

**GIOVANA AUGUSTA TORRES**

**IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES CROMOSSÔMICAS DO MILHO ASSOCIADAS COM  
TOLERÂNCIA À TOXIDEZ DE ALUMÍNIO POR MEIO DE RFLP**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

**Orientador**

Edilson Paiva



**LAVRAS**

**MINAS GERAIS - BRASIL**

**1996**

**Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da  
Biblioteca Central da UFLA**

Torres, Giovana Augusta

Identificação de regiões cromossômicas do milho associadas com tolerância à toxidez de alumínio por meio de RFLP / Giovana Augusta Torres. – Lavras : UFLA, 1996.

61 p. : il.

Orientador: Edilson Paiva.

Dissertação (Mestrado) - UFLA.

Bibliografia.

1. Milho - RFLP - Marcador molecular. 2. QTLs. 3. Alumínio - Tolerância. 4. BSA. 5. Genética molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.153

GIOVANA AUGUSTA TORRES

IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES CROMOSSÔMICAS DO MILHO ASSOCIADAS COM  
TOLERÂNCIA À TOXIDEZ DE ALUMÍNIO POR MEIO DE RFLP

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 28 de fevereiro de 1996



Sidney Netto Parentoni



João Bosco dos Santos



Edilson Paiva

(Orientador)

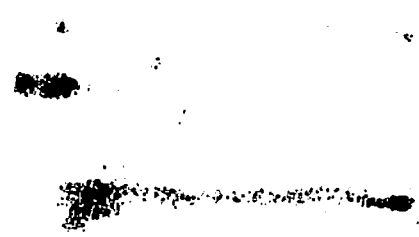
THE HISTORY OF THE

... ..

... ..

... ..

... ..



... ..

**À MINHA FAMÍLIA,**

**DEDICO ESTE TRABALHO**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao curso de Agronomia da Universidade Federal de Uberlândia pelo incentivo e apoio no início de minha carreira científica. À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de realização do curso de mestrado. À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos. Ao Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo - CNPMS/EMBRAPA, pela abertura e apoio oferecidos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Curso de Genética e Melhoramento de Plantas da UFLA pela formação profissional de alta qualidade que me propiciaram.

Ao meu orientador, Edilson Paiva, pela credibilidade e respeito depositados em meu trabalho e pela convivência amigável que me propiciou grande enriquecimento profissional e pessoal.

Aos pesquisadores do CNPMS, Maurício Antônio Lopes e Sidney Netto Parentoni, que sempre compartilharam seus conhecimentos e amizade, dando contribuições valiosas para minha formação e para a realização deste trabalho. Ao pesquisador Antônio Carlos de Oliveira pela orientação nas análises estatísticas.

Ao amigo Miguel Reis, que com sua dedicação, disponibilidade, paciência e especialmente pelo seu companheirismo, fez de minha passagem pelo Laboratório de Biologia Molecular uma experiência extremamente produtiva e engrandecedora.

Aos funcionários e estagiários do CNPMS, especialmente Gislene, que me auxiliaram em várias etapas do meu trabalho, viabilizando sua concretização.

A todos os amigos da UFLA e do CNPMS, os quais certamente deram as contribuições mais importantes para o sucesso desta etapa de minha vida.

Ao Eduardo, por tudo.

## SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
2.1 Efeitos do AI e possíveis mecanismos de tolerância.....	4
2.2 Metodologias de avaliação da tolerância ao AI tóxico.....	7
2.3 Herança da tolerância ao AI tóxico.....	9
2.4 Marcadores moleculares no estudo de QTLs.....	11
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Análise fenotípica.....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Material genético.....	17
3.1.2 Avaliação em solução nutritiva.....	18
3.1.3 Avaliação da população F <sub>2</sub> .....	20
3.1.4 Avaliação das famílias F <sub>3</sub> .....	21
3.1.5 Eficiência do CRRS.....	22
<b>3.2 Análise genética.....</b>	<b>22</b>
3.2.1 Análise de RFLP.....	22
3.2.1.1 Extração, digestão do DNA e Southern blot.....	23
3.2.1.2 Hibridação e detecção.....	23
3.2.2 Seleção de sondas.....	25
3.2.3 Análise dos bulks de DNA.....	26
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 Avaliação fenotípica da população F <sub>2</sub> .....	27
4.2 Avaliação fenotípica das famílias F <sub>3</sub> .....	29

4.3 Seleção de sondas e análise dos bulks.....	39
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>56</b>



## LISTA DE TABELAS

Tabela		página
1	Composição da solução nutritiva para crescimento de plântulas de milho (MAGNAVACA, 1982).....	19
2	Resumo da análise de variância dos ensaios 1 e 2 para avaliação de famílias $F_3$ em solução nutritiva contendo alumínio tóxico.....	29
3	Médias ajustadas e variâncias genéticas dos valores de CRRS apresentados pelas famílias $F_{2(53 \times 1327)}:F_3$ avaliadas quanto a tolerância ao Al tóxico em solução nutritiva no ensaio 1. Famílias identificadas de 1 a 15 são suscetíveis e de 16 a 30 são tolerantes.....	31
4	Médias ajustadas e variâncias genéticas dos valores de CRRS apresentados pelas famílias $F_{2(53 \times 1327)}:F_3$ avaliadas quanto a tolerância ao Al tóxico em solução nutritiva no ensaio 2. Famílias identificadas de 31 a 44 são suscetíveis e de 45 a 60 são tolerantes.....	32
5	Médias ajustadas e variâncias genéticas dos valores de CRRS apresentados pelos tratamentos controle nos ensaios 1 e 2 de avaliação, em solução nutritiva, das famílias $F_{2(53 \times 1327)}:F_3$ quanto a tolerância ao Al tóxico.....	35

## LISTA DE FIGURAS

Figura		página
1	Distribuição de frequência dos valores de CRRS obtidos na avaliação da população $F_{2(53 \times 1327)}$ em solução nutritiva contendo alumínio tóxico. Intervalo de confiança com 95% de probabilidade: $0,15 \pm 0,01$ e $0,75 \pm 0,06$ , para as linhagens L53 e L1327, respectivamente.....	28
2	Distribuição de frequência dos valores de CRRS apresentados pelos grupos de famílias $F_3$ suscetível e tolerante ao Al tóxico nos ensaios 1 e 2 de avaliação em solução nutritiva.....	33
3	Contraste de comportamento do sistema radicular das famílias $F_3$ não segregantes para tolerância/suscetibilidade ao Al tóxico, após cultivo em solução nutritiva sem Al (à esquerda) e com Al (à direita). (A) Família $F_3$ (41), suscetível e (B) Família $F_3$ (60), tolerante.....	34
4	Contraste de comportamento do sistema radicular das testemunhas (L53, L1327, F <sub>1</sub> , BR 201, CMS 36, L726 e L19), usadas nos ensaios de avaliação de famílias $F_3$ , em solução nutritiva. À esquerda, plântulas antes do cultivo em solução nutritiva; no centro, plântulas após cultivo em solução sem Al; à direita, plântulas após cultivo em solução com Al.....	36
5	Relação entre o CLRS e o CIRS apresentados no 2º ensaio pelos tratamentos controle. A- Materiais suscetíveis, L19 e L53. Equação de regressão: $Y = 1,13 + 0,22X$ , $R^2 = 2,2\%$ ( $P < 0,01$ ). B- Materiais tolerantes, L1327 e CMS 36. Equação de regressão: $Y = 1,21 + 0,61X$ , $R^2 = 56,3\%$ ( $P < 0,01$ ).....	38

Figura		página
6	Tipos de padrões obtidos nas análises de RFLP para seleção de sondas polimórficas usando DNA das linhagens L53, L1327 e $F_{1(L53 \times 1327)}$ . <b>A-</b> Padrão polimórfico simples. <b>B-</b> Padrão polimórfico complexo. <b>C-</b> Padrão não polimórfico.....	40
7	Localização cromossômica das sondas genômicas e sondas de cDNA que foram polimórficas entre as linhagens parentais.....	41
8	Identificação de polimorfismo entre bulks tolerante e suscetível ao Al tóxico. <b>PS</b> - Parental suscetível, L53; <b>PT</b> - Parental tolerante, L1327; <b>F<sub>1</sub></b> - Híbrido resultante do cruzamento das linhagens parentais; <b>BS</b> - Bulk suscetível; <b>BT</b> - Bulk tolerante. Todos os materiais foram digeridos com Eco RI. <b>A-</b> Autoradiografia da hibridação com UMC 103; <b>B-</b> Autoradiografia da hibridação com CSU 155; <b>C-</b> Autoradiografia da hibridação com UMC 48.....	42
9	Padrão de bandas de RFLP dos bulks tolerante e suscetível e dos seus constituintes quando digeridos com Eco RI e hibridadas com CSU 155. <b>BS</b> - Bulk suscetível; <b>BT</b> - Bulk tolerante; <b>1 a 6</b> - Indivíduos constituintes do bulk suscetível; <b>7 a 11</b> - Indivíduos constituintes do bulk tolerante. <b>M</b> - Marcador de peso molecular.....	43
10	Padrão de bandas de RFLP dos bulks tolerante e suscetível e dos seus constituintes quando digeridos com Eco RI e hibridadas com UMC 103. <b>BS</b> - Bulk suscetível; <b>BT</b> - Bulk tolerante; <b>1 a 6</b> - Indivíduos constituintes do bulk suscetível; <b>7 a 11</b> - Indivíduos constituintes do bulk tolerante. <b>M</b> - Marcador de peso molecular.....	44
11	Padrão de bandas de RFLP dos bulks tolerante e suscetível e dos seus constituintes quando digeridos com Eco RI e hibridadas com UMC 48. <b>BS</b> - Bulk suscetível; <b>BT</b> - Bulk tolerante; <b>1 a 6</b> - Indivíduos constituintes do bulk suscetível; <b>7 a 11</b> - Indivíduos constituintes do bulk tolerante. <b>M</b> - Marcador de peso molecular.....	45

## RESUMO

**TORRES, Giovana Augusta. Identificação de regiões cromossômicas do milho associadas com tolerância à toxidez de Al por meio de RFLP. Lavras: UFLA, 1996. 61p. (Dissertação - Mestrado em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas)\***

O objetivo deste estudo foi identificar RFLPs ligados a QTLs (Locos de Caracteres Quantitativos) que controlam a tolerância ao Al tóxico em milho. Utilizou-se a estratégia de "Bulked Segregant Analysis (BSA), a qual se baseia na construção de bulks de indivíduos  $F_2$  contrastantes e homocigotos para o caráter em estudo. O material genético utilizado consistiu de uma população  $F_2$  proveniente do cruzamento entre a linhagem L53, suscetível ao Al, e a linhagem L1327, tolerante. Ambas as linhagens foram desenvolvidas pelo programa de melhoramento do Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo - CNPMS/EMBRAPA. Avaliou-se 1554 indivíduos  $F_2$  em solução nutritiva contendo Al tóxico utilizando como critério fenotípico, medidor da tolerância, o índice Comprimento Relativo da Raiz Seminal - CRRS. A distribuição de frequência de distribuição do CRRS foi contínua, unimodal com tendência para suscetibilidade. As plântulas  $F_2$  que apresentaram os maiores e menores valores de CRRS foram transplantadas para o campo e autopolinizadas para obtenção de famílias  $F_3$ . Sessenta famílias  $F_3$  (30 suscetíveis e 30 tolerantes) foram avaliadas em solução nutritiva para confirmação da homocigose para tolerância à toxidez de Al dos indivíduos  $F_2$  que as originou. Foram feitos 2 ensaios, cada qual com 15 famílias tolerantes, 15 famílias suscetíveis e seis testemunhas (L53, L1327,  $F_1$ , CMS 36,

---

\*Orientador: Edilson Paiva. Membros da banca: Sidney Netto Parentoni e João Bosco dos Santos.

BR201, L726) utilizando delineamento em blocos incompletos, com uma testemunha comum (L19 - suscetível ao AI). Obteve-se, com base na média e variância genética apresentadas pelas famílias F<sub>3</sub>, 5 famílias tolerantes e 6 suscetíveis para construção dos bulks. Para análise de RFLP dos bulks foram selecionadas 113 sondas de forma a cobrir todo o genoma do milho em intervalos de 30 cM. O DNA das linhagens L53, L1327 e do F<sub>1</sub> foram digeridos com Eco RI, Bam HI e Hind III. Quarenta e seis sondas diferenciaram as linhagens parentais, apresentando padrão simples. Estas foram usadas para análise de RFLP dos bulks contrastantes. Foram identificadas 3 sondas localizadas no cromossoma 8, as quais em combinação com a enzima de restrição Eco RI, foram capazes de distinguir os bulks por diferença de intensidade de bandas. A utilização destas combinações sonda e enzima nos indivíduos constituintes do bulk, individualmente, mostrou a existência de heterozigotos para as sondas em questão nos dois bulks, o que explica a existência das bandas menos intensas provenientes do parental contrastante. Os resultados indicam que existe no cromossoma 8 uma região envolvida no controle da tolerância ao AI tóxico em milho.

## **SUMMARY**

### **SEARCHING RFLP MARKERS TO IDENTIFY GENES FOR ALUMINUM TOLERANCE IN MAIZE**

The objective of this study was to identify RFLP markers linked to QTLs that control Al tolerance in maize. The strategy used was Bulk Segregant Analysis (BSA), which is based on choosing homozygous  $F_2$  individuals for bulking. The genetic material utilized was an  $F_2$  population derived from a cross between the Al-susceptible line L53 and Al-tolerant line L1327. Both lines were developed at the National Maize and Sorghum Research Center - CNPMS/EMBRAPA. A population with 1554 individuals were evaluated in nutrient solution containing toxic Al. The index Relative Seminal Root Length (RSRL) was used as the phenotypic measure of tolerance. The frequency distribution of RSRL was continuous with skewing towards Al-susceptible individuals. Seedlings of the  $F_2$  population which scored the highest and the lowest values for RSRL were subsequently selfed to obtain  $F_3$  families. Sixty  $F_3$  families (30 Al-susceptible and 30 Al-tolerant) were evaluated in nutrient solution to identify the ones that weren't segregating for aluminum tolerance. They were distributed in 2 experiments, each one with 15 Al-susceptible, 15 Al-tolerant  $F_3$  families and six controls (L53, L1327,  $F_1$ , CMS 36, BR 201 and L726), using an incomplete block design. Based on the average and genetic variance were chosen 6 Al-susceptible, and 5 Al-tolerant  $F_3$  families to construct the bulks. One hundred and thirteen probes were selected at an average interval of 30 cM covering all the ten maize chromosomes. DNA from L53, L1327 and  $F_1$  was digested with Eco RI, Bam HI and Hind III. Forty six markers showed codominant effect that could distinguish the parental lines. These 46 probes were hybridized with

the bulks by differences of bands intensity. DNA from individuals of the bulks was hybridized with these probes, showing the existence of heterozygotes. This explained the existence of bands from the contrasting parental. The results suggests that there is at the chromosome 8 a region related to the aluminum tolerance in maize.

## 1 INTRODUÇÃO

A acidez do solo é um dos principais entraves para a agricultura nos trópicos. No Brasil, os solos ácidos encontram-se predominantemente na região do cerrado e ocupam cerca de 205 milhões de hectares, dos quais 112 milhões representam importante fronteira agrícola para o país. Estes solos se caracterizam pela baixa fertilidade, baixa Capacidade de Troca Catiônica (CTC) e alta concentração de alumínio (Al) tóxico. Esta última característica parece constituir a maior limitação para a produção vegetal. Na presença do alumínio em níveis tóxicos ocorre paralisação da divisão celular nas raízes das plantas, prejudicando o desenvolvimento e funcionamento do sistema radicular. Em consequência, as plantas sensíveis apresentam baixa eficiência na absorção de nutrientes do solo e maior suscetibilidade à seca (Lopes, 1987).

Uma alternativa para este problema seria a correção da acidez através de calagem. Esta prática propicia aumento no pH da solução do solo e em decorrência o aumento da disponibilidade de nutrientes e elimina o efeito tóxico do Al. No entanto, a calagem é exequível apenas na camada arável do solo, permanecendo a acidez nas camadas subsuperficiais. Muitas vezes esta prática é inviável devido a dificuldades de ordem técnica e econômica. Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de associar à calagem o uso de genótipos tolerantes ao Al tóxico obtidos via melhoramento genético (Olmos e Camargo, 1976).

No caso da cultura do milho, cuja maioria das cultivares é suscetível ao alumínio tóxico, a obtenção de materiais tolerantes é uma estratégia viável uma vez que tem sido demonstrado existir variabilidade para esta característica. Os estudos de herança feitos, tanto em solução nutritiva quanto em condições de campo, são conflitantes no que diz respeito ao número de genes envolvidos e quanto ao tipo de



ação gênica. Contudo um modelo genético proposto por Prioli (1987) consegue conciliar, em parte, estes resultados considerando a existência de poucos genes de pronunciado efeito no fenótipo associados a genes modificadores. Dessa forma existe a possibilidade de quantificação do efeito destes genes para elucidação da base genética da tolerância ao Al tóxico .

Novas perspectivas para o entendimento de características mais complexas surgiram com o advento da Biologia Molecular. O desenvolvimento de técnicas de investigação molecular e bioquímica permitem estudar caracteres quantitativos em seus componentes individuais, ou seja, tratá-los segundo os conceitos da genética mendeliana (Helentjaris, 1992). Os marcadores moleculares, tanto de proteína quanto de DNA, possuem grande potencial de auxílio a programas de melhoramento. Além de gerar conhecimento e fornecer informações importantes para a definição de estratégias de melhoramento, os marcadores moleculares podem ainda ser diretamente usados pelos melhoristas no processo de seleção quando ligados aos alelos de interesse.

Dentre os marcadores existentes, destaca-se os RFLPs (Restriction Fragments Length Polymorphisms) que se baseiam na utilização de sondas (fragmentos de DNA de localização conhecida) para detectar diferenças na informação genética entre plantas. É uma técnica que vem sendo amplamente utilizada e aperfeiçoada, sendo hoje bastante viável sua implantação e utilização como ferramenta de suporte a programas de melhoramento genético.

Vários estudos de mapeamento de locos controladores de caracteres quantitativos (QTLs) usando marcadores moleculares têm sido realizados em várias espécies como o tomate, milho, aveia, etc. Para tal utiliza-se uma população segregante originada do cruzamento entre materiais contrastantes para a característica em estudo. As estratégias utilizadas diferem em vários aspectos tais como o tipo de população segregante, o tamanho da população e o tipo de marcador. Via de regra são metodologias que exigem a manipulação de um grande número de indivíduos sendo, na maioria dos casos, laboriosas e demoradas.

Recentemente Michelmore, Paran e Kesseli (1991) desenvolveram uma metodologia de identificação rápida de regiões específicas do genoma, a Análise de Segregantes em Bulk (Bulked Segregant Analysis - BSA). Ela se baseia na comparação de bulks de DNA constituídos de indivíduos contrastantes para a

característica em estudo. Os indivíduos constituintes de cada bulk são idênticos para as regiões genômicas ligadas aos genes em estudo e bastante distintos para as regiões não ligadas. Assim, os locos marcadores que discriminam os bulks têm alta probabilidade de estarem ligados aos genes de interesse. Desenvolvida originalmente para caracteres qualitativos, esta estratégia é também bastante promissora para caracteres quantitativos de menor complexidade (Wang e Paterson, 1994) como parece ser o caso da tolerância ao AI tóxico.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho é identificar locos de RFLP associados a regiões cromossômicas que controlam a tolerância ao AI tóxico em milho.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Efeitos do Al e possíveis mecanismos de tolerância

A acidez dos solos constitui uma das principais barreiras para a exploração de uma vasta extensão de terras em todo o mundo, especialmente nos trópicos. O efeito direto do baixo pH, ou seja, da alta concentração de íons  $H^+$  na solução do solo sobre o desenvolvimento das plantas, somente se manifesta em pH menor que 3,0. Considerando que a solução do solo raramente atinge valores inferiores a 4,0, este efeito deve ser pouco expressivo. O efeito prejudicial do baixo pH é, portanto, o resultado da soma de vários efeitos adversos indiretos (Mello et al. 1984).

Dentre estes efeitos indiretos destaca-se a toxidez do  $Al^{3+}$ , a qual é reconhecida como o maior fator limitante para o aproveitamento dos solos ácidos (Silva 1976). Em solos com pH alto o  $Al^{3+}$  liberado na solução é precipitado na forma de hidróxido de alumínio, não disponível para a planta. Em solos com baixo pH o  $Al^{3+}$  liberado permanece disponível na solução.

O alumínio disponível no solo pode ser encontrado em diversas formas, dependendo das características físicas e químicas do solo. O conhecimento de qual destas formas causa toxidez às plantas é de grande importância para o entendimento dos efeitos desencadeados pela presença do alumínio bem como dos mecanismos de tolerância. A maioria dos trabalhos indicam que o  $Al^{3+}$  é a espécie mais tóxica às plantas, com relatos de toxidez da forma  $Al^{13+}$  (Howeler 1991).

Em estudos de absorção e translocação de Al na planta, Henning (1975), citado por Foy e Fleming (1978) verificou que o Al absorvido penetrava na região apical da raiz e se acumulava no núcleo e citoplasma das células adjacentes a esta zona, sendo que grande parte do Al era retido nas células corticais.

Ryan, Ditomaso e Kochian (1993) observaram que quando apenas a parte terminal da raiz (capa da ponta e meristema) era exposta ao Al, ocorria inibição da alongação da raiz. Quando a raiz era totalmente imersa, com exceção do meristema, as raízes tinham crescimento normal. Esta e outras evidências citadas na literatura mostram que a região apical constitui uma zona fortemente afetada pelo Al. Bennet e Breen (1991) propuseram um modelo onde a capa da ponta da raiz seria um sítio de percepção do Al. Em plantas submetidas a uma solução com Al, eles observaram mudanças na região da capa da ponta da raiz, especialmente alterações na atividade secretória. Os autores sugeriram que o Al induziria a inibição do crescimento da raiz através de uma rota de sinais envolvendo a capa da ponta da raiz, o meristema apical e hormônios.

Pelo fato de ser o órgão da planta que absorve e, muitas vezes, retém o Al, o sistema radicular é o primeiro a manifestar seus efeitos fitotóxicos. Após a absorção do Al pelas plantas, ocorre a paralisação das divisões celulares na região meristemática, prejudicando a alongação das raízes e tornando-as curtas, grossas, escurecidas e quebradiças. Esta resposta inicial do sistema radicular à absorção do  $Al^{3+}$  desencadeia outros distúrbios na planta devido à ineficiência do sistema radicular em absorver nutrientes e água.

Esta ineficiência provoca sintomas foliares que variam com a espécie. Em algumas, os sintomas são semelhantes aos da deficiência de fósforo, ocorrendo avermelhamento do caule e das nervuras e atrofiamento generalizado. Outras apresentam sintomas semelhantes aos da deficiência de cálcio, ocorrendo enrolamento das folhas jovens e morte das pontas de crescimento (Foy 1976).

Vários mecanismos de tolerância ao Al têm sido propostos na literatura. No entanto, a maioria destes não possuem evidências consistentes que os suportem (Kochian 1995), e provavelmente a tolerância não deve ser explicada por apenas um mecanismo isolado, mas sim por vários processos fisiológicos que variam de espécie para espécie e também dentro de uma mesma espécie.

No que diz respeito ao mecanismo de tolerância ao Al tóxico, as espécies podem ser divididas em três grupos. No primeiro grupo, as plantas tolerantes possuem menores concentrações de Al em suas raízes e concentrações similares na parte aérea quando comparadas com as plantas sensíveis. Estas espécies apresentam mecanismo

de exclusão do Al, tais como trigo, cevada e soja ; no segundo grupo, a parte aérea das plantas tolerantes contém menores teores de Al que as raízes, geralmente devido à acumulação do Al neste órgão. São representantes deste grupo: arroz, trigo e milho; e finalmente o terceiro grupo, no qual as espécies acumulam e detoxificam o Al dentro de seus tecidos, como o chá (*Camellia sinensis* L.), que complexa o Al com ácidos orgânicos e polifenóis, acumulando-o nas folhas mais velhas (Foy e Fleming 1978).

Um mecanismo de tolerância que tem atraído grande atenção é o aumento do pH na zona radicular através da liberação de ânions na rizosfera, propiciando insolubilização do Al e portanto impedindo sua absorção. Em algumas culturas como o trigo e o milho, tem sido observado aumento do pH em genótipos tolerantes, enquanto os genótipos sensíveis não alteram ou até mesmo diminuem o pH na rizosfera (Foy e Fleming 1978).

Outro importante mecanismo é a imobilização do Al por agentes quelantes. A exsudação de ácidos orgânicos, tais como ácido málico e cítrico, propicia a quelação do Al na rizosfera, revertendo seu efeito fitotóxico (Miyasaka et al. 1991). Delhaize, Ryan e Randall (1993) investigaram a relação dos ácidos orgânicos e a tolerância ao Al em linhagens isogênicas de trigo e verificaram que existe uma forte correlação entre a tolerância ao Al e a exsudação de elevadas taxas de ácido málico estimulada pela presença do Al.

A permeabilidade diferencial da membrana tem sido postulada como um mecanismo de exclusão do Al, prevenindo seus efeitos fitotóxicos na raiz e sua translocação para a parte aérea. Esta permeabilidade diferencial foi comprovada por Clarkson, citado por Prioli (1987) pois a capacidade de impedir a passagem do Al através da membrana não implicou na tolerância a outros cátions trivalentes.

Na presença do Al, o fósforo é fixado na forma de fosfato de alumínio, que é um precipitado insolúvel e, portanto, não disponível para a planta. Assim, genótipos capazes de absorver fósforo na presença de Al, ou ainda, de se desenvolverem em condições de baixa disponibilidade de fósforo, provavelmente seriam tolerantes ao Al (Clark e Brown 1974). No entanto, esta hipótese tem sido contestada. Furlani e Furlani (1991), estudando linhagens de milho e arroz quanto à eficiência na absorção de P e tolerância ao Al, verificaram que as duas características eram independentes.

A Capacidade de Troca Catiônica (CTC) das raízes das plantas tem sido relatada como uma característica capaz de conferir tolerância ao Al. Plantas com alta CTC atraem e absorvem cátions polivalentes em maior intensidade; assim, plantas com baixa CTC de raiz seriam tolerantes ao Al (Vose e Randal 1962). Por outro lado, Blamey, Robinson e Asher (1992) avaliaram, em solução nutritiva, 12 espécies representadas por genótipos cuja reação ao Al era previamente conhecida com base em estudos de alongação de raiz e não foi observada correlação entre tolerância ao Al e baixa CTC.

Uma vez absorvido, o Al pode ainda ter seu efeito fitotóxico revertido dentro da célula pela ação de proteínas quelantes. Vários estudos de proteínas de raiz de materiais suscetíveis e tolerantes têm sido feitos na tentativa de encontrar alguma proteína específica de genótipos tolerantes. Campbell e Jackson (1994) encontraram uma proteína de 18,7 kD, presente apenas em raízes de clones tolerantes de alfafa após exposição a diferentes níveis de estresse de Al. Basu, Basu e Taylor (1991), estudaram o padrão protéico de membranas extraídas da região meristemática de raízes de trigo e identificaram uma proteína de aproximadamente 51 kD induzida pela exposição das raízes ao Al. Com a suspensão do estresse, a proteína desaparecia gradualmente. Outros metais não foram capazes de induzir a síntese desta proteína, indicando que a mesma é especificamente induzida pelo Al e preservada durante o período de estresse pelo qual os genótipos tolerantes foram submetidos.

## **2.2 Metodologias de avaliação da tolerância ao Al tóxico**

Várias metodologias de avaliação da tolerância ao Al tóxico têm sido desenvolvidas visando o entendimento das bases fisiológicas e genéticas da tolerância. Estas avaliações são realizadas tanto em solo, a campo e vasos em casa de vegetação, como em solução nutritiva.

Nas avaliações a campo, vários níveis de calcário são utilizados para se estabelecer diferentes índices de saturação de Al, onde são avaliados os diferentes genótipos (Azevedo Filho 1989). Este tipo de avaliação possui a vantagem de avaliar os genótipos sob condições naturais de solo e clima, produzindo resultados que

refletem o efeito da saturação de Al sobre todo o ciclo de desenvolvimento das plantas. Por outro lado, são metodologias que consomem muito tempo, requerem grandes áreas e os genótipos avaliados estão sujeitos a vários fatores ambientais que podem mascarar o efeito do Al (Garcia, Silva e Massei 1979).

Os ensaios em casa de vegetação usando vasos contendo solo corrigido, que propicia vários níveis de saturação de Al, é uma opção intermediária entre a avaliação a campo e o uso de solução nutritiva, propiciando maior controle dos fatores ambientais e simulando de forma mais realística as condições de cultivo (Howeler, 1991).

As metodologias baseadas no uso de solução nutritiva possuem as vantagens de serem rápidas, de permitirem a avaliação de vários genótipos em um curto período de tempo e ocupando pequenos espaços, de não serem destrutivas, possibilitando posterior transplante para o campo e ainda propicia o controle das condições ambientais; portanto, o isolamento do efeito do Al nas plantas (Howeler 1991).

Vários procedimentos de avaliação de genótipos de milho em solução nutritiva são descritos na literatura (Rhue e Grogan 1977; Garcia, Silva e Massei 1979; Magnavaca 1982; Sawasaki e Furlani 1988). Grande parte destes trabalhos utilizou critérios fenotípicos baseados na alongação da raiz seminal. No entanto, o critério de discriminação entre genótipos tolerantes e suscetíveis adotado pelos autores não foram coincidentes.

Em gramíneas, características do sistema radicular, baseadas na alongação, são os melhores critérios para medição da tolerância ao Al (Furlani 1981; Garcia, Silva e Massei 1979). Em milho, o uso do peso de matéria seca da parte aérea e mesmo da raiz não são bons critérios para avaliação da tolerância ao Al (Lopes et al. 1987). Já as medições do sistema radicular, de acordo com esses autores, têm se mostrado bastante eficientes para tal.

Magnavaca (1982) avaliou 6 critérios fenotípicos, baseados na alongação da raiz seminal e no peso seco da raiz, e concluiu que o Comprimento Relativo da Raiz Seminal, ou CRRS (comprimento final subtraído do comprimento inicial, dividido pelo comprimento inicial da raiz seminal), foi o mais indicado, por levar em consideração as diferenças de vigor entre os genótipos testados. Por outro lado, Prioli (1987) mostrou

que o Comprimento Líquido da Raiz Seminal (comprimento final menos o comprimento inicial) foi mais eficiente quando comparado ao CRRS.

### **2.3. Herança da tolerância à toxidez do Al**

Utilizando diferentes estratégias de avaliação, vários estudos têm sido realizados sobre a variabilidade e tipo de herança da tolerância ao Al tóxico em várias espécies. Para algumas culturas, como a cevada, alfafa e trigo, tem sido demonstrada a ocorrência de herança monogênica. Em trigo, que é uma das espécies mais estudadas, existe alguma controvérsia nos resultados mostrados na literatura. Além da herança monogênica (Kerridge e Kornstad 1968), alguns autores demonstraram que a tolerância ao Al trata-se de uma característica mais complexa (Camargo 1981; Ruiz-Torres e Carver 1992 e Bona et al. 1994). Segundo Craver e Ownby (1995), qualquer modelo genético proposto para um grupo de genótipos de trigo não se aplica necessariamente a outro, e nem tampouco ao mesmo grupo quando este é submetido a diferentes níveis de estresse de Al. A expressão pode ser alterada em diferentes "backgrounds" e possivelmente diferentes genes se expressam em diferentes níveis de toxidez.

Vários trabalhos têm demonstrado que em trigo ocorre uma quebra gradual de dominância em função do aumento da concentração do Al na solução nutritiva (Camargo 1981; Ruiz-Torres e Carver 1992, Bona et al. 1994).

Em milho, grande esforço tem sido empreendido no sentido de elucidar a base genética da tolerância ao Al. No entanto, os resultados relatados na literatura são muito conflitantes, não permitindo a definição de um modelo genético único.

Rhue et al (1978) avaliaram linhagens de milho tolerantes e suscetíveis ao Al, seus  $F_1$ ,  $F_2$  e retrocruzamentos (RC) em solução nutritiva com Al tóxico. Os híbridos  $F_1$  exibiram tolerância ao Al igual ou superior à apresentada pelos pais mais tolerantes, o que indicou ser um fenótipo dominante. Baseando-se na avaliação visual do comprimento da raiz, os  $F_2$  e RC segregaram na razão de 3:1 e 1:1 respectivamente, para tolerantes e suscetíveis, não aparecendo tipos intermediários. De acordo com os



resultados, os autores sugeriram que uma série alélica seria responsável pela tolerância ao AI em milho.

Garcia e Silva (1979), utilizando areia lavada e irrigada com solução de AI, concluíram que a herança da tolerância é monogênica e dominante.

Outros trabalhos têm mostrado que a herança da tolerância ao AI é de natureza complexa. Magnavaca et al. (1987) estudaram a herança da tolerância ao AI analisando 6 gerações (Parental 1, Parental 2, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, RC<sub>1</sub> e RC<sub>2</sub>), provenientes de cruzamentos entre linhagens de milho tolerantes e suscetíveis, avaliando o CRRS das plantas em solução nutritiva. A distribuição de frequência da geração F<sub>2</sub> foi contínua, unimodal, característica de um caráter herdado quantitativamente, e com alguma tendência da suscetibilidade ser dominante sobre a tolerância. Os efeitos genéticos aditivos contribuíram com a maior parte da variância genética, e os efeitos de dominância equivaleram à metade dos efeitos aditivos. A epistasia do tipo aditiva contribuiu muito pouco em comparação com os efeitos aditivos e dominantes. Porém, nos cruzamentos entre as linhagens suscetíveis, os efeitos genéticos de dominância explicaram a maior parte da variação, seguidos, em ordem, pelos efeitos de epistasia (dominante por dominante explicou a maior parte da variância epistática) e aditivos. Este mesmo autor analisou 8 linhagens parentais e seus 28 híbridos simples em um cruzamento dialélico. A Capacidade Geral de Combinação (CGC) explicou a maior parte da variação para o CRRS, sendo a Capacidade Específica de Combinação (CEC) igualmente significativa. Deste modo, houve tanto a ocorrência de interação aditiva quanto de dominância.

Sawasaky e Furlani (1988) avaliaram as linhagens Ip 48-5-3 (milho cateto) e Col 2(22) (milho duro da Colômbia) e as gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e RC, utilizando solução nutritiva com AI tóxico. O critério de avaliação da tolerância ao AI foi o comprimento inicial da raiz subtraído do comprimento final. O híbrido F<sub>1</sub> teve comportamento intermediário em relação aos pais, e a distribuição da geração F<sub>2</sub> foi contínua e unimodal, típica de um caráter quantitativo. Estes autores concluíram que no mínimo estiveram envolvidos três genes e os efeitos genéticos aditivos foram responsáveis pela maior parte da herança da tolerância ao AI, embora a curva de distribuição de frequência em F<sub>2</sub> evidenciasse a presença de genes de efeito dominante.

Prioli (1987), estudando uma população  $F_2$  em solução nutritiva, verificou que a distribuição fenotípica dos valores dos critérios baseados na alongação de raiz, nesta população, era contínua e unimodal, sugerindo tratar-se de herança quantitativa. No entanto, a estimativa do número de locos variou de 1 a 3, com valores de herdabilidade no sentido amplo variando de 0,89 a 0,95, e no sentido restrito variando de 0,61 a 0,86. Dessa forma, o autor considera que apesar da natureza quantitativa do caráter, poucos genes devem estar envolvidos no seu controle. Neste trabalho também houve variação na magnitude da dominância e no número de genes à medida que o nível de AI na solução era aumentado. Assim como no trigo, parece haver uma forte interação do genótipo com o nível de estresse.

#### **2.4. Marcadores moleculares no estudo de QTL's**

A grande maioria das características de interesse agrônômico é de natureza quantitativa, ou seja, é controlada por muitos genes, fortemente influenciadas pelo ambiente e portanto de difícil estudo e manipulação. Os genes que controlam estes caracteres herdados quantitativamente são também conhecidos por "Quantitative Trait Loci" ou simplesmente QTL (Kochert 1989).

Sax (1923) reportou pela primeira vez a possibilidade de se entender caracteres quantitativos em seus componentes individuais, quando encontrou associação entre a segregação para tamanho de grão e cor do grão em feijão. A partir de então vários trabalhos utilizando marcadores morfológicos e citogenéticos foram feitos na tentativa de se entender melhor o controle de características quantitativas. O número relativamente pequeno de marcadores disponíveis dificultou a obtenção de resultados, mas propiciou o desenvolvimento de uma base teórica bastante sólida para a utilização de marcas genéticas de herança simples no estudo de características complexas (Dudley, 1993).

Os marcadores moleculares surgiram como uma metodologia alternativa para identificação e manipulação de genes de interesse em programas de melhoramento. Os primeiros marcadores moleculares utilizados foram as isoenzimas, as quais têm a vantagem de fornecer respostas rápidas e baratas. Porém são de uso

limitado devido ao pequeno número de locos disponíveis para a análise, ao baixo polimorfismo detectado, à influência do ambiente na atividade isoenzimática e à dependência do estágio de desenvolvimento da planta. Posteriormente surgiram os marcadores de DNA, que detectam diferenças na informação genética entre indivíduos (Helentjaris, 1992).

O marcador do tipo RFLP - "Restriction Fragment Length Polymorphism" - ou polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição foi o primeiro marcador de DNA desenvolvido pela Biologia Molecular e constitui um dos principais marcadores disponíveis. É obtido através de diferenças no peso molecular de fragmentos de DNA genômico digeridos por enzimas de restrição. Estas enzimas reconhecem sítios específicos (normalmente compostos por 4 a 6 pares de base) que ocorrem em todo o genoma de um indivíduo, efetuando cortes que originam fragmentos de diferentes tamanhos. Estes fragmentos são separados por eletroforese, desnaturados para gerar fitas simples de DNA, e em seguida transferidos para uma matriz sólida (membrana de nylon ou nitrocelulose). Esta membrana é colocada em contato com sondas (genômicas ou cDNA) marcadas que hibridam apenas onde encontram homologia. A marcação permite a visualização do polimorfismo por reação de colorimetria ou luminescência. A base genética do polimorfismo obtido nas análises de RFLP resulta de mutações nos sítios de restrição ou de inserções, deleções e rearranjos entre estes sítios (Beckmann e Soller 1986).

A técnica de RFLP possui algumas vantagens, tais como: o número de locos RFLP é praticamente ilimitado; as sondas detectam polimorfismo em todos os estádios da planta; produz alto grau de polimorfismo; a expressão fenotípica é co-dominante, possibilitando diferenciar os homozigotos dos heterozigotos; e os polimorfismos não são afetados pelo ambiente (Ferreira e Grattapaglia 1995). Por outro lado, possui como desvantagens o alto custo e a complexidade das metodologias, o que vem sendo sucessivamente superado com adaptações como, por exemplo, a marcação das sondas com o uso do sistemas não radioativos.

A marcação das sondas de DNA constituía uma das maiores limitações ao uso do RFLP em larga escala, pois exigia o uso de elemento radioativo ( $P^{32}$ ). Este radioisótopo é altamente instável, de difícil manipulação e fornece alto risco à saúde. Devido a estas dificuldades, voltou-se grande atenção ao desenvolvimento de

metodologias de marcação não radioativa. Nestas metodologias o DNA é marcado com substâncias que possuem um "anticorpo" bem caracterizado. Este anticorpo é conjugado a enzimas como a peroxidase ou fosfatase alcalina, as quais têm a capacidade de converter substratos em precipitados coloridos ou degradá-los, provocando emissão de luz. A eficiência da marcação reside na qualidade dos padrões de bandas obtidos e na viabilização do reaproveitamento da membrana. Assim, os processos que envolvem luminescência são mais apropriados que os colorimétricos (Kreike, Koning e Krens 1990).

O primeiro sistema de marcação não radioativa desenvolvido utilizava marcação com biotina. No entanto, este sistema apresentou baixa sensibilidade (Macedo, Medeiros e Pena 1989). O sistema de marcação com digoxigenina, utilizando como substrato o AMPPD, apresentou resolução semelhante à obtida com marcação radioativa e ainda permitiu a reutilização das membranas por várias vezes após a remoção das sondas, sem prejuízo para a qualidade dos resultados (Kreike, Koning e Krens 1990).

Novas classes de marcadores moleculares de DNA têm sido desenvolvidas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), onde se destacam o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e polimorfismos baseados em locos hipervariáveis de microssatélites. As metodologias, vantagens e limitações destas técnicas foram descritas por Ferreira e Grattapaglia (1995).

O estudo de caracteres quantitativos com o uso de marcadores moleculares exigiu o desenvolvimento de metodologias próprias para detecção dos QTLs. A identificação de ligação depende da presença de desequilíbrio de ligação entre as marcas e os alelos do gene em estudo. Para maximizar tal desequilíbrio utilizam-se, normalmente, populações segregantes provenientes do cruzamento entre linhagens geneticamente divergentes para a característica de interesse. As populações mais usadas para este fim são gerações  $F_2$ ,  $F_3$ , e de retrocruzamento. Em espécies que toleram alto grau de endogamia, podem ser usadas linhagens recombinantes provenientes de populações  $F_2$ . Estas últimas, apesar do menor desequilíbrio de ligação, possuem a vantagem de permitirem o uso de repetições e portanto uma mensuração mais eficaz da característica em estudo (Tanksley, 1993). Além do tipo de

população, a eficiência do uso de marcadores moleculares para a detecção de um QTL depende da magnitude do efeito do QTL na expressão do caráter, do tamanho da população em estudo e da frequência de recombinação entre o marcador e o QTL (Tanksley et al. 1989).

A detecção de QTLs relativos a uma certa característica pode ser realizada através de técnicas variadas. Para marcadores codominantes como o RFLP, três genótipos podem ser obtidos. O contraste entre os homozigotos estima o efeito aditivo de um eventual QTL que esteja ligado à sonda (Edwards, Stuber e Wendel, 1987). A variação existente entre indivíduos (ou progênies) de mesmo genótipo permite que se teste se tal contraste é significativamente diferente de zero. Já o contraste entre a média dos heterozigotos com a dos homozigotos permite detectar desvios de dominância.

Embora a técnica descrita acima possa ser aplicada a uma marca de cada vez, a análise simultânea de marcas pode aumentar a eficiência de detecção de QTLs, em especial quando elas encontram-se relativamente distantes umas das outras, acima de 20 cM (Tanksley, 1993). Nessas situações, um QTL que é flanqueado por duas marcas pode ser melhor detectado quando estas são levadas em conta simultaneamente. Lander e Botstein (1989) desenvolveram uma metodologia que permite testar a hipótese de que não existe um QTL afetando a característica ao longo do braço cromossômico. Eles se valeram de um modelo que combina a informação das várias marcas, e, rejeitando tal hipótese, é possível estimar, pelo método da máxima verossimilhança, o efeito do eventual QTL e ainda sua posição no mapa de ligação.

Outra possibilidade de reunir a informação das várias marcas consiste no uso de modelos de regressão múltipla, utilizando parâmetros de regressão associados às diversas marcas, como fizeram, entre outros, Reiter et al (1991). Nesse caso, é conveniente o uso de alguma estratégia de seleção de modelos de regressão, como os métodos de 'Backward', 'Forward' ou 'Stepwise' (Draper e Smith, 1966), para evitar que certas marcas forneçam informação redundante acerca de um mesmo QTL.

Vários caracteres quantitativos têm sido estudados com sucesso utilizando diferentes tipos de marcadores moleculares e estratégias. Nienhuis et al (1987) estudaram a associação de locos de RFLP com QTLs associados à resistência a insetos presente em espécies selvagens de tomate, a qual é devida à síntese de 2-

tridecanona (2TD). Uma população  $F_2$  com 900 indivíduos provenientes do cruzamento *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* var. *glabratum* (espécie selvagem) foi avaliada, tendo sido detectada associação entre pelo menos 3 locos de RFLP e diferentes teores de 2TD.

Edwards et al. (1992) utilizaram 98 sondas e 11 isoenzimas para o estudo de 18 caracteres quantitativos em milho, a partir de 187 plantas  $F_2$  do cruzamento entre as linhagens CO 159 e Tx 303. Observou-se que algumas regiões genômicas influenciaram o crescimento da planta no estágio inicial de desenvolvimento, outras em estágio mais avançado e outras em ambos. De modo semelhante, os QTLs para produção de grãos também apresentaram expressão diferenciada, com alguns locos afetando um caráter simples relacionado com a produção, como o número de fileiras de grãos na espiga, e outros afetando vários caracteres relacionados com a produção de grãos, simultaneamente. Dezoito regiões cromossômicas foram relacionadas com a altura de plantas e doze regiões com a produção de grãos. Segundo os autores, o número de marcadores utilizados foi suficiente para cobrir o genoma do milho e detectar a maioria dos locos com efeitos de genes maiores.

Reiter et al (1991) utilizaram 93 sondas distribuídas nos 10 cromossomos do milho para estudar a tolerância à deficiência de fósforo em 90 indivíduos  $F_2$  do cruzamento entre as linhagens NY821 e H99, comparando o peso seco de raiz e peso seco de parte aérea de famílias  $F_3$ . Cinco locos de RFLP, distribuídos em quatro cromossomos, foram associados com os caracteres medidos. Um loco, ligado à sonda UMC 117 (cromossomo 8), estava fortemente relacionado com peso seco de raiz enquanto que um segundo, UMC 19 (cromossomo 4), estava fortemente relacionado ao peso seco da parte aérea. Os restantes influenciaram igualmente as duas características. Um modelo de regressão múltipla com 3 dos 5 locos e uma interação epistática (aditiva por aditiva) explicou 46% da variação fenotípica total.

Diers et al. (1992) objetivando a detecção de locos controladores dos teores de óleo e proteína em sementes de soja, construíram um mapa saturado de RFLP, contendo 252 marcas distribuídas em 31 grupos de ligação. Plantas  $F_2$  obtidas a partir do cruzamento entre uma linhagem de *Glycine max* e outra de *Glycine soja* foram avaliadas com relação a estas características e às marcas, o que possibilitou a

detecção de 8 e 9 marcas associadas aos teores de óleo e proteína, respectivamente. A proporção da variação total explicada por elas variou de 12 a 43%.

Para aumentar a eficiência da identificação de marcadores ligados a QTLs relativos à característica de interesse, Michelmore, Paran e Kesseli (1991) desenvolveram um método denominado "Bulked Segregant Analysis" (BSA). O método consiste na comparação de dois bulks de DNA de indivíduos extremos de uma população segregante, originada do cruzamento entre pais contrastantes para o caráter em questão. Desta forma, espera-se que cada bulk contenha indivíduos geneticamente idênticos para regiões cromossômicas envolvidas no controle do caráter, e altamente heterozigotos para as demais. Esta metodologia é aplicável tanto para uso de marcadores do tipo RFLP como RAPD. Os autores avaliaram a sensibilidade da metodologia na detecção de locos controladores de características de interesse e verificaram que todos os marcadores distantes até 15 cM do loco foram capazes de detectá-lo, e sugerem que a distância limite seja aproximadamente 25 cM. Utilizando esta metodologia, os autores identificaram três marcas de RAPD ligadas ao loco Dm5, que confere resistência ao míldio em alface, mostrando ser a "BSA" uma metodologia bastante eficiente e vantajosa para mapear genes de interesse. Os autores consideram ainda que esta estratégia possa ser estendida a análises de caracteres mais complexos, permitindo a identificação rápida de marcas ligadas a QTLs.

Devido à maior praticidade e rapidez oferecidas pela Análise de Segregantes em Bulk, Wang e Paterson (1994) avaliaram, através de simulação, a eficiência desta estratégia na detecção de QTLs. Os autores levaram em consideração o tipo de população a ser usada para obtenção dos bulks ( $F_2$ , retrocruzamento, linhagens recombinantes e duplo-haplóides); a magnitude do efeito dos QTLs e o tamanho da população. As estimativas obtidas mostraram que QTLs de efeito pronunciado podem ser detectados utilizando-se qualquer tipo de população, sendo que a menos indicada para este fim seria a população  $F_2$ . Uma medida importante para o sucesso da metodologia é a construção de bulks com grande número de indivíduos, visando a minimização dos resultados falso-positivos e falso-negativos resultantes da contaminação dos bulks com indivíduos heterozigotos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Análise Fenotípica**

##### **3.1.1 Material genético**

Foi utilizada uma população  $F_2$ , segregante para o caráter tolerância ao AI tóxico, obtida a partir do cruzamento das linhagens L53, suscetível ao AI e L1327 (Cat AI 237/67) originadas respectivamente da população CMS 11 (Pool 21 do CIMMYT - Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo) e da variedade Cateto Água Limpa, tolerante ao AI. Ambas foram desenvolvidas no Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo - CNPMS /EMBRAPA e são resultantes de mais de 10 ciclos de autofecundação. Através de polinização controlada foi feito o cruzamento entre estas linhagens obtendo-se o híbrido  $F_1$  e este por autopolinização originou a população  $F_2$ .

Outros materiais genéticos, também desenvolvidos no CNPMS, de comportamento conhecido em relação à tolerância ao AI tóxico foram utilizados como testemunhas nos ensaios. Como referência de tolerância foram utilizadas a variedade CMS 36, obtida a partir de genótipos tolerantes a solos ácidos, e o híbrido duplo BR 201. Como referência de suscetibilidade foram usadas as linhagens L19 e L726 (material moderadamente suscetível), originadas respectivamente da população BR 106 advinda de um germoplasma Tuxpeño e da população BR 105 obtida de uma população tailandesa Swan-1.



### 3.1.2 Avaliação em solução nutritiva

Várias metodologias de avaliação da tolerância ao Al tóxico têm sido descritas na literatura, utilizando solução nutritiva e solo (vasos e campo) (Howeler, 1991). Neste trabalho, o ensaio em solução nutritiva constituiu a melhor opção uma vez que as condições controladas do ensaio permitiram isolar o efeito tóxico do Al dos demais efeitos adversos do complexo acidez do solo.

Os ensaios de avaliação da tolerância ao Al tóxico foram realizados em solução nutritiva conforme metodologia descrita por Magnavaca (1982), utilizando como critério fenotípico o Comprimento Relativo da Raiz Seminal - CRRS.

As sementes dos materiais genéticos avaliados foram colocadas para germinar em rolos de papel de germinação (GERMILAB) umedecidos com água destilada. Estes rolos de papel foram colocados verticalmente em vasos plásticos perfurados e estes por sua vez foram levados para casa de vegetação e mantidos em recipientes contendo água destilada sob aeração contínua. Os vasos foram cobertos com plástico transparente com o objetivo de simular as condições de uma câmara úmida. Após o início do desenvolvimento da parte aérea o plástico era retirado.

No sétimo dia após o plantio as plântulas foram transferidas para solução nutritiva contendo 6 ppm alumínio fornecido na forma de  $KAl(SO_4)_2$ . A composição da solução utilizada Magnavaca (1982) encontra-se na tabela 1. A solução final foi preparada a partir das soluções estoque e água destilada com um dia de antecedência ao transplante. O pH inicial da solução foi 4,0, isto é, o valor indicado para propiciar estresse às plântulas, não necessitando portanto de ajustes. A solução foi então transferida para bandejas opacas com capacidade para 8 litros. Estas foram cobertas com placas de PVC contendo 49 orifícios (7 fileiras com 7 orifícios), onde as plântulas foram colocadas após medição da raiz seminal. As plântulas permaneceram em solução nutritiva sob aeração contínua por 7 dias. As raízes foram novamente medidas e recolocadas nas bandejas na mesma posição visando posterior transplante para o campo.

**TABELA 1 - Composição da solução nutritiva para crescimento de plântulas de milho (Magnavaca, 1982).**

Solução estoque				Solução nutritiva final				
Elem	Fonte	g/l	ml	mg elemento/l		Composição total		
				Cátion	Ânion	Elem	mg/l	µM
Ca	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	270	3,08	Ca:141, NH <sub>4</sub> -	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:98,6 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:18,2	Ca	141,1	3527
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33,8				K	90,1	2310
K	KCl	18,6	2,31	K:22,5 K:45,6 K:22,0	Cl:20,4 SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -S:18,7 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:7,9	Mg	20,8	855
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	44,0				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	152,0	10857
	KNO <sub>3</sub>	24,6				NH <sub>4</sub> <sup>-</sup> -N	18,2	1300
Mg	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	142,4	1,54	Mg:20,8	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:24,0	P	1,4	45
P	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,6	0,35	K:1,7	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :1,4	S	18,8	587
Fe	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	20,3	1,54	Fe:4,3	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N:3,3 HEDTA:0,26	B	0,27	25
	HEDTA	13,4				Fe	4,3	77
Micro			0,77			Mn	0,5	9,1
Mn	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2,34		Mn:1,5	Cl:0,65	Cu	0,04	0,63
B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,04			BO <sub>3</sub> -H:0,27	Mo	0,08	0,83
Zn	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,88		Zn:0,15	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -S:0,07	Zn	0,15	2,29
Cu	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,2		Cu:0,04	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -S:0,02	Na	0,04	1,74
Mo	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,26		Na:0,04	MoO <sub>4</sub> -M:0,08	HEDTA	20,06	75

Durante estes 7 dias o volume das bandejas foi completado com água destilada sempre que necessário.

As variáveis medidas e calculadas para avaliação da tolerância ao Al foram as seguintes:

- (a) CIRS - Comprimento Inicial da raiz seminal: medido em cada plântula quando da transferência para a solução nutritiva.
- (b) CFRS - Comprimento Final da Raiz Seminal: medido em cada plântula após os 7 dias de cultivo em solução nutritiva.
- (c) CLRS - Comprimento Líquido da Raiz Seminal: Valor obtido subtraindo do CFRS o valor do CIRS para cada plântula.
- (d) CRRS - Comprimento Relativo da Raiz Seminal: índice resultante da divisão do CLRS pelo CIRS.

### 3.1.3 Avaliação da população F<sub>2</sub>

Esta avaliação teve por objetivo selecionar indivíduos extremos da curva de distribuição dos valores de CRRS para construção dos bulks homozigotos.

A avaliação foi feita conforme metodologia descrita no item 3.1.2. Foram colocadas para germinar 3000 sementes F<sub>2</sub> e 300 sementes de cada linhagem parental (L 53 e L1327). Após sete dias foram transplantadas 1554 plântulas F<sub>2</sub> distribuídas em 37 bandejas. Em cada bandeja foram colocadas 3 plântulas de cada linhagem parental (L53 e L1327) como controle.

Os indivíduos extremos para tolerância e para susceptibilidade foram devidamente identificados, tiveram a parte aérea e a raiz podadas e foram transplantados para sacos plásticos contendo substrato para mudas. Os sacos plásticos foram transferidos para telado, onde permaneceram por uma semana

visando a aclimação das plantas para posterior transplante para o campo. Por ocasião do florescimento estes indivíduos foram autofecundados para obtenção de famílias  $F_3$ .

### 3.1.4 Avaliação das famílias $F_3$

As famílias  $F_3$  foram avaliadas em solução nutritiva conforme a metodologia descrita para avaliação da população  $F_2$ . Foram avaliadas 60 famílias sendo 30 proveniente de indivíduos  $F_2$  tolerantes e 30 proveniente de indivíduos  $F_2$  suscetíveis. As 60 famílias foram divididas em 2 ensaios, cada qual com 15 famílias tolerantes e 15 suscetíveis. Nos dois ensaios foram incluídos os tratamentos, L53, L1327,  $F_{1(53 \times 1327)}$ ; L726; BR 201 e CMS 36. Após as medições de raiz, as folhas das plântulas foram identificadas por família, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$ .

Em cada ensaio os 36 tratamentos, designados regulares, foram dispostos em 4 latices 3 por 3 triplos, com um tratamento comum. Cada bloco (bandeja) continha 3 tratamentos com 14 plantas cada e 7 plantas da testemunha comum L 19. Foi feita uma análise conjunta dos latices de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijl} = m + p_l + b_{jl} + t_{il} + t_{i'} + e_{ijl}$$

onde:

$Y_{ijl}$  = valor de CRRS do  $i$ -ésimo tratamento regular no  $j$ -ésimo bloco do  $l$ -ésimo látice.

$m$  = média geral da análise conjunta.

$p_l$  = efeito do  $l$ -ésimo látice; ( $l=1,2,\dots,4$ )

$b_{jl}$  = efeito do  $j$ -ésimo bloco no  $l$ -ésimo látice; ( $j = 9$ ).

$t_{il}$  = efeito do  $i$ -ésimo tratamento regular no  $l$ -ésimo látice; ( $i = 1,2,\dots,9$ ).

$t_{i'}$  = efeito do  $i'$ -ésimo tratamento comum; ( $i' = 1$ )

$e_{ij}$  = efeito aleatório do erro associado ao  $i$ -ésimo tratamento no  $j$ -ésimo bloco do  $i$ -ésimo látice.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software estatístico NTIA, versão 4.2, desenvolvido pelo CNPTIA/EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa Tecnológica em Informática para a Agricultura. A variância genética dentro de famílias  $F_3$  foram obtidas a partir da média ponderada das variâncias apresentadas em cada repetição. Estas últimas foram estimadas subtraindo-se da variância fenotípica do tratamento a variância ambiental dada pela linhagem L19 em cada bandeja.

### 3.1.5 Eficiência do CRRS

Para verificar a eficiência do índice CRRS como critério fenotípico medidor da tolerância ao AI tóxico foram feitas análises de regressão do CLRS (Crescimento Líquido da Raiz Seminal) em função do CIRS (Comprimento Inicial da Raiz Seminal) para o grupo de linhagens sabidamente suscetível (L19 e L53) e para o grupo de genótipos sabidamente tolerante (L1327 e CMS 36).

## 3.2 **Análise genética**

### 3.2.1 Análise de RFLP

As análises genéticas foram feitas utilizando a técnica de RFLP descrita por Brondani (1993), com algumas modificações.

### 3.2.1.1 Extração, Digestão do DNA e Southern Blot

O DNA foi extraído conforme o método descrito por Saghai-Marroof (1984). Uma alíquota foi submetida a eletroforese (50 V) em gel de agarose (0,8%) e através da visualização por luz ultravioleta do gel corado com brometo de etídio estimava-se a quantidade de DNA o qual foi estocado em TE (10 mM Tris pH 8,0 ; 1 mM EDTA) com concentração final de 1 µg/µl.

Cerca de 50 µg de DNA de cada material foi digerido com as enzimas de restrição Eco RI, Bam HI e Hind III, utilizando 2,5 unidades de enzima por µg de DNA, por pelo menos 18 horas a 37°C. A qualidade da digestão foi verificada de forma similar à descrita para quantificação. O material digerido foi então submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8%, submerso em tampão TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA), por uma noite a 18 mA.

Incubou-se o gel por uma hora sob agitação, em solução de desnaturação (0,4 M NaOH; 0,6 M NaCl) e em seguida por mais uma hora em solução de neutralização (0,5 M Tris pH 7,5 ; 1,5 M NaCl). O DNA foi transferido do gel para membrana de nylon (MSI Corporation) através de fluxo capilar na presença de tampão de transferência ( 1M acetato de amônio; 20 mM NaOH). Após cerca de 24 horas, a membrana foi lavada em SSC 2x (3 M NaCl; 0,3 M citrato de sódio) por 5 minutos, em SSPE 5x (NaCl; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; EDTA) por 10 minutos e colocada a 95°C por três horas para imobilizar o DNA na membrana.

### 3.2.1.2 Hibridação e Detecção

O sistema de marcação de sondas utilizado foi a marcação a frio com digoxigenina. A marcação se deu através de PCR (Polymerase Chain Reaction) em termociclador (Ericomp, inc.), utilizando nucleotídeos dUTP marcados com digoxigenina. Cada reação foi composta de tampão PCR 1x, 50µM dos dNTPs( dATP, dCTP, dGTP), 48,75 µM de dTTP, 1,25 µM de Dig-dUTP, 1,6 unidades da Taq-polimerase, 0,2 µM dos "primers" CV72 e CV76, 100 ng do plasmídeo pUC

19 contendo a sonda e água q.s.p. 100  $\mu$ l. Adicionou-se 75  $\mu$ l de óleo mineral ultrapuro e iniciou-se a reação de amplificação utilizando o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C por 1 minuto, 25 ciclos com três fases: 94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos e 72°C por 2 minutos e 1 ciclo a 72°C por 1 minuto. O óleo foi removido com 100  $\mu$ l de clorofórmio e 50  $\mu$ l de TE, sendo a mistura homogeneizada com centrifugação a 3000 rpm por 3 minutos. Para verificar a amplificação foi feita uma corrida de eletroforese em gel de agarose 0,8%. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizou-se o aparecimento do fragmento amplificado sob luz ultra-violeta e estimava-se a concentração visualmente através da comparação com padrões de concentração conhecida.

As membranas foram pré-hibridadas por duas horas em sacos de hibridação contendo solução de hibridação (SSC 5x, 0,1% reagente bloqueio, 0,1% sarcosil, 10% SDS). Após este período a solução foi trocada por uma nova solução de hibridação contendo a sonda previamente desnaturada na concentração de 80 ng/ml. A hibridação foi realizada a 65°C, sob agitação, por 18 horas.

Após a hibridação as membranas passaram por uma série de lavagens, sob agitação, na seguinte ordem:

1. Duas vezes em solução 0,15x SSC; 0,1% SDS, por 5 minutos à TA (Temperatura ambiente).
2. Duas vezes em solução 0,15x SSC; 0,1% SDS, por 30 minutos a 65° C.
3. Tampão 1 (0,01 M Tris pH 7,5; 0,15 M NaCl), por 5 minutos à TA.
4. Tampão 2 (0,01 M Tris pH 7,5; 0,15 M NaCl; 0,1% reagente de bloqueio) por 30 minutos.
5. Tampão 2 contendo o anticorpo contra digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Boheringer Mannheim) na concentração de 1  $\mu$ l para 15 ml de tampão 2, por 1 hora.
6. Duas vezes em tampão 2, por 15 minutos.
7. Duas vezes em tampão 1, por 15 minutos.
8. Tampão 3 (0,01M Tris pH 9,5; 0,1 M NaCl; 0,05M MgCl<sub>2</sub>) por 5 minutos.

Após estas lavagens aplicou-se às membranas solução do substrato AMPPD (Tropix Co.) na concentração de 10 µl/ml de tampão 3, em folders transparentes próprios para sistemas de detecção de DNA (Gibco BRL). Os folders foram colocados em contato com o filme de raio-x em câmara escura onde permaneceram por 18 horas. Os filmes foram imersos em solução de revelação (Kodak GBX developer), em solução fixadora (Kodak GBX fixer), lavados com água e secos à temperatura ambiente, obtendo-se assim as autoradiografias com os padrões de bandas de RFLP para análise.

Após a revelação do filme removeu-se a sonda que estava hibridada com o DNA presente nas membranas lavando-as com SSC 2x por 10 minutos à TA, em seguida com solução 0,2M NaOH; 0,1% SDS a 37° C por 10 minutos e por último em TE (Tris-EDTA), por 5 minutos. Quando não utilizadas após a remoção das sondas, as membranas foram armazenadas em TE a 4° C. As membranas foram reutilizadas de 3 a 5 vezes.

### 3.2.2 Seleção de Sondas

Paralelamente à análise fenotípica foi feita a seleção de combinações sonda:enzima capazes de gerar polimorfismo e discriminar as linhagens parentais contrastantes (L53 e L1327).

Para tal, as análises de RFLP foram feitas conforme a metodologia descrita no item 3.2.1, utilizando como fonte de DNA folhas liofilizadas das linhagens parentais e do híbrido resultante do cruzamento destas linhagens.

As sondas foram selecionadas de forma a cobrir todo o genoma do milho em intervalos de 30 cM, pois segundo Michelmore (1991) um marcador localizado a 25 cM do loco de interesse pode ser identificado na Análise de Segregantes em Bulk. Para alcançar esta cobertura foram testadas 113 sondas em combinação com as enzimas de restrição Eco RI, Bam HI e Hind III. Os padrões de bandas obtidos foram então avaliados quanto ao seu valor informativo, em função da capacidade de diferenciar as linhagens parentais contrastantes e na complexidade dos padrões, os quais foram classificados em



PS - Polimórfico Simples quando da presença de 1 a 2 bandas, PC - Polimórfico Complexo quando da presença de mais de 3 bandas e NP - Não Polimórfico.

### 3.2.3 Análise dos bulks de DNA

Os bulks tolerante e suscetível foram constituídos por 5 e 6 indivíduos, respectivamente. Considerando que um "pool" de indivíduos  $F_3$  tem, em média, a constituição genotípica semelhante à do indivíduo  $F_2$  que o originou, folhas de 28 plântulas de cada família  $F_3$  foram liofilizadas e misturadas. O DNA de cada constituinte do bulk foi extraído desta mistura homogênea. A quantificação dos DNAs extraídos se deu por meio de leitura em espectrofotômetro. Os DNAs foram então misturados de forma que no bulk gerado cada indivíduo contribuiu com igual quantidade de DNA.

Os bulks foram submetidos a análise de RFLP, conforme procedimento descrito no item 3.2.1, com 46 sondas classificadas como polimórficas simples e 8 classificadas como complexas.

Para verificar os genótipos dos indivíduos constituintes dos bulks com relação a estes locos polimórficos, estes foram analisados com as combinações sonda e enzima de restrição que distinguiram os bulks.

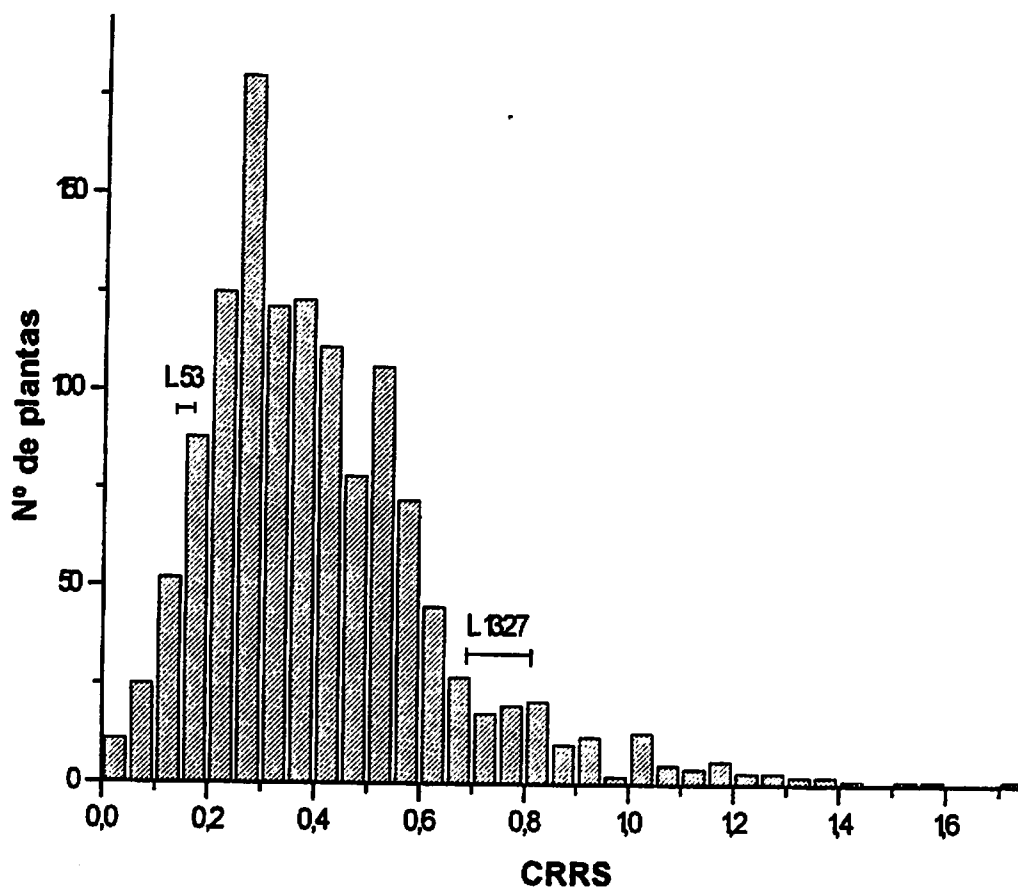
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação fenotípica da população F<sub>2</sub>

A distribuição de frequência dos valores de CRRS apresentados pelos indivíduos F<sub>2</sub> foi contínua, unimodal, típica de caracteres quantitativos com alguma tendência para a suscetibilidade (figura 1). As médias das linhagens parentais L53 e L1327 foram respectivamente  $0,15 \pm 0,005$  e  $0,75 \pm 0,028$ . A população F<sub>2</sub> teve média de  $0,43 \pm 0,006$  e variância 0,058.

Houve diferenças entre os intervalos de variação do CRRS dos indivíduos F<sub>2</sub> de bandeja para bandeja, com amplitudes variando de 0,24 a 1,68. Devido a esta variação a seleção de indivíduos extremos foi feita por bandeja, tomando como critério o desempenho das linhagens parentais. Foram selecionados cerca de 300 indivíduos em cada extremo. Este número elevado foi eleito para garantir a obtenção de uma quantidade razoável de famílias F<sub>3</sub> visto que foi prevista a ocorrência de perdas no transplântio dos indivíduos F<sub>2</sub> e durante as polinizações.

A técnica de transplântio teve praticamente 100% de sucesso, no entanto ao longo do ciclo, algumas plantas morreram. Das plantas restantes obteve-se espigas de 102 famílias tolerantes e 76 famílias suscetíveis com sementes de boa qualidade e em quantidade suficiente.



**FIGURA 1** - Distribuição de frequência dos valores de CRRS obtidos na avaliação da população  $F_{2(53 \times 1327)}$  em solução nutritiva contendo alumínio tóxico. Intervalo de confiança com 95% de probabilidade:  $0,15 \pm 0,01$  e  $0,75 \pm 0,06$ , para as linhagens L53 e L1327 respectivamente.

## 4.2 Avaliação fenotípica das famílias F<sub>3</sub>

Das famílias F<sub>3</sub> obtidas selecionou-se 30 famílias suscetíveis com CRRS menor que 0,2 e 30 famílias tolerantes com CRRS maior que 0,6 para avaliação da homozigose. Este número foi considerado suficiente para selecionar pelo menos 10 indivíduos em cada extremo.

O resultado das análises de variância dos ensaios 1 e 2 estão apresentados na tabela 2. Nos dois ensaios houve diferenças significativas entre tratamentos. Por outro lado, o efeito de bandeja foi significativo apenas no ensaio 2, sendo que o quadrado médio de tratamento foi praticamente 10 vezes superior ao quadrado médio de bandeja. A média da linhagem controle nos ensaios 1 e 2 foi 0,34 e 0,31, respectivamente.

**TABELA 2** - Resumo da análise de variância dos ensaios 1 e 2 para avaliação de famílias F<sub>3</sub> em solução nutritiva contendo alumínio tóxico.

Fonte de variação	Ensaio 1		Ensaio 2	
	gl	QM	gl	QM
Bandeja	35	0,00710557 <sup>ns</sup>	35	0,00681105**
Tratamento	36	0,15248892**	36	0,10430988**
CV%	14,0%		11%	

\*\* significativo ao nível de 1% pelo teste de F; <sup>ns</sup> não significativo.

Nas tabelas 3 e 4 estão as médias ajustadas e variâncias dos valores de CRRS das famílias F<sub>3</sub> avaliadas em solução nutritiva nos ensaios 1 e 2, respectivamente. Estes parâmetros foram estimados como indicadores da homozigose dos indivíduos F<sub>2</sub> visto que as famílias homozigotas para tolerância / suscetibilidade ao

alta média associada a pequena variância quando tolerantes. No ensaio 1 apesar do efeito significativo de tratamento as famílias  $F_3$  não apresentaram tolerância diferencial ao AI, sendo que, o grupo de famílias suscetíveis apresentou média similar ao grupo tolerante. No ensaio 1 o grupo suscetível apresentou média 0,68 e desvio padrão de 0,14 enquanto o grupo tolerante apresentou média 0,63 e desvio de 0,18. No ensaio 2 o grupo suscetível apresentou média 0,44 e desvio padrão de 0,17 e o tolerante apresentou média 0,61 e desvio padrão de 0,08. Estes resultados discrepantes nos ensaios 1 e 2 estão bem evidenciados na figura 2. Dessa forma, utilizou-se apenas os resultados do ensaio 2 para a seleção das famílias  $F_3$  presumivelmente homozigotas quanto à tolerância/suscetibilidade ao AI para construção dos bulks contrastantes. Foram selecionadas 6 famílias suscetíveis e 5 famílias tolerantes, as quais apresentaram pelo menos 0,5 de desvio padrão acima ou abaixo da média do grupo tolerante e suscetível, respectivamente e pequena variância. Estas famílias estão assinaladas em negrito na tabela 4. O fenótipo apresentado por estas famílias está exemplificado na figura 3.

A tabela 5 contém os resultados de média ajustada e variância dos valores de CRRS apresentados pelos materiais genéticos usados como controle. Apesar da diferença entre os resultados da avaliação das famílias  $F_3$  nos ensaios 1 e 2, o desempenho destes materiais usados como controle, cujo comportamento em relação à tolerância ao AI tóxico é conhecido, foi bastante similar nos 2 ensaios e coincidentes com o esperado (figura 4).

**TABELA 3** - Médias ajustadas e variâncias genéticas dos valores de CRRS apresentados pelas famílias  $F_{2(53 \times 1327)}:F_3$  avaliadas quanto a tolerância ao Al tóxico em solução nutritiva no ensaio 1. Famílias identificadas de 1 a 15 são suscetíveis e de 16 a 30 são tolerantes.

Família	Média	Variância <sup>1</sup>	Família	Média	Variância
$F_3$	(CRRS)	( $\times 10^3$ )	$F_3$	(CRRS)	( $\times 10^3$ )
1	0,4514	12,827	16	0,6977	9,825
2	0,9604	69,037	17	0,4548	18,258
3	0,6729	43,581	18	0,4763	40,571
4	0,5667	12,626	19	0,7740	9,692
5	0,6928	8,231	20	0,6851	15,834
6	0,8782	52,413	21	0,4834	0,000
7	0,6359	15,745	22	0,2925	3,392
8	0,6345	2,657	23	0,6574	9,234
9	0,7279	82,800	24	0,4848	3,330
10	0,8827	30,931	25	0,5547	3,819
11	0,6852	41,686	26	0,6789	3,792
12	0,6058	9,976	27	0,9612	59,290
13	0,6799	20,168	28	0,8897	37,574
14	0,6363	23,453	29	0,7868	55,415
15	0,5068	1,793	30	0,6417	7,471

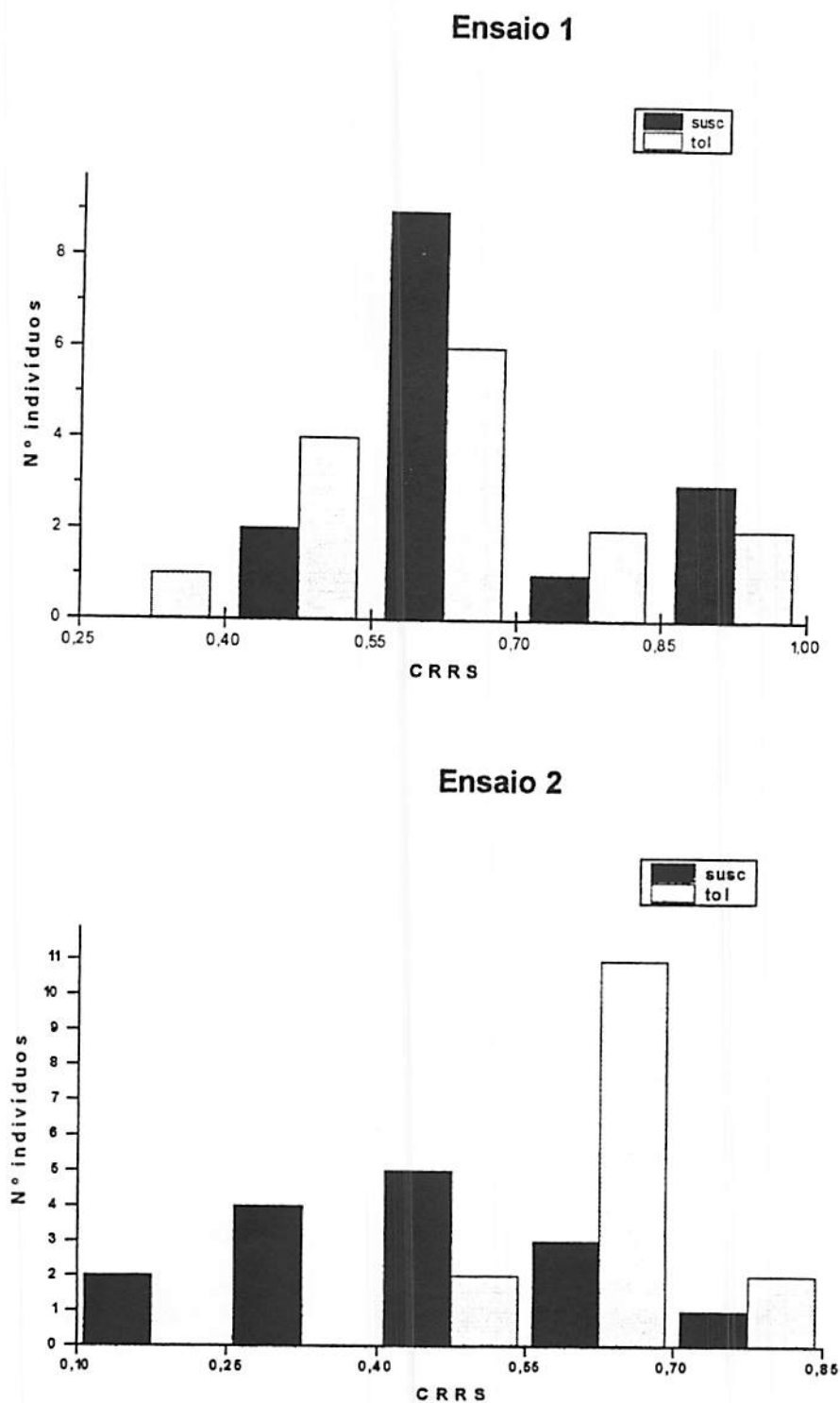
<sup>1</sup>  $\sigma^2_G = (n_1 - 1) \sigma^2_{G1} + (n_2 - 1) \sigma^2_{G2} + (n_3 - 1) \sigma^2_{G3} / (n_1 + n_2 + n_3 - 3)$ , onde  $n_1 = N^\circ$  de plantas na repetição 1;  $n_2 = N^\circ$  de plantas na repetição 2;  $n_3 = N^\circ$  de plantas na repetição 3,  $\sigma^2_{G1}, \sigma^2_{G2}, \sigma^2_{G3} =$  Variância genética nas repetições 1, 2 e 3.

**TABELA 4** - Médias ajustadas e variâncias genéticas dos valores de CRRS apresentados pelas famílias  $F_{2(53 \times 1327)}$ : $F_3$  avaliadas quanto a tolerância ao Al tóxico em solução nutritiva no ensaio 2. Famílias identificadas de 31 a 44 são suscetíveis e de 45 a 60 são tolerantes.

Família $F_3$	Média (CRRS)	Variância <sup>1</sup> ( $\times 10^3$ )	Família $F_3$	Média (CRRS)	Variância ( $\times 10^3$ )
<b>31<sup>S</sup></b>	<b>0,3536</b>	<b>9,470</b>	46	0,5814	15,126
<b>32<sup>S</sup></b>	<b>0,3290</b>	<b>14,021</b>	<b>47<sup>T</sup></b>	<b>0,6459</b>	<b>13,452</b>
33	0,6340	9,568	48	0,6152	10,109
34	0,4967	25,924	<b>49<sup>T</sup></b>	<b>0,6355</b>	<b>23,322</b>
35	0,6047	34,224	50	0,5431	17,189
<b>36<sup>S</sup></b>	<b>0,3441</b>	<b>7,836</b>	51	0,5517	39,269
37	0,4675	11,881	52	0,5517	8,041
38	0,4535	1,097	53	0,4606	44,184
39	0,4113	17,432	54	0,5789	21,952
<b>40<sup>S</sup></b>	<b>0,2461</b>	<b>4,304</b>	<b>55<sup>T</sup></b>	<b>0,6397</b>	<b>21,267</b>
<b>41<sup>S</sup></b>	<b>0,3261</b>	<b>13,342</b>	56	0,6166	45,824
42	0,7529	2,771	57	0,6052	6,969
43	0,4218	13,954	58	0,5993	16,475
<b>44<sup>S</sup></b>	<b>0,1206</b>	<b>2,319</b>	<b>59<sup>T</sup></b>	<b>0,7311</b>	<b>20,845</b>
45	0,6747	102,115	<b>60<sup>T</sup></b>	<b>0,7802</b>	<b>5,847</b>

<sup>1</sup>  $\sigma^2_G = (n_1 - 1) \sigma^2_{G1} + (n_2 - 1) \sigma^2_{G2} + (n_3 - 1) \sigma^2_{G3} / (n_1 + n_2 + n_3 - 3)$ , onde  $n_1 = N^\circ$  de plantas na repetição 1;  $n_2 = N^\circ$  de plantas na repetição 2;  $n_3 = N^\circ$  de plantas na repetição 3,  $\sigma^2_{G1}, \sigma^2_{G2}, \sigma^2_{G3} =$  Variância genética nas repetições 1, 2 e 3.

<sup>S</sup> família suscetível selecionada, <sup>T</sup> família tolerante selecionada.



**FIGURA 2.-** Distribuição de frequência dos valores de CRRS apresentados pelos grupos de famílias  $F_3$  suscetível e tolerante ao Al tóxico nos ensaios 1 e 2 de avaliação em solução nutritiva.





**FIGURA 3** - Contraste de comportamento do sistema radicular das famílias  $F_3$  não segregantes para tolerância/suscetibilidade ao Al tóxico após cultivo em solução nutritiva sem Al (à esquerda) e com Al (à direita). **(A)** Família  $F_3$  (41), suscetível e **(B)** Família  $F_3$  (60), tolerante.

**TABELA 5** - Médias ajustadas e variâncias genéticas dos valores de CRRS apresentados pelos tratamentos controle nos ensaios 1 e 2 de avaliação, em solução nutritiva, das famílias  $F_{2(53 \times 1327)}$ : $F_3$  quanto a tolerância ao Al tóxico.

Tratamento	Ensaio 1		Ensaio 2	
	Média	Variância x 10 <sup>3</sup>	Média	Variância x 10 <sup>3</sup>
L53 <sup>S</sup>	0,3430	3,035	0,1172	0,000
L1327 <sup>T</sup>	0,8338	21,160	0,8067	28,448
F <sub>1</sub> <sup>T</sup>	0,9960	24,033	0,6815	3,368
BR 201 <sup>T</sup>	0,3485	23,377	0,4080	7,852
CMS 36 <sup>T</sup>	0,7288	27,385	0,7139	0,238
L726 <sup>S</sup>	0,3707	12,395	0,2324	0,000
L19 <sup>S</sup>	0,3383	-	0,3054	-

<sup>T</sup> Genótipo tolerante; <sup>S</sup> Genótipo suscetível.

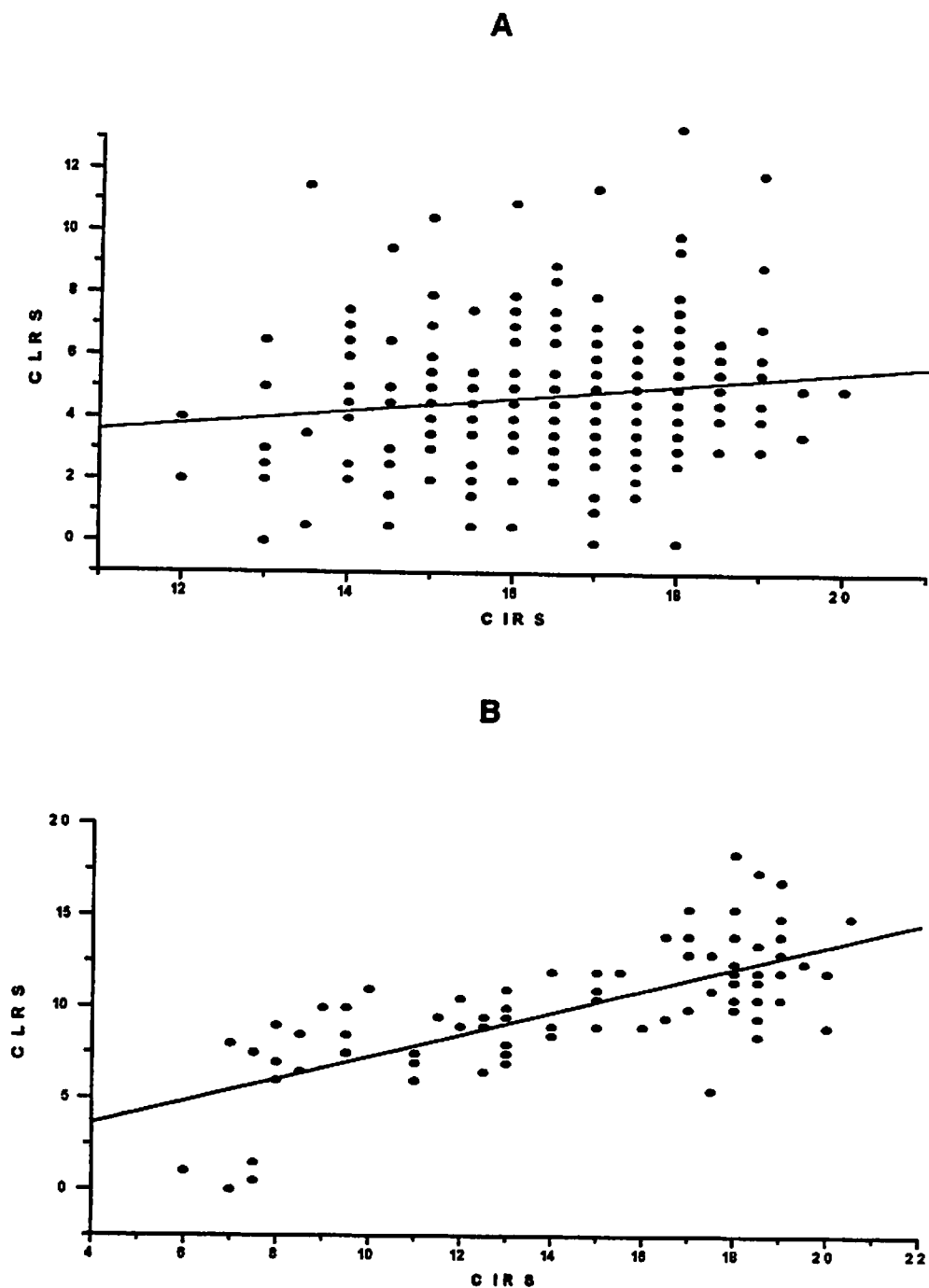




**FIGURA 4** - Contraste do comportamento do sistema radicular das testemunhas (L53, L1327, F<sub>1</sub>, BR 201, CMS 36, L 726 e L19) usadas nos ensaios 1 e 2 de avaliação, em solução nutritiva, das famílias F<sub>3</sub>. À esquerda, plântulas antes do cultivo em solução nutritiva; no centro, plântulas após cultivo em solução sem Al; à direita, plântulas após cultivo em solução com Al.

Em vista dos problemas enfrentados para diferenciar os genótipos quanto à suscetibilidade ao AI, foram feitas análises para verificar a eficiência do índice (CRRS) como medidor de tolerância. Uma das pressuposições assumidas para a construção deste índice é a consideração de que, para um mesmo grau de tolerância, à medida que as plântulas apresentam maior CIRS devem também apresentar maior CLRS. Para averiguar este pressuposto, tomou-se os dados dos tratamentos controle, sabidamente suscetíveis e tolerantes e procedeu-se uma análise de regressão linear do CLRS em função do CIRS para verificar que tipo de relação se estabelecia entre eles.

Os resultados apresentados na figura 5 mostram que tanto para os materiais suscetíveis como para os tolerantes houve uma tendência de aumento do CLRS em função do aumento do CIRS, no entanto, para o grupo suscetível o coeficiente de determinação da reta foi muito baixo, 2,2%, indicando que esta pressuposição não foi atendida totalmente. Para os materiais tolerantes o  $R^2$  foi bastante superior, 56,3%, indicando que neste caso o poder de discriminação do índice foi bem maior.



**FIGURA 5** - Relação entre o CLRS e o CIRS apresentados no 2º ensaio pelos tratamentos controle. **A-** Materiais suscetíveis, L19 e L53. Equação de regressão:  $Y = 1,13 + 0,22X$ ,  $R^2 = 2,2$  ( $P < 0,01$ ). **B-** Materiais tolerantes L1327 e CMS 36. Equação de regressão:  $Y = 1,21 + 0,61X$ ,  $R^2 = 56,3\%$  ( $P < 0,01$ ).

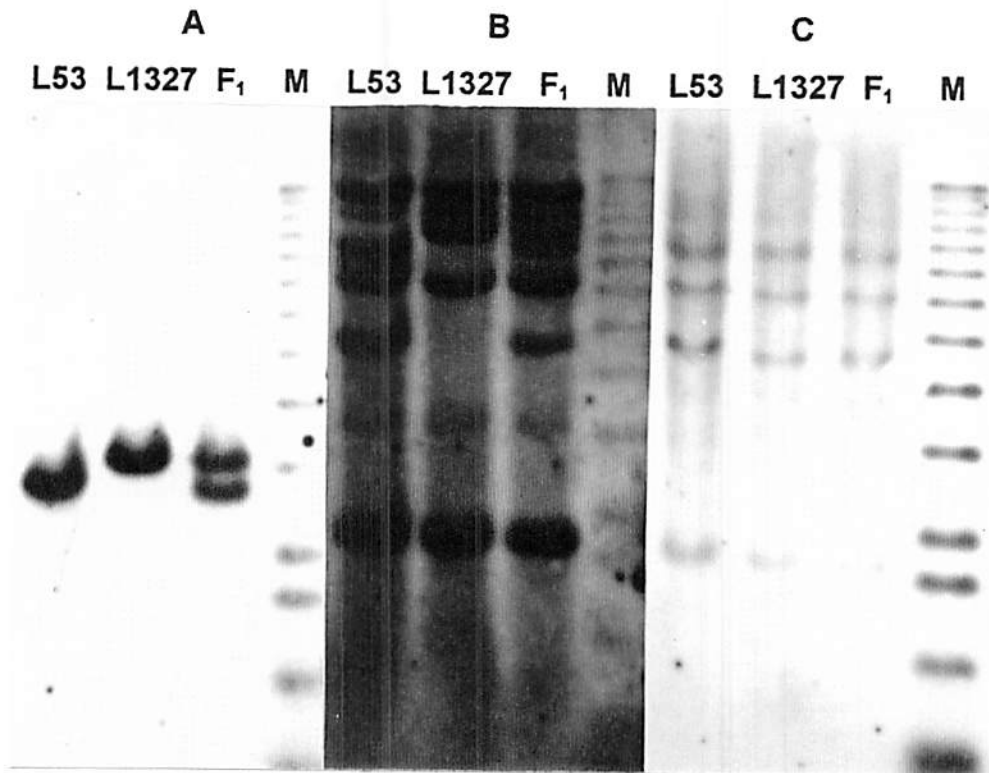
### **4.3 Seleção de sondas e análise dos bulks.**

Das 113 sondas testadas 46 foram capazes de diferenciar as linhagens parentais apresentando padrão do tipo Polimórfico Simples (PS) e 8 apresentaram padrão polimórfico complexo (PC) e 59 foram não polimórficas (NP). Das 54 sondas polimórficas, 26 (56%) apresentaram polimorfismo com mais de uma enzima de restrição, perfazendo um total de 73 locos de RFLP. Na figura 6 estão mostrados exemplos dos três tipos de padrão de classificação das sondas.

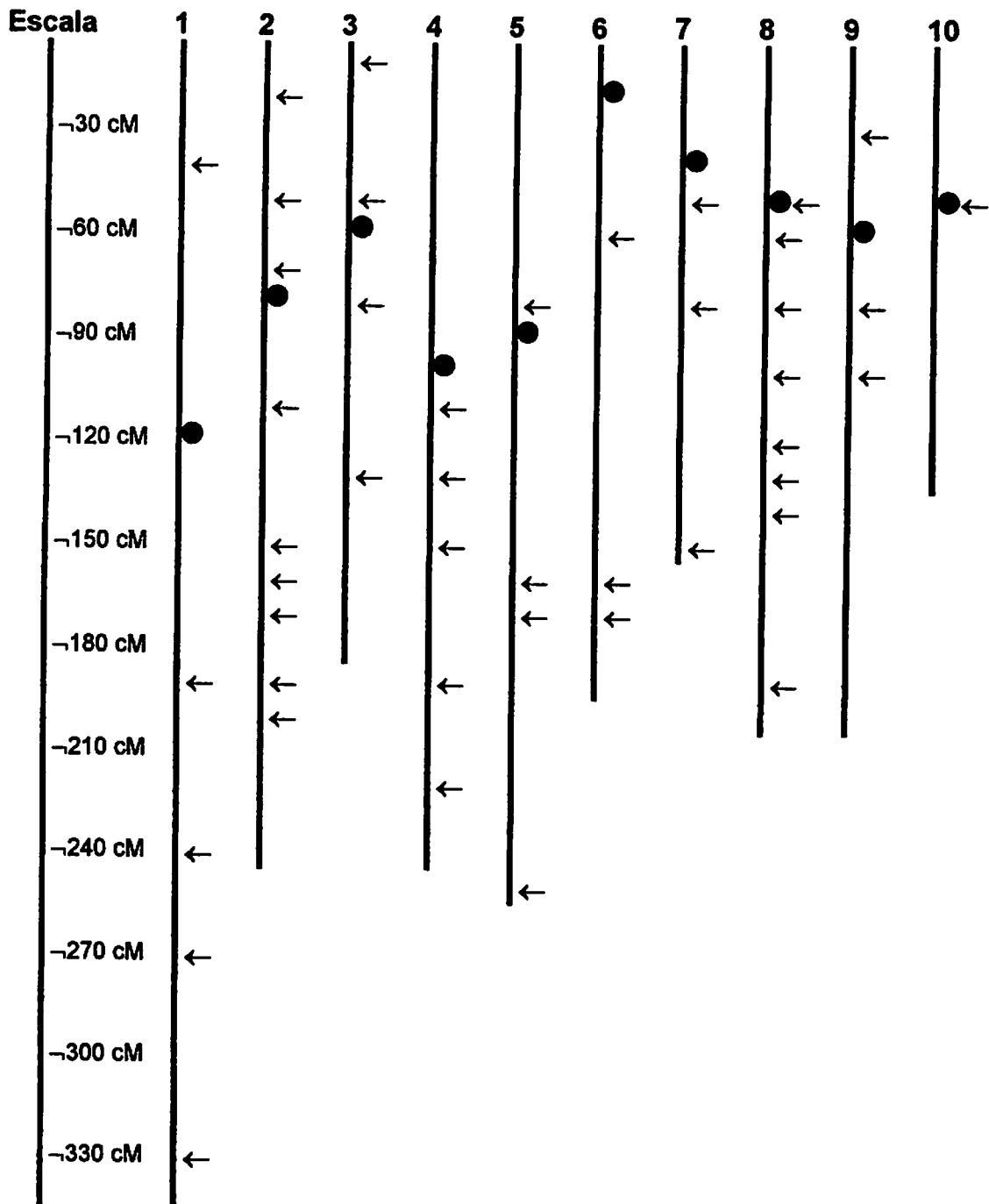
Com este número de sondas não foi possível obter a cobertura desejada em todos os cromossomos, permanecendo alguns intervalos maiores que 30 cM. A localização cromossômica das sondas polimórficas e a cobertura obtida estão esquematizadas na figura 7. Os resultados de todas as combinações sonda:enzima de restrição estão apresentados no Anexo.

Para análise dos bulks, foram usadas as sondas que apresentaram polimorfismo simples e complexo, sendo 26 em combinação com Hind III, 19 com Eco RI e 9 com Bam HI. As digestões dos bulks com Hind III e Bam HI não apresentaram resolução satisfatória o que dificultou a interpretação dos padrões obtidos. Portanto, obteve-se resultado apenas com as sondas utilizadas em combinação com a enzima de restrição Eco RI. Três sondas localizadas no cromossoma 8, UMC 48, CSU 155 e UMC 103, distinguiram os bulks tolerante e suscetível através de diferença de intensidade de bandas, ou seja, o bulk tolerante apresentou a(s) banda(s) do parental tolerante bem mais intensa que a(s) banda(s) do parental suscetível e vice-versa. Estes resultados, bem como a localização destas sondas (Chao et al. 1994) estão mostrados na figura 8.

As análises dos constituintes dos bulks individualmente, utilizando estas sondas, mostraram que alguns indivíduos apresentavam genótipo heterozigoto (figura 9, 10 e 11).

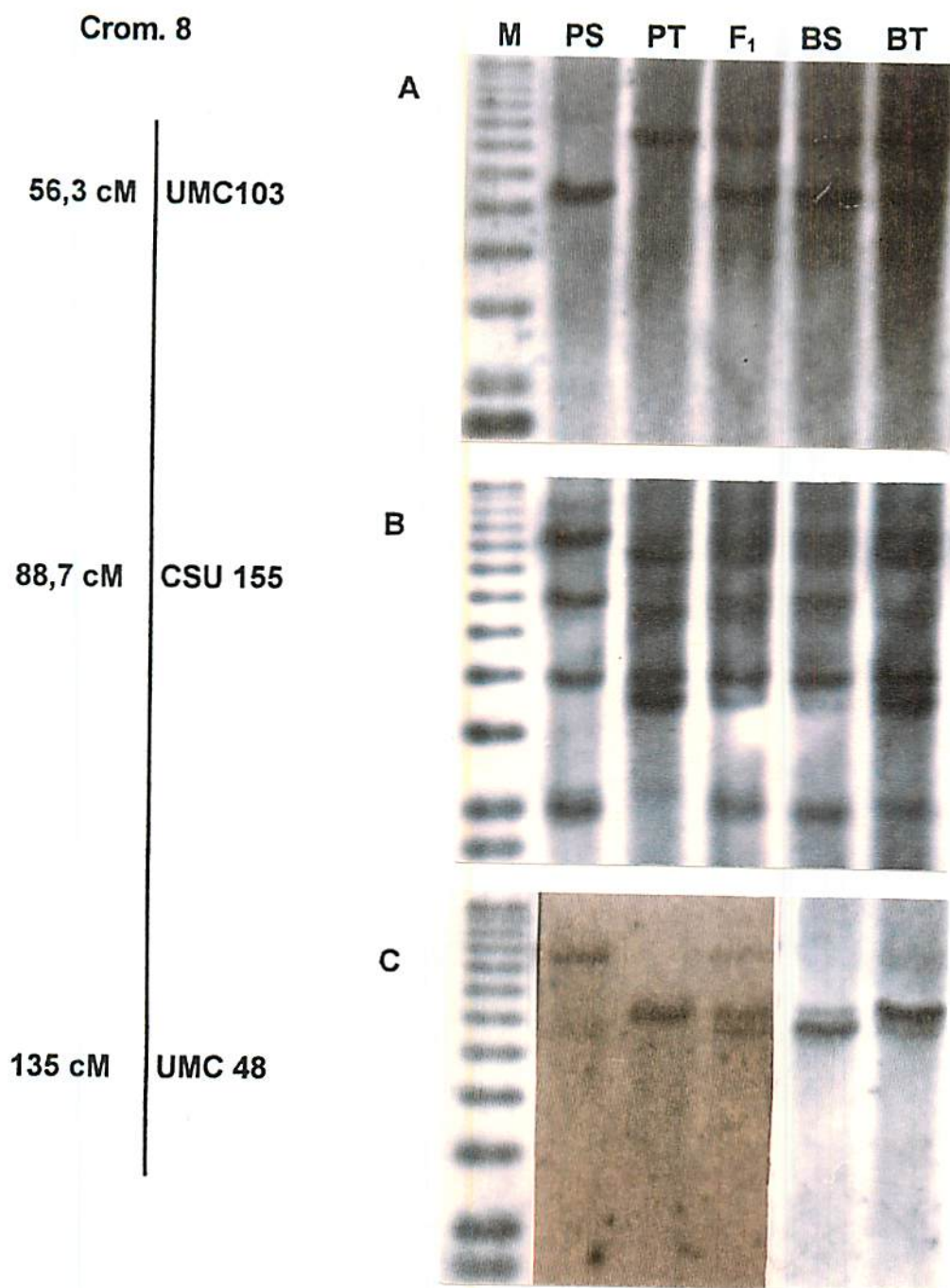


**FIGURA 6** - Tipos de padrões obtidos nas análises de RFLP para seleção de sondas polimórficas usando DNA das linhagens L53, L1327 e F<sub>1(53x1327)</sub>. **A** - Padrão polimórfico simples (UMC 43 x Hind III). **B**- Padrão polimórfico complexo (UMC 8 x Eco RI). **C**- Padrão não polimórfico (UMC 108 x Bam HI).

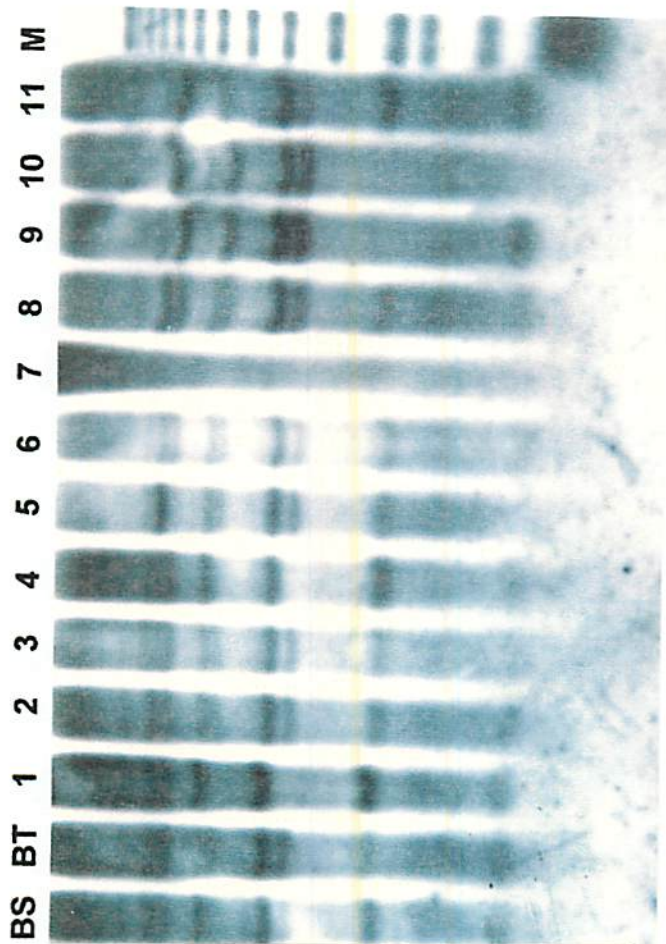


**FIGURA 7 -** Localização cromossômica das sondas genômicas e sondas de cDNA que foram polimórficas entre as linhagens parentais.

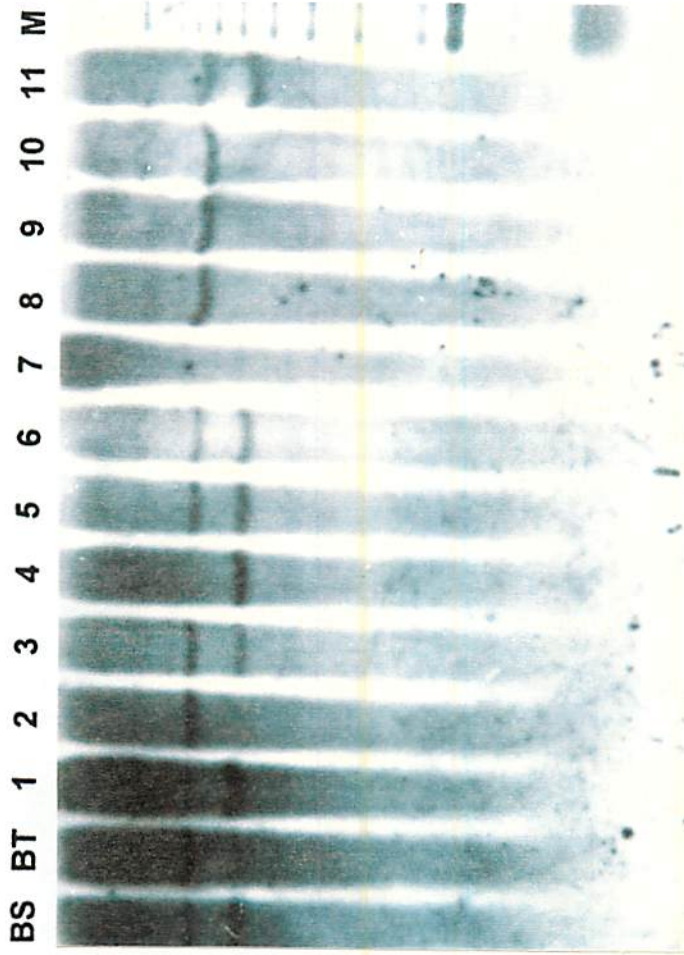




**FIGURA 8** - Identificação de polimorfismo entre bulks tolerante e suscetível ao Al tóxico. **PS** - Parental suscetível, L53; **PT** - Parental tolerante, L 1327; **F<sub>1</sub>** - Híbrido resultante do cruzamento das linhagens parentais; **BS** - Bulk suscetível; **BT** - Bulk tolerante. Todos os materiais foram digeridos com Eco RI. **A** Autoradiografia da hibridação com UMC 103; **B** Autoradiografia da hibridação com CSU 155. **C** Autoradiografia da hibridação com UMC 103.

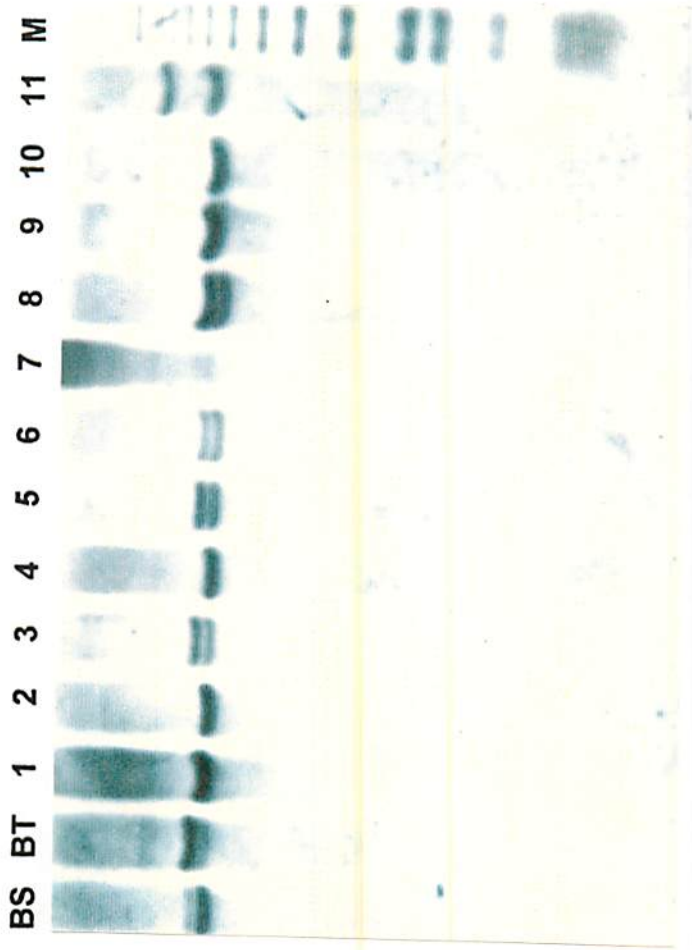


**FIGURA 9** - Padrão de bandas de RFLP dos bulks tolerante e suscetível e dos seus constituintes quando digeridos com Eco RI e hibridadas com CSU 155. **BS** - Bulk suscetível, **BT** - Bulk tolerante; **1 a 6** - indivíduos constituintes do bulk suscetível; **7 a 11** - indivíduos constituintes do bulk tolerante; **M** - marcador de peso molecular.



**FIGURA 10** - Padrão de bandas de RFLP dos bulks tolerante e suscetível e dos seus constituintes quando digeridos com Eco RI e hibridadas com UMC 103. **BS** - Bulk suscetível, **BT** - Bulk tolerante; **1 a 6** - indivíduos constituintes do bulk suscetível; **7 a 11** - indivíduos constituintes do bulk tolerante; **M** - marcador de peso molecular.





**FIGURA 11** - Padrão de bandas de RFLP dos bulks tolerante e suscetível e dos seus constituintes quando digeridos com Eco RI e hibridadas com UMC 48. **BS** - Bulk suscetível, **BT** - Bulk tolerante; **1 a 6** - indivíduos constituintes do bulk suscetível; **7 a 11** - indivíduos constituintes do bulk tolerante; **M** - marcador de peso molecular.



## 5 DISCUSSÃO

A análise fenotípica da população  $F_2$  mostrou que a tolerância ao AI tóxico, apesar de sua natureza quantitativa demonstrada pelo tipo de distribuição dos valores de CRRS (figura 1), não deve ser controlada por muitos genes, uma vez que o fenótipo das linhagens parentais foi recuperado e até mesmo superado pelos indivíduos extremos da população. Estes resultados concordam com o modelo proposto por Prioli (1987), onde genes maiores (1 a 3) seriam responsáveis pela tolerância ao AI tóxico em milho, e que estes seriam afetados por genes modificadores. Estes resultados indicam que a escolha da Análise de Segregantes em Bulk foi adequada, visto que esta metodologia é eficiente para detecção de QTLs quando se trata de caracteres menos complexos (Wang e Paterson 1994).

Nestes casos, a avaliação fenotípica assume importância crucial, pois a identificação de indivíduos extremos, homocigotos para os QTLs em estudo, é dificultada pela influência do ambiente na expressão do caráter em estudo e pela presença de diferentes combinações genotípicas capazes de conferir o mesmo fenótipo. No entanto, o critério fenotípico usado para avaliar a tolerância ao AI (CRRS) não se mostrou totalmente eficiente (figura 5). Os resultados da análise de regressão mostraram que a relação de proporcionalidade estabelecida pelo índice na realidade não ocorreu nas avaliações feitas neste trabalho, especialmente na medição de suscetibilidade. Prioli, em 1987, já havia comparado a eficiência do CRRS e do CLRS como medidores de tolerância e concluiu que o último era mais adequado, contrariando os resultados de Magnavaca (1982). Esta contradição de resultados deve estar relacionada ao fato de que o primeiro utilizou plântulas com comprimento inicial bem uniforme, o que eliminou o efeito do comprimento inicial no desenvolvimento da planta em solução. Já o segundo autor realizou o transplante sem se preocupar com

uniformidade de tamanho, mas sim com os dias de desenvolvimento que precederam o transplântio para a solução nutritiva.

Uma possível explicação para a ineficácia do CRRS detectada neste trabalho reside na própria fisiologia da raiz seminal, utilizada nas medições. Esta raiz tem crescimento determinado, perdendo a funcionalidade quando o sistema radicular se estabelece. Desta forma, a taxa de crescimento não deve continuar a mesma após a raiz atingir um certo tamanho. Em nossas avaliações, as raízes foram transplantadas para solução nutritiva com comprimentos que variaram de 8 a 24 cm. Assim, se esta hipótese for verdadeira, uma planta com genótipo tolerante que foi transplantada com CIRS maior pode apresentar o mesmo CRRS que uma planta de genótipo suscetível que apresentava CIRS pequeno. A uniformização do CIRS em valores pequenos, de no máximo de 10 cm, seria uma alternativa para aumentar a eficiência do uso de critérios baseados em alongação da raiz seminal. Neste caso, o próprio CLRS seria um bom medidor da tolerância, visto que já não seria necessário eliminar o efeito do comprimento inicial.

As condições climáticas não foram semelhantes nos dois ensaios. Durante o ensaio 1, houve nebulosidade e baixa temperatura enquanto no período de duração do ensaio 2 a luminosidade foi bem intensa e a temperatura bastante superior. Como não houve controle da temperatura e luminosidade dentro da casa de vegetação, estas variações devidas à variação climática podem estar relacionadas à discrepância de resultados. Na literatura existem relatos de alterações no estresse causado pelo alumínio em solução nutritiva provocadas por variações na temperatura (Pearson, Ratliff e Taylor 1970; Foy, Chaney e White 1978). Assim, o estresse propiciado às famílias no primeiro ensaio pode não ter sido suficiente para discriminar as famílias quanto à tolerância. No entanto, a possível variação do estresse parece não ter exercido influência direta na discrepância dos resultados, uma vez que as testemunhas apresentaram comportamentos similares nos dois ensaios e coincidentes com o esperado (figura 4). Além disso, a eficiência da metodologia de avaliação da tolerância em solução nutritiva tem sido comprovada em vários trabalhos (Magnavaca 1982, Furlani et al. 1986 e Lopes et al 1988).

Entretanto, pode ter ocorrido uma interação entre os genótipos avaliados e o nível de estresse. A existência desse tipo de interação foi verificada em alguns estudos

de herança da tolerância à toxidez de Al em milho e trigo (Camargo, 1981, Bona et al. 1994 e Prioli, 1987). A explicação para esta interação tem sido associada à expressão de diferentes genes envolvidos no controle do mecanismo de tolerância ou, até mesmo, à ativação de diferentes mecanismos de tolerância em função da variação nos níveis de Al da solução nutritiva. Assim, a ineficiência da avaliação das famílias  $F_3$  no primeiro ensaio pode ser resultado da interação entre os genótipos avaliados e o nível de estresse propiciado pela solução, ainda que as testemunhas tenham apresentado comportamentos consistentes nos dois ensaios.

Além dos componentes metodológicos discutidos, os quais prejudicaram a análise fenotípica e portanto a obtenção de bulks com o número desejado de indivíduos, há que se considerar a natureza do caráter em estudo. Considerando o modelo proposto por Prioli (1987), citado anteriormente, os genes de efeito pronunciado sofreriam a ação de genes modificadores. A segregação destes genes nas famílias  $F_3$  pode ter sido responsável pela manifestação fenotípica inesperada, dificultando a identificação de indivíduos homocigotos. Isto sugere que em avaliações futuras seja usado um número maior de indivíduos  $F_2$  e de famílias  $F_3$  ou ainda que se opte por outro tipo de população segregante (retrocruzamento ou linhagens recombinantes) para obtenção dos indivíduos que componham os bulks contrastantes.

Apesar dos obstáculos encontrados nas avaliações fenotípicas, as análises dos bulks conseguiram identificar polimorfismo entre os mesmos, quando foram utilizadas três sondas (UMC 48, UMC 103 e CSU 155) localizadas no cromossoma 8 (figura 8). O polimorfismo se deu apenas por diferença de intensidade de bandas, o que pode ser explicado tanto pela distância da região onde a sonda hibrida em relação à região de interesse (acarretando recombinação), como pela presença de indivíduos heterocigotos no bulk. A análise dos constituintes do bulk individualmente, utilizando estas mesmas sondas, indicou que 4 dos 6 indivíduos suscetíveis eram heterocigotos, e para os tolerantes 2 em 4 também o eram, mostrando que a segunda explicação é a mais plausível.

A contaminação dos bulks com indivíduos heterocigotos, associada ao pequeno número de indivíduos que constituíram os bulks, a princípio diminuiriam as chances de que o polimorfismo tenha ocorrido entre a região onde a sonda hibrida e regiões envolvidas no controle da tolerância ao Al tóxico devido à ligação entre as

mesmas. No entanto, os resultados podem ser considerados promissores, visto que, em estudo anterior (dados não apresentados), com bulks construídos a partir da mesma população utilizada neste estudo, estas sondas já haviam identificado polimorfismo entre os mesmos, além de que neste trabalho o polimorfismo se manteve ao longo do cromossoma 8. Outra forte evidência de que no cromossoma 8 existe uma região envolvida no controle do desenvolvimento radicular, sob condições de estresse, são os resultados obtidos por Reiter et al. (1993) no estudo da ligação entre marcas de RFLP e genes de tolerância a baixo fósforo. Eles identificaram uma sonda neste cromossoma (UMC 117, próxima à sonda UMC 48) altamente correlacionada com peso seco de raiz.

Com o aperfeiçoamento da metodologia de avaliação fenotípica para tolerância ao Al, e o incremento da cobertura do genoma em intervalos inferiores a 30 cM, ligações com alguma região neste cromossoma provavelmente serão identificadas e confirmadas através de análise de segregação em população F<sub>2</sub>.

Neste trabalho ficou comprovado que a técnica de RFLP utilizando marcação a frio já está muito bem estabelecida, permitindo a obtenção de resultados consistentes, com alta eficiência e praticidade. Fica também evidenciada a importância de uma avaliação fenotípica bastante criteriosa e eficiente para o fornecimento de genótipos adequados para as análises moleculares.



## **6 CONCLUSÕES**

As análises dos bulks por meio de RFLP sugerem que no cromossoma 8 do milho deve haver uma região envolvida no controle da tolerância ao Al tóxico.

Para aumentar a eficiência das análises de RFLP para estudo da tolerância ao Al tóxico faz-se necessário o aperfeiçoamento da metodologia de avaliação fenotípica.

Deve-se procurar uma maior saturação do cromossoma 8 e a análise de uma população de indivíduos  $F_2$  para confirmação e localização do efeito do(s) QTL(s) em estudo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- AZEVEDO FILHO, J.A. **Potencialidade de cultivares de feijão para o melhoramento visando a tolerância às condições químicas de solos ácidos de baixa fertilidade.** Lavras: ESAL, 1989. 95p. (Tese - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BASU, A.; BASU, U.; TAYLOR, G.J. Induction of microsomal membrane proteins in roots of an aluminum-resistant cultivar of (*Triticum aestivum* L.) under conditions of aluminum stress. **Plant Physiology**, Washington, v.104, n.3, p.1007-1013, mar. 1991.
- BECKMANN, J.S. ; SOLLER, M. Restriction Fragment Length Polymorphism in Plant Genetic Improvement. **Oxford Surverys of Plant Molecular and Cell Biology**, Oxford, v.3, p.196-250, 1986.
- BENNET, R.J.; BREEN, C.M. The recovery of the roots of *Zea mays* L. from various aluminum treatments: towards elucidating the regulatory processes that underlie root growth control. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.31, n.2, p.153-163, 1991.
- BLAMEY, F.P.C; ROBINSON, N.J. ; ASHER, C.J. Interspecific differences in aluminum tolerance in relation to root cation-exchange capacity. **Plant and Soil**, Netherlands, v.146, n.1/2, p.77-82, Oct. 1992.
- BONA, L.; CARVER, B.F.; WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. Aluminum tolerance of segregating wheat populations in acidic soil and nutrient solutions. **Communications in Soil Science and Plant. Analysis**, New York, v.25, n.3/4, p.327-339, 1994.
- BRONDANI, C. **Análise de RFLP da tolerância à toxidez do alumínio em milho.** Lavras: UFLA, 1993. 78 p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas ).
- CAMARGO, C.E.O. Melhoramento do Trigo. I - Hereditariedade da tolerância à toxicidade do alumínio. **Bragantia**, Campinas, v.40, n.4, p.33-45, fev. 1981.
- CAMPBELL, T.A. ; JACKSON, P.R. Effects of aluminum stress on alfafa root proteins. **Journal of plant nutrition**, New York, v.17, n.2/3, p.461-471, 1994.

- CARVER, B.F. ; OWNBY, J.D. Acid Soil Tolerance in wheat. **Advances in Agronomy**, New York, v.54, p.120 - 173, 1995.
- CHAO, S.; BAYSDORFER, C.; HEREDIA-DIAZ, O.; MUSKET, T.; XU, G.; COE Jr., E.H. RFLP mapping of partially sequenced leaf cDNA clones in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.88, p.717-721, 1994.
- CLARK, R.B. ; BROWN, J.C. Differential phosphorus uptake by phosphorus-stressed corn inbreds. **Crop Science**, Madison, v.14, n.3, p.505-508, may/jun. 1974.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. ; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II - Aluminum simulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, Washington, v.103, n.3, p.695-702, nov. 1993.
- DIERS, B.W.; DEIM, P.; FEHR, W.R.; SHOEMAKER, R.C. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, p.608-612, 1992.
- DRAPER, N.R.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. New York: John Wiley & Sons, 2<sup>a</sup> edition, 1981. 709p.
- DUDLEY, J.W. Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. **Crop Science**, Madison, v.33, n. 4, p.660-668, jul/aug. 1993.
- EDWARDS, M.D.; HELENTJARIS, T.; WRIGHT, S.; STUBER, C.W. Molecular-marker facilitated investigation of quantitative trait loci in maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, p.765-774, Apr. 1992.
- EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Wisconsin, v.116, p.113-125, may. 1987.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1995. 220p.
- FOY, C.D. Differential aluminum and manganese tolerance of plant species and varieties in acid soils. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.28, n.2, p.150-155, fev. 1976.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.29, p.511-566, 1978.
- FOY, C.D. ; FLEMING, A.L. The physiology of plant tolerance to excess available aluminum and manganese in acid soils. In: JUNG, G.A.. **Crop tolerance to**

- subotimal land conditions.** Madison: American Society of Agronomy, 1978. p.301-328.
- FURLANI, P.R. **Effects of aluminum on growth and mineral nutrition of sorghum genotypes.** Lincoln: University of Nebraska. 1981. 136p. (Ph.D. Thesis).
- FURLANI, P.R.; FURLANI, A.M.C. Tolerância a alumínio e eficiência a fósforo em milho e arroz: Características independentes. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.2, p.331 -340, 1991.
- FURLANI, P.R.; LIMA, M.; MIRANDA, L.T.; MIRANDA, L.E.C.; SAWASAKI, E. ; MAGNAVACA, R. Avaliação de linhagens, materiais comerciais e duas populações de milho para tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.6, p.655-660, jun. 1986.
- GARCIA, O.; SILVA, W.J. Análise genética da tolerância ao alumínio em milho. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.31, n.7, p.585, jul. 1979 (Suplemento).
- GARCIA, O.; SILVA, W.J. ; MASSEI, M.A.S. An efficient method for screening maize inbreds for aluminum tolerance. **Maydica**, Bergamo, v.24, n.2, p.75-82, Apr./Jun. 1979.
- HELENTJARIS, T.G. RFLP analysis for manipulating agronomic traits in plants. In: STALKER, H.T. and MURPHY, J. P. (ed). **Plant Breeding in 1990s**. Wallingford, 1992. p.357-372.
- HOWELER, R.H. Identifying plants adaptable to low pH conditions. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C.; MURRMANN, R.P. (Eds.) **Plan soil interactions at low pH**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 885-904.
- KERRIDGE, P.C. ; KRONSTAD, W.E. Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum*). **Agronomy Journal**, Madison, v.60, n.6, p. 710-711, nov/dec. 1968.
- KOCHERT, G. **Introduction to RFLP mapping and plant breeding applications**. New York: Rockefeller Foundation, 1989. 16p. (Apostila).
- KOCHIAN, L.V. Cellular Mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.46, p.237-260, 1995.
- KREIKE, C.M.; KONING, J.R.A. de ; KRENS, F.A.. Non-radioactive detection of single copy DNA-DNA hybrids. **Plant Molecular Biology Report**, Dordrecht, v.8, n.3, p.172-179, 1990.
- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Wisconsin, v.121, p.185-199, jan. 1989.

- LOPES, A.S. Calagem e gesso agrícola como fatores de produtividade dos solos sob cerrado. In: SEMINÁRIO SOBRE FERTILIDADE DO SOLO, 2, Cotia, 1987. **Resumos...** Cotia, 1987. p. 52-111.
- X LOPES, M.A.; MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A.F.C. ; GAMA, E.E.G. Avaliação de populações de milho e seus cruzamentos para a tolerância à toxidez do Al em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v 22, n.3, p.257-263, Mar. 1987.
- MACEDO, A.M.; MEDEIROS, A.C. ; PENA, S.D.J. A general method for efficient non-isotopic labeling of DNA probes cloned in M13 vectors: application to DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v.17, n.11, p.4414, 1989.
- MAGNAVACA, R. **Genetic variability and inheritance of aluminum tolerance in maize**. Lincoln: University of Nebraska, 1982. 135p. (Ph.D. Thesis).
- MAGNAVACA, R.; GARDNER, C.O.; CLARK, R.B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN, H.W. ; LOUGHMAN, B.C. **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht, Martinus Niphoff, 1987. p. 201-211.
- MELLO, F.A.F.; BRASIL SOBRINHO, M.O.C.; ARZOLLA, S.; SILVEIRA, R.I.; COBRANETTO, A. ; KIELL, J.C. **Fertilidade do Solo**. São Paulo: Nobel, 1984. 400p.
- MICHELMORE, R.W.; PARAN; I.; KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic region by using segregating populations. **Proceedings of National. Academic Science of USA**, v.88, p.9828-9832, nov. 1991.
- MIYASAKA, S.C.; BUTA, J.G.; HOWELL, R.K.; FOY, C.D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, Washington, v.96, n.3, p.737-743, jul. 1991.
- NIENHUIS, J.; HELENTIARIS, T.; SLOCUM, M.; RUGGERO, B.; SCHAEFER, A.. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. **Crop Science**, Madison, v.27, n. 4, p.797-803, Jul/Aug. 1987.
- OLMOS, I.J.L. CAMARGO, M.N. Ocorrência de Al tóxico nos solos do Brasil, sua caracterização e distribuição. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.28, n.2, p.171-180, fev. 1976.
- PEARSON, R.W.; RATLIFF, L.F.; TAYLOR, H.M. Effect of soil temperature, strenght, and pH on cotton seedling root elongation. **Agronomy Journal**, Madison, v.62, n.2, p.243-246, mar/apr. 1970.
- PRIOLI, A.J. **Análise genética da tolerância à toxidez do alumínio em milho (*Zea mays* L.)**. Campinas: UNICAMP, 1987. 182 p. (Tese - Doutorado em Ciências).

- REITER, R.S.; COORS, J.G.; SUSSMAN, M.R. ; GABELMAN, W.H. Genetic analysis of tolerance to low-phosphorus stress in maize using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.82, p.561-568, 1991.
- RHUE, R.D. ; GROGAN, C.O. Screening corn for Al tolerance using different Ca e Mg concentrations. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, n.5, p.755-760, Sept/Oct, 1977.
- RHUE, R.D. ; GROGAN, C.O.; STOCKMEYER, E.W. ; EVERETT, H.L. Genetic control of aluminum tolerance in corn. **Crop Science**, Madison, v.18, n.6, p.1063-1067, nov/dec, 1978.
- RUIZ-TORRES, N.A. ; CARVER, B.F. Genetic expression of aluminum tolerance in hard red winter wheat. **Cereal Research Communications**, v.20, n.3/4, p.233-240, 1992.
- RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M. ; KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots on investigations of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, London, v.44, n.259, p.437-446, feb. 1993.
- SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A. ; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of National Academic Science of USA.**, v.81, p.8014-8018, dec. 1984.
- SAWASAKI, E. ; FURLANI, P.R. Genética da tolerância à toxidez do alumínio em linhagens de milho cateto. In: Congresso Brasileiro de Milho e Sorgo, 16, Belo Horizonte, 1986. **Anais...** Sete Lagoas: CNPMS, 1988. p.382-392.
- SAX, K. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, Austin, v.8, p.552-560, 1923.
- SILVA, A.R. Melhoramento genético para resistência à toxidez de Al e manganês no Brasil. Antecedentes, necessidades e possibilidades. Tópicos para discussão e pesquisa. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.28, n.2, p. 147-149, fev. 1976.
- TANSKLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v.27, p.205-233, 1993.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. ; BONIERBALE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology**, Ithaca, v.7, p.257-264, Mar. 1989.
- VOSE, P.B. ; RANDALL, P.J. Resistance to aluminum and manganese toxicities in plants related to variety and cation-exchange capacity. **Nature**, London, v.196, p.85-86, 1962.
- WANG, G.L.; PATERSON, A.H. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.88, p.355-361, 1994.

## ANEXO

**TABELA 1** - Seleção de RFLPs entre as linhagens L53 e L1327, suscetível e tolerante ao Al tóxico, respectivamente. NP: padrão não polimórfico; PS: padrão polimórfico simples; PC: padrão polimórfico complexo. A localização cromossômica foi extraída de Chao et al, 1994.

Sonda	Localização (cM)	Eco RI	Bam HI	Hind III
<u>Cromossoma 1</u>				
UMC 157	20,1	NP	NP	NP
UMC 115	24,8	NP	NP	NP
UMC 76	40,6	NP	NP	PC
UMC 11	46,2	PS	PS	PS
UMC 8	76,6	PC	NP	PC
CSU 3	92,3	NP	NP	NP
UMC 167	103,3	NP	NP	NP
UMC 67	116,3	NP	NP	NP
CSU 92	129,2	NP	–	NP
CSU 61	130,1	PS	–	PS
BNL 5,59	134,9	NP	NP	NP
UMC 128	197,3	PS	NP	NP
UMC 140	228,7	NP	–	NP
UMC 107	241,3	PS	PS	PS
UMC 106	249,1	NP	NP	NP

Continua...

TABELA 1, Cont.

Sonda	Localização (cM)	Eco RI	Bam HI	Hind III
<u>Cromossoma 1</u>				
UMC 84	311,4	NP	NP	NP
BNL 6,32	329,5	NP	NP	PS
UMC 161	270,3	NP	PS	NP
CSU 134	291,6	NP	—	NP
<u>Cromossoma 2</u>				
CSU 29	9,2	PS	—	PS
UMC 53	15,1	NP	NP	NP
UMC 6	52,0	NP	NP	PS
UMC 34	69,8	NP	NP	PS
CSU 148	110,3	NP	—	PS
UMC 131	114,3	NP	NP	NP
UMC 55	155,2	NP	NP	NP
UMC 98	159,2	PS	NP	NP
UMC 139	162,7	PS	PC	PS
UMC 5	171,4	PC	PS	NP
UMC 4	195,6	NP	NP	NP
CSU 154	195,6	NP	—	NP
UMC 22	197	PC	NP	PC
UMC 125	197,4	NP	—	PS
UMC 122	199,2	PS	NP	PS
UMC 137	202,0	PS	—	PS
CSU 17	206,8	NP	—	NP
UMC 49	217,2	PC	NP	NP
CSU 64	220,0	NP	—	NP
UMC 36	238,6	NP	PC	NP
CSU 109	239,5	NP	—	NP

Continua...



TABELA 1, Cont.

Sonda	Localização (cM)	Eco RI	Bam HI	Hind III
<u>Cromossoma 3</u>				
UMC 32	0,0	PS	PS	PS
UMC 121	14,2	PC	PC	NP
UMC 97	58,3	NP	PS	PS
UMC 10	71,0	NP	NP	NP
UMC 102	75,8	NP	PS	NP
UMC 26	84,4	NP	NP	NP
UMC 60	114,3	NP	NP	NP
UMC 3	122,3	PS	PS	PS
UMC 39	128,9	NP	NP	NP
UMC 63	157,5	NP	NP	NP
UMC 96	173,0	NP	NP	NP
UMC 2	179,9	NP	NP	NP
<u>Cromossoma 4</u>				
UMC 31	13,9	NP	NP	NP
UMC 47	69,5	NP	NP	NP
UMC 66	107,0	NP	NP	NP
UMC 19	110,8	PS	NP	NP
UMC 133	127,1	PS	PS	PS
UMC 15	144,7	PS	PS	PS
UMC 52	160,9	NP	NP	NP
UMC 111	203,7	NP	NP	NP
BNL 8.23	215,6	NP	PS	NP
<u>Cromossoma 5</u>				
UMC 147	20,1	PC	NP	NP
CSU 108	65,4	NP	—	NP
UMC 43	86,2	PS	PS	PS

---

 Continua...

TABELA 1, Cont.

Sonda	Localização (cM)	Eco RI	Bam HI	Hind III
<u>Cromossoma 5</u>				
CSU 36	104,0	PS	—	NP
UMC 40	104,9	NP	NP	NP
UMC 126	156,2	NP	NP	NP
UMC 54	158,0	NP	—	NP
UMC 51	162,7	PS	NP	PS
UMC 141	164,0	NP	NP	PS
CSU 26	194,0	NP	—	NP
UMC 68	221,6	NP	NP	NP
UMC 104	252,4	NP	PS	NP
<u>Cromossoma 6</u>				
UMC 85	1,9	NP	NP	NP
UMC 59	20,3	PS	PC	PS
UMC 65	63,4	PS	NP	PS
UMC 21	109,6	NP	NP	NP
CSU 116	120,0	NP	—	NP
UMC 46	123,6	NP	NP	NP
UMC 38	140,2	NP	NP	NP
UMC 132	159,4	NP	NP	PS
UMC 62	170,0	PS	NP	NP
UMC 134	185,8	NP	NP	NP
<u>Cromossoma 7</u>				
CSU 81	34,6	NP	—	NP
UMC 116	54,2	PS	PS	PS
UMC 56	74,5	NP	NP	NP
UMC 110	80,1	PS	PS	PS
UMC 45	128,7	NP	NP	NP

Continua...

TABELA 1, Cont.

Sonda	Localização (cM)	Eco RI	Bam HI	Hind III
<u>Cromossoma 7</u>				
UMC 80	134,5	NP	NP	NP
UMC 35	148,9	NP	NP	PS
<u>Cromossoma 8</u>				
BNL 13.05	15,0	PC	—	PC
UMC 124	62,0	PC	NP	PS
UMC 120	80,1	NP	NP	NP
CSU 155	88,7	PC	—	NP
UMC 12	102,5	NP	NP	NP
UMC 103	103,0	PS	NP	PS
UMC 89	105,3	NP	NP	PS
CSU 31	121,3	PC	—	NP
CSU 110	127,7	NP	—	NP
UMC 30	133,2	PS	—	PS
UMC 48	135,5	PS	NP	NP
CSU 165	196,6	NP	—	PS
UMC 7	197,5	NP	NP	NP
<u>Cromossoma 9</u>				
UMC 113	11,9	NP	NP	NP
UMC 94	34,6	PC	NP	PS
UMC 81	68,9	NP	—	NP
UMC 114	78,3	PS	PS	PS
UMC 95	103,3	NP	NP	NP
CSU 93	144,7	NP	—	NP
<u>Cromossoma 10</u>				
UMC 130	53,1	PS	PS	NP
UMC 64	68,3	NP	NP	NP

---

 Continua...

TABELA 1, Cont.

Sonda	Localização (cM)	Eco RI	Bam HI	Hind III
<u>Cromossoma 10</u>				
UMC 57	121,1	NP	NP	NP
UMC 44	122,7	NP	NP	NP