20 indivíduos e um *bulk* de 30 indivíduos. Seis combinações de *primers* AFLP foram empregadas. Todos os tamanhos e número de *bulks* avaliados foram eficientes em discriminar as duas populações analisadas. Entretanto, considerando a rapidez, custo e poder discriminatório, o *bulk* formado por 20 indivíduos foi o mais apropriado para estimar a divergência genética entre populações de azevém. Foi evidenciado que embora ocorra uma perda dos alelos que estão presentes em baixa frequência nas populações, a avaliação de *bulks* acarreta na redução de amostras a serem processadas, permitindo que um grande número de populações sejam caracterizadas sem perder a identidade de cada população.

**Palavras-chave:** *Lolium multiflorum*, variabilidade genética, *bulks* de DNA.

## Abstract

BRESOLIN\_SOARES, ADRIANA PIRES. **Evaluation of aluminum tolerance and DNA bulk sample sizes in Italian ryegrass populations assessed with AFLP markers.** 2007. 76f. Dissertation (Master of Science) – Postgraduate Program in Agronomy. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) is the most important forage grass in Rio Grande do Sul, as well as in most part of temperate and subtropical regions of the world. Due to its importance, in 1999 Embrapa Temperate Agriculture initiated activities to develop an Italian ryegrass breeding program, which started with collecting germplasm in Southern Brazil. However, collecting and conservation of germplasm, without its characterization, results in genebanks as simple repositories of genetic materials, without use. To established correct strategies of efficient management and use of genebanks, is extremely important to know the amount and quality of genetic resources available in genebanks. This study was developed aiming to evaluate Italian ryegrass populations to aluminum tolerance and to establish the optimum bulk size to estimate genetic diversity among populations with AFLP markers. Two experiments were undertaken; the first one evaluated six Italian ryegrass populations in hydroponic solution to aluminum ( $Al^{3+}$ ) tolerance. The results showed that the nutrition solution combined with the different aluminum doses (0; 7 and 21  $mg.L^{-1}$ ) were efficient to discriminate the populations evaluated, showing the presence of genetic variability among populations. Tolerance to  $Al^{3+}$  was higher in populations CNPGL 136 and CNPGL 178, which also showed stability in both periods of evaluation. The second experiment was developed aiming to establish the optimum bulk size to estimate genetic diversity among Italian ryegrass populations with AFLP markers. Two populations were evaluated; from each population were characterized 30 individuals and the respective bulk samples sizes: six bulks of 5 individuals each; three bulks of 10 individuals; two bulks of 15 individuals; one bulk of 20 individuals and one bulk of 30 individuals. Six AFLP primer combinations were employed. All numbers and sizes of bulks evaluated were able to discriminate the two populations characterized. However, considering time, cost and discriminatory power, the bulk of 20 individuals is more indicated to be employed in genetic diversity analysis studies among Italian ryegrass populations. Although alleles that occur in low frequency in the populations are lost when bulks are analyzed, the evaluation of bulks, instead of individual genotypes, saves processing time of samples allows that a larger number of populations to be analyzed without identity losses.

Key words: *Lolium multiflorum*, genetic variability, DNA bulks.

## Lista de tabelas

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>CAPITULO 1. Populações de azevém anual (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.) sob condições de hidroponia para identificação de sensibilidade e tolerância ao alumínio</b>   | 16   |
| <b>Tabela 1.</b> Resumo da análise da variância conjunta, para o caráter comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA), de seis populações de azevém avaliadas nas doses 0; 7 e 21 mg.L <sup>-1</sup> de alumínio em solução hidropônica. FAEM/UFPel, 2005/2006.  | 35   |
| <b>Tabela 2.</b> Resumo da análise da variância e comparação de médias, para o caráter comprimento de raiz e comprimento da parte aérea, de seis populações de azevém avaliadas nas doses 0; 7 e 21 mg.L <sup>-1</sup> de alumínio em solução hidropônica, considerando o efeito simples de ano x genótipo x dose. FAEM/UFPel, 2005/2006.                   | 36   |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados da análise de variação da regressão para a variável dependente comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA) de populações de azevém para os testes de significância dos componentes linear quadrático da variação atribuível ao efeito de doses de Al <sup>3+</sup> em solução nutritiva. FAEM/UFPel, 2005/2006. | 37   |
| <b>CAPITULO 2. Otimização do tamanho de bulks para análise da diversidade genética em populações de azevém anual com base em marcadores AFLP</b>  | 40   |
| <b>Tabela 1.</b> Fragmentos AFLP obtidos, com cada combinação de <i>primers</i> , nas amostras individuais de DNA genômico e nas amostras em <i>bulks</i> e total de fragmentos obtidos com as seis combinações de primers nas mesmas condições. População CNPGL, 188. CFACT, 2007.   | 57   |
| <b>Tabela 2.</b> Fragmentos AFLP obtidos, com cada combinação de <i>primers</i> , nas amostras individuais de DNA genômico e nas amostras em <i>bulks</i> e total de fragmentos obtidos com as seis combinações de primers nas mesmas condições. População CNPGL, 136. CFACT, 2007.   | 58   |
| <b>ANEXO. Otimização de protocolo para análise de AFLPp em <i>Lolium multiflorum</i> Lam.</b>   | 64   |
| <b>Tabela 1.</b> Reações de digestão do DNA genômico, testadas em azevém.   | 69   |

## Lista de figuras

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>CAPITULO 1. Populações de azevém anual (<i>Lolium multiflorum</i> Lam.) sob condições de hidroponia para identificação de sensibilidade e tolerância ao alumínio</b>   | 16   |
| <b>Figura 1.</b> Regressões ajustadas para a variável dependente crescimento de raiz (CR) das populações CNPGL 136, CNPGL 178, LE 284, CNPGL 188, CPPSUL 001, CNPGL 185, nas concentrações de 0; 7 e 21 mg L <sup>-1</sup> de Al <sup>3+</sup> em solução. FAEM/UFPEl, 2005/2006.   | 38   |
| <b>Figura 2.</b> Regressões ajustadas para a variável dependente comprimento da parte aérea (CPA) das populações CNPGL 136, CNPGL 178, LE 284, CNPGL 188, CPPSUL 001, CNPGL 185, nas concentrações de 0; 7 e 21 mg L <sup>-1</sup> de Al <sup>3+</sup> na solução. FAEM/UFPEl, 2005/2006.   | 39   |
| <b>CAPITULO 2. Otimização do tamanho de bulks para análise da diversidade genética em populações de azevém anual com base em marcadores AFLP</b>  | 40   |
| <b>Figura 1.</b> Exemplo de fragmentos padrões de amostras individuais (linhas 1-30) e amostras em bulks de 5 indivíduos (linhas 31- 36); de 10 indivíduos (37-39); de 15 indivíduos (40-41); de 20 indivíduos (42) e de 30 indivíduos (43), da população CNPGL 136 de <i>Lolium multiflorum</i> , visualizados em gel de poliacrilamida 6%. CPACT, 2007. | 48   |
| <b>Figura 2.</b> Análise de agrupamento de 59 indivíduos (amostras individuais) que compõe as populações A (CNPGL 188) com 29 indivíduos e B (CNPGL 136) com 30 indivíduos, por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. CPACT, 2007.   | 50   |
| <b>Figura 3.</b> Análise de agrupamento dos seis bulks de 5 indivíduos cada, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136) , por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. CPACT, 2007.   | 52   |
| <b>Figura 4.</b> Análise de agrupamento dos três bulks de 10 indivíduos cada, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. CPACT, 2007.   | 52   |
| <b>Figura 5.</b> Análise de agrupamento dos dois s bulks de 15 indivíduos cada, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. CPACT, 2007.   | 52   |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 6.</b> Análise de agrupamento do <i>bulk</i> de 20 indivíduos, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. CPACT, 2007. | 52 |
| <b>Figura 7.</b> Análise de agrupamento do <i>bulk</i> de 30 indivíduos, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. CPACT, 2007. | 53 |
| <b>ANEXO. Otimização de protocolo para análise de AFLPp em <i>Lolium multiflorum</i> Lam.</b>  | 64 |
| <b>Figura A.</b> População CNPGL 136 (amostras de DNA ).   | 68 |
| <b>Figura B.</b> População CNPGL 188 (amostras de DNA).  | 68 |
| <b>Figura C.</b> Resultado da amplificação seletiva (AFLP)   | 72 |
| <b>Figura D.</b> População CNPGL 136, amostras de 1-30, amplificadas em gel de poliacrilamida 6%, combinação de <i>primers</i> E-ACA / M-CAG.  | 73 |
| <b>Figura E.</b> População CNPGL 188, amostras de 1-30, amplificadas em gel de poliacrilamida 6%, combinação e <i>primers</i> E-ACA / M-CAG.   | 73 |





















De acordo com Vicente et al. (1997), os caracteres comprimento de raiz e comprimento de parte aérea são os que melhor refletem o efeito da toxicidade de alumínio sobre genótipos de arroz. Em plantas de milho (Paterniani & Furlani, 2002), o melhor caráter para avaliar tolerância ao  $Al^{3+}$  tem sido definido pelo crescimento da raiz de plântulas quando submetidas à solução nutritiva. Experimentos em arroz revelaram que os caracteres comprimento de raiz (Freitas et al., 2006) e comprimento de parte aérea sofrem redução na presença de  $Al^{3+}$  (Mendonça et al. , 2005).

Analisando os fatores de modo exclusivo, é possível verificar que o fator genótipo evidenciou elevado valor de quadrado médio no caráter CPA, evidenciando forte efeito em relação às populações estudadas. Já para o fator dose, o CR foi de maior magnitude, expressando de forma direta o maior efeito das concentrações neste caráter. Além disso, o ano de avaliação indicou que CPA é menos influenciado pelo ambiente, pela ausência de significância observada para o efeito de ano, o que pode representar maior facilidade de seleção para tolerância ao alumínio com base neste caráter, uma vez que apresenta maior estabilidade. Contudo, a avaliação das distintas populações em estudo, apenas se torna conclusiva com o desdobramento das interações.

Não foi observada diferença significativa entre as plantas que compuseram cada população avaliada, embora exista grande variabilidade genética dentro de populações de azevém devido à alta frequência de heterozigotos como já pode ser constatado por Castro et al. (2003). Neste experimento, toda esta variabilidade pode ter ficado diluída, devido ao representativo tamanho da amostra, 150 indivíduos por população distribuídos em três repetições por tratamento. Esta constatação permite desconsiderar este fator como fonte de variação dentro dos tratamentos. A

variabilidade existente dentro das populações não foi significativa de modo a interferir na interpretação dos resultados experimentais, o que possibilita ao melhorista trabalhar com base na média geral de cada população.

Após ter sido evidenciada a interação ano x genótipo x dose, a análise prosseguiu de modo a permitir o desdobramento desta interação, a fim de observar o comportamento das diferentes populações de azevém frente aos diferentes níveis de  $Al^{3+}$  no decorrer dos anos de avaliação (Tabela 2).

Os genótipos CNPGL 136 (Pelotas, RS) e CNPGL 178 (Nova Alvorada, RS) não apresentaram variação significativa nos caracteres avaliados no decorrer de dois anos de avaliação, demonstrando, portanto, um comportamento estável frente às doses de Al, tanto no ano de 2005, quanto em 2006. Já os genótipos CNPGL 185 (Coqueiros do Sul, RS) e CNPGL 188 (Coqueiros do Sul, RS) apresentaram comportamento diferenciado para CR e CPA de um ano para o outro. O que indica que estes genótipos são mais instáveis e um único período de avaliação não seria suficiente para dar suporte a uma seleção eficiente.

O CPPSUL 001 variou o CR no ano de 2005 para 2006 considerando a dose de  $7 \text{ mgL}^{-1}$  de alumínio, porém na dose mais elevada este comportamento não foi evidenciado o que levanta a hipótese da necessidade de uso de uma maior concentração a fim de garantir maior eficiência de seleção. Já o LE 284 demonstrou variação no caráter CPA neste mesmo período, quando o  $Al^{3+}$  estava ausente na solução.

Através da análise de médias (Tabela 2), para o caráter CR, pode ser verificado que, na dose  $0 \text{ mgL}^{-1}$  de  $Al^{3+}$ , no decorrer do primeiro ano de avaliação, os genótipos apresentaram duas classes distintas “a” e “b”, confirmando a existência de diferenças genéticas entre as distintas populações. Na classe “a” se encontram o

genótipo CNPGL 136 (4,28 cm) e CNPGL 178 (3,70 cm) com os maiores comprimentos de raiz, não diferindo entre si. Já as demais populações com menor média de CR, constituíram a classe “b” apresentando médias significativamente semelhantes. Entretanto, no segundo ano de avaliação, não foram evidenciadas diferenças entre as médias dos genótipos nesta mesma dose de  $0 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ .

Na dose  $7 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  os genótipos que obtiveram os melhores desempenhos foram LE 284 (3,27 cm) e CNPGL 136 (2,97 cm), os quais não diferiram entre si. O CPPSUL 001 (2,54 cm) não diferiu do CNPGL 136. Já os genótipos CNPGL 188, 185 e 178 evidenciaram os menores valores de CR, não diferindo entre si no ano de 2005. Portanto, nesta dose damos destaque a cultivar uruguaia LE 284, que demonstrou maior tolerância.

No segundo ano de avaliação, apenas dois genótipos diferiram significativamente entre si, CNPGL 188 que apresentou a maior média (3,56 cm) e CNPGL 178 com a menor (2,81 cm) (Tabela 2). De acordo com estes resultados podemos ressaltar a importância da avaliação em mais de um período, o que nos permite fazer inferências mais consistentes, além de prever a respeito da estabilidade das constituições genéticas com as quais trabalhamos.

Na dose  $21 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , ano 2005, os genótipos CNPGL 136, LE 284 e CPPSUL 001, novamente apresentaram médias superiores, assim como na dose  $7 \text{ mgL}^{-1}$  de Al. Já no ano de 2006, CNPGL 136 e LE 284 mantiveram-se entre os genótipos de maior CR, juntamente com CNPGL 188 e 185, diferindo apenas do CNPGL 178 e CPPSUL 001, com as menores médias (Tabela 2).

Estes resultados demonstram claramente o efeito da interação ano x genótipo x dose, detectada inicialmente através da análise de variância, destacando as populações CPPSUL 001, CNPGL 188 e CNPGL 185 como constituições de grande

instabilidade de comportamento, para as quais é extremamente importante proceder mais de um período de avaliação.

Considerando o caráter CPA na dose  $0 \text{ mgL}^{-1}$  de Al, no primeiro ano de avaliação, os genótipos LE 284, CNPGL 136 e CPPSUL 001 foram os de melhor desempenho, não diferindo entre si, mas sim, dos demais CNPGL 188, 185 e 178 com os piores desempenhos, este comportamento pode ser novamente observado no segundo ano de avaliação.

Na dose  $7 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , no ano de 2005, os genótipos LE 284, CNPGL 136 e CPPSUL 001 se mantiveram em evidência, diferindo dos demais, CNPGL 188 e 178, que foram um grupo intermediário, e principalmente, do CNPGL 185, que apresentou a menor média. Observando o comportamento das mesmas constituições genéticas no ano de 2006, podemos verificar um comportamento muito semelhante, destacando o CNPGL 178 que juntamente com o CNPGL 185 demonstraram ser os genótipos de maior sensibilidade ao efeito tóxico do alumínio (Tabela 2).

Na dose  $21 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , este comportamento se manteve, apresentando os genótipos LE 284, CNPGL 136 e CPPSUL 001 como os mais tolerantes, CNPGL 188 como intermediário e CNPGL 185 e 178 como os mais sensíveis, durante os dois anos de avaliação.

O caráter CR é o que melhor demonstrou os efeitos causados pela toxicidade do alumínio. Isto tem sido demonstrado em milho (Parentoni e Furlani, 2002; Mazzocato et al., 2002), arroz (Vicente et al., 1997; Mendonça et al., 2005; Freitas et al., 2006) e aveia (Sánchez et al., 2002). Entretanto, em azevém, este caráter apresentou instabilidade quando avaliado de um ano para o outro. Este fato pode estar relacionado a uma perda de vigor da semente de um ano para o outro, uma vez que o experimento foi realizado sob condições controladas e a única alteração

nos dois períodos em que foi realizado o experimento foi a idade da semente. Já o CPA foi considerado como o de maior estabilidade na avaliação de genótipos tolerantes ao alumínio, o que nos propicia através da sua utilização, uma maior eficiência de seleção.

Entre as populações CNPGL 136, CNPGL 178 e LE 284, que evidenciaram os maiores CR na dose de  $0 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , CNPGL 136 e LE 284 mantiveram as maiores médias de CR no decorrer do experimento, nas diferentes doses de alumínio empregadas. Além disso, as populações LE 284 e CNPGL 136 juntamente com a CPPSUL 001, apresentaram o maior CPA na dose de  $0 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . Estas populações, apesar de reduzirem o CPA proporcionalmente ao incremento na dose de  $\text{Al}^{3+}$ , ainda assim, demonstraram o melhor desempenho para este caráter frente a todas as doses de  $\text{Al}^{3+}$  testadas nos diferentes anos de avaliação. Este resultado nos sugere que plantas que apresentem um bom desenvolvimento inicial, tanto de raiz como de parte aérea, possivelmente tenham melhores condições de tolerar o efeito tóxico do alumínio no solo.

O efeito das doses de alumínio sobre cada população avaliada foi mensurado através de uma análise de regressão. Em função de que no teste F foi evidenciada interação entre ano x genótipo x dose e, sendo a interação expressa pelo comportamento diferenciado das médias, produzidas pelas distintas constituições genéticas, a análise de regressão ajustando equações distintas para cada genótipo, pode ser utilizada como ferramenta de suporte à hipótese de toxicidade por alumínio.

Considerando os genótipos CNPGL 136, CNPGL 178 e LE 284, os quais não apresentaram interação significativa com o ano de avaliação para o caráter CR, todos evidenciaram equação do tipo quadrática, de acordo com o incremento da concentração de  $\text{Al}^{3+}$  (Tabela 3). O genótipo CNPGL 178 que apresentou equação: y

=  $3,77 - 0,21x + 0,006x^2$ , pode tolerar uma concentração de  $17,05 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , sendo que, a partir deste nível, o crescimento da raiz tende a ser prejudicado (Figura 1. B). CNPGL 136 tolerou até  $17,00 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . Enquanto que, se considerarmos o genótipo LE 284 (Figura 1. F), o resultado é bastante diferente, isto porque, neste caso, uma pequena concentração de apenas  $0,04 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  já é capaz de afetar o desenvolvimento da raiz. Portanto, nesta primeira análise dos genótipos que não variaram de comportamento de acordo com o ano, podemos indicar os genótipos CNPGL 178 e CNPGL 136 como os mais tolerantes ao efeito tóxico do alumínio e em contrapartida, destacamos o genótipo LE 284 como o de maior sensibilidade.

Para os genótipos que apresentaram interação significativa com o ano, para o caráter CR, na avaliação de 2005 (Tabela 3), também foi evidenciado que todas as equações também foram do tipo quadrática. Destaque para os genótipos CNPGL 185 (Figura 1. C) que a partir da dose de  $16,42 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  é que inicia o aparecimento dos sintomas de toxicidade, o CPPSUL 001 (Figura 1. E) a partir de  $15,8 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  e o CNPGL 188 (Figura 1. D) a partir de  $14,44 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ .

Durante o segundo ano de avaliação (2006) (Tabela 3), foi possível observar que os genótipos CNPGL 185 (Figura 1. C) e 188 (Figura 1. D) evidenciaram equação do tipo linear com coeficientes ( $b_1$ ) significativos e de sinal negativo,  $-0,05$  e  $-0,04$ , respectivamente, o que nos indica que o incremento na concentração de  $\text{Al}^{3+}$ , resulta em uma redução no CR, até a total paralisação do desenvolvimento. Entretanto, o CPPSUL 001 (Figura 1. E) evidenciou equação do tipo quadrática, demonstrando paralisação do crescimento a partir da dose de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . De acordo com estes resultados destacamos o genótipo CPPSUL 001 como o mais tolerante ao efeito do alumínio no segundo ano de avaliação.

Para o caráter CPA três genótipos não evidenciaram interação com o ano de avaliação (Tabela 3), que foram: CNPGL 178 (Figura 2. B) que evidenciou equação do tipo quadrática, demonstrando paralisação no crescimento da parte aérea a partir da dose de  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , e CPPSUL 001 (Figura 2. E) e CNPGL 136 (Figura 2. A) com equação linear, sobre os quais a cada  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  adicionado à solução reduz em 0,08 e 0,06 cm respectivamente, o comprimento da parte aérea das plantas.

Para os genótipos que apresentaram interação significativa com o ano para o caráter CPA, em 2005, os genótipos CNPGL 185 (Figura 2. C) e LE 284 (Figura 2. F) evidenciaram equação do tipo linear, reduzindo em 0,08 cm o comprimento da parte aérea a cada  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  adicionado à solução nutritiva e CNPGL 188 apresentando coeficiente de regressão não significativo, não tendo, portanto, o comportamento explicado através da análise de regressão linear (Tabela 3).

Em 2006 o genótipo LE 284 apresentou equação do tipo quadrática, na qual a partir de uma dose de  $11,66 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  inicia o processo de paralisação de desenvolvimento do comprimento da parte aérea. CNPGL 185 e 188 apresentaram coeficiente de regressão não significativo (Tabela 3).

Com base na análise de regressão é possível verificar o comportamento de cada genótipo de modo geral, já na análise de médias a inferência se faz especificamente no ponto estabelecido referente a cada dose (0; 7 e  $21 \text{ mgL}^{-1}$ ). Conseqüentemente, o nível de tolerância determinado dentro de cada ponto pode não representar o comportamento do genótipo quando analisado através da regressão, como podemos observar no presente estudo. Mas, por se tratar de um fator quantitativo, a análise de regressão representa o parâmetro mais ajustado para determinar o comportamento dos genótipos frente às doses de alumínio. Desta

forma, com base na análise de regressão, destaque para as populações CNPGL 178 e CNPGL 136 como as de maior tolerância ao efeito tóxico do  $Al^{3+}$ , com base no caráter CR e na estabilidade de comportamento evidenciada no decorrer do experimento. Já a população CPPSUL 001, demonstrou elevada tolerância no ano de 2006, no entanto, apresentou-se como uma constituição instável, e que por este motivo, não deve ser indicada como base em um único período.

A variabilidade encontrada no germoplasma de azevém avaliado concorda com resultados de Dias et al. (2001), Neske et al. (2002), Rosa et al. (2002), Castro et al. (2003) e Mittelman et al. (2004) que detectaram a existência de variabilidade entre populações de azevém do Sul do Brasil, indicando a possibilidade de seleção de populações superiores e mais ajustadas. Estes resultados são de grande importância tendo em vista que a ausência de fontes de variabilidade pode inviabilizar a formação de populações melhoradas (Smith & Smith, 1992).

Diferentes resultados experimentais já foram obtidos com outras poaceas, obtendo sucesso na detecção de diferentes níveis de tolerância ao alumínio tóxico. Em milho, outra espécie alógama, Paterniani & Furlani (2002) identificaram o efeito de tolerância ao  $Al^{3+}$  com base no comprimento da radícula utilizando uma dose de  $4,5 \text{ mgL}^{-1}$  de  $Al^{3+}$  em solução nutritiva. Em arroz, Vicente et al. (1997) definiram um intervalo entre 20 e  $30 \text{ mgL}^{-1}$  de  $Al^{3+}$  como suficiente para identificação de características indicativas de sensibilidade ao alumínio. Bertan et al. (2005) detectou variabilidade para tolerância ao  $Al^{3+}$  em genótipos de trigo avaliados sob cultivo hidropônico, utilizando uma dose de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de  $Al^{3+}$ , permitindo a classificação de genótipos tolerantes, intermediários e suscetíveis, já Sánchez-Chacón et al. (2000), definiu o nível de  $20 \text{ mgL}^{-1}$  de  $Al^{3+}$  como o que estabeleceu maior número de classes fenotípicas e melhor discriminou o germoplasma de aveia quanto à tolerância ao

alumínio. Neste trabalho o intervalo de 15 a 21 mgL<sup>-1</sup> de Al<sup>3+</sup> em solução nutritiva, permitiu a identificação de populações de azevém tolerantes e sensíveis à toxicidade por alumínio tóxico.

### **Conclusões**

O emprego de solução nutritiva combinada com diferentes doses de Al<sup>3+</sup> possibilitou a discriminação das constituições genéticas em estudo. Os resultados indicam a existência de variabilidade no germoplasma de azevém avaliado quanto aos níveis de tolerância e sensibilidade ao alumínio tóxico. As populações CNPGL 178 e CNPGL 136 apresentaram constituições genóticas mais estáveis e com maior tolerância ao Al<sup>3+</sup>. A dose de 21 mgL<sup>-1</sup> de Al<sup>3+</sup> empregada neste trabalho pode ser considerada a mais indicada na seleção de genótipos tolerantes e sensíveis à toxicidade por alumínio.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Projeto FINEP/EPROGGIA – Estratégias de prospecção de genes em gramíneas de interesse agrônômico e ao CNPq pelo suporte financeiro.

### **Referências bibliográficas**

Bertan I, Carvalho FIF. de. Oliveira AC de. Silva JAG da. Bennin G, Silva GO da, Hartwing I e Padilha EB (2005) Caracteres associados à tolerância ao alumínio tóxico em genótipos de trigo sul brasileiros. **Revista Brasileira Agrocência** 11: 149-154.

Breese EL e Hayward MD (1972) The genetic basis of present breeding methods in forage crops. **Euphytica** 21: 324-336.

Camargo CEO de e Oliveira OF (1981) Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia** 40: 21-23.

Carambula M (1977) **Producción y manejo de pasturas sembradas**. Montevideo: Hemisfério Sur, 463p.

Castro CM, Oliveira AC, Carvalho IF, Maia MS, Mattos LA e Freitas F (2003) Morphological and molecular characterization of italian ryegrass populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 3: 245-254.

Dias JCA, Gomes JF e Infeld JA (2001) Avaliação de genótipos de azevém anual em solos hidromórficos. **Embrapa** (Comunicado Técnico n.42), Brasília.

Dornelles CAL (1994) **O uso da cultura de tecidos na geração de variabilidade para tolerância à toxicidade do alumínio e sensibilidade ao ácido giberélico em trigo (*Triticum aestivum* L.)** Tese de doutorado, UFRGS, Porto Alegre, 102p.

Echart CL and Cavalli-Molina S (2001) Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural** 31: 531-541.

Ferreira RP, Cruz CD, Sediyaama CS e Fageria NK (1995) Identificação de cultivares de arroz tolerantes à toxidez de alumínio por técnica multivariada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 30: 789-795.

Ferrer ME e Clausen AM (2001) Variabilidad genética en los recursos vegetales de importancia para la agricultura del Cono Sur. In: BERRETA, A.; RIVAS, M. (eds.). Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Montevideu, PROCISUR - **Série Documentos** 43-57.

Fleming AL and Foy CD (1968) Root structure reflects differential aluminum tolerance in wheat varieties. **Agronomy Journal** 60: 172-176.

Floss EL (1992) **Avaliação da toxicidade do alumínio em genótipos de aveia.**

Tese de Doutorado, ESQAQ, Piracicaba, 269p.

Foy CD (1974) Effects of aluminum on plant growth: In: Carson EW **The plant root and its environment.** University Press of Virginia, Charlottesville, p. 601-624.

Foy CD and Fleming AL (1978) The physiology of plant tolerance to excess available aluminum and manganese in acid soils. In: Jung GA **Crop tolerance to suboptimal land condition.** Soil Science Society of American, Madison, p.301-338.

Freitas F A de ; KOPP M M ; Sousa, R O de ; Zimmer, P D ; Carvalho, F I F de ; Oliveira, A C de . (2006) Absorção de P, Mg, Ca e K e tolerância de genótipos de arroz submetidos a estresse por alumínio em sistemas hidropônicos. **Ciência Rural**, Santa Maria-RS, v. 36, n. 1, p. 72-79.

Furlani PR, Duarte AP e Paterniani MEAGZ (2000) Tolerância ao alumínio em cultivares de milho. In: Duarte AP, Paterniani MEAGZ (Coords). **Fatores bióticos e abióticos em cultivares de milho e estratificação ambiental: avaliação IAC/CATI/Empresas — 1999-2000.** Instituto Agronômico, Campinas, p. 19-29.

Jones DL, Kochian LV (1995) Aluminum inhibition 1,4,5-triphosphate signal transduction pathway in wheat roots: a role in Al toxicity? **Plant Cell** 7: 1913-1922.

Kerridge PC, Dawson MD and Moore DP (1971) Separation of degrees of aluminum in wheat. **Agronomy Journal** 63: 586-591.

Kerridge PC and Kronstad WE (1968) Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* Vill., Host.). **Agronomy Journal** 60: 710-711.

Kinraide TB (1991) Identity of the rhizotoxic aluminum species. **Plant and Soil** 134: 167- 178.

Lafever HH, Campbell LG and Foy CD (1977) Differential response of wheat cultivars to Al. **Agronomy Journal** 69: 563-568.

- Maia MS (1995) **Secagem de sementes de azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) com ar em ambiente controlado**. Tese (doutorado), Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 108p.
- Matsumoto H, Hirasawa F, Torikai H et al. (1976) Localization of absorbed aluminium in peã root and its binding to nuclei acid. **Plant Cell Physiology** 17: 631-637.
- Mazzocato AC, Rocha P S G da, Sereno M J C M, Bohnen H, Grongo V, Neto J F B. (2002) Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural** 32: 1-10.
- Mendonça de R J, Cambraia J, Oliva M A e Oliveira de J A (2005) Capacidade de Cultivares de arroz de modificar o pH de soluções nutritivas na presença de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 40: 447-452.
- Mittelmann, A. (2005) O melhoramento de azevém na Embrapa. In: I Seminário Caminhos do Melhoramento de Forrageiras e dia de Campo de Melhoramento de Forrageiras. Pelotas: EMBRAPA - **Série Documentos**.80p.
- Mittelmann A, Moraes COC, Poli CHEC, Neske MZ, Brandolt T L de e Anillo L C (2004) Variabilidade entre plantas de azevém para caracteres relacionados à precocidade. **Ciência Rural** 34: 1249-1250.
- Neske MZ, Mittelmann A, Poli CHEC, Moraes COC, Gonçalves EN, Rosa CB e Silva ACHN (2002) Avaliação de diferentes populações de azevém quanto a produção de matéria seca. In: Mostra de Iniciação Científica da Universidade da Região da Campanha, 1. **Resumos**. URCAMP, Bagé.
- Oliveira PH (2002) **Herança Genética e Mapeamento Molecular da Tolerância à Toxicidade do Alumínio em Aveia (*Avena sativa* L.)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto alegre, 102p.

Paterniani MEAGZ e Furlani PR (2002) Tolerância à toxicidade de alumínio de linhagens e híbridos de milho em solução nutritiva. **Bragantia** 61: 11-16.

Rosa CB, Mittelmann A, Poli CHEC, Moraes COC, Gonçalves EN, Neske MZ e Silva ACHN (2002) Avaliação de azevém quanto à altura de planta e densidade de afilhos. In: Mostra de Iniciação Científica da Universidade da Região da Campanha, 1. **Resumos**. URCAMP, Bagé.

Ryan PR, Ditomaso JM, Kochian LV (1993) Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal Experimental Botany** 44: 437-446.

Sánchez-chacón CD, Federizzi LC, Milach SCK e Pacheco M T (2000) Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35: 1797-1808.

SAS Learning edition (2002) Getting started with the SAS. **SAS Institute Inc.**, North Carolina.

Silva JAG, Carvalho FIF, Oliveira AC, Silva AS, Marchioro VS, Lorencetti C, Benin G, Schimdt DAM e Hartwig I (2004) Trigos di-haplóides com potencial para tolerância a toxicidade ao alumínio e a sensibilidade ao ácido giberélico em cultivo hidropônico. **Revista Brasileira de Agrociência** 10: 37-41.

Silva JGA da (1996) **Estatística experimental**. Pelotas. 427p.

Smith J S C e Smith O S (1992) Fingerprinting crop varieties. **Advances in Agronomy** 47: 85-140.

Vicente FMP, Rossiello ROP e Pereira MB (1997) Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. II. Correlação canônica com produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 33: 9-15.

**Tabela 1.** Resumo da análise da variância conjunta, para o caráter comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA), de seis populações de azevém avaliadas nas doses 0; 7 e 21 mgL<sup>-1</sup> de alumínio em solução hidropônica. FAEM/UFPel, 2005/2006.

| Fonte de variação       | GL   | QM (cm)            |                     |
|-------------------------|------|--------------------|---------------------|
|                         |      | CR                 | CPA                 |
| Modelo                  | 623  | 5,28*              | 36,10*              |
| Genótipo                | 5    | 39,41*             | 3.276,68*           |
| Dose                    | 2    | 784,18*            | 469,89*             |
| Ano                     | 1    | 106,78*            | 14,21 <sup>ns</sup> |
| Genótipo x Dose         | 10   | 9,68*              | 28,39*              |
| Ano x Genótipo          | 5    | 32,94*             | 194,39*             |
| Ano x Dose              | 2    | 48,50*             | 77,74*              |
| Ano x Genótipo x Dose   | 10   | 5,77*              | 30,35*              |
| Planta (Ano x Genótipo) | 588  | 1,70 <sup>ns</sup> | 5,85 <sup>ns</sup>  |
| Erro                    | 4773 | 1,75               | 5,74                |
| Total                   | 5396 | -                  | -                   |
| Média Geral             | -    | 2,98               | 12,09               |

\* Valores significativos a 5% de probabilidade de erro pelo teste F; <sup>ns</sup> Valores não significativos a 5% de probabilidade de erro pelo teste F; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio.

**Tabela 2.** Resumo da análise da variância e comparação de médias, para o caráter comprimento de raiz e comprimento da parte aérea, de seis populações de azevém avaliadas nas doses 0; 7 e 21 mgL<sup>-1</sup> de alumínio em solução hidropônica, considerando os efeitos simples de ano, genótipo e dose. FAEM/UFPel, 2005/2006.

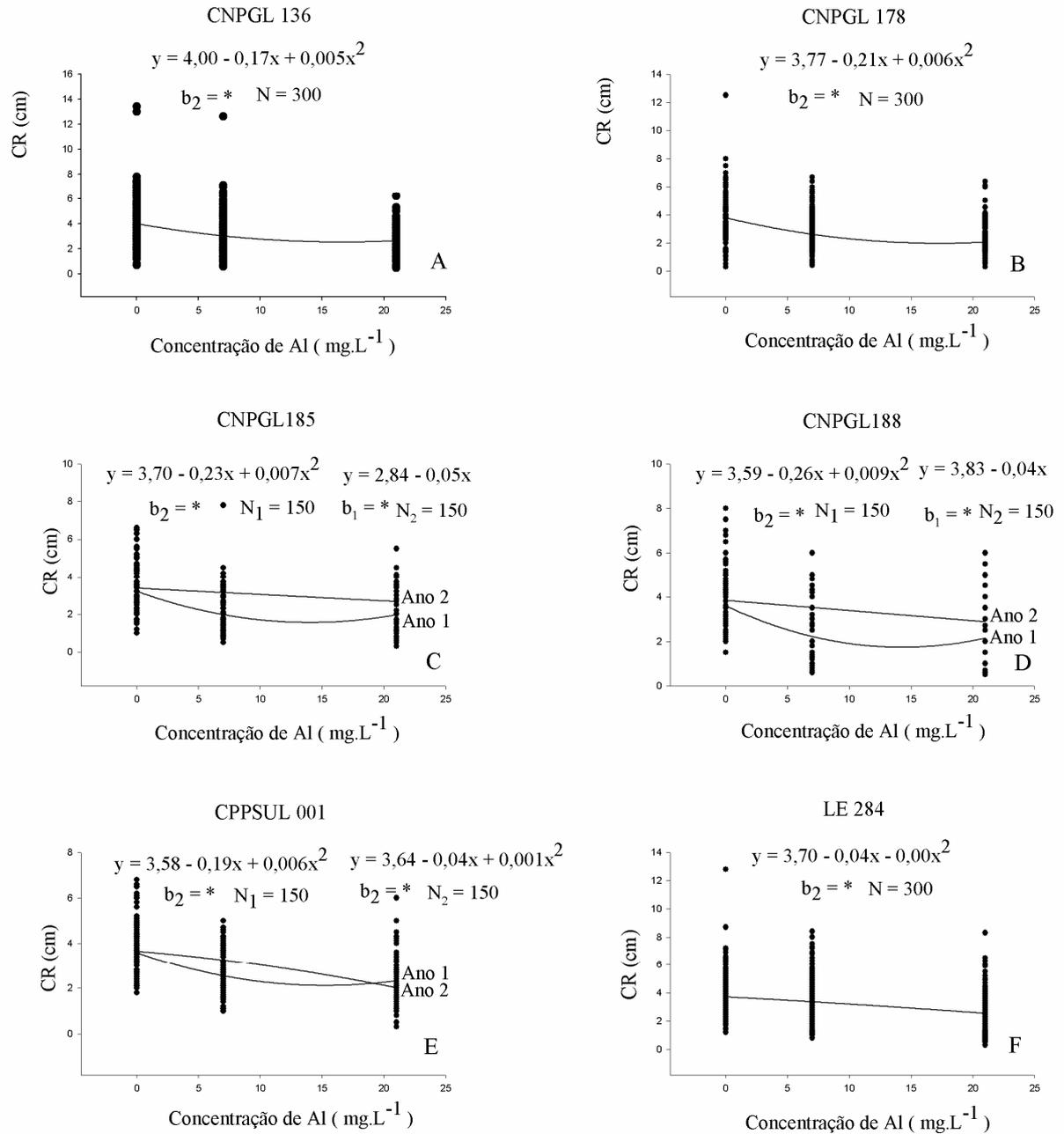
| Genótipos  | Doses<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | GL | QM (cm)             |                     | Médias (cm) |           |           |            |
|------------|--------------------------------|----|---------------------|---------------------|-------------|-----------|-----------|------------|
|            |                                |    | (2005 – 2006)       |                     | 2005        |           | 2006      |            |
|            |                                |    | CR                  | CPA                 | CR          | CPA       | CR        | CPA        |
| CNPGL 136  | 0                              | 1  | 23,13 <sup>ns</sup> | 70,08 <sup>ns</sup> | 4,28 a      | 15,14 a   | 3,72 a    | 14,17 a    |
| CNPGL 178  | 0                              | 1  | 1,52 <sup>ns</sup>  | 59,22 <sup>ns</sup> | 3,70 ab     | 10,08 b   | 3,84 a    | 10,97 b    |
| CNPGL 185  | 0                              | 1  | 2,23 <sup>ns</sup>  | 4,36 <sup>ns</sup>  | 3,20 b      | 10,37 b   | 3,37 a    | 10,62 b    |
| CNPGL 188  | 0                              | 1  | 2,88 <sup>ns</sup>  | 44,70 <sup>ns</sup> | 3,59 b      | 10,75 b   | 3,79 a    | 11,52 b    |
| CPPSUL 001 | 0                              | 1  | 0,31 <sup>ns</sup>  | 91,70 <sup>ns</sup> | 3,58 b      | 14,82 a   | 3,64 a    | 13,71 a    |
| LE 284     | 0                              | 1  | 2,34 <sup>ns</sup>  | 305,22*             | 3,61 b      | 15,17 a   | 3,79 a    | 13,15 a    |
| CNPGL 136  | 7                              | 1  | 0,93 <sup>ns</sup>  | 37,95 <sup>ns</sup> | 2,97 (ab)   | 14,20 (a) | 3,09 (b)  | 13,49 (ab) |
| CNPGL 178  | 7                              | 1  | 13,51 <sup>ns</sup> | 21,67 <sup>ns</sup> | 2,38 (c)    | 10,63 (b) | 2,81 (ab) | 10,08 (c)  |
| CNPGL 185  | 7                              | 1  | 102,08*             | 135,34*             | 1,96 (c)    | 9,16 (c)  | 3,13 (ab) | 10,50 (c)  |
| CNPGL 188  | 7                              | 1  | 137,76*             | 167,85*             | 2,21 (c)    | 10,65 (b) | 3,56 (a)  | 12,15 (b)  |
| CPPSUL 001 | 7                              | 1  | 37,03*              | 6,33 <sup>ns</sup>  | 2,54 (bc)   | 13,53 (a) | 3,24 (ab) | 13,82 (a)  |
| LE 284     | 7                              | 1  | 1,80 <sup>ns</sup>  | 13,70 <sup>ns</sup> | 3,27 (a)    | 14,27 (a) | 3,43 (ab) | 13,84 (a)  |
| CNPGL 136  | 21                             | 1  | 6,16 <sup>ns</sup>  | 14,83 <sup>ns</sup> | 2,79 a*     | 13,54 a*  | 2,50 ab*  | 13,09 ab*  |
| CNPGL 178  | 21                             | 1  | 9,68 <sup>ns</sup>  | 11,14 <sup>ns</sup> | 1,86 b*     | 9,09 bc*  | 2,22 b*   | 9,48 c*    |
| CNPGL 185  | 21                             | 1  | 36,16*              | 272,08*             | 1,96 b*     | 8,54 c*   | 2,66 a*   | 10,44 c*   |
| CNPGL 188  | 21                             | 1  | 37,45*              | 156,49*             | 2,14 b*     | 10,34 b*  | 2,85 a*   | 11,80 b*   |
| CPPSUL 001 | 21                             | 1  | 7,23 <sup>ns</sup>  | 31,78 <sup>ns</sup> | 2,32 ab*    | 12,97 a*  | 2,01 b*   | 12,32 ab*  |
| LE 284     | 21                             | 1  | 3,63 <sup>ns</sup>  | 0,28 <sup>ns</sup>  | 2,65 a*     | 13,43 a*  | 2,43 ab*  | 13,37 a*   |

\* Valores significativos a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup> Valores não significativos a 5% de probabilidade de erro pelo teste de Tukey; GL= graus de liberdade; QM= quadrado médio; CR= comprimento de raiz; CPA= comprimento da parte aérea; a, b e c = comparação de médias na dose de 0 mgL<sup>-1</sup> de Al; (a), (b) e (c) = comparação de médias na dose de 7 mgL<sup>-1</sup> de Al; a\*, b\* e c\* = comparação de médias na dose de 21 mgL<sup>-1</sup> de Al.

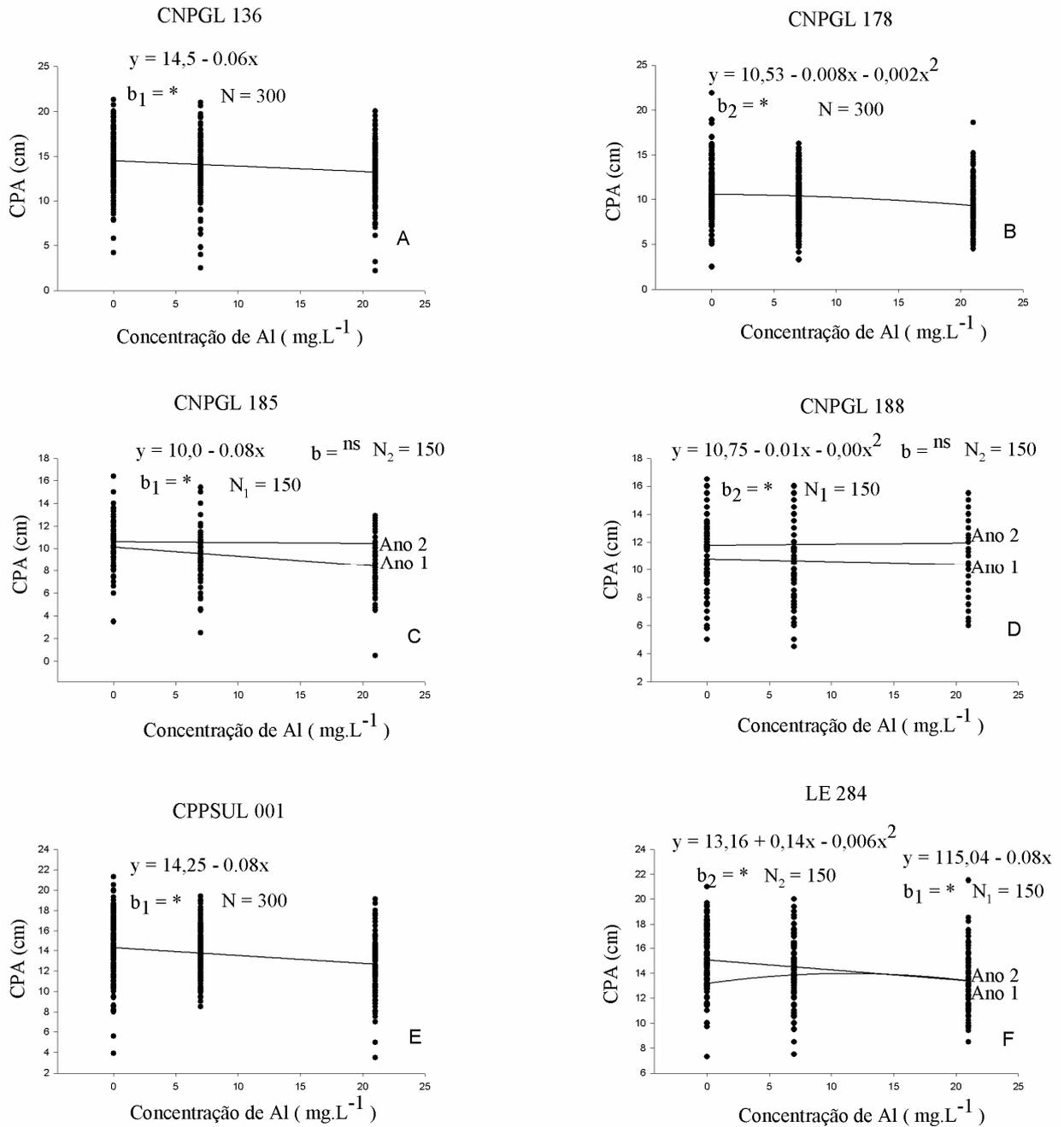
**Tabela 3.** Resultados da análise de variância da regressão para as variáveis dependentes comprimento de raiz (CR) e comprimento de parte aérea (CPA) de populações de azevém para os testes de significância dos componentes linear e quadrático da variação atribuível ao efeito de doses de  $Al^{3+}$  em solução nutritiva. FAEM/UFPel, 2005/2006.

| Genótipo   | Ano | Fonte de Variação | QM (CR)            | x = (-b/2C)<br>(mgL <sup>-1</sup> ) | QM (CPA)            | x = (-b/2C)<br>(mgL <sup>-1</sup> ) |
|------------|-----|-------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| CNPGL 136  | S/I | Linear            | 277,30*            | -                                   | 268,94*             | -                                   |
|            | S/I | Quadrática        | 17,07*             | 17,00                               | 3,74 <sup>ns</sup>  | -                                   |
| CNPGL 178  | S/I | Linear            | 448,07*            | -                                   | 232,75*             | -                                   |
|            | S/I | Quadrática        | 18,48*             | 17,05                               | 39,40*              | 2,00                                |
| CPPSUL 001 | S/I | Linear            | -                  | -                                   | 329,06*             | 1,00                                |
|            | S/I | Quadrática        | -                  | -                                   | 9,95 <sup>ns</sup>  | -                                   |
| LE 284     | S/I | Linear            | 204,52*            | -                                   | -                   | -                                   |
|            | S/I | Quadrática        | 10,81*             | 0,04                                | -                   | -                                   |
| CNPGL 185  | 1   | Linear            | 114,72*            | -                                   | 252,63*             | 1,00                                |
|            | 1   | Quadrática        | 37,97*             | 16,42                               | 8,86 <sup>ns</sup>  | -                                   |
| CNPGL 188  | 1   | Linear            | 157,83*            | -                                   | 12,10 <sup>ns</sup> | -                                   |
|            | 1   | Quadrática        | 43,38*             | 14,44                               | 1,03 <sup>ns</sup>  | -                                   |
| CPPSUL 001 | 1   | Linear            | 118,06*            | -                                   | -                   | -                                   |
|            | 1   | Quadrática        | 16,64*             | 15,80                               | -                   | -                                   |
| LE 284     | 1   | Linear            | -                  | -                                   | 277,77*             | 1,00                                |
|            | 1   | Quadrática        | -                  | -                                   | 0,08 <sup>ns</sup>  | -                                   |
| CNPGL 185  | 2   | Linear            | 37,95*             | 1,00                                | 2,21 <sup>ns</sup>  | -                                   |
|            | 2   | Quadrática        | 1,29 <sup>ns</sup> | -                                   | 0,07 <sup>ns</sup>  | -                                   |
| CNPGL 188  | 2   | Linear            | 66,27*             | 1,00                                | 5,60 <sup>ns</sup>  | -                                   |
|            | 2   | Quadrática        | 6,02 <sup>ns</sup> | -                                   | 23,74 <sup>ns</sup> | -                                   |
| CPPSUL 001 | 2   | Linear            | 199,27*            | -                                   | -                   | -                                   |
|            | 2   | Quadrática        | 17,44*             | 20,00                               | -                   | -                                   |
| LE 284     | 2   | Linear            | -                  | -                                   | 3,41 <sup>ns</sup>  | -                                   |
|            | 2   | Quadrática        | -                  | -                                   | 32,87*              | 11,66                               |

Significativo a 5% de probabilidade de erro teste de Tukey (QM<sub>CR</sub> e QM<sub>CPA</sub>); QM<sub>CR</sub>= Quadrado médio do comprimento de raiz (cm), QM<sub>CPA</sub>= Quadrado médio do comprimento da parte aérea; S/I= sem interação com ano; x = (-b/2C) (mgL<sup>-1</sup>) = dose ideal de Al<sup>3+</sup>.



**Figura 1.** Regressões ajustadas para a variável dependente crescimento de raiz (CR) das populações CNPGL 136, CNPGL 178, CNPGL 185, CNPGL 188, CPPSUL 001, LE 284, avaliadas nos anos de 2005 e 2006, nas concentrações de 0; 7 e 21  $\text{mg.L}^{-1}$  de  $\text{Al}^{3+}$  na solução. FAEM/UFPel.



**Figura 2.** Regressões ajustadas para a variável dependente comprimento da parte aérea (CPA) das populações CNPGL 136, CNPGL 178, CNPGL 185, CNPGL 188, CPPSUL 001, LE 284, avaliadas nos anos de 2005 e 2006, nas concentrações de 0; 7 e 21 mgL<sup>-1</sup> de Al<sup>3+</sup> na solução. FAEM/UFPel.

### 3. Otimização do tamanho de *bulks* de DNA para análise da diversidade genética em populações de azevém anual com base em marcadores AFLP

#### Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (Submetido)

##### Resumo

Duas populações de azevém (*Lolium multiflorum*) coletadas no Rio Grande do Sul foram caracterizadas com marcadores AFLP com o objetivo de avaliar o impacto do uso de *bulks* de DNA na caracterização molecular de populações de azevém e de definir o tamanho de *bulk* mais apropriado para estimar a diversidade genética entre populações de azevém. Foram avaliados 30 indivíduos de cada população e os respectivos tamanhos de *bulks*: seis *bulks* constituídos por 5 indivíduos cada; três *bulks* de 10 indivíduos; dois *bulks* de 15 indivíduos, um *bulk* de 20 indivíduos e um *bulk* de 30 indivíduos. Seis combinações de *primers* AFLP foram empregadas: (E-AAC / M-CTT); (E-ACA / M-CAG); (E-AAC / M-CAT); (E-AGG / M-CAT); (E-AGC / M-CAT) e (E-ACG / M-CAT). No total foi possível detectar 321 fragmentos polimórficos quando analisados individualmente 30 genótipos de cada população. Todos os tamanhos e número de *bulks* avaliados foram eficientes em discriminar as duas populações analisadas. Entretanto, considerando a rapidez, custo e poder discriminatório, o *bulk* formado por 20 indivíduos foi o mais apropriado, quando comparado com os demais tamanhos de *bulk*, para estimar a divergência genética entre populações de azevém. Foi evidenciado que embora ocorra uma perda dos alelos que estão presentes em baixa frequência nas populações, a avaliação de

*bulks* acarreta na redução de amostras a serem processadas, permitindo que um grande número de populações sejam caracterizadas sem perder a identidade de cada população.

**Termos para indexação:** *Lolium multiflorum*, marcador molecular, caracterização, germoplasma.

### **Optimization of bulked DNA samples for genetic diversity analysis of Italian ryegrass populations based on AFLP markers**

#### **Abstract**

Two Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) populations collected in Southern Brazil were characterized with AFLP markers aiming to assess the impact of DNA bulks in the molecular characterization of Italian ryegrass populations, and to establish the optimum bulk size to estimate genetic diversity among ryegrass populations. From each population were characterized 30 individuals and the respective bulk samples size: six bulks of 5 individuals each; three bulks of 10 individuals; two bulks of 15 individuals; one bulk of 20 individuals and one bulk of 30 individuals. Six AFLP primer combinations were employed. All numbers and sizes of bulks evaluated were able to discriminate the two populations characterized. However, considering time, cost and discriminatory power, the bulk of 20 individuals is more indicated to be employed in genetic diversity analysis studies among Italian ryegrass populations. Although alleles that occur in low frequency in the populations are lost when bulks were analyzed, the evaluation of bulks, instead of individual

genotypes, results in a reduction of samples to be processed which allows that a larger number of populations can be analyzed without loose its identity.

**Index terms:** *Lolium multiflorum*, molecular markers, characterization, germoplasm.

### **Introdução**

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma das espécies forrageiras alógamas ( $2n = 2x = 14$ ) de clima temperado mais difundidas no mundo (Camlin, 1997). A estrutura genética das populações de azevém é similar a de outros organismos de fecundação cruzada, em que cada indivíduo é altamente heterozigoto e apresenta uma grande variabilidade potencial como já pode ser constatado por alguns autores como Castro et al., 2003 e Vieira et al., 2004. Segundo Auler *et al* (2002), o conhecimento do nível de variabilidade e da estrutura genética das populações é crucial para a definição das estratégias de melhoramento e conservação a serem empregadas.

O marcador molecular baseado no polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) tem sido bastante utilizado atualmente em estudos de diversidade genética, isso se deve principalmente à capacidade deste marcador em acessar a variabilidade em nível de DNA (Vos et al., 1995). Spooner *et al* (2005), destacam na técnica algumas vantagens como: detecção de grande número de fragmentos por reação, com ampla cobertura do genoma e considerável reprodutibilidade.

Para conservar e manejar de forma adequada os recursos genéticos existentes é indispensável conhecer a diversidade genética presente nas populações. No entanto, a análise detalhada da diversidade do germoplama de uma

espécie requer a avaliação de um grande número de acessos, em especial quando trabalhamos com espécies de fecundação cruzada, com estrutura genética heterogênea. Neste caso, o estudo da variabilidade genética pode ser feito por meio de amostras compostas (*bulks*), que são constituídas pela combinação de várias plantas individuais de uma mesma população em uma única amostra, um *bulk* de DNA. Esta técnica reduz drasticamente o número de amostras processadas preservando os alelos mais freqüentes de cada população. Entretanto, pode-se esperar que pequenas diferenças entre freqüências gênicas de duas populações analisadas não sejam detectadas em amostras compostas por *bulks*, contudo, mesmo com esta limitação, o uso de amostras em *bulks* tem sido útil na identificação de divergência genética (Michelmore et al., 1991).

Embora a análise de AFLP em *bulks* seja freqüentemente utilizada em estudos de variabilidade genética em espécies alógamas como *Lolium perenne* (Roldán-Ruiz et al., 2001), *Daucus carota* (Bradeen et al., 2002) e *Trifolium pratense* (Hermann et al., 2005), há poucas evidências de como este método influencia as estimativas de variabilidade das populações (Hermann et al., 2005). Kölliker et al. (2001), constataram a eficiência do método em *Trifolium repens*. Entretanto, são limitadas as informações a respeito do impacto do uso de *bulks* em estimativas de variabilidade genética usando a técnica de AFLP em azevém anual. Portanto, este estudo tem como objetivos: (i) avaliar o impacto do uso de *bulks* de DNA em análise de AFLP em populações de azevém, e (ii) estimar o tamanho de *bulk* mais apropriado para analisar a diversidade genética existente nas populações.

## **Material e métodos**

### *Extração do DNA genômico*

O material biológico consistiu de duas populações de azevém do banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado, CNPGL 136, coletado em Pelotas, RS e CNPGL 188, de Coqueiros do Sul, RS. As sementes foram semeadas diretamente, em vasos plásticos com capacidade de 1 Kg e mantidas em casa de vegetação. O DNA foi extraído individualmente de 30 indivíduos de cada população, a partir de 0,4 g de tecido vegetal jovem e fresco, utilizando o tampão CTAB, conforme técnica descrita por Saghai-Marroof (1984) com pequenas modificações, adaptando o protocolo a quantidade menor de tecido, permitindo a obtenção menor volume de DNA, suficiente para a realização da técnica. O precipitado DNA/RNA foi ressuspenso em tampão Tris-EDTA, pH 8,0 e quantificado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. Através da intensidade da banda foi estimada a quantidade de DNA em ng/ $\mu$ l, por comparação com o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA).

O DNA quantificado foi padronizado em uma concentração de 50 ng/ $\mu$ l, a partir desta concentração foram constituídas as amostras em *bulks*, através da mistura de alíquotas de 5 $\mu$ l (250 ng de DNA) de cada um dos 30 indivíduos, de acordo com o tamanho de cada *bulk*.

De cada população foram constituídos seis *bulks* de 5 indivíduos; três *bulks* de 10 indivíduos; dois *bulks* de 15 indivíduos, um *bulk* de 20 plantas e um *bulk* de 30.

#### *Análise de AFLP*

A análise de AFLP foi realizada segundo protocolo descrito por Vos *et al* (1995), com algumas modificações. Foram utilizados reagentes do Kit AFLP<sup>®</sup> Analysis System I (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA). O DNA genômico (amostras individuais e em *bulks*) na concentração de 100ng, foi digerido com 1 U de cada enzima de restrição *EcoRI* / *MseI* em tampão 5x [Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM, Acetato Mg 10 mM, Acetato K 50 mM] e H<sub>2</sub>O MilliQ<sup>®</sup> suficiente para completar o volume final de reação de 10µl, por 12h a 37°C e 15 min. a 70°C.

A reação de ligação de adaptadores foi realizada logo após a digestão com a adição da solução de ligação de adaptadores e 0,4 U de T4 DNA ligase em um volume final de 10µl, por 2h a 20°C. Após a ligação de adaptadores foi realizada uma diluição de 1:5 em H<sub>2</sub>O MilliQ<sup>®</sup>.

As amostras foram pré-amplificadas a partir de 1µl da solução de *adapters* diluída (1:5), 10X PCR buffer com Mg Plus [Tris-HCl (pH 7.6) 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM], BSA 0,003% e 1 U de *Taq* DNA polymerase (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA), completando com mix de pré-amplificação até alcançar o volume final de 11µl. A desnaturação inicial foi a 94°C por 30 s, seguida por 56°C por 60 s e 72°C por 60 s completando um total de 20 ciclos. Após a pré-amplificação foi realizada uma diluição de 1:25 em H<sub>2</sub>O MilliQ<sup>®</sup>, antes de ser procedida a amplificação seletiva.

A amplificação seletiva foi realizada utilizando 2,5 µl da solução de DNA pré-amplificado (diluído 1:25), 10X PCR buffer com Mg Plus [Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM], BSA (0,003%) e 1 U de *Taq* DNA polymerase (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA), *EcoRI* (10 ng), *MseI* (1,5 ng), 0,4mM de DNTs e H<sub>2</sub>O MilliQ<sup>®</sup> até completar o volume final de 10µl. Foram empregadas seis combinações de *primers*: *EcoRI* / *MseI* (E-AAC / M-CTT); (E-ACA / M-CAG); (E-AAC / M-CAT); (E-AGG / M-CAT); (E-AGC / M-CAT) e (E-ACG / M-CAT). A reação teve início a uma temperatura de 94°C por 60 s, 65°C por 60 s, (reduzindo a temperatura em 0,7°C após cada ciclo, num total de 11 ciclos) e 72°C por 1:30 min, após retorna a 94°C por 30 s, 56°C por 30 s e 72°C por 60 s, por mais 23 ciclos.

Todas as reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ao produto da amplificação final (10µl) foram adicionados 4µl da solução tampão de carregamento (formamida deionizada 99%, EDTA 10 mM, 0,025% de xileno-ciano e 0,025% de azul de bromofenol) e procedida a desnaturação das amostras a 94°C por 5min. Foram aplicados 4,0 µl desta solução em gel de seqüenciamento (poliacrilamida 6% p/v, uréia 7 M). Os fragmentos foram separados em gel de acrilamida a 6% em uma corrida a 60w durante 2:30h. Os fragmentos amplificados foram visualizados após coloração do gel com nitrato de prata seguindo protocolo descrito por Creste *et al* (2001). O tamanho dos alelos foi estimado em comparação com o marcador de peso molecular de DNA de 10 Pb (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA).

#### *Análise de dados*

Os marcadores AFLP foram identificados por presença (1) e ausência (0). Com base na leitura dos géis foi construída uma matriz binária. A similaridade genética entre as populações com base nas amostras individuais e dos *bulks*, foi estimada, utilizando o coeficiente de Jaccard através da fórmula:  $S_{ij} = a / (a + b + c)$ , onde, “ $S_{ij}$ ” é a similaridade entre os pares de genótipos  $i$  e  $j$ , “ $a$ ” é o número de fragmentos presentes em comum entre  $i$  e  $j$ , “ $b$ ” é o número de fragmentos presentes em  $i$  e ausentes em  $j$  e “ $c$ ” o número de fragmentos presentes em  $j$  e ausentes em  $i$ . Com base nos coeficientes de similaridade foram construídos os dendrogramas adotando-se como critério de agrupamento o método de UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages). Foi estimado o coeficiente de correlação cofenética entre a matriz de similaridade e o dendrograma. As análises foram realizadas com o auxílio do programa NTSYS-pc (versão 2.01; Rohlf, 2001).

## Resultados e discussão

Na caracterização de 29 indivíduos da população A (uma amostra da população A foi descartada por não apresentar amplificação em nenhuma das análises realizadas), e 30 indivíduos da população B, portanto, com um total de 59 indivíduos avaliados foi possível detectar em média 50 fragmentos polimórficos entre 330 Pb e 80 Pb, em cada uma das seis combinações de *primers* empregadas (Figura 1). Com as seis combinações de *primers* foi possível visualizar um total de 321 fragmentos polimórficos, sendo destes 310 comuns às duas populações, o que evidencia a grande variabilidade existente dentro das populações e demonstra o alto poder de detecção de polimorfismo apresentado pela técnica AFLP em azevém.

Considerando as combinações de *primers* separadamente é possível constatar que, de modo geral, todas geraram entre 44 e 67 fragmentos polimórficos por reação, considerando as amostras individuais das duas populações avaliadas (Tabelas 1 e 2). Tanto na população A quanto na B, a combinação de *primers* E-AAC / M-CTT foi a que apresentou o maior número de fragmentos amplificados e a combinação E-ACG / M-CAT foi a que apresentou o menor número de fragmentos polimórficos em ambas as populações (Tabelas 1 e 2).

De acordo com o conjunto de dados obtidos com as seis combinações de *primers* empregadas neste estudo, analisando separadamente o comportamento de cada população, é possível constatar que na população A (CNPGL 188), do total de fragmentos amplificados nas amostras individuais dos 29 indivíduos avaliados, 67,1 % destes fragmentos foram detectados através da análise dos seis *bulks* de 5 indivíduos, 70,6 % nos três *bulks* de 10 indivíduos cada, 63,5 % nos dois *bulks* de 15 indivíduos, e 59,3 e 57,4 % respectivamente nos *bulks* de 20 e 29 indivíduos (Tabela 1).

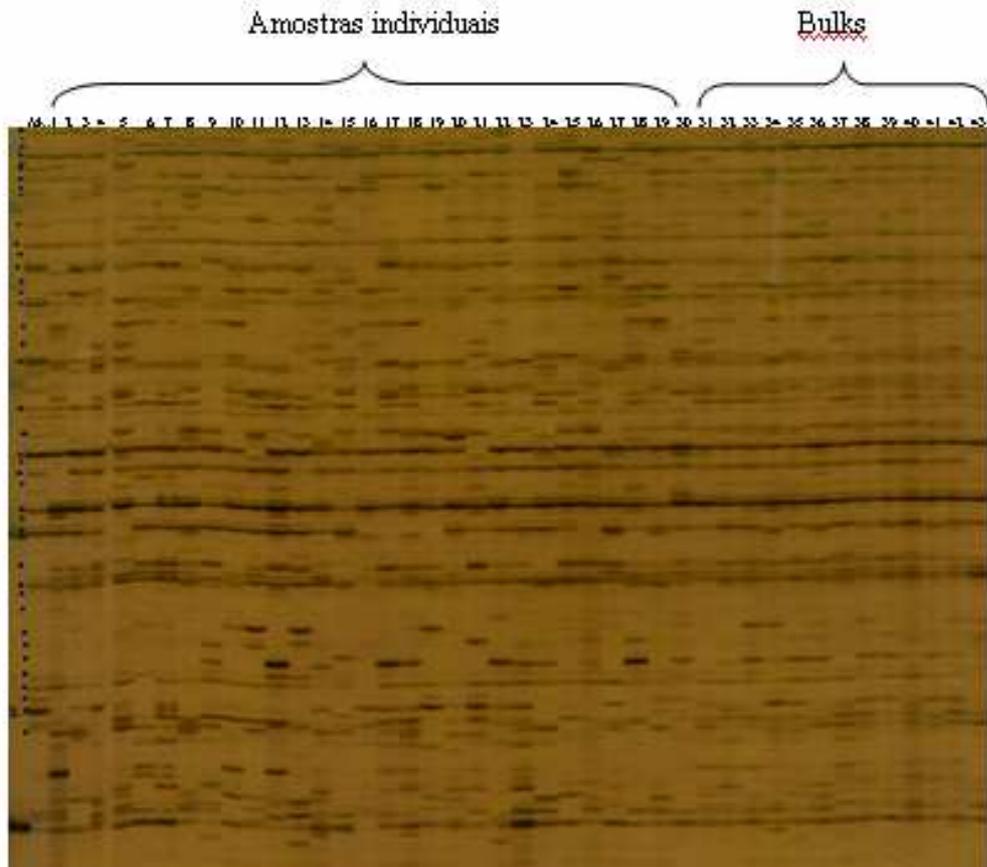


Figura 1. Exemplo de fragmentos padrões de amostras individuais (colunas 1-30) e amostras em *bulks* de 5 indivíduos (colunas 31- 36); de 10 indivíduos (colunas 37-39); de 15 indivíduos (colunas 40-41); de 20 indivíduos (coluna 42) e de 30 indivíduos (coluna 43), da população CNPGL 136 de *Lolium multiflorum*, visualizados em gel de poliacrilamida 6%.

Na população B (CNPGL 136), 81,6 % dos fragmentos encontrados nas amostras individuais também estavam presentes nos seis *bulks* de 5 indivíduos, 83,8 % nos três *bulks* de 10 indivíduos, 77,2% nos dois *bulks* de 15 indivíduos, 68,8 % no *bulk* de 20 e 68,2 % no *bulk* de 30 indivíduos (Tabela 2).

Conforme os dados obtidos com as seis combinações de *primers* nas duas populações avaliadas, pode-se verificar que entre as amostras em *bulks* os seis *bulks* de cinco e os três *bulks* de dez indivíduos foram os que apresentaram a menor perda de fragmentos amplificados quando comparados com as amostras individuais. Ocorre uma redução na percentagem de fragmentos amplificados utilizando quando

são analisados dois *bulks* de 15 indivíduos, o *bulk* de 20 e o de 30 indivíduos (Tabelas 1 e 2).

Os fragmentos que não apareceram nas amostras em *bulk* eram também os que apareciam em menor frequência nas respectivas amostras individuais. Kölliker et al. (2001) já haviam constatado este mesmo comportamento em *Trifolium repens*.

O agrupamento dos 30 indivíduos de cada população mostrou alta variabilidade intrapopulacional com aproximadamente 30 % de similaridade dentro da população A e 25 % na população B. Os 321 marcadores AFLP discriminaram as duas populações em estudo, permitindo separá-las completamente em dois grandes grupos isolados, com coeficiente de similaridade de 0,27 entre as populações (Figura 2). Esses resultados condizem com os obtidos utilizando marcadores RAPD em *Lolium multiflorum*, onde os autores evidenciaram a existência de grande variabilidade genética entre populações de azevém, mas principalmente verificaram que a maior variabilidade era encontrada dentro dessas populações (Castro et al, 2003).

Em nenhuma das populações avaliadas foram encontrados indivíduos idênticos, o que é perfeitamente compreensível por se tratar de uma espécie alógama, uma vez que cada indivíduo é altamente heterozigoto (Figura 2).

Em espécies de fecundação cruzada, a variabilidade intra-populacional é comumente maior que a inter-populacional, como em *Medicago sativa* (Yu & Pauls, 1993; Crochemore et al., 1996), *Lolium perenne* (Sweeney & Dannenberg, 1994), *Trifolium pratense* (Kongkiatngam et al., 1995) e até mesmo em *Lolium multiflorum* (Castro et al., 2003 e Vieira et al., 2004). Mas, além disso, como podemos observar neste trabalho, também foi possível detectar variabilidade suficiente entre as populações, de modo a diferenciá-las entre si (Figura 2).

Todos os tamanhos de *bulks* avaliados, com base nas seis combinações de *primers* AFLP empregados, foram eficientes em discriminar as duas populações estudadas. Através da avaliação de seis *bulks* constituídos por 5 indivíduos cada, foi possível fazer a separação das duas populações em grupos distintos com coeficiente de similaridade de 0,42 (Figura 3).

Com a avaliação de três *bulks* constituídos por 10 indivíduos cada, foi possível discriminar as duas populações com similaridade 0,59 (Figura 4). Da mesma forma, a avaliação de dois *bulks* de 15 indivíduos cada também separou as populações com de similaridade de 0,59 (Figura 5).

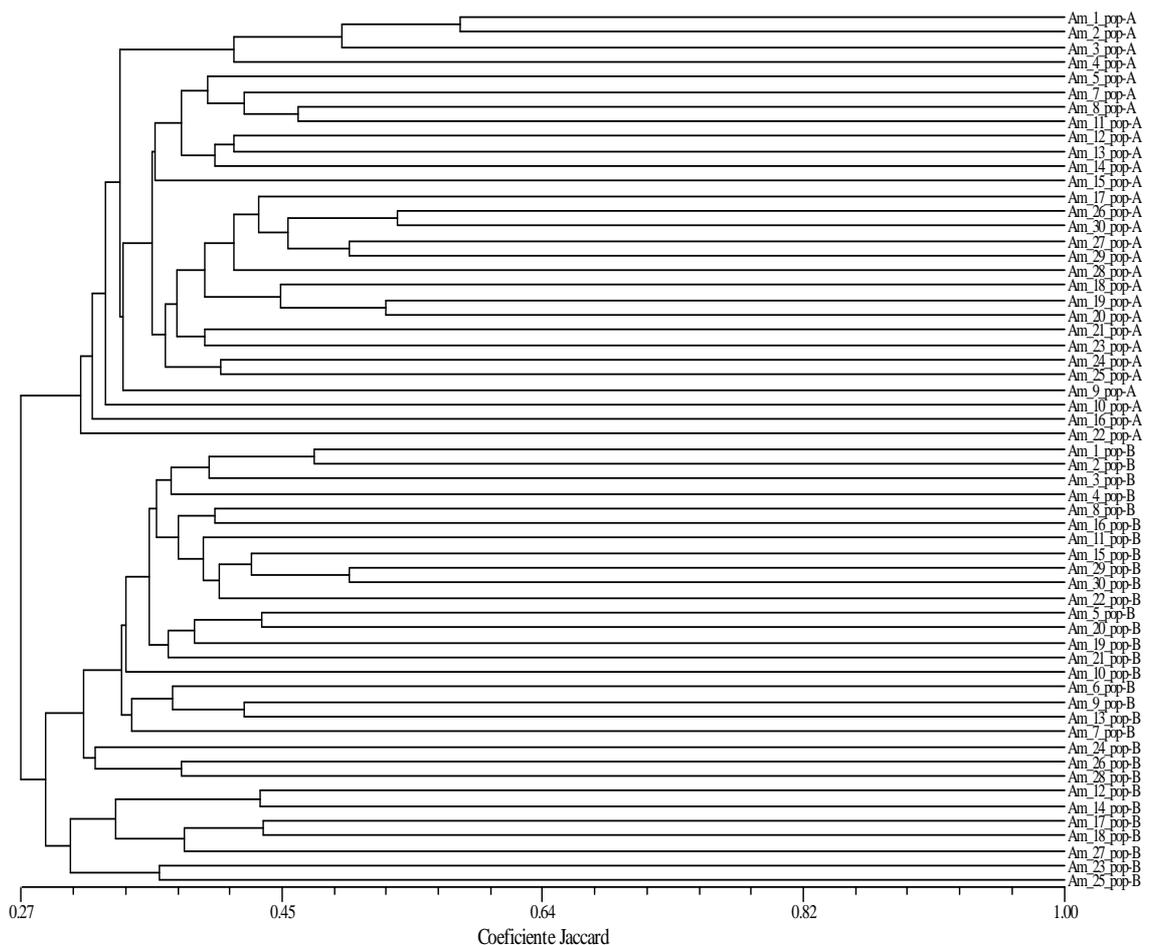


Figura 2. Análise de agrupamento de 59 indivíduos (amostras individuais) que compõem as populações A (CNPGL 188) com 29 indivíduos e B (CNPGL 136) com 30 indivíduos, por meio da matriz de similaridade calculada com base no coeficiente de jaccard, utilizando o método UPGMA. O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) é 0,75.

Os *bulks* de 20 e 30 indivíduos discriminaram as duas populações com coeficientes de similaridade entre as populações de 0,58 e 0,55 respectivamente (Figuras 6 e 7). Considerando a rapidez, custo e poder discriminatório, o *bulk* formado por 20 indivíduos foi o mais apropriado, quando comparado com os demais tamanhos de *bulk*.

A divergência entre as populações avaliadas oscilou de acordo com o número e o tamanho dos *bulks*. Os seis *bulks* de 5 indivíduos discriminaram as populações com divergência de 58%, enquanto que nos demais tamanhos de *bulks* a divergência média foi de 42,2%, com amplitude de 41- 45% (Figuras 3, 4, 5, 6, e 7).

Kölliker et al (2001), em estudos de diversidade genética utilizando um *bulk* de 20 plantas individuais conseguiu discriminar cultivares de *Trifolium repens* e detectou que aproximadamente 90% dos fragmentos amplificados nas amostras individuais também estavam presentes nas amostras em *bulks*. Este autor, assim como Guthrige et al (2001) em estudos com *Lolium perenne*, e Hermann et al (2005) com *Trifolium pratense*, verificaram a eficiência da utilização de *bulks* compostos de 20 plantas individuais na exploração de diversidade genética entre populações.

Gilbert et al (1999) evidenciou o risco de perda de identificação de alelos quando se avalia *bulks* formados de cinco plantas. Neste trabalho os *bulks* constituídos por mais de 10 indivíduos resultaram na perda de identificação de alelos raros. Entretanto, a caracterização utilizando um *bulk* composto por 20 indivíduos pode ser considerada a mais eficiente em termos de rapidez e redução de custos de análises com o objetivo de discriminar populações de azevém anual. A análise de *bulks* de 20 indivíduos apresentou em média 64 % dos fragmentos amplificados nas amostras individuais, não diferindo dos *bulks* de 30 indivíduos.

Portanto, é importante salientar que a análise em *bulks* subestima a diversidade genética real existente entre as populações. Por outro lado, quando o objetivo é caracterizar um grande número de populações, o uso de *bulks* de DNA é extremamente importante, uma vez que reduz o número de amostras a serem processadas.

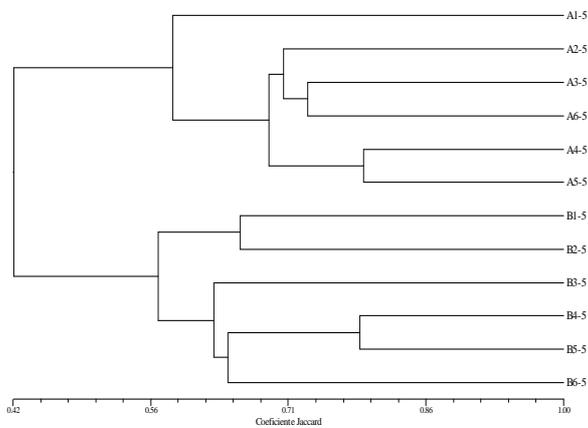


Figura 3. Análise de agrupamento dos seis *bulks* de 5 indivíduos cada, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) é 0,95.

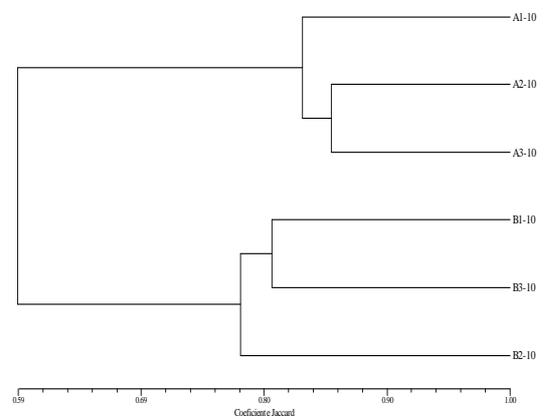


Figura 4. Análise de agrupamento dos três *bulks* de 10 indivíduos cada, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) é 0,98.

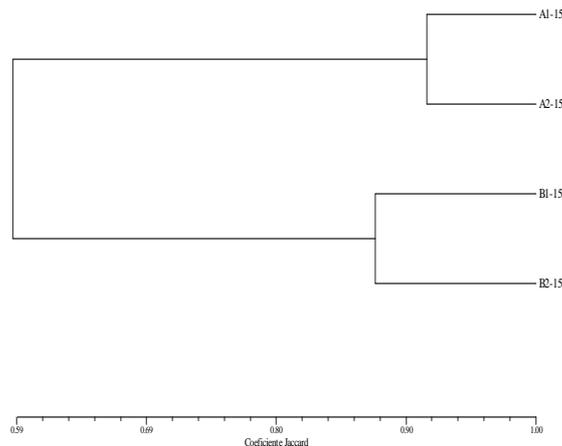


Figura 5. Análise de agrupamento dos dois *bulks* de 15 indivíduos cada, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) é 0,99.

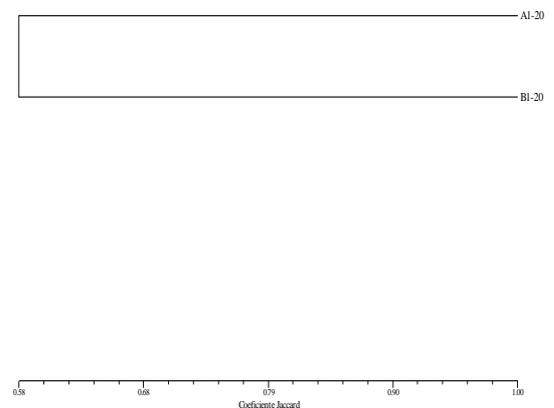


Figura 6. Análise de agrupamento do *bulk* de 20 indivíduos, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) é 1.

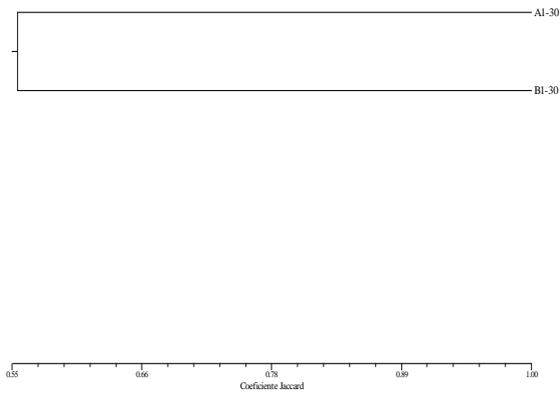


Figura 7. Análise de agrupamento do *bulk* de 30 indivíduos, nas populações A (CNPGL 188) e B (CNPGL 136), por meio da matriz de similaridade calculada utilizando os marcadores AFLP, utilizando o método UPGMA. O coeficiente de correlação cofenética ( $r$ ) é 1.

### Referências bibliográficas

- AULER, N.M.F.; REIS, M.S., GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.329-338, 2002.
- BACHMANN, K. Molecular markers in plant ecology. **New Phytol**, 126: 403-418.1994.
- BRADEEN, J. M.; BACH, I. C.; BRIARD, M.; LE CLERC, V.; GRZEBELUS, D.; SENALIK, D. A., SIMON, P. W. Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota* L.) and wild daucus populations reveals a genetically nonstructured composition **Journal of the American Society for Horticultural Science**, vol. 127, n°3, p. 383-391.2002.
- STAUB, J.E., F. C. SERQUEN & M. GUPTA. Genetic markers, map construction, and their application in plantbreeding. **Hortscience**, 31: 729-741. 996.
- CAMLIN, M.S. Achievements and prospects; grasses. In Weddell J.R. (ed), Proceedings of British Grassland Occasional Symposium No. 3: 'Seeds of Progress', Nottingham, UK, **Plant Breeding**. 14p. 1997.
- CASTRO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; MAIA, M.S.; MATTOS, L.A. FREITAS, F. Morphological and molecular characterization of italian rygrass populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, n.4, p.245-254.2003.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 299-306. 2001.

CROCHEMORE, M. L.; HUYGHE, C.; KERLAN, M. C.; DURAND, F., JULIER, B. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. **Agronomie**, Paris, v.16, p. 421-432, 1996 .

GILBERT, J. E.; LEWIS, R. V.; M.J. WILKINSON & P.D.S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collection. *Theor Appl Genet*, 98, 1125-1131. 1999.

HERRMANN, D.; BOLLER, B.; WIDMER, F., KÖLLIKER, R. Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. **Genome**, 48, 474–486. 2005.

HONGTRAKUL, V.; HUESTIS, G.M.; KNAPP, S.J. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. **Theor. Appl. Genet**, 95. 407p. 1997.

MICHELMORE, R. W., PARAN, I., AND KESSELI, R.V. Identification of Markers Linked to Disease-Resistance Genes by Bulk Segregant Analysis: A Rapid Method to Detect Markers in Specific Genomic Regions by Using Segregating Populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**88: 9828 - 9832. 1991.

MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: Milach, S. C. K. (ed). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio grande do Sul, 1998. 28p.

KÖLLINER, R.; JONES, E.S.; JAHUFER, M.Z.Z.& FORSTER,J.W. Bulk AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover(*Trifolium repens* L.). **Euphytica**, 21:305-315. 2001.

KONGKIATNGAM, P.; WATERWAY, M. J.; FORTIN, M. G & COULMAN,B.E. Genetic variation within and between cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparison of morphological, isozyme and RAPD markers.**Euphytica**, 84: 237-246.

- ROHLF, J. NTSYS-pc. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version. 2.1. New York: Exeter, 2001. Software.
- ROLDÁN-RUIZ,I.; EEUWIJK van, F.A.; GILLILAND, T.J.; DUBREUIL, P.; DILLMANN, C.; LALLEMAND, J.; LOOSE de, M.; BARIL, C.P. Comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. **Theor Appl Genet**, 103. 1150p. 2001.
- SPOONER, D., van TREUREN, R. and VICENTE de, M.C. **Molecular markers for genebank management**. IPGRI Technical Bulletin No.10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 2005. 126p.
- STAUB, J.E., F. C. SERQUEN & M. GUPTA. Genetic markers, map construction, and their application in plantbreeding. **Hortscience**, 31: 729-741. 1996.
- SWEENEY, P. M.; DANNERBERGER, T. K. Random Amplified Polymorphic DNA in Perennial Ryegrass: A comparison of Bulk Sample vs. Individuals. **Hortscience**, v. 29, n.6, p. 624-626. 1994.
- VIEIRA, E. A.; CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, A. C. de.; CARVALHO, F. I. F. de.; ZIMMER, P. D., MARTINS, L. F. Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by RAPD. **Sci. Agric**.v. 61, n.4, p. 407-413. 2004.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, n.21, p.4.407-4.414. 1995.

**Tabela 1** – Fragmentos AFLP obtidos, nas amostras individuais de DNA genômico e nas amostras em *bulks* e porcentagem de fragmentos amplificados, considerando as amostras individuais e os conjuntos de amostras em *bulks*. População CNPGL 188.

| População A CNPGL 188 ( <i>Lolium multiflorum</i> ) |  |             |               |             |               |             |               |             |               |             |               |             |            |             |
|---|--|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|------------|-------------|
| Amostras  | Número de fragmentos polimórficos (AFLP) obtidos com cada combinação de <i>primers</i> |             |               |             |               |             |               |             |               |             |               |             |            |             |
|   | E-AAC / M-CTT  | %           | E-ACA / M-CAG | %           | E-AAC / M-CAT | %           | E-AGG / M-CAT | %           | E-AGC / M-CAT | %           | E-ACG / M-CAT | %           | Total      | %           |
| Amostras individuais                                | 58   | <b>100</b>  | 58            | <b>100</b>  | 55            | <b>100</b>  | 51            | <b>100</b>  | 44            | <b>100</b>  | 44            | <b>100</b>  | <b>310</b> | <b>100</b>  |
| 6 <i>Bulks</i> de 5                                 | 28   | <b>48,3</b> | 36            | <b>62,1</b> | 38            | <b>69,0</b> | 38            | <b>75,0</b> | 30            | <b>68,2</b> | 38            | <b>86,4</b> | <b>208</b> | <b>67,1</b> |
| 3 <i>Bulks</i> de 10                                | 33   | <b>57,0</b> | 41            | <b>70,6</b> | 36            | <b>65,4</b> | 44            | <b>86,3</b> | 28            | <b>64,0</b> | 37            | <b>84,1</b> | <b>219</b> | <b>70,6</b> |
| 2 <i>Bulks</i> de 15                                | 27   | <b>47,0</b> | 36            | <b>62,1</b> | 30            | <b>55,0</b> | 38            | <b>75,0</b> | 31            | <b>70,4</b> | 35            | <b>80,0</b> | <b>197</b> | <b>63,5</b> |
| 1 <i>Bulk</i> de 20                                 | 25   | <b>43,1</b> | 33            | <b>57,0</b> | 28            | <b>51,0</b> | 36            | <b>71,0</b> | 27            | <b>61,4</b> | 35            | <b>80,0</b> | <b>187</b> | <b>59,3</b> |
| 1 <i>Bulk</i> de 30                                 | 24   | <b>41,4</b> | 33            | <b>57,0</b> | 28            | <b>51,0</b> | 35            | <b>69,0</b> | 26            | <b>59,1</b> | 33            | <b>75,0</b> | <b>178</b> | <b>57,4</b> |

Amostras individuais = total de 30 amostras individuais de DNA genômico; *Bulks* 5 = total de seis conjuntos formados pelas amostras individuais de 1 a 5, 6 a 10, 11 a 15, 16 a 20, 21 a 25 e 26 a 30; *Bulks* 10 = total de três conjuntos formados pelas amostras individuais de 1 a 10, 11 a 20 e 21 a 30; *Bulks* 15 = total de dois conjuntos formados pelas amostras individuais de 1 a 15 e 16 a 30; *Bulks* 20 = Total de um conjunto formado pelas amostras individuais de 1 a 20; *Bulks* 30 = total de um conjunto formado pelas amostras individuais de 1 a 30.

**Tabela 2** – Fragmentos AFLP obtidos, nas amostras individuais de DNA genômico e nas amostras em *bulks* e porcentagem de ragmentos amplificados, considerando as amostras individuais e os conjuntos de amostras em *bulks*. População CNPGL, 136.

| População B CNPGL 136 ( <i>Lolium multiflorum</i> ) |  |      |               |      |               |      |               |      |               |      |               |      |       |      |
|---|--|------|---------------|------|---------------|------|---------------|------|---------------|------|---------------|------|-------|------|
| Amostras  | Número de fragmentos polimórficos (AFLP) obtidos com cada combinação de <i>primers</i> |      |               |      |               |      |               |      |               |      |               |      |       |      |
|   | E-AAC / M-CTT  | %    | E-ACA / M-CAG | %    | E-AAC / M-CAT | %    | E-AGG / M-CAT | %    | E-AGC / M-CAT | %    | E-ACG / M-CAT | %    | Total | %    |
| Amostras individuais                                | 67   | 100  | 54            | 100  | 58            | 100  | 51            | 100  | 47            | 100  | 44            | 100  | 321   | 100  |
| 6 <i>Bulks</i> de 5                                 | 50   | 74,6 | 46            | 85,2 | 47            | 81,0 | 44            | 86,3 | 33            | 70,2 | 42            | 95,4 | 262   | 81,6 |
| 3 <i>Bulks</i> de 10                                | 52   | 77,6 | 49            | 90,7 | 53            | 91,4 | 41            | 80,4 | 32            | 68,0 | 42            | 95,4 | 269   | 83,8 |
| 2 <i>Bulks</i> de 15                                | 46   | 68,7 | 46            | 85,2 | 51            | 88,0 | 36            | 71,0 | 29            | 61,7 | 40            | 91,0 | 248   | 77,2 |
| 1 <i>Bulk</i> de 20                                 | 34   | 50,7 | 43            | 79,6 | 44            | 76,0 | 36            | 71,0 | 23            | 49,0 | 41            | 93,2 | 221   | 68,8 |
| 1 <i>Bulk</i> de 30                                 | 33   | 49,3 | 42            | 77,7 | 44            | 76,0 | 36            | 71,0 | 23            | 49,0 | 41            | 93,2 | 219   | 68,2 |

Amostras individuais = total de 30 amostras individuais de DNA genômico; *Bulks* 5 = total de seis conjuntos formados pelas amostras individuais de 1 a 5, 6 a 10, 11 a 15, 16 a 20, 21 a 25 e 26 a 30; *Bulks* 10 = total de três conjuntos formados pelas amostras individuais de 1 a 10, 11 a 20 e 21 a 30; *Bulks* 15 = total de dois conjuntos formados pelas amostras individuais de 1 a 15 e 16 a 30; *Bulks* 20 = Total de um conjunto formado pelas amostras individuais de 1 a 20; *Bulks* 30 = total de um conjunto formado pelas amostras individuais de 1 a 30.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O emprego de solução nutritiva combinada com diferentes doses de  $Al^{3+}$  tornou capaz a discriminação das constituições genéticas em estudo. Os resultados obtidos indicam a existência de variabilidade genética entre as populações de azevém estudadas. As populações CNPGL 136 e CNPGL 178 foram mais tolerantes ao  $Al^{3+}$  e apresentaram maior estabilidade, sendo importante fonte de genes de resistência ao  $Al^{3+}$ .

A técnica de AFPL combinada ao uso de amostras em *bulks* de DNA mostrou-se eficiente na separação das populações avaliadas. Considerando a rapidez, custo e poder discriminatório, o *bulk* formado por 20 indivíduos foi o mais apropriado para estimar a divergência genética entre populações de azevém. Entretanto, é importante salientar que ocorre uma perda dos alelos que estão presentes em baixa frequência nas populações o que acarreta em uma sub-estimativa da divergência genética.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ITEM 1

- AULER, N.M.F.; REIS, M.S., GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, p.329-338, 2002.
- BORRILL, M. Temperate grasses. In: SIMMONDS, N. (Ed.) **Evolution of crop plants**. London: Logman, 1986. p.137-142.
- CAMLIN, M.S. Achievements and prospects; grasses. In Weddell J.R. (ed), Proceedings of British Grassland Occasional Symposium No. 3: 'Seeds of Progress', Nottingham, UK, **Plant Breeding**, 14p. 1997.
- CASTRO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; MAIA, M.S.; MATTOS, L.A. FREITAS, F. Morphological and molecular characterization of italian rygrass populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, n.4, p.245-254.2003.
- ECHART, C. L and CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural** 31: 531-541. 2001.
- FERRER, M. E.; CLAUSEN, A. M. Variabilidad genética en los recursos vegetales de importancia para la agricultura del Cono Sur. In: BERRETA, A.; RIVAS, M. (eds.). Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Montevidéo: PROCISUR - **Série Documentos**, p. 43-57.2001.
- HERRMANN, D.; BOLLER, B.; WIDMER, F., KÖLLIKER, R. Optimization of bulked AFLP analysis and its application for exploring diversity of natural and cultivated populations of red clover. **Genome**, 48, 474–486. 2001.
- MICHELMORE, R. W., PARAN, I., AND KESSELI, R.V. Identification of Markers Linked to Disease-Resistance Genes by Bulk Segregant Analysis: A Rapid Method

to Detect Markers in Specific Genomic Regions by Using Segregating Populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 88: 9828 - 9832. 1991.

MITTELMANN, A. O melhoramento de azevém na Embrapa. In: I Seminário Caminhos do Melhoramento de Forrageiras e dia de Campo de Melhoramento de Forrageiras. Pelotas: EMBRAPA - **Série Documentos**. 80p. 2005.

MORAES, A.; MARASCHIN, G.E.; NABINGER, C. Pastagens nos ecossistemas de clima subtropical: Pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32, SIMPÓSIO SOBRE PASTAGENS NOS ECOSSISTEMAS BRASILEIROS: PESQUISAS PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, Brasília, **Anais...**p. 147-200. 1995.

SPOONER, D., van TREUREN, R. and VICENTE de, M.C. **Molecular markers for genebank management**. IPGRI Technical Bulletin No.10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 126p. 2005.

OLIVEIRA, P. H. **Herança Genética e Mapeamento Molecular da Tolerância à Toxicidade do Alumínio em Aveia (*Avena sativa* L.)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto alegre, 102p. 2002.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A**, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.

SILVA, J.A.G.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; SILVA, A.S.; MARCHIORO, V.S.; LORENCETTI, C.; BENIN, G.; SCHIMDT, D.A.M. e HARTWIG, I. Trigos di-haplóides com potencial para tolerância a toxicidade ao alumínio e a sensibilidade ao

ácido giberélico em cultivo hidropônico. **Revista Brasileira de Agrociência** 10: 37-41. 2004.

VIEIRA, E. A.; CASTRO, C. M.; OLIVEIRA, A. C. de.; CARVALHO, F. I. F. de.; ZIMMER, P. D., MARTINS, L. F. Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by rapd. **Sci. Agric.**v. 61, n.4, p. 407-413. 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4.407-4.414. 1995.

## VITAE

Adriana Pires Soares Bresolin, nascida em 27/03/1974 em Porto Alegre/RS. Ingressou na Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel" (FAEM), da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) em março de 1995. Foi bolsista de iniciação científica (CNPq) e monitora da disciplina de genética vegetal, no período de abril 1996 a fevereiro de 1998. No ano de 2004 iniciou estágio no Centro de Genômica e Fitomelhoramento recebendo treinamento em Técnicas Moleculares Aplicadas ao Melhoramento Vegetal, participando de vários congressos e reuniões técnicas de pesquisa. Em março de 2005 ingressou no mestrado da mesma área, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Caroline Marques Castro pesquisadora da Embrapa Clima Temperado e co-orientação do professor PhD. Antonio Costa de Oliveira da Universidade Federal de Pelotas, na área de Fitomelhoramento.

## ANEXO

### ESTABELECIMENTO DE PROTOCOLO PARA ANÁLISE DE AFLP EM *Lolium multiflorum* Lam.

#### Comunicado Técnico - Embrapa Clima Temperado (Submetido)

BRESOLIN\_SOARES, Adriana Pires<sup>1</sup>; CASTRO, Caroline Marques<sup>2</sup>; COSTA DE OLIVEIRA Antonio<sup>3</sup>; MITTELMANN, Andréa<sup>4</sup>; ANTHONISEN, Denilson<sup>5</sup>; NOLASCO, Graziela da Silva<sup>6</sup>; SILVA, Vanessa Neumann<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Eng. Agrôn., mestranda da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, spadri@pop.com.br

<sup>2</sup> Dr<sup>a</sup>., Eng. Agrôn., pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, CPACT, Pelotas, R.S, caroline@cpact.embrapa.br

<sup>3</sup> PhD., Eng. Agrôn. professor da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, acostol@terra.com.br

<sup>4</sup> Dr<sup>a</sup>., Eng. Agrôn., pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, M.G., Brasil. andream@cpact.embrapa.br

<sup>5</sup> Bacharel em química, analista da Embrapa Clima Temperado, CPACT, Pelotas, R.S, denilson@cpact.embrapa.br

<sup>6</sup> Estagiária da Embrapa Clima Temperado, CPACT, Pelotas, R.S, grazielanolasco@hotmail.com

<sup>7</sup> Graduanda do Curso de Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, vnpel@yahoo.com.br

#### Introdução

O azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma das espécies forrageiras de clima temperado mais difundidas no mundo (CAMLIN, 1997). Planta rústica, vigorosa, de excelente estabelecimento, que perfilha em abundância e possui ressemeadura natural, é uma das poaceas de maior importância no ramo pecuário do Sul do Brasil

(PUPO, 1979). Produz alimento de elevado teor de proteína, de fácil digestão e bastante palatável aos ruminantes (FONTANELI, 1991). No Sul do País, o azevém encontra-se naturalizado, devido à grande capacidade de ressemeadura natural da espécie, que após uma intensa seleção natural, conquistou a condição de espécie espontânea, com enorme adaptação e disseminação (MITTELMANN, 2005).

Devido à grande importância desta forrageira no Brasil, no ano de 1999, iniciaram-se na Embrapa Clima Temperado atividades voltadas ao melhoramento do azevém anual, através da realização de coletas de germoplasma. As coletas deram origem a experimentos pioneiros, que detectaram a existência de variabilidade genética entre as distintas populações (DIAS et al., 2001; CASTRO et al., 2003; VARGAS et al., 2006; VIEIRA et al., 2004). Em 2003, foi criado o Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Azevém e o Programa de Melhoramento de Azevém, através de uma parceria entre Embrapa Gado de Leite, Embrapa Clima Temperado e Embrapa Pecuária Sul (MITTELMANN, 2005).

No entanto, a simples coleta e a conservação do germoplasma, sem as informações sobre suas características, torna os bancos de germoplasma simples depósitos de materiais (Abadie e Berreta, 2001). Os recursos genéticos vegetais desacompanhados de sua caracterização são de pouca utilidade (FAO, 1998). Em um programa de melhoramento, é de fundamental importância que se conheçam as populações de trabalho, tanto em termos da variabilidade presente nas constituições genéticas, como em termos de qualidade destes materiais (ALLARD, 1999). Segundo Auler *et al* (2002), o conhecimento do nível de diversidade e da estrutura genética das populações é crucial para a definição das estratégias de melhoramento e conservação a serem empregadas.

A estrutura genética das populações de azevém é similar a de outros organismos de fecundação cruzada, em que cada indivíduo é altamente heterozigoto e apresenta uma grande variabilidade potencial (DALL'AGNOL et al, 1989). Para Breese e Hayward (1972), a detecção de grande variabilidade dentro das populações, com ampla diversidade e adaptação natural, como é o caso de populações de azevém, fornece ferramentas de grande valor aos melhoristas.

O uso de marcadores moleculares no manejo de bancos de germoplasma tem sido cada vez mais expressivo, fato que se deve ao rápido desenvolvimento de um grande número de técnicas para analisar a variação genética (SCHLÖTTERER, 2004). Nenhum tipo de marcador é superior a todos os demais para um grande número de aplicações. O tipo de marcador molecular mais apropriado para um determinado estudo vai depender de uma série de fatores como: o grau de polimorfismo pressuposto; a disponibilidade de reagentes e equipamentos para uso; pessoal qualificado e limitações de recursos financeiros e de tempo para execução (SPOONER et al., 2005).

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares, o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), técnica que foi desenvolvida por Vos et al. (1995), apresenta algumas vantagens para uso na caracterização de recursos genéticos, como a detecção de grande número de bandas informativas por reação, com ampla cobertura do genoma e considerável reprodutibilidade e principalmente por não necessitar de dados de seqüenciamento prévio da espécie para a construção de *primers* (SPOONER et al., 2005; VUYLSTEKE et al., 2007).

O AFLP é uma técnica na qual, fragmentos de DNA, entre 80 e 500pb, são obtidos a partir da digestão do DNA com enzimas de restrição, normalmente uma de corte raro e uma de corte freqüente. Os fragmentos digeridos são ligados a adaptadores de oligonuclotídeos específicos, os quais se anelam com *primers* pré-seletivos, cuja seqüência é complementar a dos adaptadores, acrescido de um nucleotídeo arbitrário na sua extremidade 3'. Os fragmentos pré-amplificados são então submetidos às reações de amplificação seletiva, utilizando *primers* com a mesma seqüência dos *primers* pré-seletivos acrescida de dois nucleotídeos arbitrários na sua extremidade 3'. As amplificações ocorrem via PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase). Os fragmentos amplificados (em torno de 50-100 fragmentos por reação) são, então, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (VOS et al., 1995).

Estudos comparativos entre métodos de descrição molecular através de marcadores AFLP e morfológica, detectaram variabilidade genética suficiente para diferenciar variedades de *Lolium perenne* (ROLDÁN-RUIZ et al., 2001). Estes marcadores também vêm sendo utilizados em análises de diversidade dentro e entre populações de *Lolium perenne* (GUTHRIDGE et al., 2001).

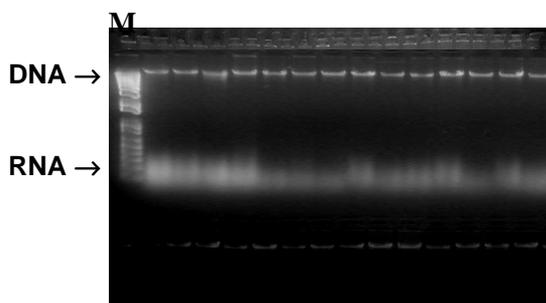
Com a finalidade de estabelecer um protocolo para o emprego da técnica de AFLP, visando explorar a diversidade genética de populações de azevém, foi conduzido este trabalho.

## **Material e métodos**

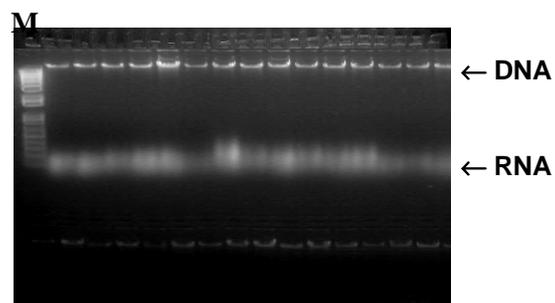
O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado- Embrapa/CPACT - Pelotas/RS – Brasil.

## Amostras de DNA

O material biológico consistiu de duas populações de azevém do banco ativo de germoplasma da Embrapa Clima Temperado, CNPGL 136, coletado em Pelotas, RS e CNPGL 188, de Coqueiros do Sul, RS. Foi extraído o DNA de 30 indivíduos de cada população, a partir de 0,4 g de tecido vegetal jovem e fresco, utilizando o tampão CTAB, conforme técnica descrita por Saghai-Marroof (1984) com pequenas modificações, adaptando o protocolo a quantidade menor de tecido, permitindo a obtenção menor volume de DNA, suficiente para a realização da técnica. O precipitado DNA/RNA foi ressuscitado em tampão Tris-EDTA, pH 8,0 e quantificado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (Figuras A e B). Através da intensidade da banda foi estimada a quantidade de DNA em ng/ $\mu$ l, por comparação com o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).



**Fig. A** – População CNPGL 136 (amostras de DNA), **M** = marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder.



**Fig. B** – População CNPGL 188 (amostras de DNA), **M** = marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder.

## Análise de AFLP

Após testes iniciais, seguindo protocolo descrito por Vos et al. (1995), utilizando o Kit *AFLP<sup>®</sup> Analysis System I* (Invitrogen), os resultados das amplificações não se mostraram satisfatórios, não apresentando quantidade de

fragmentos condizentes com a capacidade de detecção oferecida pela técnica, nem tampouco com a qualidade de visualização esperada, portanto, ajustes tiveram que ser feitos na metodologia original.

### **Etapas da análise de AFLP**

**i) Digestão:** Foram realizadas seis distintas reações de digestão, onde foram alterados o tempo de digestão, a quantidade de DNA e de enzimas de digestão e os volumes de reação, conforme descrito na tabela 1. Os reagentes utilizados em cada reação de digestão foram: Enzimas *EcoRI* e *MseI* (Invitrogen); Tampão 5x [Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM, Acetato Mg 10 mM, Acetato K 50 mM] e H<sub>2</sub>O MilliQ<sup>®</sup> suficiente para completar o volume final de reação.

**Tabela 1-** Reações de digestão do DNA genômico, testadas em azevém.

| <b>Digestão</b> | <b>Tempo</b> | <b>T °C</b> | <b>DNA</b> | <b>Tampão 5X</b> | <b><i>EcoRI</i></b> | <b><i>MseI</i></b> | <b>Volume Final</b> |
|-----------------|--------------|-------------|------------|------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| 1               | 3h           | 37°C        | 250 (ng)   | 5 µl             | 1,25 U              | 1,25 U             | 25 µl               |
| 2               | 6h           | 37°C        | 250 (ng)   | 5 µl             | 1,25 U              | 1,25 U             | 25 µl               |
| 3               | 12h          | 37°C        | 250 (ng)   | 5 µl             | 1,25 U              | 1,25 U             | 25 µl               |
| 4               | 3h           | 37°C        | 100 (ng)   | 2 µl             | 1 U                 | 1 U                | 10 µl               |
| 5               | 6h           | 37°C        | 100 (ng)   | 2 µl             | 1 U                 | 1 U                | 10 µl               |
| 6               | 12h          | 37°C        | 100 (ng)   | 2 µl             | 1 U                 | 1 U                | 10 µl               |

**Tempo** = total de horas de digestão; **T °C** = temperatura indicada para ativar a enzima; **DNA**= concentração de DNA utilizada em cada reação ; **Volume** = volume final de cada reação; ***EcoRI*** = unidades da enzima *EcoRI* utilizada em cada reação e ***MseI*** = unidades da enzima *MseI* utilizada em cada reação

**ii) Ligação de adaptadores:** A reação de ligação de adaptadores foi realizada no mesmo tubo onde previamente ocorreu a digestão, sendo adicionado, na relação 1:1 v/v com os produtos da digestão, solução de ligação de adaptadores do Kit *AFLP<sup>®</sup> Analysis System I* (Invitrogen) e 0,4 U da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen). O material foi incubado por 2h a 20°C .

**iii) Pré-amplificação:** Foram testadas quatro distintas concentrações da solução resultante da ligação dos adaptadores: solução sem diluição; diluída 1:5; 1:10 e 1:20 em H<sub>2</sub>O MilliQ<sup>®</sup>. As reações de PCR foram desenvolvidas em um volume final de 11 µL, sendo composta por 1,0 µL da solução resultante da ligação dos adaptadores, 8 µL da solução pre-amp primer mix do Kit *AFLP<sup>®</sup> Analysis System I* (Invitrogen), 1X PCR buffer [Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM], BSA 0,03 %, 1,8 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U de *Taq* DNA polymerase. O programa de PCR utilizado foi o sugerido por Vos et al. (1995). O produto da reação de pré-amplificação foi diluído nas seguintes proporções: 1:25 e 1:50 em H<sub>2</sub>O MilliQ<sup>®</sup> para serem submetidos à amplificação seletiva.

**iv) Amplificação seletiva:** A amplificação seletiva foi realizada em um volume final de 10 µL sendo composta por: 2,5 µl da solução de DNA pré-amplificado, diluída 1:25 e 1:50; 1X PCR buffer [Tris-HCl (pH 8,4) 20 mM, KCl 50 mM], BSA (0,03%), 1U de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 2,25 µL do *primer* M-CAG e 0,09 µL do *primer* E-ACA do Kit *AFLP<sup>®</sup> Analysis System I* (Invitrogen).

O programa utilizado para o PCR foi o recomendado por Vos et al. (1995). Todas as etapas das reações foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ao produto da amplificação final (10 µl) foram adicionados 4 µl da solução tampão de carregamento (formamida deionizada 99%, EDTA 10 mM, 0,025% de xileno-ciano e 0,025% de azul de bromofenol) e procedida a desnaturação das amostras a 94°C por 5min. Foram aplicados 4,0 µl desta solução em gel de seqüenciamento (poliacrilamida 6% p/v, uréia 7 M). Os fragmentos foram separados em gel de acrilamida a 6% em uma corrida a 60 w durante 2:30h. Os fragmentos amplificados foram visualizados após

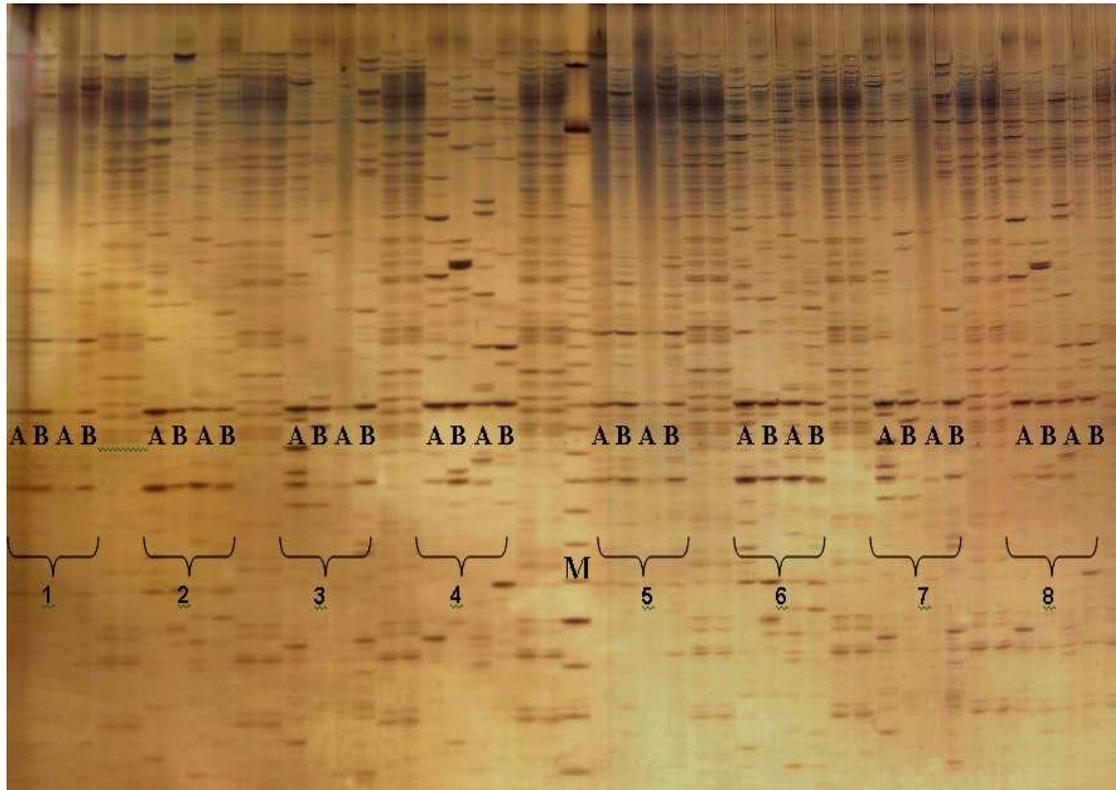
coloração do gel com nitrato de prata, seguindo protocolo descrito por Creste et al. (2001). O tamanho dos alelos foi estimado em comparação com o marcador de peso molecular de DNA de 10 pb (InvitroGen Life Technologies, Carlsbad, Calif., USA).

## Resultados e discussão

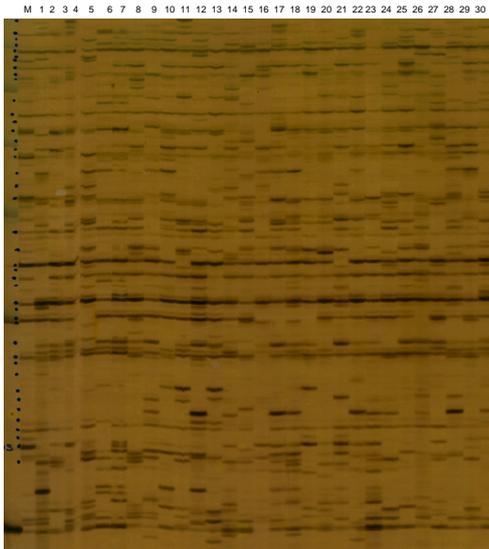
A concentração inicial de DNA genômico de 100 ng, num volume final de reação de digestão de 10 µl, com 1U de cada enzima *EcoRI* e *MseI* e tempo de reação de 12h a 37°C foi a que apresentou melhor qualidade no padrão de amplificação. Das diluições testadas após a ligação dos adaptadores e após a pré-amplificação, foram melhor sucedidas respectivamente as diluições de 1:5 e 1:25 (Figura C-6A).

Embora os resultados obtidos a partir da digestão de 100 ng de DNA por 12h a 37°C e com as diluições de 1:5 após a ligação de adaptadores e 1:25 após a pré-amplificação tenham sido satisfatórios, os perfis genotípicos resultantes, detectados a partir da coloração com nitrato de prata, ainda mostravam algumas amplificações um pouco fracas (Figura C – 6A). Por esse motivo, foi testada uma amplificação seletiva, na qual foi aumentada a concentração do *primer EcoRI* na reação de amplificação seletiva, de 0,25 ng/µL, para 10 ng/µL. A concentração do *primer MSeI* permaneceu 1,5 ng/µL.

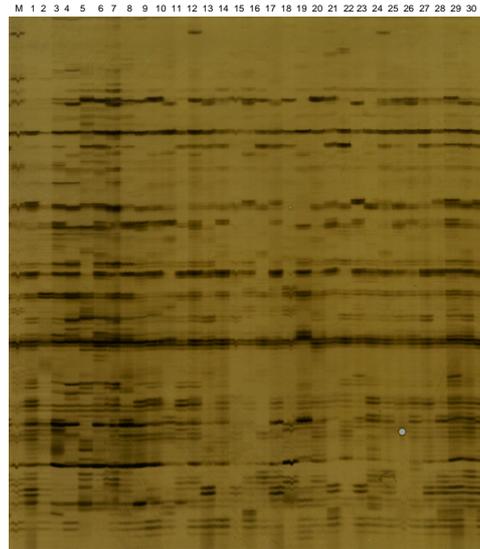
Com esta alteração foram evidenciados melhores resultados em termos de qualidade no padrão de bandas amplificadas, permitindo aos marcadores AFLP demonstrarem um alto poder de detecção de polimorfismo (Figura D e E). Uma única combinação de *primers* (M-CAG/ E-ACA), permitiu identificar 58 bandas polimórficas na população CNPGL 188 e 54 na população CNPGL 136 (entre 80 pb e 330 pb).



**Figura C.** Resultado da amplificação seletiva. Gel de poliacrilamida 6%, corado com nitrato de prata. A: 250 ng DNA; B: 100 ng DNA; 1: *adapters* sem sofrer diluição e diluição 1:50 após a pré-amplificação; 2: *adapters* com diluição de 1:5 e diluição 1:50 após a pré-amplificação; 3: *adapters* com diluição de 1:10 e diluição 1:50 após a pré-amplificação; 4: *adapters* com diluição de 1:20 e diluição 1:50 após a pré-amplificação; M: marcador 10 Pb DNA Ladder (Cat.no. 10821-015) - Invitrogen; 5: *adapters* sem diluição e diluição 1:25 após pré-amplificação; 6: *adapters* com diluição de 1:5 e diluição 1:25 após pré-amplificação; 7: *adapters* com diluição de 1:10 e diluição 1:25 após pré-amplificação; 8: *adapters* com diluição de 1:20 e diluição 1:25 após pré-amplificação.



**Fig. D-** População CNPGL 136, amostras de 1-30, amplificadas em gel de poliacrilamida 6%, combinação de primers E-ACA / M-CAG.



**Fig. E-** População CNPGL 188, amostras de 1-30, amplificadas em gel de poliacrilamida 6%, combinação de primers E-ACA / M-CAG.

## Conclusões

Foram satisfatórios os resultados obtidos neste experimento em termos de qualidade e quantidade de fragmentos amplificados, otimizando a utilização da técnica de AFLP para azevém, viabilizando a utilização da técnica na realização de estudos genéticos em *Lolium multiflorum* Lam.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Projeto FINEP/EPROGGIA – Estratégias de prospecção de genes em gramíneas de interesse agrônomo e a CAPES pela bolsa de mestrado a primeira autora.

## Referências

ABADIE, T.; BERRETA, A. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. In: BERRETA, A.; RIVAS, M. (eds.). Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. Montevideo: PROCISUR - **Série Documentos**, 2001. 99p.

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. 2<sup>a</sup>ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 254p.

AULER, N.M.F.; REIS, M.S., GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. The genetics and conservation of *Araucaria angustifolia*: I. Genetic structure and diversity of natural populations by means of non-adaptative variation in the state of Santa Catarina, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, n.25, 338p, 2002.

BREESE, E.L.; HAYWARD, M.D. The genetic basis of present breeding methods in forage crops. **Euphytica**, n.21, 336p, 1972.

CAMLIN, M.S. Achievements and prospects; grasses. In Weddell J.R. (ed), Proceedings of British Grassland Occasional Symposium No. 3: 'Seeds of Progress', Nottingham, UK, **Plant Breeding**, 14p, 1997.

CASTRO, C.M.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; MAIA, M.S.; MATTOS, L.A. FREITAS, F. Morphological and molecular characterization of italian rygrass populations. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.3, n.4, p.245-254.2003.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, n.19, 306p, 2001.

DALL'AGNOL, M.; GOMES, K.E.; VIDOR, M.A. Competição de cultivares de azevém anual. In: Reunião Anual Sociedade Brasileira de Zootecnia, 26. **Anais**. Porto Alegre: SBZ, 1989.

DIAS, J.C.A.; GOMES, J.F.; INFELD, J.A. Avaliação de genótipos de azevém anual em solos hidromórficos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. **Comunicado Técnico**, n.42, 2001, 3p.

**FAO.** The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 1998. 510p.

FONTANELI, R. S.; FREIRE JÚNIOR, N. Avaliação de con-sorciações de aveia e azevém anual com leguminosas de estação fria. Brasília, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n.26, 630p, 1991.

GUTHRIDGE, K.M.; DUPAL, M.P.; KÖLLIKER, R.; JONES, E.S.; SMITH & FORSTER, J.W. AFLP analysis of genetic diversity within and between populations of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) **Euphytica**, n.122, 201p, 2001.

MITTELMANN, A. O melhoramento de azevém na Embrapa. In: I Seminário Caminhos do Melhoramento de Forrageiras e dia de Campo de Melhoramento de Forrageiras. Pelotas: EMBRAPA - **Série Documentos**. 2005. 80p.

PUPO, N. I. H. **Manual de pastagens e forrageiras**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1979. 343 p.

ROLDÁN-RUIZ, I.; EEUWIJK van, F.A.; GILLILAND, T.J.; DUBREUIL, P.; DILLMANN, C.; LALLEMAND, J.; LOOSE De, M.; BARIL, C.P. Comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. **Theor Appl Genet**, n.103, 1150p, 2001.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, 5. 63p. 2004.

SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A**, v.89, n.2, p.1477-1481, 1984.

SPOONER, D., van TREUREN, R. and VICENTE de, M.C. **Molecular markers for genebank management**. IPGRI Technical Bulletin n.10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 2005. 126p.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S.; RIZZARDI, M.A.; SILVA, V.C. Alteração das características biológicas dos biótipos de azevém (*Lolium multiflorum*) ocasionada pela resistência ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 153-160, 2005.

VIEIRA, E. A.; CASTRO, C. M.; COSTA DE OLIVEIRA, A.; CARVALHO, F. I. F. de.; ZIMMER, P. D., MARTINS, L. F. Genetic structure of annual ryegrass (*Lolium multiflorum*) populations estimated by rapd. **Sci. Agric.** v. 61, n.4, p. 407-413. 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; LEE, T.V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Research**, n.23, 4414p, 1995.

VUYLSTEKE, M.; PELEMAN, J. D.; EIJK, M. JT. V. AFLP technology for DNA fingerprinting. **Nature Protocols**, v.2, n.6, 2007.