

CLÁUDIO BRONDANI

ANÁLISE DE RFLP DA TOLERÂNCIA
À TOXIDEZ DO ALUMÍNIO EM MILHO

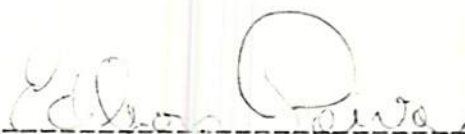
Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do grau de MESTRE.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA DE LAVRAS
LAVRAS - MINAS GERAIS

1993

ANÁLISE DE RFLP DA TOLERÂNCIA
À TOXIDEZ DO ALUMÍNIO EM MILHO

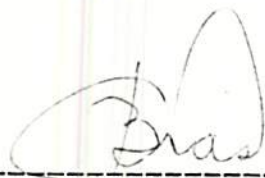
APROVADA:



Dr. Edilson Paiva
(Orientador)



Dr. João Bosco dos Santos



Dr. César Augusto Brasil P. Pinto

A DEUS

por tudo,

OFEREÇO

Aos meus pais Ivo José e Lydia,

Aos meus irmãos Júlio César, Altair,

Bruno e Irma,

Aos meus cunhados Marcos, Regina,

Reni e Stephanie,

Aos meus sobrinhos Caroline,

Paula, Isadora, Bernardo,

Júlia, Kevin, Giovana,

Daniel e Vítor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo/EMBRAPA, cujo apoio possibilitou a realização deste trabalho.

À Escola Superior de Agricultura de Lavras pela oportunidade concedida.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Dr. Edilson Paiva, pela orientação, ensinamento e amizade.

Aos professores Magno Antônio Patto Ramalho, César Augusto Brasil Pereira Pinto e João Bosco dos Santos pelo ensinamento e amizade.

Ao meu grande amigo Miguel Reis, pelo incentivo, disponibilidade, conhecimento, e sobretudo, por nossa grande amizade.

Aos pesquisadores Ricardo Magnavaca, Sidney Netto

Parentoni e Antônio Carlos de Oliveira pela participação e valiosas contribuições.

Aos funcionários do CNPMS/EMBRAPA Marília, Gislene, José Eduardo e Edna pela disponibilidade e amizade.

Aos pesquisadores Paulo C. Magalhães, Fernando H. Valicente, José Avelino S. Rodrigues, José D. Fabris, Cleso Patto Pacheco e José Édson Figueiredo pela amizade.

A Betânia S. Hercos, pelo incentivo e carinho em todos os momentos.

A Delacyr, Dermeval, Arnaldo Abreu, Tânia Barbosa, Josiane, Tereza, Walter Mewes, Paulo Maeno, Cláudia, Marta, Walter Rodrigues, Alberto, Marlúcia, Camilo e Luciano por nossa grande amizade.

Aos colegas do curso de Genética e Melhoramento de Plantas Elias, Joaquim, Camilo, Andréa, Nair, Fernando, Marcelo Tavares, Dehon, Daniel, Elaine, Marcelo Oliveira, Valéria, Guilherme, Bruno, Rosa, Otoniel, Sérgio, Bení e Eduardo pelo convívio e amizade.

A Manoel J. de Souza e família pelo carinho e amizade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1. Solos ácidos e a região do Cerrado brasileiro.....	3
2.2. Absorção, efeitos fisiológicos e possíveis mecanismos de tolerância ao Al em plantas.....	5
2.3. Avaliação da tolerância à toxidez do Al em milho... ..	7
2.4. Variabilidade genética para a tolerância ao Al em milho.....	9
2.5. Herança da tolerância à toxidez do Al em milho.....	10
2.6. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas..	13
2.6.1. Obtenção de sondas para a análise de RFLP... ..	15
2.6.2. Marcação não-radiativa das sondas.....	17
2.6.3. Seleção genética assistida pela técnica de RFLP.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Obtenção do material genético.....	24
3.2. Avaliação dos materiais genéticos sob estresse de Al.....	24
3.3. A análise de RFLP.....	28

3.3.1. Isolamento de DNA.....	28
3.3.2. Digestão do DNA e eletroforese em gel de agarose.....	29
3.3.3. Transferência por "Southern Transfer".....	30
3.3.4. Marcação das sondas de DNA.....	31
3.3.5. Hibridação, lavagens e revelação da membrana	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Resposta fenotípica ao AI tóxico.....	35
4.2. Estudo dos padrões de RFLP.....	41
5. CONCLUSÕES.....	48
6. RESUMO.....	49
7. SUMMARY.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
APÊNDICE.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Efeitos da taxa e profundidade de incorporação de calcário na saturação de Al e no desenvolvimento de raízes de milho em solo de cerrado.....	5
2	Composição da solução nutritiva para crescimento de plântulas de milho.....	25
3	Número de pares de base (pb), localização e distância das sondas utilizadas no experimento.....	32
4	Média do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) de dois híbridos de milho crescidos em solução nutritiva com e sem Al tóxico.....	35
5	Média do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) das linhagens e híbridos F1 crescidos em solução nutritiva com Al tóxico.....	36
6	Média do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) de 5 cruzamentos na geração F2.....	38

Tabela	Página
7 Comparação das médias do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) entre linhagens, F1 e F2.....	40
8 Número de bandas de RFLP produzidas em cada combinação de sonda x enzima de restrição.....	42
9 Bandas que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao AI quando utilizou-se a enzima Eco RI.....	44
10 Bandas que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao AI quando utilizou-se a enzima Eco RV.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribuição da área de cerrados incluídas áreas de transição com outras formações.....	4
2	Mapa de RFLP em milho, com distâncias em centi-Morgans.....	16
3	Esquema da hibridação sonda-fragmento de DNA e reação de luminescência produzida na degradação do AMPPD pela enzima fosfatase alcalina.....	18
4	Distribuição de frequência do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) de plantas F2 crescidas em solução nutritiva com Al tóxico, nos 5 cruzamentos testados.....	39
5	Filme de raio-x com padrões de bandas de RFLP de 14 indivíduos F2 com DNA's digeridos pela enzima Eco RV e hibridados com a sonda UMC 49.....	42

1. INTRODUÇÃO

Os solos ácidos são frequentes em áreas tropicais, e no Brasil o maior exemplo é a região do Cerrado, que ocupa cerca de 20% do território. Entre os problemas associados com a acidez do solo, a toxidez do alumínio é o principal, pois a maioria das plantas não desenvolve seu sistema radicular. Em consequência apresentam uma baixa eficiência na absorção dos nutrientes e uma maior suscetibilidade à deficiência hídrica (LOPES, 1987). A utilização da calagem atenua o problema, pois inibe a ação do Al tóxico. Entretanto, a calagem age somente nas camadas superficiais, permanecendo o problema no subsolo. Assim, a alternativa mais viável seria associar o uso da calagem com genótipos mais tolerantes à toxidez do Al (OLMOS & CAMARGO, 1976). No caso do milho isto é perfeitamente viável, uma vez que existe ampla variabilidade genética para a tolerância ao Al tóxico (MAGNAVACA, 1982 e LOPES et alii, 1987).

Em programas de melhoramento de milho visando a tolerância à toxidez do alumínio, são conduzidos experimentos a

nível de campo e em casa de vegetação utilizando solução nutritiva. Recentemente surgiu a possibilidade de utilização da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), que possibilita avaliar um grande número de materiais em um breve espaço de tempo e com grande precisão (TANKSLEY et alii, 1989 e ZEHR et alii, 1992). Esta técnica utiliza sondas (fragmento de DNA de localização conhecida) para detectar diferenças na informação genética entre as plantas. A variação a nível de DNA em milho é muito grande, podendo facilmente ser encontrada entre linhagens (HELENTJARIS et alii, 1985). Uma vez que se possa detectar a ligação de uma sonda com um alelo favorável de um caráter, esta pode ser utilizada a partir daí para selecionar indivíduos igualmente favoráveis em programas de melhoramento genético. Atualmente as metodologias envolvidas na análise de RFLP e a maneira de interpretar seus resultados estão sendo implementadas. Este trabalho objetivou viabilizar a utilização da metodologia não-radiativa de marcação e detecção de sondas de DNA com o sistema digoxigenina para a análise de RFLP, e encontrar possíveis relações entre as sondas testadas e locos da tolerância à toxidez do AI.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Solos ácidos e a região do Cerrado brasileiro

A acidez do solo é o fator mais limitante no crescimento das plantas em muitas partes do mundo, sendo frequente em áreas tropicais. Isto é particularmente verdade no caso da região do Cerrado brasileiro, onde os solos apresentam elevado grau de intemperização, baixa capacidade de troca catiônica (CTC), com os sítios de troca principalmente ocupados por íons hidrogênio (H^+) e alumínio (Al^{3+}), o que significa que possuem alta saturação de alumínio e pH baixo. (RUSSEL, 1973; OSMOND et alii, 1980 e REICHARDT, 1981). Apesar das severas limitações químicas da maioria de seus solos, o cerrado apresenta vantagens importantes no que se refere à topografia, propriedades físicas do solo, luminosidade e temperatura, além de possuir uma extensa área de 180 milhões de hectares, distribuídos em vários estados do Brasil (Figura 1). Cultivos de grande expressão na economia brasileira como o milho e a soja já são explorados nestas áreas, dentro de um modelo mais tecnificado de atividade

agrícola (LOPES et alii, 1988).

O uso da calagem em solos ácidos atenua o problema, uma vez que se baseia na quantidade requerida para neutralizar o Al trocável (KAMPRATH, 1973). Entretanto a correção da acidez na camada arável condiciona o desenvolvimento do sistema radicular



Figura 1. Distribuição da área de cerrados (//) incluídas áreas de transição com outras formações. Fonte: LOPES et alii (1988).

ao volume corrigido (FURLANI et alii, 1986). De acordo com a Tabela 1, a profundidade da calagem mostrou um efeito consistente no comprimento das raízes, que foi inversamente relacionado com a saturação do Al (REICHARDT, 1981). Entretanto, OLMOS & CAMARGO (1976) acentuam que a correção da toxidez do Al nas camadas subsuperficiais (mais de 30 centímetros) mediante os métodos

conhecidos não é exequível, tanto agronomicamente quanto economicamente.

Vários autores indicam que a combinação da prática da calagem superficial (0 a 20 centímetros) juntamente com o plantio de cultivares tolerantes ao Al seria a alternativa mais viável (OLMOS & CAMARGO, 1976; MAGNAVACA, 1982 e LOPES et alii, 1988).

Tabela 1. Efeitos da taxa e profundidade de incorporação de calcário na saturação de Al e no desenvolvimento de raízes de milho em solo de cerrado.

calagem (t/ha)	profundidade de incorporação (cm)	profundidade da amostragem do solo (cm)	saturação de Al (%)	profundidade das raízes (cm/100cm ³)
4	0 - 15	0 - 15	6	912
		15 - 30	55	342
		30 - 45	65	108
4	0 - 30	0 - 15	8	930
		15 - 30	20	650
		30 - 45	65	137

FONTE: REICHARDT (1981), com modificações.

2.2. Absorção, efeitos fisiológicos e possíveis mecanismos de tolerância ao Al em plantas

A absorção do Al ocorre inicialmente nas células da capa da ponta da raiz, movendo-se após para as células de camadas adjacentes. As raízes atingidas pela toxidez do Al são curtas, grossas e quebradiças, o que restringe a penetração e

proliferação destas. Além disto o excesso de Al reduz a replicação do DNA, fixa o fósforo em formas menos disponíveis na superfície das raízes e interfere na absorção, transporte e uso de vários elementos essenciais com o cálcio, magnésio, potássio, fósforo e ferro (FOY, 1984 e BENNET & BREEN, 1991).

MCCORMICK & BORDEN (1972) em estudos com cevada, encontraram evidências da adsorção e precipitação de fosfato na superfície das raízes, o que dificultou seu transporte por difusão nas células da raiz e conseqüentemente reduziu a distribuição de fosfatos para a parte aérea das plantas. Na verdade, a toxidez do Al e deficiência de P são difíceis de separar, poi o maior efeito da toxidez do Al é a inibição da aquisição e translocação do P pelas plantas (FOY & FLEMING, 1978 e HAYNES, 1984).

RUSSEL (1973) e FOY et alii (1978) observaram que algumas linhagens de milho mais tolerantes ao Al diferiam das demais pela maior capacidade de aquisição de fosfato em soluções que continham Al. Estes últimos autores também observaram que o aumento do pH da raiz de algumas linhagens tolerantes decresceu a solubilidade e a toxidez do Al, fato não observado nas linhagens sensíveis ao Al. Provavelmente o Al é precipitado na forma de hidróxido de Al dentro da raiz, antes de alcançar sítios metabólicos sensíveis ao Al (HAYNES, 1984).

Outro mecanismo recentemente estudado diz respeito à exudação de ácido cítrico pelas raízes. MIYASAKA et alii (1991) em estudos com feijoeiro notaram que a cultivar tolerante exudou 70 vezes mais ácido cítrico em solução nutritiva com Al em relação à solução sem Al, sendo que a cultivar suscetível exudou uma quantidade mínima, nas mesmas condições. O ácido cítrico é conhecido por quelar o Al, deste modo revertendo seu efeito fitotóxico. Algumas espécies acumulam e destoxificam o Al dentro de seus tecidos, como no chá (*Camellia sinensis* L.), que complexa o Al com ácidos orgânicos e polifenóis, acumulando-o nas folhas mais velhas; em outras espécies a parte aérea das plantas tolerantes contém menores teores de Al que as suscetíveis, geralmente devido a acumulação do Al nas raízes; e um terceiro grupo, onde as plantas tolerantes possuem menores concentrações de Al em suas raízes e concentrações similares na parte aérea quando comparadas com as plantas tolerantes. (FOY & FLEMING, 1978).

2.3. Avaliação da tolerância à toxidez do Al em milho

Normalmente são utilizadas duas alternativas para avaliar a reação das plantas à toxidez do Al, quais sejam a avaliação em condições de campo e em solução nutritiva. Na primeira, vários níveis de calcário são utilizados para se estabelecer diferentes índices de saturação de Al, onde são

avaliados os diferentes genótipos (AZEVEDO FILHO, 1992). A avaliação a nível de campo é demorada, e as respostas ao Al são muitas vezes afetadas pela heterogeneidade do solo (GARCIA et alii, 1979).

A segunda alternativa foi desenvolvida em virtude de que o efeito do alumínio é evidenciado inicialmente por uma redução no comprimento das raízes (GARCIA et alii, 1979). A solução nutritiva é um método que permite avaliar de maneira rápida um grande número de materiais, além de isolar o fator toxidez do Al de outros fatores que interferem na adaptação ambiental (MAGNAVACA, 1982 e LOPES et alii, 1988). Vários procedimentos de avaliação em solução nutritiva são descritos na literatura (RHUE & GROGAN, 1977; GARCIA et alii, 1979; MAGNAVACA, 1982 e SAWAZAKI & FURLANI, 1988). MAGNAVACA (1982), avaliou 6 parâmetros, 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, além de apresentar o menor coeficiente de variação nos ensaios.

De acordo com MAGNAVACA & BAHIA FILHO (1991), o melhor procedimento para seleção de materiais tolerantes ao Al é o emprego tanto da solução nutritiva quanto do teste de campo. Com a solução nutritiva faz-se uma avaliação preliminar para

discriminar os materiais mais tolerantes, sendo estes posteriormente avaliados a campo em solo de cerrado.

2.4. Variabilidade genética para a tolerância ao Al em milho.

Segundo MAGNAVACA (1982) e LOPES et alii (1987) há ampla ocorrência de variabilidade para a tolerância ao Al em milho.

FURLANI et alii (1986) encontraram variabilidade genética avaliando 39 linhagens, 98 materiais comerciais, 167 progênies de uma população IAC-maya e 466 progênies de uma população IAC-taiuba de milho, em solução nutritiva.

MAGNAVACA et alii (1987b) testaram linhagens brasileiras e americanas em solução nutritiva com Al tóxico. As linhagens brasileiras apresentaram de um modo geral uma maior tolerância em relação às americanas, sendo que as linhagens brasileiras L69 e M1002 destacaram-se por terem apresentado um bom desenvolvimento das raízes em alta concentração de Al tóxico. Estas linhagens quando testadas para a tolerância ao Al em solos ácidos, demonstraram igualmente alta tolerância ao Al.

MAGNAVACA et alii (1987c) compararam os seguintes materiais em solução nutritiva com Al tóxico: Composto Amplo, Composto Amplo com 4 ciclos de seleção, variedade "Hays Golden",

sintético Nebraska B e os compostos "Corn Belt" x "Brazilian" e "Corn Belt" x "Caribbean". Composto Amplo e Composto Amplo selecionado indicaram ter uma maior frequência de alelos favoráveis para a tolerância ao AI, sendo que "Corn Belt" x "Caribbean", "Hays Golden" e Nebraska B diferiram pouco entre si quanto a tolerância ao AI. Também observou-se que a introgressão do germoplasma brasileiro na população "Corn Belt" aumentou a tolerância ao AI desta.

2.5. Herança da tolerância à toxidez do AI em milho

RHUE et alii (1978) avaliaram linhagens de milho tolerantes e suscetíveis ao AI, seus F1, F2 e retrocruzamentos (RC) em solução nutritiva com AI tóxico. Os híbridos F1 exibiram maior ou igual tolerância ao AI que os pais, o que indicou ser um caráter dominante. Baseando-se na avaliação visual do comprimento da raiz, os F2 e RC segregaram na razão de 3:1 e 1:1 respectivamente, para tolerantes e suscetíveis, não aparecendo tipos intermediários. Comparando-se o desempenho de dois dos híbridos F1 estudados, W1828N x C0192 e W1828N x A554, notou-se que o primeiro não teve maior tolerância que o parental mais tolerante, e o segundo sim. Este resultado, de acordo com os autores, foi devido à linhagem A554, a qual aumentou a expressão da tolerância ao AI no F1.

SAWAZAKI & FURLANI (1988) avaliaram as linhagens Ip 48-5-3 (milho cateto) e Col 2(22) (milho duro da Colômbia) e as gerações F1, F2 e RC utilizando solução nutritiva com Al tóxico. O parâmetro de avaliação da tolerância ao Al foi o comprimento inicial da raiz subtraído do comprimento final. O híbrido F1 teve comportamento intermediário em relação aos pais, e a distribuição da geração F2 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 Al, embora o formato do gráfico da distribuição de frequência em F2 evidenciasse a presença de genes de efeito dominante.

MAGNAVACA (1987a) estudou a herança da tolerância ao Al analisando 6 gerações (Parental 1, Parental 2, F1, F2, RC1 e RC2) provenientes de cruzamentos entre linhagens de milho tolerantes e suscetíveis, avaliando o CRRS das plantas em solução nutritiva. A distribuição de frequência da geração F2 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. Os efeitos de epistasia contribuíram 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 x dominante explicou a maior parte da variância epistática) e aditividade. 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.

LOPES et alii (1987) avaliaram 5 populações de milho (CMS 04, CMS 14, CMS 36, CMS 13 e CMS 30), seus F1's e recíprocos em esquema dialélico. Os genótipos selecionados em condições de toxidez de Al no campo, CMS 30 e CMS 36, tiveram a maior tolerância "per se". A CGC explicou a maior parte da variação. Observou-se que as populações CMS 36 e CMS 30 aumentaram a média dos cruzamentos que participaram, e as populações CMS 14, CMS 04 e CMS 13 tiveram médias de seus cruzamentos menores que a média geral, provavelmente devido a contribuição dos alelos de ação aditiva os quais provocaram queda no desempenho dos cruzamentos em que participaram. A CEC embora com menor significância (5%), também esteve presente, sendo que os cruzamentos CMS 14 x CMS 30 e CMS 13 x CMS 30 tiveram os maiores valores positivos.

2.6. Marcadores moleculares no melhoramento de plantas

O melhoramento de plantas é um processo que compreende três fases cíclicas: a criação de uma população de plantas geneticamente variável, a seleção e a recombinação dentro desta população. Logo, as novas variedades desenvolvidas são provenientes da seleção de plantas com genótipo desejável. Contudo, em muitos casos os efeitos ambientais mascaram os do genótipo, de modo que o fenótipo fornece uma medida imperfeita do potencial da planta. Para contornar este problema, técnicas de melhoramento de plantas baseadas na inferência estatística tem sido utilizadas para o desenvolvimento de novas variedades (FREY, 1981 e TANKSLEY, 1989). Uma metodologia alternativa para identificação e manipulação de genes de interesse em programas de melhoramento surgiu com o desenvolvimento e utilização de marcadores moleculares. Os primeiros marcadores moleculares utilizados foram as isoenzimas marcadoras, as quais tem a vantagem de fornecer respostas rápidas e baratas, porém são de uso limitado devido ao pequeno número de locos cromossômicos disponíveis para a análise.

Posteriormente surgiram os marcadores de DNA, que simplesmente detectam diferenças na informação genética entre os indivíduos. Especialmente para o milho a variação a nível de DNA é muito grande, podendo facilmente ser encontrada entre linhagens (HELENTJARIS et alii, 1985 e HOISINGTON & COE, 1990). O RFLP -

"Restriction Fragment Length Polymorphism" - ou polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição é um destes marcadores, os quais são obtidos através de diferenças no peso molecular dos fragmentos do 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, e efetuam um corte neste sítio, originando fragmentos de diferentes tamanhos. Como a mobilidade do fragmento varia de acordo com o seu tamanho, estes são separados em gel de eletroforese, desnaturados para gerar fitas simples de DNA, e em seguida transferidos para uma matriz sólida (membrana de nylon, por exemplo). O fragmento de DNA que for homólogo a uma sonda (fragmento de DNA de localização conhecida no genoma) pode então ser visualizado através do aparecimento de uma banda em um filme de raio-x. Se por exemplo dois indivíduos diferirem num sítio de restrição que afete o comprimento do fragmento homólogo à sonda, a banda aparecerá em locais diferentes no filme de raio-x (BECKMANN & SOLLER, 1986; HELENTJARIS, 1987 e MALUF, 1990).

As vantagens das sondas incluem o fato de que os estas são detectadas em todos os estágios da planta; uma sonda não interfere no padrão de outra; todos os polimorfismos em todos os locos são identificados por uma mesma metodologia laboratorial; as sondas são disponíveis em muitos locos nos 10 cromossomos do milho; os polimorfismos são detectados de modo codominante, possibilitando diferenciar os homozigotos dos heterozigotos; e os

polimorfismos não são afetados pelo ambiente.

2.6.1. Obtenção de sondas para a análise de RFLP

Primeiramente o DNA genômico total da planta é digerido com uma enzima de restrição, geralmente a Pst I. Esta enzima é sensível à metilação, o que é uma característica desejável, pois os fragmentos com várias cópias no genoma são metilados, e por consequência não serão isolados (HOISINGTON & COE, 1990). Posteriormente fragmentos de 1000 a 2000 pares de base são isolados por centrifugação em gradiente de sacarose e ligados a um plasmídeo (moléculas de DNA circular de dupla fita, extra-cromossômicas), o qual é inserido em um hospedeiro, geralmente a bactéria *Escherichia coli*. O plasmídeo e o DNA a ser clonado são cortados com a mesma enzima de restrição (Pst I) para produzir extremidades capazes de serem ligadas. Este processo é conhecido por clonagem gênica, e fornece um meio de multiplicar segmentos específicos de DNA durante o processo de divisão celular do hospedeiro. Estes segmentos servirão como sonda para a análise de RFLP (GRIERSON & COVEY, 1984 e HOISINGTON & COE, 1990).

HELENTJARIS et alii (1986) descrevem o procedimento para localizar as sondas no genoma. Sondas de genes com localização cromossômica conhecida (como o *waxy* e o *shrunken-1*), foram hibridadas com o DNA genômico de plantas de milho. O padrão de bandas resultante da hibridação serviu para determinar a

ordenação e a distância entre estes genes utilizando o método de máxima verossimilhança. Estes locos servem então como base para a localização de novas sondas que forem sendo clonadas.

O milho possui um dos mais desenvolvidos mapas de RFLP, havendo aproximadamente 900 locos mapeados. A Figura 2 indica a localização cromossômica de 223 sondas obtidas na Universidade de Missouri-Columbia, EUA.

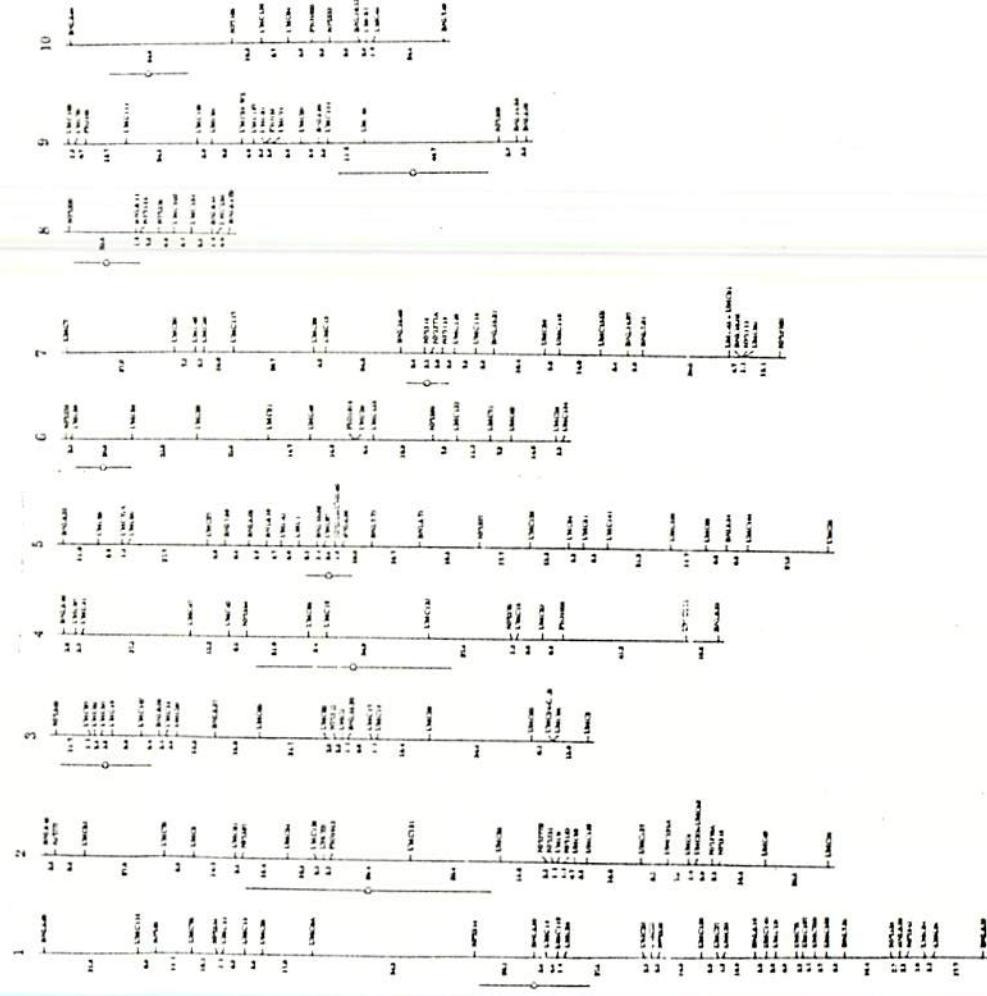


Figura 2. Mapa de RFLP em milho, com distâncias em centimorgans. Adaptado de HOISINGTON & COE (1990).

2.6.2. Marcação não-radiativa das sondas

A marcação das sondas de DNA com elementos radiativos como o fósforo 32, enxofre 35 e iodo 131 foi a pioneira e ainda hoje é a mais utilizada. Contudo, ocorrem vários problemas relacionados com sua utilização, tais como o alto risco para a saúde devido à radiatividade, a necessidade de se ter um depósito para o lixo radiativo, a curta meia-vida do elemento radiativo (no caso do fósforo, de 14 dias), e a necessidade de uma nova marcação da sonda a cada análise. O surgimento da marcação não-radiativa das sondas trouxe uma economia de tempo, custo e eliminou os riscos à saúde. O primeiro sistema não-radiativo desenvolvido foi o da biotina. Posteriormente surgiu o sistema digoxigenina, o qual aumentou a sensibilidade da reação de detecção (MARTIN et alii, 1990). Digoxigenina pertence a um grupo de substâncias conhecidas como esteróides, e é incorporada à molécula de desoxiuridina nucleosídeo trifosfato (dUTP). Anticorpos contra digoxigenina são produzidos (anti-Dig), e posteriormente unidos à enzima fosfatase alcalina. Quando esta enzima entra em contato com o substrato AMPPD, ou 3-(2-espiroadamantano)-4-metoxi-4-(3"-fosforiloxi)fenil-1,2-sal de dioxetano dissódico, ocorre a reação ilustrada na Figura 3, havendo a emissão de luz captada pelo filme de raio-x.

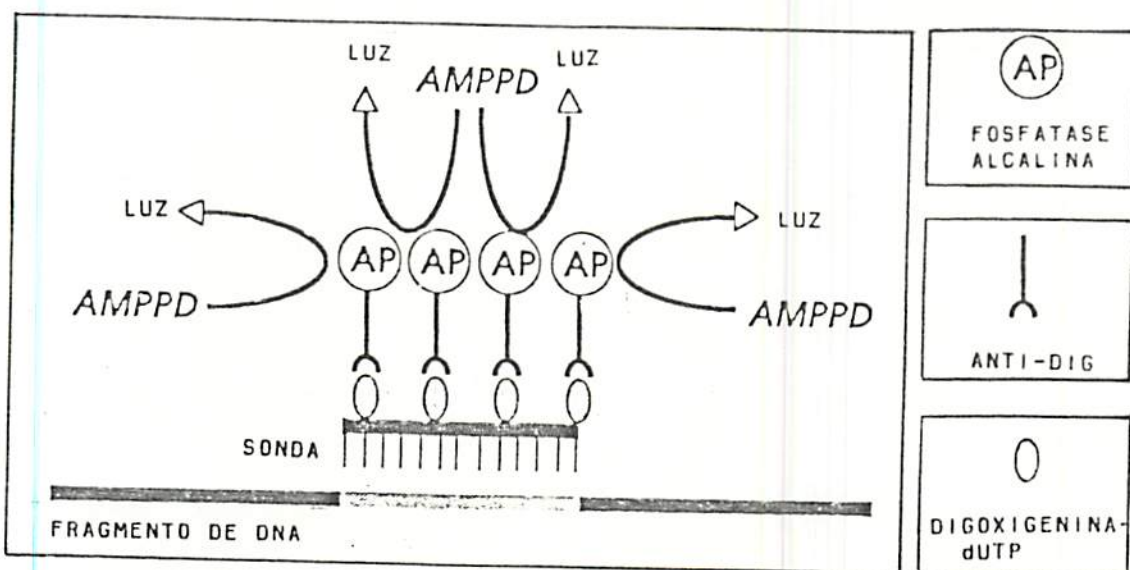


Figura 3. Esquema da hibridação sonda-fragmento de DNA e reação de luminescência produzida na degradação do AMPPD pela enzima fosfatase alcalina (AP).

Os métodos normalmente utilizados para incorporação dos nucleotídeos marcados às sondas são o "nick-translation", o "random priming" e o "polymerase chain reaction", também conhecido por PCR. Este último produz uma marcação mais eficiente, além de ser um processo automatizado, conduzido em um "termociclador". Este produz três diferentes temperaturas de incubação da sonda: 94 °C (para separação da dupla fita de DNA), 55 °C (para anelamento dos iniciadores) e 72 °C (para o alongamento das novas fitas de DNA). Os iniciadores ou "primers" são cadeias que possuem um pequeno número de nucleotídeos (normalmente de 20 a 24), e que são complementares às regiões de início e fim da amplificação. O alongamento da cadeia ocorre devido à presença da enzima Taq-DNA polimerase I, que suporta altas temperaturas. Esta enzima é responsável pela colocação dos

nucleotídeos na nova fita que sejam complementares aos nucleotídeos da fita antiga (adenina com timina, citosina com guanina), partindo do "primer" iniciador até o outro "primer". Entre os nucleotídeos incorporados estarão também os nucleotídeos marcados. A amplificação se processa de modo exponencial, da ordem de 2^n moléculas geradas, onde n é o número de ciclos de amplificação. Normalmente são efetuados 25 a 35 ciclos de amplificação, gerando em torno de 3×10^{10} moléculas de DNA (HOISINGTON, 1992).

2.6.3. Seleção genética assistida pela técnica de RFLP

A seleção de indivíduos que possuam determinado gene de interesse pode ser facilitada pela análise de RFLP, desde que uma sonda esteja tão próxima a um gene que possa ser considerada como ligada a ele. Isto permite que uma vez sendo detectada a presença da sonda, pode-se confiar que o gene também estará presente (KOCHERT, 1989).

Porém a maioria dos caracteres de significância agrônômica são de natureza quantitativa, controlados por um número significativo de genes distribuídos pelos cromossomos, cada qual contribuindo com um pequeno efeito positivo ou negativo no caráter de interesse. Os genes que controlam estes caracteres herdados quantitativamente são também conhecidos por "Quantitative Trait Loci" ou simplesmente QTL (PHILLIPS & JAMES,

1988 e KOCHERT, 1989).

Normalmente os estudos que envolvem a detecção de QTL's por RFLP's é conduzido de modo simples: um cruzamento é feito entre duas plantas que são geneticamente diferentes em um ou mais caracteres de interesse. A detecção do QTL é dependente do desequilíbrio de ligação entre as sondas e os alelos do gene em estudo. Deste modo, para maximizar tal desequilíbrio utilizam-se F2 ou retrocruzamentos. Para a análise de RFLP são utilizadas mais de 100 indivíduos. Se apenas um caráter for avaliado, TANKSLEY et alii (1989) sugerem que sejam analisados os indivíduos com valores fenotípicos extremos para o caráter, a fim de facilitar as análises. Utilizam-se sondas distribuídas a intervalos regulares no genoma (10 a 20 cM), objetivando encontrar sondas que sejam relacionadas com o caráter (HELENTJARIS, 1987 e REITER, 1989). A capacidade da sonda em detectar um alelo de um gene pertencente a um QTL depende da magnitude do efeito do QTL no caráter, do tamanho da população em estudo e a frequência de recombinação entre o marcador e o alelo (TANKSLEY et alii, 1989).

A utilização da análise de RFLP para identificar QTL's em populações segregantes está apenas começando a ser explorada. NIENHUIS et alii (1987) estudaram a associação de locos de RFLP com um QTL, a resistência a insetos de espécies selvagens de tomate, a qual é devida a 2-tridecanona (2TD). Analisou-se uma população F2 com 900 indivíduos provenientes do cruzamento

Lycopersicon esculentum x *L. hirsutum* var. *glabratum* (espécie selvagem), e encontraram associação entre pelo menos 3 locos de RFLP e altos teores de 2TD. Os resultados sugerem que a seleção dos locos de RFLP resultaria numa resposta correlacionada que aumentaria a frequência dos alelos favoráveis associados com a expressão de 2TD.

DIERS et alii (1992) estudaram a associação entre 243 sondas e QTL's para conteúdo de óleo e teor de proteína em soja. A análise foi efetuada em 60 famílias F3 derivadas de F2 do cruzamento de *Glycine max* x *G. soja*. As linhagens foram divididas em 3 classes de acordo com o padrão de bandas das sondas: homozigotas para bandas de *G. max*, homozigotas para bandas de *G. soja* e heterozigotas). Foram encontradas 8 sondas associadas com o teor protéico, sendo que todos os alelos para altos teores foram provenientes de *G. max*, e 9 sondas associadas com o conteúdo de óleo total, com todos os alelos para o maior conteúdo de óleo provenientes de *G. soja*. Os alelos responsáveis pelo aumento dos níveis de um caráter na maioria dos casos foram relacionados com menores níveis no outro caráter, ou seja, houve um forte indicativo de correlação negativa entre os caracteres estudados.

EDWARDS et alii (1992) estudaram a associação de 98 sondas e 11 isoenzimas com 18 QTL's (tais como peso de grãos, altura da planta, altura da espiga, etc.) utilizando 187 plantas F2 do cruzamento das linhagens de milho CO 159 x 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 QTL's para produção de grãos também mostraram-se complexos, 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 (1989) utilizou 93 sondas distribuídas nos 10 cromossomos do milho para estudar a tolerância à deficiência de fósforo em 90 indivíduos F3 do cruzamento entre as linhagens NY821 x H99, comparando o crescimento vegetativo das plantas. Cinco sondas foram associadas com o caráter, sendo que um destes, localizado no braço longo do cromossomo 6 explicou 25% da variação fenotípica total. Um modelo de regressão múltipla com 3 dos 5 locos explicou 46% da variação fenotípica total.

A manipulação de regiões cromossômicas de interesse pela seleção assistida por marcadores ainda está sendo estabelecida. Embora ainda trabalhosa e cara, este tipo de seleção tem um grande potencial para auxiliar programas de melhoramento. No caso da tolerância à toxidez do Al, tem-se um

bom volume de informações a respeito de seu tipo de herança, porém pouco se sabe a respeito da localização cromossômica dos genes relacionados com este caráter. MIRANDA et alii (1987) encontraram evidências, com base em cálculos estatísticos, de que alguns locos gênicos dos cromossomos 2 e 10 estariam envolvidos no controle da tolerância à toxidez do Al. A análise de RFLP poderia então confirmar a importância destes locos na expressão do caráter, e fazer o acompanhamento dos alelos favoráveis destes locos visando auxiliar a seleção de genótipos mais tolerantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do material genético

O material genético utilizado no experimento foi fornecido pelo programa de melhoramento de milho do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo/EMBRAPA. Baseando-se em informações prévias as linhagens utilizadas foram divididas em dois grupos: o tolerante (linhagens 15, 16, 699, 1327) e o suscetível ao AI (linhagens 19, 53, 57); todas com no mínimo 10 gerações de autofecundação. Efetuando-se cruzamentos do tipo tolerante x suscetível, obtiveram-se os seguintes híbridos F1: 57 x 1327, 57 x 699, 53 x 16, 53 x 15, 19 x 1327. Cerca de 100 sementes F1 de cada cruzamento foram plantadas e autofecundadas, obtendo-se então 5 populações F2.

3.2. Avaliação dos materiais genéticos sob estresse de AI

O caráter tolerância ao AI foi avaliado em solução nutritiva em casa de vegetação. A Tabela 2 fornece os reagentes e

Tabela 2. Composição da solução nutritiva para crescimento de plântulas de milho.

Solução estoque			Solução nutritiva para teste				
Nome	Químicos	concentração		cátion	ânion	composição total	
		g. litro ⁻¹	ml estoque/l	mg elemento/l		elemento mg/l	N
Ca	Ca(NO ₃).4H ₂ O	270	3,08	Ca=141,1	NO ₃ ⁻ -N=98,6	Ca 141,1	3527
	NH ₄ NO ₃	33,8		NH ₄ -N= 18,2	NO ₃ ⁻ -N=18,2	K 90,1	2310
						Mg 20,8	855
K	KCl	18,6	2,31	K= 22,5	Cl=20,4	NO ₃ -N 152,0	10857
	K ₂ SO ₄	44,0		K= 45,6	SO ₄ -S=18,7	NH ₄ -N 18,2	1300
	KNO ₃	24,6		K= 22,0	NO ₃ -N= 7,9	P 1,4	45
						S 18,8	587
Mg	Mg(NO ₃) ₂ . 6H ₂ O	142,4	1,54	Mg= 20,8	NO ₃ -N= 24,0	B 0,27	25
P	KH ₂ PO ₄	17,6	0,35	K= 1,7	H ₂ PO ₄ = 1,4	Fe 4,3	77
						Mn 0,5	9,1
Fe	Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	20,3	1,54	Fe= 4,3	NO ₃ -N= 3,3	Cu 0,04	0,63
	HEDTA	13,4			HEDTA=20.6	Mo 0,08	0,83
						Zn 0,15	2,29
Micro	MnCl ₂ .4H ₂ O	2,34	0,77	Mn= 0,5	Cl= 0,65	Na 0,04	1,74
	H ₃ BO ₃	2,04			BO ₃ -H= 0,27	HEDTA 20,06	75
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,88		Zn= 0,15	SO ₄ -S= 0,07		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,20		Cu= 0,04	SO ₄ -S= 0,02		
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,26		Na= 0,04	MoO ₄ -M= 0,08		

FONTE: MAGNAVACA (1982)

concentrações da solução nutritiva. Nos tratamentos contendo Al foi adicionado à mesma 222 μmol de Al/litro na forma de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$. O pH foi ajustado inicialmente para 4,0, permanecendo sem ajustes até a colheita, quando observou-se a tendência de aumentar o pH.

Os materiais genéticos foram avaliados na solução nutritiva contendo Al tóxico em dois experimentos. O primeiro envolveu os 7 pais e os 5 híbridos F1 anteriormente descritos, mais o híbrido Pioneer 3072 que serviu de testemunha. Cerca de 40 sementes destes materiais genéticos, foram enroladas em papel toalha para germinação, sendo mantidas em local umedecido com água aerada, na temperatura ambiente (TA). Após 7 dias selecionaram-se 21 plântulas por material genético, uniformes e sem danos nas raízes. Mediu-se o comprimento inicial da raiz seminal de cada plântula, sendo então transferidas para uma placa de plástico com 49 furos. Colocou-se esta placa sob uma bandeja com 8 litros de solução nutritiva com Al tóxico. O volume, sob contínua aeração foi mantido adicionando-se água sempre que necessário. Utilizaram-se 6 bandejas, onde foram colocadas as 3 repetições por material genético, no delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi montado em casa de vegetação, sem iluminação artificial, com a temperatura variando de 15 a 33 °C.

Após 8 dias em solução nutritiva, mediu-se o comprimento final da raiz seminal das plantas. O Comprimento

Relativo da Raiz Seminal (CRRS) foi obtido pela diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial, dividido pelo comprimento inicial.

O segundo experimento foi realizado com a geração F2 dos cruzamentos anteriormente descritos. Os procedimentos de implantação e condução do experimento foram semelhantes ao anterior. Cerca de 500 sementes F2 foram colocadas para germinar, e aos 7 dias selecionaram-se cerca de 300 plântulas por cruzamento, uniformes e sem danos nas raízes. Utilizaram-se 6 bandejas por cruzamento mais oito bandejas com as testemunhas, totalizando 38 bandejas dispostas na casa de vegetação mediante sorteio, em delineamento inteiramente casualizado.

Para conferir se a solução nutritiva serviria para discriminar as plântulas quanto à tolerância ao Al, foram utilizadas duas testemunhas, os híbridos comerciais BR - 201 (EMBRAPA) e Pioneer 3072. Cada um destes materiais foi colocado em contato com dois tipos de solução nutritiva, uma contendo Al e a outra sem Al, com duas repetições por tratamento. Colocaram-se 400 sementes de cada híbrido para germinar, sendo selecionadas cerca de 200 plântulas de cada um.

Após a medição final das raízes, as plantas de todos os tratamentos foram identificadas, individualmente congeladas a - 80 °C, e posteriormente liofilizadas.

3.3. Análise de RFLP

As metodologias para condução da análise de RFLP foram seguidas de acordo com os procedimentos sugeridos por HOISINGTON (1992), com algumas modificações.

3.3.1. Isolamento de DNA

Baseando-se no CRRS foram selecionadas 5 a 6 plantas mais tolerantes e 5 a 6 plantas mais suscetíveis da geração F2 de cada um dos 5 cruzamentos, o que totalizou 58 indivíduos, número correspondente aos orifícios da gel de agarose abaixo descrita. Pesou-se 250 mg de tecido liofilizado de cada planta, sendo moído com gral e pistilo em presença de nitrogênio líquido, e incubado por 90 minutos (65 °C) em 9 ml de tampão de extração contendo 0,1M Tris-HCl pH 7,5, 0,7M NaCl, 10mM EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético) pH 8,0, 0,14M betamercaptoetanol e 1% CTAB ("mixed alkyltrimethyl-ammonium bromide", obtido da SIGMA Co.). Após, adicionou-se à mistura 4,5 ml de clorofórmio:octanol (24:1), homogenizando-se por 10 minutos à TA. Centrifugou-se a 3.000 rpm por 10 minutos (TA). A fase aquosa superior foi colocada em um novo tubo e a extração com clorofórmio:octanol foi repetida. A fase aquosa foi removida para um novo tubo com pipeta de ponta larga, adicionando-se um volume igual de isopropanol. Esta solução foi misturada vagarosamente por repetidas inversões

até a precipitação do DNA. O DNA foi removido com anzol de vidro e colocado em 1 ml de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0), deixando-se o DNA entrar em solução durante uma noite a 4 °C. O DNA foi então reprecipitado adicionando-se 50 microlitros (ul) de 5M NaCl e 4 ml de etanol gelado, sendo removido com anzol de vidro e colocado em 2 ml de etanol 76% e 0,2M NaOAc por 20 minutos. O anzol com DNA foi rapidamente imerso em etanol 76% e 10mM NH₄OAc, sendo ressuspensão por toda a noite em 1 ml de tampão TE pH 8,0 a 4 °C. Após o DNA foi armazenado a 4 °C na concentração de 0.2 ug/ul.

3.3.2. Digestão do DNA e Eletroforese em Gel de agarose

Aproximadamente 15 ug de DNA foram digeridos com as enzimas de restrição Eco RI e Eco RV, selecionadas por serem de comprovada eficácia em produzir polimorfismo em DNA de milho (HELENTJARIS. et alii, 1985 e REITER, 1989). O DNA foi digerido com 5 unidades da enzima por ug de DNA por 4 horas a 37 °C em presença de 2,5 mM de espermidina, sendo que o volume de reação foi de 300 ul para cada amostra. Parou-se a reação com 16 ul de 5M NaCl, e adicionou-se 750 ul de etanol, homogenizando-se rapidamente e colocando-a a - 80 °C por 30 minutos. Após as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante, sendo o pellet de DNA ressuspensão em 60 ul de tampão TE pH 8,0 por 3 horas, quando adicionou-se 5 ul

de tampão "sample gel buffer" (50 mM Tris pH 8,0, 50% glicerol, 5mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS, 0,15% azul de bromofenol e 0,15% xileno cianol).

Após imergir a gel de agarose 0,8% (dimensão 20 x 25 cm) em tampão de corrida tris-acetato-EDTA (40 mM tris-acetato pH 8,0, 10 mM EDTA), colocaram-se os DNA's digeridos em cada um dos 58 orifícios da gel. Com a finalidade de efetuar a corrida do DNA, aplicou-se 25 a 30 mA por 12 a 18 horas. Com a finalidade de visualizar o DNA em luz ultravioleta e conferir a qualidade da digestão, coloriu-se a gel com 1 ug/ml de brometo de etídio por 20 minutos sob leve agitação, lavando-a posteriormente em água destilada pelo mesmo tempo.

3.3.3. Transferência por "Southern Transfer"

Comprovada a boa digestão do DNA, a gel foi incubada por 30 minutos em 1 litro de solução de desnaturação (0,4N NaOH e 0,6M NaCl) a fim de separar as fitas de DNA, e em seguida incubada por 30 minutos em 1 litro de solução de neutralização (0,5M Tris-HCl pH 7,5 e 1,5M NaCl), sempre sob leve agitação.

O DNA foi então transferido da gel para uma membrana de nylon (marca Micron Separation Inc.) por fluxo capilar do tampão de transferência (25 mM NaPO₄ pH 6,5) por 18 a 24 horas. Após, a membrana foi lavada em 2X SSC (0,3M NaCl e

0,03M Na-citrato) por 15 minutos, seca à temperatura ambiente por 30 minutos e colocada em estufa a 90 °C por 3 horas, a fim de imobilizar o DNA na membrana.

3.3.4. Marcação das sondas de DNA

As sondas de DNA utilizadas foram cedidas pelo Dr. David Hoisington, do Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT), obtidas a partir da digestão do DNA genômico de milho com a enzima Pst I e clonadas no plasmídeo pUC 19. Utilizaram-se nas análises de RFLP sondas localizadas em diferentes regiões do cromossomo 2 (Tabela 3), pois segundo MIRANDA et alii (1987), este cromossomo pode ter locos envolvidos com o caráter tolerância ao AI.

A marcação das sondas foi efetuada pela incorporação de nucleotídeos marcados com digoxigenina (Dig-11dUTP, obtido da Boehringer Mannheim Co.) na reação de amplificação da sonda através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), que consiste de tampão PCR 1X, 50 µM de cada um dos dNTP's (dATP, dCTP, dGTP), 48,75 µM dTTP, 1,25 µM DIG-11dUTP, 1,5U de enzima Taq-polimerase, 0,2 µM "primer" CV72 (de sequência 5' ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT 3'), 0,2 µM "primer" CV76 (de sequência 5' AAACAGCTATGACCATGATTACGCC 3') 10 ng da sonda de DNA e H₂O q.s.p. 100 µl. Adicionou-se a esta reação 75 µl de óleo mineral ultrapuro, sendo então colocada em máquina de PCR. A

amplificação deu-se de acordo com o seguinte programa: 1 ciclo de 94 °C por 1 minuto; 25 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos; e 1 ciclo de 72 °C por 1 minuto. O óleo foi removido colocando-se 100 ul de clorofórmio e 50 ul de TE à reação, homogenizando-a e centrifugando-a a 3000 rpm por 3 minutos. A amplificação foi checada correndo-se 5 ul de cada amostra da reação em gel de agarose 1%, sendo esta posteriormente colorida em solução com brometo de etídio a 1 ug/ml, visualizando-se então o fragmento amplificado sob luz ultravioleta.

Tabela 3. Número de pares de base (pb), localização e distância das sondas utilizadas no experimento.

Sondas	pb	Cromossomo 2	Distância (cM)
UMC 34	970		74,5
			77,8
UMC 6	590		
UMC 122	490		
UMC 49	630		
UMC 36	690		

3.3.5. Hibridação, lavagens e revelação da membrana

As membranas foram pré-hibridadas com 15 ml de solução de hibridação (5X SSC, 0,1% sarcosil, 0,02% SDS- sódio dodecil

sulfato, e 0,1% de reagente de bloqueio, obtido da Boehringer Mannheim) por 3 horas a 65 °C em um rotator. Posteriormente, colocaram-se as membranas para hibridar em solução de hibridação acrescida da sonda marcada (15 ml de solução contendo 375 nanogramas da sonda), previamente desnaturada em banho-maria por 10 minutos. A solução de hibridação permaneceu em contato com as membranas por 15 a 18 horas a 65 °C em um rotator. Após a solução de hibridação foi removida e armazenada a - 20 °C para reutilização.

Após a hibridação as membranas foram lavadas com 0,15X SSC e 0,1% SDS, 2 vezes por 5 minutos à TA, e 3 vezes por 15 minutos a 65 °C. Em seguida incubaram-se as membranas em tampão 2 (0,01M Tris-HCl pH 7,5, 0,15M NaCl e 0,1% de reagente de bloqueio) por 30 minutos à TA, em seguida em solução contendo o anticorpo da digoxigenina por 30 minutos (60 ml de tampão 2, e 4 ul do anticorpo da digoxigenina, fornecido pela Boehringer Mannheim). Posteriormente foram feitas novas lavagens nas membranas, 3 vezes por 10 minutos com tampão 2, 3 vezes por 10 minutos com tampão 1 (0,01 M Tris-HCl pH 7,5 e 0,15M NaCl), uma vez por 5 minutos com tampão 3, sempre à TA. Em seguida incubaram-se as membranas em solução de AMPPD (60 ml de tampão 3 e 300 ul de AMPPD obtido da Tropix Co.) por 45 minutos. Esta última solução pôde ser reutilizada por 5 a 10 vezes, sendo armazenada a 4 °C.

As membranas foram secas brevemente, plastificadas e colocadas em contato com filmes de raio-x por 15-18 horas. Posteriormente os filmes de raio-x foram imersos em solução de revelação (Kodak GBX developer) e em seguida em solução fixadora (Kodak GBX fixer), surgindo então as bandas de RFLP.

As bandas foram numeradas de acordo com sua localização nos filmes de raio-x em ordem crescente da parte superior para a inferior do filme.

As membranas puderam ser utilizadas por 4 a 5 vezes, removendo-se a sonda que hibridou com o DNA presente na membrana com 2X SSC por 10 minutos à TA, posteriormente com 0,2N NaOH e 0,1% SDS a 37 °C por mais 10 minutos e por último lavada em TE por 5 minutos à TA, sempre sob agitação. Quando não utilizadas imediatamente, as membranas foram estocadas em TE a 4 °C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Resposta fenotípica ao Al tóxico

A solução nutritiva contendo o Al tóxico foi eficiente para discriminar os indivíduos tolerantes e suscetíveis ao Al. Observou-se uma redução de aproximadamente 40% na média do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) das testemunhas, quando comparadas as soluções com e sem Al tóxico (Tabela 4).

Tabela 4. Média do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) de dois híbridos de milho crescidos em solução nutritiva com e sem Al tóxico.

HÍBRIDOS	CRRS		Redução (%)
	Solução com Al	Solução sem Al	
BR-201	0,48	0,82	41,46
Pioneer 3072	0,55	0,91	39,56

O CRRS médio das linhagens e híbridos F1 pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Média do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) das linhagens e híbridos F1 crescidos em solução nutritiva com Al tóxico.

MATERIAIS GENÉTICOS	CRRS ¹
19 x 1327	1,01 a
57 x 1327	0,86 ab
1327	0,75 bc
57 x 699	0,66 cd
53 x 15	0,60 cd
57	0,55 de
15	0,50 def
699	0,49 def
53 x 16	0,40 ef
19	0,33 fg
16	0,33 fg
53	0,20 g

¹ As médias com as mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

Conforme esta tabela, nota-se que houve respostas diferenciadas ao Al tóxico tanto entre linhagens quanto entre cruzamentos. A linhagem 1327 foi significativamente mais tolerante que as demais, e os cruzamentos os quais participou foram igualmente mais tolerantes que os demais. As linhagens suscetível 57 e tolerante 16 tiveram um comportamento diferente em relação aos ensaios à campo; a primeira tendo um CRRS médio semelhante aos parentais tolerantes, e a segunda semelhante aos suscetíveis. Isto indica que o CRRS, apesar de avaliar um

importante parâmetro de medida da tolerância que é o crescimento da raiz em condições de toxidez de Al, deve apenas servir de apoio aos ensaios a nível de campo. Nestes ensaios existem vários outros fatores interagindo para conferir um maior ou menor grau de tolerância ao Al.

Nos cruzamentos 57 x 1327, 57 x 699, 53 x 15 e 53 x 16 o CRRS médio dos F1 não diferiram significativamente da média do parental tolerante envolvido no cruzamento, indicando a ocorrência de interação alélica dominante para a tolerância ao Al. No cruzamento 19 x 1327 o CRRS médio foi significativamente maior que o CRRS do parental mais tolerante, podendo ter ocorrido dominância ou sobredominância. Percebe-se com estes resultados que um dos caminhos para se conseguir materiais mais tolerantes ao Al poderia ser através de combinações híbridas, uma vez que o caráter apresentou claramente interação alélica de dominância, e houve heterose em todos os cruzamentos.

A Tabela 6 fornece os dados do CRRS médio dos cruzamentos na geração F2. Observa-se que a ordenação dos cruzamentos não foi alterada em relação à geração F1.

Tabela 6. Média do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) de 5 cruzamentos na geração F2.

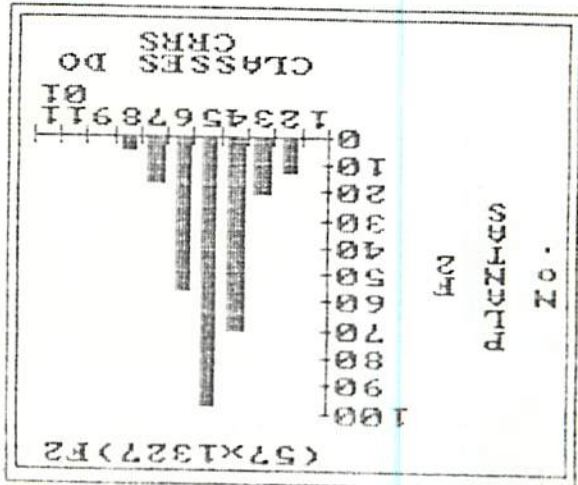
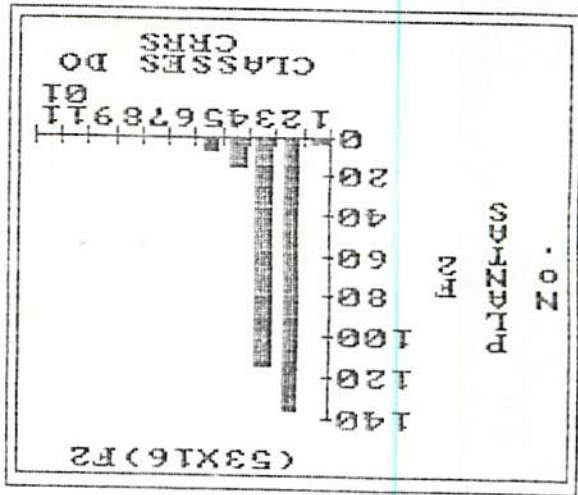
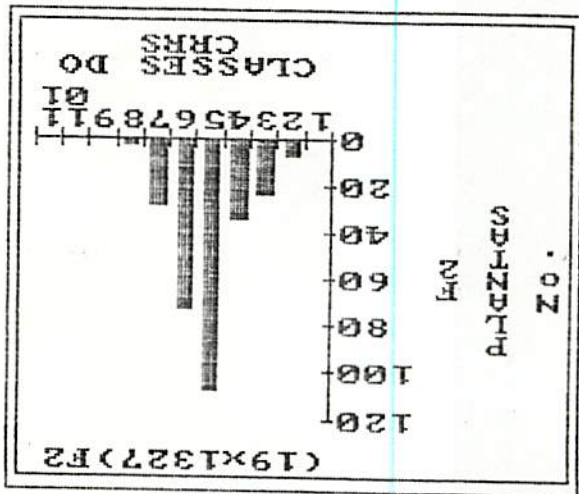
MATERIAIS GENÉTICOS	CRRS ¹
(19 x 1327)F2	0,71 a
(57 x 1327)F2	0,65 a
(53 x 15)F2	0,49 b
(57 x 699)F2	0,38 c
(53 x 16)F2	0,21 d

↑ As médias com as mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade.

A Figura 4 mostra a distribuição de frequência das plantas da geração F2 de cada cruzamento testado. Percebe-se em todos eles uma distribuição contínua, unimodal, típica de um caráter herdado quantitativamente.

A Tabela 7 fornece a comparação dos valores do CRRS médio dos parentais, F1's e F2's, obtidos pela análise conjunta dos experimentos. De um modo geral o CRRS médio dos cruzamentos na geração F2 decresceu em relação à média da F1, como ocorre nos casos onde a interação de dominância é predominante. Excetuou-se o cruzamento 53 x 15, onde a média da F2 não diferiu do F1 e do parental tolerante 15. Percebe-se novamente que a linhagem 1327 forneceu os resultados mais consistentes quanto à tolerância ao Al, baseados no seu desempenho "per se" e nos cruzamentos em que esteve envolvida.

Figura 4. Distribuição de frequência de Comprimento Relativo de Raiz Seminal (CRS) de plantas F2 crescidas em solução nutritiva com Al tóxico, nos 5 cruzamentos testados.



Legenda:

Classe 1:	-0,22 a -0,019
Classe 2:	-0,02 a 0,17
Classe 3:	0,18 a 0,37
Classe 4:	0,48 a 0,57
Classe 5:	0,58 a 0,77
Classe 6:	0,78 a 0,97
Classe 7:	0,98 a 1,17
Classe 8:	1,18 a 1,37
Classe 9:	1,38 a 1,57
Classe 10:	1,58 a 1,77
Classe 11:	1,78 a 1,97

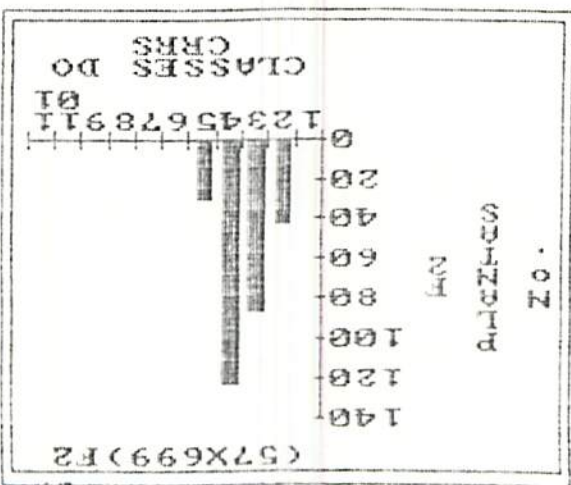
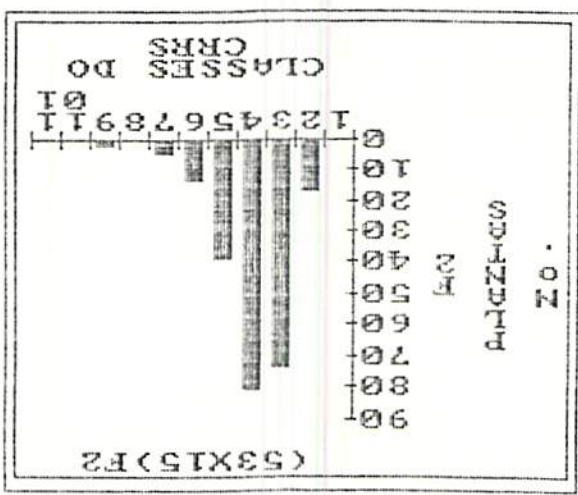


Tabela 7. Comparação das médias do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) entre parentais, F1 e F2.

MATERIAIS GENÉTICOS	CRRS ajustado ¹	
19 x 1327	1.03	a
57 x 1327	0.88	ab
1327	0.77	bc
(19 x 1327)F2	0.69	cd
57 x 699	0.68	cde
(57 x 1327)F2	0.63	cdef
53 x 15	0.62	cdefg
57	0.57	defgh
15	0.52	defghi
699	0.51	fghij
(53 x 15)F2	0.47	ghijl
53 x 16	0.42	hijlm
(57 x 699)F2	0.37	ijlmn
19	0.35	jlmno
16	0.35	lmno
53	0.22	nop
(53 x 16)F2	0.19	op

¹ As médias com as mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey a nível de 5% de probabilidade. O cálculo do CRRS ajustado foi efetuado de acordo com GOMES (1985).

4.2. Estudo dos padrões de RFLP

Dos 58 indivíduos F2 selecionados, conseguiu-se os padrões de RFLP de 38 indivíduos digeridos com a enzima Eco RI e 41 indivíduos com a enzima Eco RV, devido a problemas metodológicos ocorridos nos processos de isolamento, purificação ou digestão do DNA genômico.

A marcação não-radiativa das sondas com digoxigenina foi eficiente, sendo as bandas de RFLP perfeitamente visualizadas, como ilustra o filme de raio-x da Figura 5.

Como pode ser observado na Tabela 8, quase todas as combinações de sonda x enzima produziram muitas bandas de RFLP, com exceção da combinação UMC 34 x Eco RI, onde não foi encontrado polimorfismo. De acordo com HELENTJARIS et alii (1988), provavelmente este padrão de múltiplas bandas foi devido às regiões cromossômicas duplicadas encontradas nos cromossomos 2 e 7.

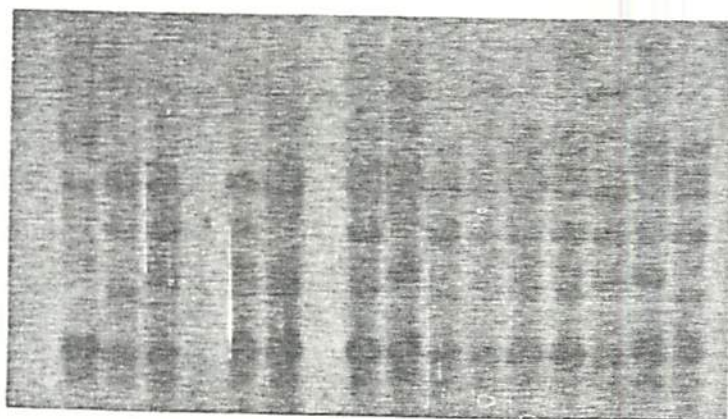


Figura 5. Filme de raio-x com padrões de bandas de RFLP de 14 indivíduos F2 com DNA's digeridos pela enzima Eco RV e hibridados com a sonda UMC 49.

Tabela 8. Número de bandas de RFLP produzidas em cada combinação de sonda x enzima de restrição.

SONDAS	Número de Bandas de RFLP	
	Enzima Eco RV	Enzima Eco RI
UMC 6	10	10
UMC 34	10	1
UMC 36	9	12
UMC 49	16	13
UMC 122	9	10

Como surgiram várias bandas provenientes da combinação sonda x enzima de restrição, não pôde-se efetuar a análise convencional baseada na codominância de um loco de RFLP. A análise foi efetuada então baseando-se na presença ou ausência de cada banda em particular. Admitindo-se a ocorrência de dois

resultados possíveis, a presença ou ausência da banda, este tipo de evento se enquadra em uma distribuição binomial.

As Tabelas 9 e 10 (DNA's digeridos com Eco RI e Eco RV, respectivamente) indicam quais as bandas de RFLP discriminaram os indivíduos tolerantes dos suscetíveis ao AI tóxico na geração F2. Os padrões de bandas de RFLP de cada planta F2 testada encontram-se no Apêndice.

Pode-se notar nas Tabelas 9 e 10 que a maioria das bandas que discriminaram o grupo tolerante do suscetível de um cruzamento não ocorreram em todos os indivíduos de um ou outro grupo. Por exemplo, na Tabela 9, a banda 10 do cruzamento 57 x 699, proveniente da hibridação com a sonda UMC 6 apareceu em 4 indivíduos dos 5 testados, discriminando para o grupo suscetível. Deste modo, conclui-se que ou esta sonda não está relacionada com um dos locos responsáveis pela tolerância ao AI ou a ligação entre a sonda e o loco não se manteve na população segregante.

Tabela 9. Bandas que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao Al quando utilizou-se a enzima Eco RI.

SONDA	57x1327	57x699	53x16	53x15	19x1327
UMC 6	6(1:5)T ¹	9(1:6)T 10(4:5)S	1(2:5)S 5(4:5)S	2(1:3)T 3(4:4)S*	9(3:4)T
UMC 36	1(1:2)S	2(2:6)T 10(1:6)T	2(1:5)S 5(2:5)S 6(1:5)S 7(5:5)S*	2(1:3)T	1(1:4)T
UMC 49	4(2:5)S 11(1:2)S 12(1:5)T	4(2:6)T 10(3:6)T	1(4:5)S 3(5:5)S* 6(3:5)S 8(2:5)S	2(1:3)T 9(1:3)T	2(2:6)S 4(2:6)S
UMC 122	-	3(1:6)T 4(1:6)T 9(4:5)S	3(3:5)S 5(5:5)S* 7(2:5)S 9(3:5)S	1(4:4)S* 2(1:4)S	1(1:5)S 3(2:4)T 10(4:4)T*

* Bandas que estiveram presentes em todos os indivíduos testados do grupo.

¹ O primeiro valor corresponde ao número da banda, o segundo o número de vezes que a banda está presente; número de indivíduos testados, e a letra T ou S, se a banda representa plantas F2 tolerantes ou suscetíveis.

Tabela 10. Bandas que discriminaram indivíduos tolerantes e suscetíveis ao AI quando utilizou-se a enzima Eco RV.

SONDA	57x1327	57x699	53x16	53x15	19x1327
UMC 6	5(2:2)S ¹ 7(2:2)S	1(1:6)T 2(2:6)T 4(1:6)T 8(1:6)T 10(4:5)S	9(1:4)S	4(2:2)T 5(1:4)S 8(2:2)T	3(3:4)S 5(2:4)S 6(1:4)T 8(4:4)S* 10(3:4)T
UMC 34	1(2:2)S 8(1:2)S	3(5:6)T 4(2:6)T	-	2(1:2)T	6(1:4)T 10(3:4)T
UMC 36	1(1:2)S	2(4:6)T 3(1:6)T	4(3:4)S	5(1:2)T	6(1:4)T 6(3:4)T
UMC 49	1(2:2)S 2(1:2)S 12(1:2)S	6(3:6)T	4(1:2)S 10(1:4)S 13(3:4)S	4(1:2)S 5(2:2)T 6(1:4)S 7(4:4)S* 13(2:2)T 14(1:2)T 16(1:2)T	3(1:4)T 16(2:4)T
UMC 122	1(1:2)S 3(2:2)S 6(1:2)S 7(2:2)S 8(1:2)T 9(1:2)S	1(2:6)T 3(2:6)T 4(3:8)T	-	2(1:2)T 3(1:3)S	3(1:4)T 7(1:4)T 9(2:5)S

* Bandas que estiveram presentes em todos os indivíduos testados do grupo (consideraram-se somente os grupos com mais de quatro indivíduos).

¹ O primeiro valor corresponde ao número da banda, o segundo o número de vezes em que a banda está presente; número de indivíduos testados, e a letra T ou S, se a banda representa indivíduos tolerantes ou suscetíveis.

Na Tabela 9, observa-se que no cruzamento 53 x 16 houve 3 casos onde uma banda apareceu em todos os 5 indivíduos testados do grupo suscetível: sonda UMC 36, banda 7; sonda UMC 49, banda 3 e sonda UMC 122, banda 5. Utilizando a distribuição binomial, a probabilidade da ocorrência destas bandas com a suscetibilidade ter sido devida ao acaso foi de $(0,5)^5$, ou 3,1%. Do mesmo modo, no cruzamento 53 x 15 a banda 3 da sonda UMC 6 e a banda 1 da sonda UMC 122 estão relacionadas com a suscetibilidade ao AI, com 6,25% de probabilidade de ser devida ao acaso. Este mesmo percentual teve a banda 10 da sonda UMC 122 no cruzamento 19 x 1327.

Na tabela 10, somente a banda 8 da sonda UMC 6 (cruzamento 19 x 1327), e a banda 7 da sonda UMC 49 (cruzamento 53 x 15) estiveram relacionadas com a suscetibilidade ao AI, cada uma tendo 6,25% de probabilidade de ser devida ao acaso.

Ainda em relação às tabelas 9 e 10, observa-se que nenhuma banda que discriminou indivíduos tolerantes ou suscetíveis em um cruzamento teve igual efeito em outro cruzamento, mesmo naqueles onde o parental tolerante ou suscetível eram comuns. Deste modo faz-se necessário definir os padrões de RFLP dos parentais e F1's para cada cruzamento, e a partir daí proceder normalmente às análises de RFLP na geração segregante F2 de cada cruzamento a fim de detectar ligações entre as sondas e os alelos que conferem a tolerância ao AI tóxico.

Para que se pudesse ter maior confiabilidade na ligação das sondas citadas nos parágrafos anteriores com algum dos locos da tolerância ou suscetibilidade ao Al, um número maior de indivíduos F2 deve ser analisado, algo em torno de 10% dos indivíduos mais tolerantes e 10% dos mais suscetíveis da população testada, localizados nos extremos dos gráficos de distribuição de frequência do CRRS (David Hoisington, comunicação pessoal).

Como já foi comentado no presente trabalho, as combinações de sonda x enzima de restrição produziram padrões de RFLP com várias bandas. Deve-se ressaltar contudo que a procura por combinações que produzam 3 a 6 bandas é de fundamental importância para os estudos de ligação entre sondas e locos relacionados com um caráter (ZEHR et alii, 1992).

A adaptação das técnicas envolvidas na análise de RFLP, para que estas fossem executadas com eficiência e repetibilidade, foi a etapa que consumiu mais tempo e esforço no presente trabalho, e que levou a resultados pioneiros no país utilizando a marcação e detecção não-radiativa das sondas com o sistema digoxigenina. Percebe-se com estes resultados preliminares que existe um grande potencial da análise de RFLP no sentido de auxiliar o melhoramento genético através da seleção assistida por marcadores moleculares.

5. CONCLUSÕES

- 1) Os resultados obtidos com o GRRS indicaram que o caráter tolerância à toxidez do alumínio é de natureza quantitativa, e que há ocorrência de interação alélica de dominância.
- 2) O sistema de marcação e detecção não-radiativa das sondas com digoxigenina mostrou-se uma metodologia perfeitamente viável para ser utilizada na análise de RFLP.
- 3) A análise de RFLP indicou que podem haver regiões no cromossomo 2 relacionadas com locos do caráter tolerância à toxidez do Al.

6. RESUMO

UTILIZAÇÃO DA ANÁLISE DE RFLP NO ESTUDO DA TOLERÂNCIA À TOXIDEZ DO ALUMÍNIO EM MILHO

No presente trabalho foram utilizadas quatro linhagens de milho tolerantes (15, 16, 699 e 1327) e três suscetíveis ao Al tóxico (19, 52 e 57), oriundas do programa de melhoramento de milho do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo/EMBRAPA. A geração F2 foi constituída dos cruzamentos 57 x 1327, 57 x 699, 53 x 16, 53 x 15 e 19 x 1327. As avaliações dos parentais, F1 e F2 foram realizadas em solução nutritiva contendo alto teor de alumínio (222 $\mu\text{mol Al/l}$) em casa de vegetação, no delineamento inteiramente casualizado. Para avaliar a tolerância ao Al utilizou-se o Comprimento Relativo da Raiz Seminal - CRRS (comprimento final subtraído do comprimento inicial dividido pelo comprimento inicial). Após 7 dias as plantas F2 mais tolerantes e mais suscetíveis de cada cruzamento foram selecionadas e submetidas à análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Utilizaram-se na análise as enzimas de

restrição Eco RI e Eco RV, em combinação com 5 sondas de DNA de diferentes regiões do cromossomo 2 (UMC 34, UMC 6, UMC 122, UMC 49 e UMC 38). Os objetivos foram viabilizar a utilização da metodologia não-radiativa de marcação das sondas de DNA com o sistema digoxigenina na análise de RFLP, e encontrar alguma relação entre as sondas testadas e locos da tolerância ao AI. Os resultados obtidos com o sistema digoxigenina mostraram que sua utilização é perfeitamente viável em análises de RFLP. Houve indicativo da existência de regiões no cromossomo 2 relacionadas com locos do caráter tolerância à toxidez do AI.

7. SUMMARY

RFLP ANALYSIS OF ALUMINUM TOLERANCE IN MAIZE

Four aluminum tolerant maize lines (15, 16, 699 and 1327) and three nontolerant ones (19, 52 and 57), originated from the maize breeding program of the National Maize and Sorghum Research Center - CNPMS/EMBRAPA were used in this work. The F2 generation was constituted of the crosses 57 x 1327, 57 x 699, 53 x 16, 53 x 15 e 19 x 1327. The degree of tolerance to aluminum of the parents, F1 and F2 were determined through measurements of the Relative Seminal Root Length of seedlings grown in nutrient solution containing 222 μmol of Al/l. The experiments were carried on under greenhouse condition in a completely randomized design. After seven days the most tolerant and nontolerant F2 individuals from each cross were selected and used for RFLP analysis. Two restriction enzymes, Eco RI and Eco RV, were used in combination with five DNA probes from different regions of the chromosome 2 (UMC 34, UMC 6, UMC 122, UMC 49 and UMC 36). The objectives were to viabilize the use of the nonradioactive

labeled probes with the digoxigenin system, and to look for relationship among the probes used and the loci of the AI tolerance. The results showed that the digoxigenin system is sensitive and reliable for RFLP analysis. Some regions of the chromosome 2 are probably related with loci controlling AI tolerance in maize.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. 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 MS).
02. BECKMANN, J.S. & SOLLER, M. Restriction Fragment Length Polymorphism in plant genetic improvement. Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology, Oxford, 3:196-250, 1986.
03. BENNET, R.J. & BREEN, C.M. The aluminum signal: new dimensions to mechanisms of aluminum tolerance. In: WRIGHT, R.J. Plant-soil interactions at low pH. Dordrecht, Kluwer, 1991. p.703-16.
04. DIERS, B.W.; KEIM, P.; FEHR, W.R. & SHOEMAKER, R.C. RFLP analysis of soybean seed protein and oil content. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 83:608-12, Mar. 1992.

05. 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, 83:765-74, Apr. 1992.

06. FOY, C.D. Physiological effects on hydrogen, aluminum and
manganese toxicities in acid soils. In: ADAMS, F. *Soil
acidity and liming*. Madison, American Society of Agronomy,
1984. p.57-97.

07. _____; CHANEY, R.L. & WHITE, M.C. The physiology of metal
toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, New
York, 29:511-66, 1978.

08. _____ & FLEMING, A.L. The physiology of plant tolerance to
excess available aluminum and manganese in acid soils.
In: JUNG, G.A. *Crop tolerance to suboptimal land
conditions*. Madison, American Society of Agronomy, 1978.
p.301-28.

09. FREY, K.J. Capabilities and limitations of conventional plant
breeding. In: RAGHIE, K.O. & LYMAN, J.M. *Genetic
engineering for crop improvement*. New York, Rockefeller
Foundation, 1981. p.15-62.

10. 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, 21(6):655-60, Jun. 1986.
11. GARCIA, O.; SILVA, W.J. & MASSEI, M.A.S. An efficient method for screening maize inbreds for aluminum tolerance. Maydica, Bergamo, 24(2):75-82, Apr./Jun. 1979.
12. GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. Piracicaba, Nobel, 1985. 466p.
13. GRIERSON, D. & COVEY, S. Plant Molecular Biology. London, Blackie, 1984. 176p.
14. HAYNES, R.J. Lime and phosphate in the soil-plant system. Advances in Agronomy, Orlando, 37:249-303, 1984.
15. HELENTJARIS, T. A genetic linkage map for maize based on RFLP's. Trends in Genetics, Ames, 3(8):217-21, Aug. 1987.
16. _____; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A. & NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, Berlin, 72:761-9, June 1986.

17. HELENTJARIS, T.; WEBER, D. & WRIGHT, S. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism. *Genetics*, Austin, 118:353-63, Feb. 1988.
18. HOISINGTON, D.A. Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. Mexico, CIMMYT, 1992. 66p. (Apostila).
19. _____ & COE, E.H. Mapping in maize using RFLP's. In: GUSTAFSON, J.P. Gene manipulation in plant improvement. New York, Plenum Press, 1990. p.331-52.
20. KAMPRATH, E.J. Soil acidity and liming. In: SANCHEZ, P.A. A review of soils research in tropical Latin America. Raleigh, NCSU, 1973. p.126-37.
21. KOCHERT, G. Introduction to RFLP mapping and plant breeding applications. New York, Rockefeller Foundation, 1989. 16p. (Apostila).
22. LOPES, A.S. Calagem e gesso agrícola como fatores de produtividade dos solos sob cerrado. In: SEMINÁRIO SOBRE FERTILIDADE DO SOLO DA CAG-CC, 2, Cotia, 1987. Resumos... Cotia, 1987. p.52-111.

23. 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, 22(3):257-63, mar. 1987.
24. _____; _____; GAMA, E.E.G.; PARENTONI, S.N.; SANTOS, M.X. & BAHIA FILHO, A.F.C. Mejoramiento de maiz para adaptacion a los suelos de "cerrado" brasileno. In: RAMAKRISHNA, B. Mejoramiento para tolerancia a factores ambientales adversos en el cultivo del maiz. Quito, IICA, 1988. p.53-105.
25. MAGNAVACA, R. Genetic variability and inheritance of aluminum tolerance in maize. Lincoln, University of Nebraska, 1982. 135 p. (Tese de Doutorado).
26. _____ & BAHIA FILHO, A.F.C. Seleção de milho para tolerância ao alumínio. Sete Lagoas, CNPMS, 1991. 30p. (Apostila).
27. _____; GARDNER, C.O. & CLARK, R.B. Comparisons of maize populations for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H.W. & LOUGHMAN, B.C. Genetic aspects of plant mineral nutrition. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987a. p.189-99.

28. MAGNAVAGA, R.; GARDNER, C.O. & CLARK, R.B. Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. In: GABELMAN, H.W. & LOUGHMAN, B.C. Genetic aspects of plant mineral nutrition. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987b. p.255-65.
29. _____; _____ & _____. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN, H.W. & LOUGHMAN, B.C. Genetic aspects of plant mineral nutrition. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1987c. p.201-11.
30. MALUF, W.R. Perspectivas da aplicação da biologia molecular no melhoramento de plantas: o uso dos RFLP's. In: TORRES, A.C. & CALDAS, L.S. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas. Brasília, CNPH, 1990. p.381-89.
31. MARTIN, R.; HOOVER, C.; GRIMME, S.; GROGAN, G.; HOLTKE, J. & KESSLER, C. A highly sensitive, nonradioactive DNA labeling and detection system. *Biotechnology*, Mannheim, 9(6):762-8, Jun. 1990.
32. McCORMICK, L.H. & BORDEN, F.Y. Phosphate fixation by aluminum in plant roots. *Soil Science Society of American Proceedings*, Madison, 36:799-802, Sept./Oct. 1972.

33. MIRANDA, L.E.C.; MIRANDA, L.T. & BRUNINI, O. A summing up of the latente systems, latente-1 stomatal control and linkages in chromosome 2S. Maize Genetics Cooperation News Letter, Bloomington, 61:27-9, 1987.
34. MIYASAKA, S.C.; BUTA, J.G.; HOWELL, R.K. & FOY, C.D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Plant Physiology, Washington, 98:737-43, July 1991.
35. NIENHUIS, J.; HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; RUGGERO, B. & SCHAEFER, A. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of loci associated with insect resistance in tomato. Crop Science, Madison, 27:797-803, July/Aug. 1987.
36. OLMOS, J.I.L. & CAMARGO, M.N. Ocorrência de Al tóxico nos solos do Brasil, sua caracterização e distribuição. Ciência e Cultura, São Paulo, 28:171-80, fev. 1976.
37. OSMOND, C.B.; BJORKMAN, O. & ANDERSON, D.J. Physiological processes in plant ecology. Berlin, Springer-Verlag, 1980. 468p.
38. PHILLIPS, R.L. & JAMES, C. North/Latin American RFLP network. Mexico, CIMMYT, 1988. (Apostila).

39. REICHARDT, K. Soil physico-chemical conditions and the development of roots. In: RUSSEL, R.S.; IGUE, K. & MEHTA, Y.R. The soil-root system in relation to brazilian agriculture. Londrina, IAPAR, 1981. p.103-14.
40. REITER, R.S. Genetic analysis of tolerance to low phosphorus stress in maize using Restriction Fragment Length Polymorphism. Madison, University of Wisconsin, 1989. 102p. (Tese de Doutorado).
41. RHUE, R.D. & GROGAN, C.O. Screening corn for Al tolerance using different Ca e Mg concentrations. Agronomy Journal, Madison, 69:755-60, Sept./Oct. 1977.
42. _____; _____; STOCKMEYER, E.W. & EVERETT, H.L. Genetic control of aluminum tolerance in corn. Crop Science, Madison, 18:1063-67, Nov./Dec. 1978.
43. RUSSEL, E.W. Soil conditions and plant growth. London, Longman, 1973. 849p.
44. SAWAZAKI, 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.382-92.

45. 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, 7: 257-64, Mar. 1989.
46. ZEHR, B.E.; DUDLEY, J.W.; CHOJECKI, J.; MAROOF, M.A.S.; MOWERS, R.P. Use of molecular markers to search for alleles in a maize population for improvement of an elite hybrid. *Theoretical and Applied Genetics*, Berlin, 83:803-11, Apr. 1992.

APÊNDICE

../.

Individuos
por cruzamiento

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS

53 x 15

CRRS

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

0,8696 T

1,7273 T

0,0698 S

0,0000 S

0,1915 S

0,0233 S

19 x 1327

CRRS

1,2143 T

1,7000 T

1,2727 T

1,1458 T

0,0417 S

-0,0714 S

0,2800 S

0,0526 S

SONDA UHC 36

57 x 1327

CRRS

0,9706 T

0,9474 T

1,3889 T

1,6071 T

0,1667 S

0,0238 S

...../.....

 Individuos
 por cruzamiento

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS

53 x 16 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

CRRS

0,6667 T	S	-	-	S	-	-	-	S	-	-
-0,0400 S	-	-	-	S	-	-	-	S	-	-
-0,2097 S	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-
0,0000 S	S	-	-	-	-	-	-	S	-	-
0,0385 S	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-

53 x 15

CRRS

0,8696 T	-	S	-	S	-	-	-	S	-	-
1,7273 T	-	-	S	S	-	-	-	S	-	-
0,0698 S	-	-	-	-	-	-	-	S	-	-
0,0000 S	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-
0,1915 S	-	-	S	S	-	-	-	-	-	-
0,0233 S	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-

19 x 1327

CRRS

1,2143 T	-	-	-	S	-	-	-	-	-	S
1,7000 T	-	-	-	S	-	S	-	-	-	S
1,2727 T	-	-	-	S	-	-	-	-	-	S
1,1458 T	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-
0,0417 S	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-
-0,0714 S	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-
0,2800 S	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-
0,0526 S	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-

...../.....

...../.....

Indivíduos
por cruzamento

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS

57 x 1327

SONDA UMC 6

CRRS

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

0,9706 T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,9474 T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,3889 T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,6071 T	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-
0,1667 S	-	-	S	-	S	-	S	S	-	-
0,0238 S	-	-	S	-	S	-	S	S	-	-

57 x 699

CRRS

0,7500 T	-	-	-	-	S	-	S	-	-	-
1,0476 T	S	-	-	-	S	-	-	-	-	-
0,6296 T	-	-	-	-	S	-	S	-	-	-
0,7561 T	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-
0,7059 T	-	-	-	-	S	-	S	-	-	-
0,7727 T	-	S	-	S	-	-	-	S	-	-
0,0000 S	-	-	-	-	S	-	S	-	-	-
0,1000 S	-	-	-	-	S	-	S	-	-	-
0,1538 S	-	-	-	-	S	-	S	-	-	-
0,0000 S	-	-	-	-	-	-	S	-	-	-
-0,0444 S	-	-	-	-	S	-	S	-	-	S

53 x 16

CRRS

0,6667 T	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-
-0,0400 S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-0,2097 S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,0000 S	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-
0,0385 S	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-

...../.....

Individuos
por cruzamiento

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS

53 x 15

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

CRRS

0,8696 T
1,7273 T
0,0698 S
0,0000 S
0,1915 S
0,0233 S

- S - - - - -
- S S - - - - -
- - - - - S - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -

19 x 1327

CRRS

1,2143 T
1,7000 T
1,2727 T
1,1458 T
0,0417 S
-0,0714 S
0,2800 S
0,0526 S

- - - - - S - - - - -
- - - - - S S - - - - -
- - - - - S S S - - - - -
- - - - - S S S - - - - -
- - - - - S - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -
- - - - - - - - - - -

SONDA UMC 122

CRRS

57 x 1327

0,9706 T
1,6071 T
0,1667 S
0,0238 S

- - - - - S - - - - -
- - - - - S - - - - -
- - - - - S - - - - -
- - - - - S - - - - -
- - - - - S - - - - -
- - - - - S - - - - -
- - - - - S - - - - -
- - - - - S - - - - -

Individuos
por cruzamento

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS

57 x 699

CRRS

1 2 3 4 5 6 7 8 9

0,7500 T

1,0476 T

0,6296 T

0,7561 T

0,7059 T

0,7727 T

0,0000 S

0,1000 S

0,1538 S

0,0000 S

-0,0444 S

53 x 16

CRRS

0,6667 T

-0,0400 S

-0,2097 S

0,0000 S

0,0385 S

53 x 15

CRRS

0,8696 T

1,7273 T

0,0000 S

0,1915 S

0,0233 S

...../.....

 Indivíduos
 por cruzamento

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS

19 x 1327

1 2 3 4 5 6 7 8 9

CRRS

1,2143 T	-	-	-	-	S	-	-	-	-
1,7000 T	-	S	S	-	S	-	-	-	-
1,2727 T	-	S	-	-	S	S	S	S	-
1,1458 T	-	S	-	-	-	-	-	-	-
0,0417 S	-	-	-	-	S	-	-	-	-
-0,0714 S	-	S	-	-	S	S	-	S	S
0,2800 S	-	-	-	-	-	-	-	S	S
0,0526 S	-	-	-	-	S	-	-	S	-

Individuos
por cruzamiento

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS

53 x 16 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

CRRS

0,6667 T - - - 5 5 - 5 - 5 - -
 -0,0400 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 -0,2097 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0000 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0385 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0000 S - - - 5 - 5 - - 5 - -

53 x 15

CRRS

0,8696 T - - - 5 - 5 - - 5 - -
 1,7273 T - - - 5 - 5 - - 5 - -
 1,8571 T - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0698 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0000 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,1915 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0233 S - - - 5 - 5 - - 5 - -

19 x 1327

1,2143 T - - - 5 - 5 - - 5 - -
 1,7000 T - - - 5 - 5 - - 5 - -
 1,2727 T - - - 5 - 5 - - 5 - -
 1,1458 T - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0417 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 -0,0714 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,2800 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0000 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0526 S - - - 5 - 5 - - 5 - -
 0,0000 S - - - 5 - 5 - - 5 - -

.../...

.../...

...../....

Indivíduos
por cruzamento

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS

53 X 15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
CRRS												
0,8696 T	-	-	S	-	-	S	S	S	S	-		
1,7273 T	-	-	S	-	S	S	S	S	S	-		
0,0698 S	-	-	-	-	-	-	-	-	S	-		
0,0000 S	-	-	-	-	S	-	-	-	S	-		
0,1915 S	-	-	-	-	S	S	-	S	-	-		
0,0233 S	-	S	S	-	S	-	S	S	S	-		

19 x 1327

CRRS

1,2143 T	-	-	-	-	-	-	S	-	-	S		
1,7000 T	-	S	S	S	-	S	S	-	-	S		
1,2727 T	-	S	S	S	-	S	S	-	-	S		
1,1458 T	-	S	-	S	-	S	S	S	-	S		
0,0417 S	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-		
-0,0714 S	-	-	-	S	-	S	S	S	-	-		
0,2800 S	S	S	-	S	-	S	S	S	-	-		
0,0000 S	-	-	-	-	-	S	S	-	-	-		
0,0526 S	-	-	-	S	-	S	S	-	-	-		

SONDA UMC 6

57 X 1327

CRRS

0,9706 T	-	-	-	S	S	-	-	-	-	-		
0,9474 T	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-		
1,3889 T	-	-	-	S	S	-	-	-	-	-		
1,0000 T	-	-	-	-	S	S	-	-	-	-		
1,6071 T	-	-	-	S	S	-	-	-	-	-		
0,1667 S	-	-	-	S	S	-	-	-	-	-		
0,0238 S	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-		

...../.....

...../

Individuos
por cruzamiento

53 x 16

CRRS

0,6667 T
-0,0406 S
-0,2097 S
0,0000 S
0,0385 S
0,0000 S

53 x 15

CRRS

0,8696 T
1,7273 T
1,8571 T
0,0698 S
0,0000 S
0,1915 S
0,2233 S

19 x 1327

CRRS

1,2143 T
1,7000 T
1,2727 T
0,1458 S
0,0417 S
-0,0714 S
0,2800 S
0,0000 S
0,0526 S
0,0000 S

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

SONDAS E NÚMERO DE BANDAS