

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

HERANÇA DA TOLERÂNCIA À TOXICIDADE AO
ALUMÍNIO (Al^{3+}) EM MILHO E IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES
CROMOSSÔMICAS ASSOCIADAS AO CARÁTER

Léo Duc Haa Carson Schwartzaupt da Conceição
Engenheiro Agrônomo/UFRGS

Tese apresentada com um dos
requisitos à obtenção do Grau de
Doutor em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio de 2006

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul em especial ao programa de Pós-graduação em Fitotecnia da Faculdade de Agronomia e ao CNPq pelo apoio financeiro e oportunidade de realizar o curso.

As professoras Dra. Maria Jane Sereno, Dra. Fernanda Bered, Dra. Sandra Milach e Dra. Carla Delatorre pelo apoio e colaboração na minha formação.

Aos professores Dr. Fernando Carvalho e Dr. Humberto Bohnen pela colaboração e participação na comissão de orientação.

Aos colegas Carolina Tessele, Josana Rodrigues, Norian Bispo, Tatiana Terra, Márcio Luiz De Carli, Agenor Wernz, Tatiana Boff, Paulo Roberto Silva, Paula Witholter, Cícero Carlos de Almeida, Edison Amorin, Paulo Fagundes, Sérgio Silva e Adriane Leite do Amaral pela amizade, companheirismo e colaboração em diferentes fases deste trabalho.

Aos ex-estudantes e amigos Diego Pegoraro, Elton Vacaro, Andréa Milttelmann e Ana Cristina Mazzocatto pela importante participação no início de minha formação como bolsista de iniciação.

A todos os professores do departamento e do programa que de alguma forma contribuíram durante minha vida acadêmica nesta escola.

Aos funcionários do departamento e da estação experimental pelo auxílio em diversas oportunidades, em especial a Marisa por toda sua paciência em muitas ocasiões.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular Fábio e Jonatah pela eficiência no auxílio dos trabalhos finais e pela amizade.

A Empresa Monsanto pelo fornecimento de sementes de híbridos.

A Empresa Agroeste, em especial ao pesquisador Cláudio Natalino Nuss, pelo fornecimento das linhagens e híbridos e suporte na realização de alguns trabalhos a campo.

A Fundacep de Cruz Alta em especial a Dra. Larissa Winkler pelos serviços prestados e fornecimento de área para trabalhos a campo na fase final do trabalho.

Um agradecimento especial ao Prof. Dr. José Fernandes Barbosa Neto pela excelente orientação, apoio, paciência, amizade e confiança durante esses nove anos de trabalhos desde a graduação na iniciação científica até o final do doutorado.

Aos meus pais Carlos Nelson da Conceição e Maria Bernadete Schwartzhaupt pelo apoio e incentivo.

A minha esposa Géssica Caroline e minha filha Gabriela, que foram as maiores motivações para realização e conclusão deste trabalho.

HERANÇA DA TOLERÂNCIA À TOXICIDADE AO ALUMÍNIO (Al^{3+}) EM MILHO E IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES CROMOSSÔMICAS ASSOCIADAS AO CARÁTER ¹

Autor: Léo Duc Haa Carson Schwartzhaupt da Conceição
Orientador: José Fernández Barbosa Neto
Coorientador: Fernanda Bered

RESUMO

A toxicidade por alumínio é uma das principais limitações para produção de plantas em áreas cultiváveis, incluindo a cultura do milho. Existe elevada variabilidade genética para o caráter tolerância ao alumínio nesta espécie, porém, a seleção é trabalhosa devido à dificuldade de avaliação a campo. Os objetivos do presente trabalho foram caracterizar a tolerância à toxicidade ao alumínio em cinco linhagens de milho e identificar marcadores moleculares ligados aos genes que determinam essa tolerância. Foi realizado um experimento dialélico entre três linhagens tolerantes e duas sensíveis ao alumínio utilizando o método de recrescimento da raiz principal (DIF). Houve superioridade das populações híbridas em relação aos genitores e, pelo desdobramento dos efeitos de heterose, houve significância nos efeitos de heterose de variedade e heterose específica. As linhagens L06 e L09 obtiveram maior capacidade geral de combinação e o cruzamento L10xL08 foi a melhor combinação específica. Para fenotipagem, realizada em famílias F_3 dos cruzamentos L09xL06 e L10xL08 foi utilizado DIF e o método coloração com hematoxilina (HEM). Para análise molecular foram utilizados marcadores SSR. Foram obtidos 37 marcadores polimórficos. A análise de regressão mostrou significância em marcadores localizados nos cromossomos 4, 5, 6, 8 e 10. Os QTLs identificados explicaram 41% e 37% da variação para as variáveis DIF e HEM, respectivamente. Foi encontrada associação entre os experimentos a campo e trabalhos realizados em solução mínima para os híbridos testemunha, entretanto não houve correlação nos dados gerados pelas famílias F_3 dos cruzamentos estudados. Os resultados sugerem o envolvimento de diversos genes, tratando-se de uma característica de herança complexa determinada por efeitos genéticos aditivos e não-aditivos.

¹Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, (87p.) Maio, 2006.

INHERITANCE OF THE ALUMINUM TOLERANCE IN MAIZE AND IDENTIFICATION OF CHROMOSSOMIC REGIONS ASSOCIATED TO THE TRAIT ¹

Author: Léo Duc Haa Carson Schwartzhaupt da Conceição

Adviser: José Fernandes Barbosa Neto

Co-adviser. Fernanda Bered

ABSTRACT

Aluminum toxicity is an important limitation for crop production in cultivated areas, including the culture of corn. High genetic variability exists for the trait aluminum tolerance in corn; however, selection of tolerant plants is inefficient due to difficulties in field evaluation. The objectives of the present work were to characterize tolerance to aluminum toxicity five corn inbreds and to identify molecular markers linked to the genes that determine this tolerance. A diallel was accomplished between three tolerant inbreds and two sensitive to the aluminum. There was superiority of the hybrid populations compared to the parents. Heterosis effects were significant for variety and specific effects. The inbreds L06 and L09 showed larger general combining ability and the cross L10xL08 was the best for specific combining ability. F₃ families were phenotypes for root growth (DIF) and hematoxilin coloration (HEM). The molecular marker analysis used SSR and 37 markers were polymorphic. The regression analysis showed significance for markers located in chromosomes 4, 5, 6, 8, and 10. Identified QTLs explained 41% and 37% of the variation for the variables DIF and HEM, respectively. It was found association among field experiment and results obtained with minimum solution for the hybrid checks. On the other hand, there was no correlation for the data generated by the families F₃ of the studied crossings. The results suggest the involvement of several genes in the tolerance to aluminum in corn, being a trait of complex inheritance determined by additive and non-additive genetic effects.

¹Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (87p.) May, 2006.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Relação Alumínio-Planta.....	4
2.2. Mecanismos de tolerância.....	9
2.3. Genética da tolerância.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Germoplasma.....	26
3.2. Adequação da técnica de recrescimento da raiz principal.....	26
3.3. Dialélico - F ₂	27
3.4. Estabelecimento do protocolo para coloração com hematoxilina.....	28
3.5. Fenotipagem - F ₃	29
3.6. Extração do DNA.....	29
3.7. Mapeamento com marcadores moleculares.....	30
3.8. Experimento a campo.....	32
3.9. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Adequação da técnica de recrescimento da raiz principal.....	35
4.2. Análise Dialélica.....	40
4.3. Estabelecimento do protocolo para coloração com hematoxilina.....	47
4.4. Fenotipagem.....	51
4.5. Mapeamento com marcadores moleculares.....	60
4.6. Experimento a campo.....	67
5. CONCLUSÕES	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Resumo da análise de variância conjunta dos experimentos para as variáveis diferença do comprimento final relativo ao controle (DCFRC) e diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial (DIF). FA-UFRGS. 2002.....	36
2. Coeficiente de variação das variáveis analisadas, diferença do comprimento final relativo ao controle (DCFRC) e diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial (DIF), para as seis combinações de concentrações (mM) de Al e Ca testadas para adequação da técnica recrescimento da raiz principal. FA-UFRGS. 2002.....	39
3. Média (cm) de DIF, variância (VAR), desvio padrão (DP), após tratamento com alumínio por 48h em cinco linhagens e dois híbridos testemunhas (DKB747, tolerante, e DKB205, sensível). FA-UFRGS. 2004.....	40
4. Resumo da análise de variância para recrescimento de raiz (DIF) de milho em cruzamento dialélico 5x5 de acordo com o modelo de Gardner & Eberhart (1966) adaptado pro Miranda Filho & Chaves (1996). FA-UFRGS. 2004.....	42
5. Média para recrescimento de raiz (DIF) após tratamento de alumínio em cinco linhagens (diagonal) e a geração F ₂ de todos os possíveis cruzamentos (diagonal acima). FA-UFRGS. 2004.....	43
6. Estimativa do efeito de variedade (vi), heterose de variedade (hi) e heterose específica (sij), variância (σ^2) e capacidade geral de combinação (gi) no cruzamento dialélico 5x5. FA-UFRGS. 2004.....	44
7. Teste realizado com os híbridos testemunhas para os métodos coloração com hematoxilina (HEM) e recrescimento da raiz principal (DIF) simultaneamente após 24h de exposição. FA-UFRGS. 2005.....	50
8. Informações sobre marcadores microssatélites polimórficos, loco, localização cromossômica do marcador (BIN), seqüência repetitiva (motivo) e temperatura de anelamento (T.A.). FA-UFRGS. 2005-2006.....	61
9. Marcadores associados a QTL, localização cromossômica do marcador (BIN), probabilidade e coeficientes de correlação (em %) em relação as variáveis analisadas. FA-UFRGS. 2005-2006.....	64

	Página
10. Comparação de relatos de regiões cromossômicas (BIN) associadas ao caráter tolerância. FA-UFRGS. 2005-2006.....	66
11. Médias das variáveis observadas a campo rendimento da parcela (REND PARC), número de espigas (N ESP), número de espigas por planta (N ESP PLA), peso de espiga (PES ESP) e estatura (EST). Fundacep-Cruz Alta. 2005-2006.....	69
12. Correlações entre as variáveis diferença de crescimento da raiz principal (DIF), coloração com hematoxilina (HEM), rendimento da parcela (REND PARC) e variáveis observadas a campo para as famílias F ₃ do cruzamento L09xL06. Fundacep-Cruz Alta. 2005-2006.....	70
13. Correlações entre as variáveis diferença de crescimento da raiz principal (DIF), coloração com hematoxilina (HEM), rendimento parcela (REND PARC) e variáveis observadas a campo para as famílias F ₃ do cruzamento L10xL08. Fundacep-Cruz Alta. 2005-2006.....	71

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. As raízes foram classificadas de acordo com a intensidade e distribuição da coloração em 1, 2 e 3. FA-UFRGS. 2005.....	28
2. Diferença do comprimento final relativo ao controle (DCFRC). As barras brancas representam o genótipo tolerante (DKB747) e as barras pretas representam o genótipo sensível (DKB205). Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FA-UFRGS. 2002.....	37
3. Diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial (DIF). As barras brancas representam o genótipo tolerante (DKB747) e as barras pretas representam o genótipo sensível (DKB205). Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FA-UFRGS. 2002.....	38
4. Teste do método coloração com hematoxilina nos híbridos testemunhas (DKB350, DKB747, DKB205, AS3466 e AS1533) variando a concentração de alumínio (0,06, 0,08 e 0,1mM de $AlCl_3$ e tempo de exposição (2, 4, 6, 24, 48h). As categorias 1, 2 e 3 (Figura 2, Material e Métodos) estão representadas pelas cores branco, cinza e preto, respectivamente. Cada retângulo representa uma plântula avaliada. FA-UFRGS. 2005.....	49
5. Médias dos valores de recrescimento para os híbridos comerciais testemunhas. Abaixo, cada gráfico representa a porcentagem de plântulas na categoria 1 (branco), 2 (cinza) e 3 (preto) para cada híbrido avaliado em hematoxilina após 24h de exposição ao alumínio na concentração de 0,1mM de $AlCl_3$. Médias seguidas por mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FA-UFRGS. 2005.....	52
6. Médias dos valores de recrescimento para as linhagens. Abaixo, cada gráfico representa a porcentagem de plântulas na categoria 1 (branco), 2 (cinza) e 3 (preto) para cada linhagem avaliada em hematoxilina após 24h de exposição ao alumínio na concentração de 0,1mM de $AlCl_3$. Médias seguidas por mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FA-UFRGS. 2005.....	53

	Página
7. Interação genótipo X tempo de exposição ao alumínio tóxico. FA-UFRGS. 2004-2005.....	54
8. Diagrama de dispersão para análise de correlação entre os valores médios das variáveis DIF e HEM após 24h de exposição ao Al ³⁺ (0,1mM). Foram avaliadas 30 famílias F ₃ do cruzamento das linhagens L09xL06 (Gráfico A) e 60 famílias F ₃ do cruzamento das linhagens L10xL08 (Gráfico B). FA-UFRGS. 2005.....	55
9. Distribuição da freqüência dos indivíduos a cada acréscimo de milímetro (Gráfico B, média das famílias F ₃) e a cada 2 milímetros (Gráfico A, média de plântulas F ₂) nos valores da variável DIF para o cruzamento L09xL06. FA-UFRGS. 2005.....	57
10. Distribuição da freqüência dos indivíduos a cada acréscimo de milímetro (gráfico B, média das famílias F ₃) e a cada 2 milímetros (gráfico A, média de plântulas F ₂) nos valores da variável DIF para o cruzamento L10xL08. FA-UFRGS. 2005.....	58
11. Grupos referentes aos cromossomos 8 e 10 obtidos pela análise de ligação. Marcadores umc1202 e umc1318 estão associados as variáveis DIF e HEM e localizados no mesmo BIN de <i>idh1</i> e <i>csu359</i> (homólogo a <i>wali7</i>), respectivamente. FA-UFRGS. 2005-2006.....	67
12. Distribuição da freqüência dos indivíduos a cada acréscimo de 0,1kg na média das famílias F ₃ nos valores da variável rendimento em peso total de espigas (REND PARC) para os cruzamentos L09xL06 (Gráfico A) e L10xL08 (Gráfico B). Fundacep-Cruz Alta. 2005-2006.....	72

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays*) no Estado do Rio Grande do Sul ocupa, aproximadamente, 28% do total das áreas cultivadas com culturas de grãos de primavera-verão, possuindo importância relevante para a economia gaúcha. De acordo com o senso agropecuário do IBGE de 1995/96, em relação ao milho, 94% das propriedades rurais possuíam áreas menores do que 100 hectares e produziram 70% do total da safra referida, refletindo o papel sócio-econômico desta cultura.

Em solos tropicais e subtropicais úmidos, com altas precipitações pluviométricas, nutrientes solúveis como cálcio, magnésio, potássio e outros elementos básicos são lixiviados. Quando a remoção de cátions básicos é maior que sua taxa de liberação pelas intempéries, o pH do solo diminui. A degradação da matéria orgânica por microorganismos do solo resulta na liberação de nitrato e hidrogênio, ocasionando a redução do pH. Em pH baixo, o hidrogênio (H^+) atua sobre os minerais liberando íons alumínio (Al^{3+}) que ficam predominantemente retidos pelas cargas negativas das partículas de argila do solo, em equilíbrio com Al^{3+} em solução. Assim, a quantidade de Al^{3+} em solução aumenta com a acidez do solo. Estimativas recentes sugerem que quase 50% dos solos cultiváveis disponíveis em todo mundo para produção agrícola estão sujeitos à toxicidade do alumínio. O alumínio deprime o sistema de raízes em plantas, prejudicando a absorção de

nutrientes, interferindo no desenvolvimento e, por conseqüência, reduzindo o rendimento e qualidade do cultivo. Entre as culturas afetadas destaca-se o milho, em que os problemas causados por alumínio podem reduzir a produtividade em níveis acima de 80%. Os problemas de acidez dos solos podem ser contornados com o uso de técnicas agronômicas como a calagem. Porém nem sempre esta prática é viável em regiões nas quais predominam agricultores com nível tecnológico limitado. Além disso, com o advento do sistema de semeadura direta a técnica da calagem tem sido restrita a aplicações na fase inicial do processo, sendo que aplicações posteriores são realizadas em linha ou na superfície do solo, determinando baixa eficiência no controle da acidez.

Por estas razões, o melhoramento de plantas tem empenhado esforços na busca de genótipos de milho com tolerância ao alumínio, entretanto, apesar de diversos trabalhos demonstrarem a existência de variabilidade genética para o caráter, a seleção para tolerância ao alumínio em milho é trabalhosa. Entre os fatores que reduzem a eficiência na seleção é possível destacar a dificuldade nas avaliações a campo, sendo exigidas avaliações de laboratório com solução nutritiva. Da mesma forma, é fundamental um melhor entendimento das bases genéticas, fisiológicas e moleculares da tolerância ao alumínio.

Atualmente, a identificação de genes de importância econômica é um objetivo atingível em plantas cultivadas e a análise genética de DNA está se tornando cada vez mais eficiente. Com isto, uma grande quantidade de informações sobre genomas está sendo gerada, abrindo inúmeras oportunidades para exploração da variabilidade genética existente, tanto em espécies agronômicas como no germoplasma silvestre.

Uma importante estratégia é a identificação de marcadores moleculares associados a genes ou locos controladores de caracteres quantitativos responsáveis pela expressão (QTL). Desta forma, esta alternativa possibilita a realização de seleção assistida para o caráter tolerância ao alumínio em milho, tornando o processo de seleção mais eficiente, dinâmico e com custo relativamente baixo.

Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram caracterizar a tolerância à toxicidade ao alumínio em cinco linhagens de milho, quanto aos efeitos genéticos que determinam o caráter e identificar novos marcadores moleculares ligados aos genes que determinam essa tolerância.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A acidez do solo (com $\text{pH} \leq 5,5$) é uma limitação importante para a produção agrícola no mundo. Aproximadamente 30% das áreas de terra do planeta são solos ácidos, somando 50% das terras potencialmente aráveis do planeta (Kochian et al., 2004). Muitas espécies de plantas são sensíveis a concentrações micromolares de alumínio. Considerando que a solubilização do alumínio em sua forma fitotóxica (Al^{3+}) ocorre em solos com acidez, o Al^{3+} é o principal impedimento na produção, alterando o rendimento das culturas em solos nesta condição (Delhaize & Ryan, 1995). A toxicidade por alumínio trocável tem sido identificada como um problema em solos ácidos por quase 90 anos (Ruprecht, 1918; citado por Barceló & Poschenrieder, 2002) e, apesar dos grandes avanços tecnológicos na ciência em termos de métodos de análise em nível celular, o total entendimento das bases fisiológicas e moleculares sobre os mecanismos de toxicidade do alumínio ainda permanecem incompletos e insatisfatórios.

2.1. Relação alumínio-planta

Os danos causados por alumínio as plantas, assim como os mecanismos ligados à tolerância deste elemento, têm sido abordados em publicações recentes, e evidências apontam que a tolerância está ligada a habilidade da planta em excluir alumínio das raízes ou destoxicar íons de alumínio da planta (Delhaize & Ryan, 1995;

López Búcio et al., 2000; Ryan et al., 2001; Ma et al., 2001; Barceló & Poschenrieder, 2002; Kochian et al., 2004). Entretanto, progressos na definição e conhecimento dos mecanismos de tolerância ao alumínio dependem da compreensão da reação das plantas a este elemento em sua forma tóxica (Bennet & Breen, 1991). São vários os sintomas das injúrias causadas pelo Al^{3+} em plantas. Em algumas espécies os sintomas nas folhas lembram a deficiência de P^{2+} , em outras, a deficiência de Ca^{2+} ou de Fe^{3+} . As raízes danificadas pelo Al^{3+} apresentam um desenvolvimento característico nas extremidades, a região meristemática das raízes principais e laterais engrossa e tem uma coloração mais escura, sendo estas ineficientes na absorção de nutrientes e água (Foy et al., 1978).

O sintoma mais facilmente perceptível de toxicidade ao alumínio é a inibição do crescimento das raízes. Em soluções com nutrientes simples, concentrações micromolares de alumínio podem inibir o crescimento de raízes em 60 minutos (Delhaize & Ryan, 1995), resultando em uma redução e danos no sistema radical, e desta forma, limitando a absorção de água e nutrientes minerais (Kochian et al., 2004). Diferentes hipóteses para o mecanismo dessa inibição induzida por alumínio no crescimento das raízes têm sido discutidas por muitos autores durante estas últimas décadas de experimentação. Entre elas, estão relacionadas a interferência do alumínio no metabolismo do Ca^{2+} , inibição da divisão celular nas raízes e a inibição na alongação das células das raízes (Barceló & Poschenrieder, 2002).

Alguns autores têm levantado hipóteses e evidências à respeito do sítio primário de efeito tóxico do Al^{3+} , relacionado com o deslocamento do Ca^{2+} do apoplasma por competição por ligantes na membrana plasmática (Rengel, 1992) ou

pela redução da entrada e transporte do Ca^{2+} para as células (Huang et al. 1992; Rengel, 1992;) que pode inclusive causar deficiência deste elemento (Foy, 1978). Entretanto, estas hipóteses foram rebatidas por trabalhos realizados pelo grupo de pesquisadores da Austrália, mostrando que a inibição do crescimento das raízes de genótipos sensíveis de trigo não podia ser explicada por essas razões citadas acima (Ryan et al., 1994; Ryan et al., 1997b). O cálcio é absorvido pelas plantas como íon Ca^{+2} , sendo encontrado nas células em compostos orgânicos ou na forma iônica, e possui papel relevante na formação da lamela média das células e na absorção de nutrientes. O crescimento das raízes também é afetado. Desta forma, as raízes necessitam do elemento no ambiente de absorção (Bissani & Tedesco, 1995). Trabalhos realizados em milho por Canal & Mielniczul (1993a; 1993b) salientaram que para o contínuo crescimento da raiz era exigido um suprimento permanente de Ca^{2+} da solução externa. Os mesmos autores também observaram que o aumento do Ca^{2+} na solução contribuía para o aumento do comprimento da raiz, tanto o tratamento com Al^{3+} , como no sem Al^{3+} . Diversos trabalhos têm demonstrado que a razão Al/Ca é extremamente importante na separação de genótipos de diferentes reações à toxidez de Al^{3+} (Andrade, 1976; Nodari, 1980, Camargo, 1985). Cambria & Cambria, (1995) verificaram que o Al^{3+} na presença de Ca^{2+} reduzia significativamente o comprimento da raiz principal apenas no híbrido de milho sensível, no entanto, para o híbrido tolerante, a redução ocorria apenas na ausência de Ca^{2+} .

A zona do ápice da raiz (capa da raiz, meristema e zona de alongação) acumula mais Al^{3+} e atraem maiores danos físicos do que em tecidos maduros

localizados na raiz (Delhaize & Ryan, 1995). De fato, somente os 2 à 3mm apicais em raízes de milho (capa e meristema) necessitam ser expostos para o crescimento ser inibido. Quando o alumínio é seletivamente aplicado na zona de alongação ou em toda raiz, exceto o ápice, o crescimento não é afetado (Ryan et al., 1993). Bennet & Breen (1991) sugeriram que o Al^{3+} poderia inibir o crescimento da raiz indiretamente via uma rota sinal-resposta envolvendo capa da raiz, hormônios e mensageiros secundários. Entretanto, Ryan et al. (1993) mostraram que os efeitos causados pelo Al^{3+} não eram cessados em raízes decapadas de milho comparado a raízes intactas, realçando, desta forma, a importância do meristema. Sendo assim, o sítio primário de toxicidade do Al^{3+} está localizado no ápice, deste modo, pesquisas em mecanismos de tolerância também devem ser focadas nesta região da raiz (Kochian et al, 2004). Existe uma série de discussões em relação aos mecanismos responsáveis pela inibição do crescimento da raiz, principalmente dúvidas em relação se a inibição é causada devido a inibição da divisão celular ou da expansão das células da raiz (Barceló & Poschenrieder, 2002). Outra questão é se os efeitos tóxicos são de maior responsabilidade do alumínio apoplástico ou simplástico (Delhaize & Ryan,1995; Barceló & Poschenrieder, 2002). A inibição do crescimento da raiz tem sido considerada por alguns autores como o resultado de distúrbios na divisão celular de sua região meristemática e, por conseqüência, a interrupção da mitose (Nichol & Oliveira, 1995). Fiskesjö (1983) observou, em raízes de *Allium cepa* L. expostas ao Al^{3+} , a desintegração e extrusão do material nucleolar para o citoplasma em células das zonas afetadas. Morimura & Matsumoto (1978) propuseram que polímeros de Al^{3+} poderiam ligar-se a fosfatos do DNA causando

estabilização da dupla fita resultando em um decréscimo do desenrolamento da estrutura do DNA e, conseqüentemente, redução da atividade de duplicação. Os mesmos autores determinaram que a síntese de RNA era claramente reprimida na cromatina de plantas tratadas com alumínio *in vivo* e *in vitro*. Conjuntamente, foram realizadas análises com espectrofotômetro, onde foram observadas mudanças na absorção do comprimento de onda na cromatina com o aumento da concentração de Al^{3+} , indicando que polímeros de alumínio ligavam-se aos grupos fosfato na dupla fita, resultando no agregamento das fibras da cromatina. Esta mudança estrutural da cromatina torna-a mais condensada, e, conseqüentemente, leva a uma menor atividade de transcrição (Matsumoto & Morimura, 1980). Contudo, as evidências apontam que o decréscimo da divisão celular não seria o mecanismo primário da inibição do crescimento da raiz induzida pelo alumínio. Entre os argumentos que reforçam contra esta hipótese, é que a rápida resposta da planta pela inibição pode ocorrer dentro de poucos minutos de exposição ao alumínio, e que a desorção do alumínio apoplástico pelo citrato, permite a recuperação da taxa de crescimento da raiz (Horst, 1995). Horst et al. (1999) verificaram que a rápida desorganização do citoesqueleto, levando a inibição do crescimento da raiz, poderia ser mediada pela interação do alumínio com o lado apoplástico da parede celular, membrana plasmática e citoesqueleto. Wallace & Anderson (1984), avaliando dois cultivares de trigo com diferentes graus de suscetibilidade ao Al^{3+} , colocadas em solução nutriente contendo este elemento em diferentes níveis de concentrações, observaram que a inibição induzida por alumínio no crescimento radicular precedia qualquer efeito mensurável na síntese de DNA. Os autores concluíram que o alumínio teria dois

efeitos em cultivares suscetíveis: rápida inibição do crescimento radical, seguido pela inibição na síntese de DNA. Entretanto, apesar do alumínio em teoria, mesmo em sua forma tóxica, ser insolúvel à membrana plasmática, não só apenas ele cruza a membrana, mas metade do Al^{3+} presente no ápice da raiz encontra-se no simplasma (Delhaize & Ryan, 1995). Com o avanço de alguns métodos é possível medir em pequenas frações a entrada de alumínio no simplasma em plantas expostas em um curto tempo (Lazof et al., 1996). Desta forma, ambos apoplástico e simplástico podem estar envolvidos no sítio primário de toxicidade ao alumínio (Barceló & Poschenrieder, 2002). Contudo, é válido considerar que não há dúvidas que o Al^{3+} tem rápido e fácil acesso ao apoplasma e que interações com a parede celular e a membrana precede qualquer transporte para dentro do simplasma. Assim, qualquer interação é potencialmente nociva pela complexação do alumínio com elementos envolvidos em processos metabólicos importantes, como por exemplo, enzimas, calmodulinas, tubulinas, ATP, GTP e DNA (Delhaize & Ryan, 1995).

2.2. Mecanismos de tolerância

Existe um consenso de que a resistência ao alumínio deve ser mediada em nível celular. Esta conclusão tem sido freqüentemente declarada por diversos autores (Wheeler et al., 1992; Wagatsuma et al., 1995; Horst et al., 1997). Existem hipóteses e especulações sobre mecanismos de tolerância ao alumínio, que possam estar operando nas diferentes espécies de plantas, divididos em dois grupos. O primeiro grupo pode ser formado pelos mecanismos de exclusão. Neste grupo estão incluídos mecanismos que envolvem a exudação das raízes de ligantes orgânicos que complexam o alumínio (ácidos orgânicos ou compostos fenólicos), ligantes ao Al

contidos na mucilagem secretada pelas raízes, efluxo do alumínio acumulado e alteração no pH da rizosfera. No outro grupo, formado pelos mecanismos de detoxicação interna, estão incluídos a fixação do alumínio na parede celular, a complexação no simplasma via ligantes orgânicos e o seqüestro no vacúolo (Kochian et al., 2004). Nas últimas décadas, fortes evidências têm apontado como principal mecanismo de tolerância em espécies cultivadas de importância agronômica, a participação dos ácidos orgânicos como um mecanismo de exclusão e recentemente excelentes revisões tem abordado este tema (Delhaize & Ryan, 1995; López-Búcio et al., 2000; Ryan et al., 2001; Ma et al., 2001, Ma et al., 2003; Kochian et al., 2004). Os primeiros trabalhos importantes relacionados com este mecanismo foram apresentados em estudos realizados com trigo. Rincón & Gonzalez (1992), avaliando raízes de trigo após 24h de exposição ao alumínio, observaram que o nível de sensibilidade ao alumínio estava correlacionado com a concentração do elemento nos meristemas, sugerindo que a exclusão metabólica nos meristemas era um mecanismo importante de tolerância nesta espécie. Trabalhos realizados no início da década de 90 pelo grupo de pesquisa da Austrália, liderados por Emmanuel Delhaize e Peter R. Ryan, culminaram na hipótese da participação de ácido málico como um mecanismo de exclusão em trigo. Delhaize et al (1993a) realizaram um trabalho detalhado sobre a absorção e distribuição do alumínio no ápice de plantas de trigo, de duas linhagens isogênicas de trigo, diferenciando em tolerância ao alumínio em um loco. Este loco foi nomeado *Alt1*, verificado pela análise da segregação da população F₂ de retrocruzamento. Os autores observaram coloração diferencial por hematoxilina entre os genótipos contrastantes, correlacionando com o crescimento

relativo da raiz e acumulação de Al^{3+} no ápice nos 2-3mm terminais. A hematoxilina é um corante e possui a propriedade de tornar-se azul ao formar um complexo com o Al^{3+} , desta forma, a penetração e retenção deste íon nas raízes podem ser visualizadas (Polle et al, 1978). A quantificação do alumínio apresentou que os ápices de plantas sensíveis, acumularam de 5-10 vezes mais do que em plantas tolerantes. Em artigo que acompanhou a mesma publicação, Delhaize et al (1993b) investigaram a função dos ácidos orgânicos, conferindo tolerância ao alumínio nas linhagens diferindo pelo loco *Alt1* (ET8-tolerante e ES8-sensível) e verificaram que a presença do Al^{3+} na solução nutriente estimulava a secreção de ácido málico, sendo que genótipos tolerantes secretavam 5-10 vezes mais do que os sensíveis. Os autores constataram ainda que os 3-5mm terminais da raiz formavam a fonte primária do ácido orgânico secretado, havendo correlação entre tolerância e secreção elevada de malato na população segregante, demonstrando que *Alt1* codificaria para um mecanismo baseado na exudação de malato estimulado pelo Al^{3+} . Diante destes resultados, em revisão publicada pelos autores Delhaize & Ryan (1995) lançaram um esquema hipotético da interação entre o alumínio e um possível canal de ânions de malato, codificado por *Alt1*, presente na membrana que estimularia o efluxo de malato. Desta forma, estudos para uma melhor caracterização do efluxo de malato foram iniciados (Ryan et al, 1995a; Ryan et al, 1995b) assim como para verificar a existência deste canal de ânions de malato (Ryan et al., 1997a). Em trabalhos realizados pelo mesmo grupo, Zhang et al (2001), utilizando patch-clamp, um instrumento capaz de detectar correntes elétricas a nível celular, encontraram estímulos gerados pelas cargas negativas dos ânions de malato na

membrana. Os autores constataram que as correntes geradas pelos protoplastos de ET8 (linhagem tolerante) eram mais intensas e duráveis do que em ES8 (linhagem sensível).

Em trabalhos recentes realizados num esforço conjunto entre o grupo Australiano e a Universidade Okayama no Japão, foi clonado o gene *ALMT1* (*aluminum-activated malate transporter*) que co-segrega com populações segregantes derivadas do cruzamento entre as linhagens ET8 e ES8. O *ALMT1* é um gene expressado constitutivamente no ápice das raízes de plântulas de trigo, que codifica para uma proteína trans-membrana, um transportador ativado por Al^{3+} que facilita o efluxo de malato. Os autores ainda verificaram através do sequenciamento dos cDNAs derivados das duas linhagens que se tratavam de dois genes, provavelmente dois alelos, *ALMT1-1* e *ALMT1-2* expressos pela ET8 e ES8, respectivamente. Entretanto, a relativa tolerância ao alumínio proporcionada pelo gene *ALMT1* foi determinada primariamente pelo nível de expressão dos seus alelos, superior em ET8. Esta hipótese foi confirmada pela análise de cDNAs de outros cultivares tolerantes que expressam somente *ALMT1-2* (Chinese Spring), todavia, em um nível mais elevado do que em ES8 e cultivares sensíveis (Sasaki et al., 2004). No mesmo ano, os mesmos grupos de pesquisadores transformaram cevada com o gene *ALMT1*, a expressão do gene de trigo conferiu efluxo similar de malato ativado por Al e elevada tolerância em níveis tóxicos em cultura hidropônica e em solo ácido (Delhaize et al., 2004).

A outra grande contribuição foi no desvendamento de mecanismos de destoxicação interna. Neste sentido, em estudos realizados na espécie *Hydrangea*

macrophylla, que apresenta uma variação de cores avermelhadas a azuladas de acordo com a variação do pH do solo, Ma et al (1997a) constataram que esta espécie poderia acumular até 300 mgKg^{-1} de matéria seca nas folhas, formando o complexo Al-citrato. A cor azul nas sépalas é devido à ação estabilizante do Al^{3+} na formação do complexo com outros compostos orgânicos (*delphinidin 3-glucoside* e *3-caffeoylquinic acid*). Em trigo mourisco, outra espécie acumuladora de alumínio, além de um mecanismo de exclusão pela exudação de oxalato no ápice das raízes induzido por alumínio (Zheng et al, 1998), sua elevada tolerância ao alumínio tóxico é explicada pela presença de um outro mecanismo interno operando. Ma et al (1997b, 1998, 2000b) constataram a presença de complexos Al-oxalato nas raízes e nas folhas, entretanto, sua translocação no xilema das raízes para as folhas ocorre no complexo Al-citrato, havendo uma troca de ligantes orgânicos. Nas folhas o Al^{3+} é seqüestrado no vacúolo das células (Shen et al 2002) podendo acumular mais de 15000 mgkg^{-1} de alumínio quando desenvolvido em solo ácido.

As pesquisas em milho têm apontado para um mecanismo de exclusão semelhante ao trigo, com a exudação de ânions de citrato no ápice da raiz. Esta tem sido uma das importantes linhas de pesquisa dos trabalhos da Universidade de Cornell nos Estados Unidos, liderados por Leon V. Kochian, Owen A. Hoekenga e Miguel A. Piñeros. Utilizando a técnica pach-clamp, Piñeros & Kochian (2001) verificaram a indução de corrente interna na presença de Al^{3+} , seletiva a ânions, em protoplastos de genótipos tolerantes, extraídos das células do ápice das raízes de milho. Neste estudo os autores conseguiram isolar a membrana plasmática e, utilizando a mesma metodologia para detecção de corrente, revelaram a existência

de canais de ânions dependente de alumínio, indicando que a maquinaria requerida para ativação destes canais estava presente na membrana plasmática. Em trabalhos subseqüentes, Piñeros et al. (2002) sugeriram que este transportador, o canal de ânions presentes em protoplastos, era responsável pela liberação de citrato induzida por alumínio em raízes intactas. Desta forma, de acordo com o modelo proposto por Delhaize & Ryan (1995) das possíveis interações entre Al-célula na ativação de canais de ânions, a possibilidade da ativação via sinal-cascata envolvendo componentes do citosol é descartada, permanecendo apenas a ativação direta do canal ou via receptor de membrana. No entanto, a resposta através da exudação de citrato no cultivar de milho Cateto-Colombia (cruzamento entre as linhagens SLP 181/71 x Cateto Colômbia 96/71) utilizado por Piñeros et al. (2002) foi exclusivamente dependente do Al^{3+} , não constitutiva, e observada dentro de 30 minutos a taxas constantes durante 4 dias. O cultivar SA3 utilizado em estudos realizados por Pellet et al. (1995), exibiu outro comportamento, com liberação constitutiva de citrato, apresentando uma fase *lag* (retardo) antes de atingir o máximo na liberação de citrato nas raízes. Em estudo realizado pela Universidade Estadual de Campinas, no Brasil, Jorge & Arruda (1997) selecionaram plantas tolerantes e sensíveis ao alumínio de uma variedade de milho tropical chamada Taiúba e os avaliaram na presença ou ausência de alumínio em concentrações fitotóxicas. Durante as primeiras 20 horas, a taxa de desenvolvimento de ambos, sensíveis e tolerantes, foi severamente inibida pela infiltração do Al^{3+} nas células da ponta da raiz. Após este período, as plantas tolerantes recuperaram as taxas similares ao controle, enquanto as plantas sensíveis permaneceram severamente inibidas. A

recuperação de plantas tolerantes coincide com a extrusão do Al^{3+} absorvido nas primeiras 20 horas e exudação de malato e citrato foram observadas apenas em plantas tolerantes. Os investigadores concluíram que a infiltração de Al^{3+} nas raízes no início do tratamento induziu a exudação de ácidos orgânicos, excluindo o íon tóxico das células da ponta da raiz de plantas tolerantes. Estas evidências colaboraram com a afirmativa que em milho estão presentes os dois padrões de resposta do mecanismo de exclusão (Ma et al. 2001), indicando toda a complexidade do carácter tolerância nesta espécie. Em um estudo fisiológico comparativo realizado por Piñeros et al (2005) foi verificado que a tolerância em alumínio em milho não poderia ser explicada somente pela exudação de ácidos orgânicos na raiz. Os autores utilizaram seis genótipos (um tolerante, Cateto-Colombia, um intermediário, Pioneer 3355, e quatro sensíveis Mol17, B73, L53, e 11x723) e verificaram que não houve clara correlação entre exclusão do Al^{3+} na ponta da raiz, baseado no conteúdo de Al^{3+} na raiz, e tolerância ao alumínio, assim como não houve correlação entre tolerância diferencial e liberação de citrato nas raízes, com o genótipo sensível Mo17 apresentando a mais elevada exudação. Os autores ainda investigaram a possibilidade de outros mecanismos estarem envolvidos, além da exclusão nas raízes dos genótipos tolerantes, como outros compostos orgânicos queladores, alcalinização do pH da rizosfera, mudanças internas de compostos queladores na raiz e translocação de Al^{3+} por complexos com compostos orgânicos. Entretanto, nada foi encontrado. Os trabalhos da Universidade de Cornell abrem as portas para investigações de novos mecanismos de tolerância existentes em plantas e coloca o milho como uma incógnita em relação à tolerância ao Al^{3+} . O trabalho realizado por

Kidd et al. (2001) contribui para esta afirmação. Os autores constataram uma melhor correlação entre diferencial tolerância ao alumínio e exudação de compostos fenólicos nas raízes, do que com a exudação de ácidos orgânicos em três genótipos de milho agindo como um mecanismo de exclusão. Os compostos fenólicos têm capacidade de complexar metais como o alumínio e estão envolvidos em mecanismos de destoxicação interna em espécies acumuladoras de alumínio (Matsumoto et al., 1976; Ofei-Manu et al, 2001).

2.3. Genética da Tolerância

O entendimento da natureza da herança do caráter é de extrema importância para a decisão dos procedimentos mais adequados a serem adotados para a seleção de genótipos com maior grau de tolerância. Na cultura do trigo, alguns cultivares apresentam herança complexa, indicando a presença de diversos genes aditivos (Aniol & Gustafson, 1984). Entretanto, a grande maioria dos estudos genéticos aponta para uma herança simples envolvendo um ou dois locos (Kerridge & Kronstad, 1968; Nodari et al. 1982; Larkin, 1987; Lagos et al, 1991). O gene maior dominante em trigo foi chamado *Alt2* na cultivar Chinese Spring (Luo & Dvorák, 1996) ou *Alt_{BH}* em BH1146 (Riede & Anderson, 1996), mapeado no cromossomo 4DL e fisicamente mapeado por Milla & Gustafson (2001) através de 91 linhagens recombinantes do cruzamento BH1146 (tolerante) x Anahuac (sensível). Este gene trata-se provavelmente do *Alt1* em trigo identificado por Delhaize e Ryan (1993a) ou mais recentemente chamado de *ALMT1* que codifica para um transportador de ânions de malato ativado por alumínio (Sazaki et al., 2004). Igualmente ao trigo, o gene maior de tolerância ao alumínio foi mapeado em centeio também no braço

longo do cromossomo 4, o loco nomeado *Alt3* (Miftahudin et al., 2002). Em cevada, outro membro da tribo Triticeae, o maior loco de tolerância ao alumínio está localizado no braço longo do cromossomo 4, o loco chamado *Alp* (Minella & Sorrells, 1992; Tang et al., 2000). Diversos autores relatam a provável possibilidade dos três locos, *Alt_{BH}*, *Alt3* e *Alp*, pertencentes aos três membros da tribo Triticeae, serem ortólogos, visto que marcadores em comum estão fortemente ligados a estes locos nas três espécies, especialmente o marcador *Xbcd1230* (Magalhães et al., 2004; Kochian et al., 2004; Wight et al., 2006).

Estudos de QTL para o caráter tolerância ao alumínio em arroz demonstram que esta espécie possui diversos genes responsáveis pelo controle desta característica, sendo complexa e quantitativamente herdada (Ma et al. 2002; Nguyen et al., 2002; 2003; Mao et al., 2004). Entre as diversas regiões cromossômicas apontadas por estes estudos, destaca-se o QTL encontrado no cromossomo 1 que explica grande parte da variância encontrada no caráter. O cromossomo 3 também possui um QTL que é freqüentemente relatado nestes estudos. Magalhães et al (2004) identificaram um gene maior para sorgo, o loco *Alt_{SB}*. Neste mesmo estudo foi realizado um mapeamento comparativo utilizando sondas localizadas nos cromossomos 4 e próximo ao gene maior das espécies da tribo Triticeae e na região sintênica na cultura do sorgo, o grupo de ligação C. Entretanto, apesar da macrocolinearidade encontrada nestas regiões, o gene *Alt_{SB}* não está ligado a nenhum dos marcadores próximos aos locos da tribo Triticeae indicando que além do gene estar localizado em outra região cromossômica, não é ortólogo ao gene maior desta tribo. O gene *Alt_{SB}* foi localizado no grupo de ligação G, contido em uma porção

homeóloga à região do QTL localizado no cromossomo 1 em arroz, o mais importante desta espécie, possuindo em comum forte ligação ao marcador *isu68*. Entre o arroz e o gene maior da tribo Triticeae existe em comum a sintonia entre o cromossomo 3 e os cromossomos grupo 4, respectivamente, havendo a provável possibilidade de ortologia entre o importante QTL localizado no cromossomo 3 em arroz e o loco da tribo Triticeae, devido a forte ligação em comum ao marcador *Xcdo1395* (Nguyen, 2003).

As espécies do gênero *Avena* estão entre as mais tolerantes a este íon tóxico (Al^{3+}). Estudos genéticos realizados em aveia hexaplóide revelaram a existência de um gene dominante responsável pelo fenótipo tolerância (Sánchez-Chacón et al, 2000). Wagner et al (2001) no cruzamento entre três genótipos hexaplóides encontrou que um ou dois genes contribuíam para tolerância. Num trabalho realizado por Wight et al. (2006) com o diplóide *Avena strigosa*, considerada a espécie mais tolerante do gênero, os autores utilizaram marcadores RFLP ligados ao caráter tolerância ao Al em outras espécies de cereais e comuns a regiões do genoma de *A. strigosa*, na tentativa de encontrar locos ortólogos. Foram identificados 4 QTL. Dois QTL foram associados entre marcadores anônimos (AFLP e SCAR) utilizados para proporcionar uma maior cobertura do genoma. O QTL que explicou maior parte da variância, cerca de 39%, é provavelmente ortólogo ao gene encontrado na tribo Triticeae, ao QTL menor em arroz localizado no cromossomo 3 e ao gene *Alm1* em milho. Quanto ao quarto QTL, existe a possibilidade de ser ortólogo ao gene *Alm2* em milho, devido a proximidade com os marcadores *cdo393* e *cdo1173*, no entanto, esta possibilidade é especulada com cautela, visto que marcadores ligados a este

gene em milho não estavam presentes na população investigada neste estudo comparativo. Os genes *Alm1* e *Alm2* são dois locos mapeados por Sibov et al (1999), e serão comentados em detalhe logo adiante neste tópico.

Em milho, assim como para outras culturas, diversos trabalhos têm demonstrado a existência de elevada variabilidade genética para o caráter tolerância ao alumínio (Bahia Filho et al., 1978; Naspolini Filho et al., 1981; Lima et al., 1992; Pandey et al., 1994). O modo de herança da tolerância ao Al em milho não está bem definido. Existe uma série de relatos na literatura sobre estudos da herança de tolerância a toxicidade causada por alumínio em milho, com divergências sobre a natureza quantitativa ou qualitativa do caráter. Brondani & Paiva (1996) observaram que o caráter tolerância ao alumínio apresentava herança quantitativa, havendo ocorrência de interações alélicas de dominância. A existência de um gene maior dominante para tolerância à toxicidade ao alumínio foi relatada por Rhue et al. (1978) e Garcia Júnior & Silva (1979). Em estudo realizado por Magnavaca & Bahia Filho (1995) os autores demonstraram que a tolerância ao Al^{3+} era um caráter de herança quantitativa, ressaltando a importância de genes de efeitos aditivos, no entanto, não descartaram uma menor influência de efeitos de dominância. Prioli et al. (1985) verificaram que a capacidade geral de combinação foi o parâmetro de maior magnitude no estudo de cruzamentos dialélicos entre populações de milho tolerantes e não tolerantes à toxicidade do alumínio, sugerindo efeito de ação gênica aditiva na herança do caráter. Num estudo realizado sobre a genética da tolerância ao alumínio em milho Cateto, Sawazaki & Furlani (1987) identificaram uma linhagem altamente tolerante (linhagem Ip 48-5-3) e constataram que a tolerância no material estudado

era devido à ação gênica aditiva de genes menores. Diversos outros autores têm mostrado que a característica é quantitativamente herdada, com predominância de efeitos genéticos aditivos (Lopes et al., 1987; Pandey & Gardner, 1992; Lima et al., 1995).

O Brasil têm colaborado em importantes trabalhos realizados em milho, já citados no tópico anterior (Piñeros et al. 2002; 2005), em um esforço conjunto entre a Universidade de Cornell e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas – Brasil. Outra instituição de pesquisa no Brasil que realizou alguns estudos de cunho fisiológico envolvendo mecanismos de tolerância e toxicidade na mesma espécie (Jorge & Arruda, 1997; Moon et al., 1997; Jorge et al., 2001), é a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). O Brasil vem se destacando nos estudos relacionadas com o caráter tolerância ao alumínio em análises de variabilidade genética e herança em espécies como milho (Bahia Filho et al., 1978; Garcia Júnior & Silva 1979; Napolini Filho et al., 1981; Prioli et al. 1985; Sawazaki & Furlani 1987; Lopes et al., 1987; Lima et al., 1992; Lima et al., 1995; Magnavaca & Bahia Filho, 1995; Brondani & Paiva, 1996;), trigo (Nodari et al., 1982; Lagos et al., 1991) e aveia (Sánchez-Chacón et al., 2000; Wagner et al., 2001). A maior contribuição do Brasil, tem sido no mapeamento de genes relacionados com o caráter tolerância em diversos cereais. A seleção para tolerância é extremamente dificultada e requer um enorme esforço nos trabalhos de campo na busca de genótipos superiores. Uma alternativa seria a identificação de marcadores moleculares associados a genes ou regiões cromossômicas responsáveis pela expressão deste caráter, o que representaria um passo importante no processo de

seleção de plantas superiores (Sibov et al., 1999). O Brasil teve participação fundamental no mapeamento do gene *Alt_{BH}* em trigo em trabalhos realizados com o cultivar BH1146 (Nodari et al., 1982; Lagos et al., 1991) por pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e posteriormente mapeado por Riede & Anderson (1996) com colaboração do Instituto Brasileiro do Paraná (IAPAR). A Embrapa Milho e Sorgo, de Sete Lagoas colaborou com o estudo comparativo realizado na Universidade de Cornell, nos Estados Unidos, culminando com a identificação do gene maior *Alt_{SB}* em Sorgo (Magalhães et al., 2004). O Brasil é responsável pelos dois maiores estudos de identificação de regiões cromossômicas associados ao caráter tolerância ao alumínio em milho. Sibov et al. (1999), pela Unicamp, identificaram 10 marcadores de RFLP co-segregando com a tolerância ao alumínio, na população gerada pelo cruzamento entre uma variante somaclonal fortemente sensível ao alumínio (S1587-17) e uma linhagem de milho tolerante (Cat-100-6). Foram identificados dois locos, um no braço curto do cromossomo 6, chamado de *Alm2*, e outro no braço curto do cromossomo 10, sendo este, chamado *Alm1*, com efeito superior e responsável pela maior parte da variação fenotípica do caráter. O marcador cdo1395, ligado ao gene maior da tribo Triticeae *Alp*, está localizado no cromossomo 10 em milho na região do marcador umc130, ligado ao loco *Alm1*, indicando que estes genes podem ser ortólogos.

A exemplo das comparações realizadas com o genoma do milho, o cromossomo 3 em arroz possui homologia ao grupo de cromossomos 4 em Triticeae, e um QTL encontrado em dois diferentes estudos neste cromossomo também está ligado ao marcador cdo1395 (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2003). Próxima a região

do *Alm1*, no cromossomo 10 de milho, está localizado o marcador *csu359*. A seqüência da sonda RFLP que origina o marcador é homóloga a um gene que codifica para uma proteína induzida pelo alumínio em trigo (Davis et al. 1999; Wight et al, 2006), o que deixa dúvida sobre a existência de um ou dois locos neste cromossomo. Esta proteína é codificada por *wali7* que tem sua expressão aumentada em ponta de raízes, induzida pela exposição ao alumínio (Richards et al., 1994).

A Embrapa Milho e Sorgo por quase uma década, em conjunto com Universidades do Brasil, tem empenhado esforços na procura de genes importantes relacionados com tolerância (Brondani & Paiva, 1996; Torres et al., 1997 e Ninamango-Cárdenas et al., 2003). No último trabalho, o mais completo de associação de marcadores ligados a QTL em milho para o caráter tolerância, segundo a opinião de diversos pesquisadores da área, foram identificadas cinco regiões genômicas utilizando marcadores RFLP e SSR em famílias $F_{3:4}$ derivadas do cruzamento entre as linhagens L53, sensível ao alumínio e originada da variedade de polinização aberta CMS11(Pool 21), e a linhagem L1327, tolerante ao alumínio e originada do Cateto Colômbia. Os cinco QTL localizados nos cromossomos 2, 6 e 8, explicaram 60% da variação fenotípica encontrada. No mesmo estudo, o marcador *umc043*, localizado no cromossomo 5, foi associado ao caráter. Porém, esta ligação não foi definida como QTL pelo mapeamento por intervalo, devido a impossibilidade de flamqueamento com outros marcadores na região identificada (Ninamango-Cárdenas et al., 2003). Segundo os autores, este marcador (*umc043*) está localizado na mesma região do gene *mdh5* que codifica para malato desidrogenase, enquanto

o QTL localizado no cromossomo 8, está próximo ao loco *idh1* que codifica para isocitrato desidrogenase. Ambas enzimas estão presentes no ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) e em outras reações envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos (Ryan et al. 2001). Somando-se a isto, o QTL localizado no cromossomo 6, está exatamente na mesma região do gene *Alm2*, mapeado por Sibov et al (1999). Os marcadores que flanqueiam esta região podem ser localizados no cromossomo 5 em arroz, na mesma vizinhança de um QTL identificado por Nguyen et al (2001).

Wigth et al (2006) cita alguns fatores que devem ser considerados na interpretação de dados relacionados a estudos de mapeamento comparativo. Primeiramente diferentes estudos, aplicam diferentes métodos estatísticos na análise de QTL. Segundo, em relação as metodologias para avaliação da tolerância, é improvável que somente um simples experimento irá detectar todos os relevantes genes que estão segregando na população. Embora o grau de tolerância nas espécies seja medido por danos causados no sistema radical em plantas, diferentes métodos são usados para impor e acessar estes danos. Existem diversos métodos utilizados na avaliação de tolerância ao alumínio. Os parâmetros baseados no crescimento da raiz principal têm sido freqüentemente utilizados na avaliação da tolerância ao alumínio e são amplamente reconhecidos como os mais adequados índices fenotípicos para muitas espécies estudadas (Polle et al. 1978; Rhue et al., 1978; Camargo et al., 1985; Dornelles et al., 1996). Cançado et al (1999) realizou um excelente estudo de comparação entre os métodos hematoxilina e parâmetros acessados do crescimento de raízes de plântulas desenvolvidas em solução contendo alumínio. Os autores verificaram que a coloração com hematoxilina revelou

maior capacidade para discriminar entre genótipos de milho tolerantes e sensíveis ao Al^{3+} . Para análises de correlação entre os índices estudados foram utilizadas 20 famílias S_3 derivadas do cruzamento entre linhagens contrastantes para o caráter tolerância. Foi observada significativa correlação entre hematoxilina e os demais parâmetros. Este método é não destrutivo para as raízes, e devido a esta peculiar característica, pode ser empregado em conjunto com outros métodos. Diversos trabalhos têm empregado esse método na avaliação da tolerância ao Al^{3+} em estudos fisiológicos (Delhaize et al., 1993b; Ryan et al., 1993; Jorge & Arruda et al., 1997; Jorge et al., 2001; Piñeros et al., 2002), estudos de herança e seleção em cereais (Delhaize et al., 1993a; Moon et al., 1997). Em cevada, este método tem sido utilizado na fenotipagem de populações segregantes por ser reconhecidamente um indicador preciso de tolerância para esta espécie (Minella & Sorrells, 1992; Tang et al., 2000; Echart, 2001). Além da cevada, diversos autores têm empregado este método em conjunto com outras técnicas no mapeamento do caráter tolerância em outros cereais como milho (Sibov et al., 1999), trigo (Riede & Anderson, 1996) e sorgo (Magalhães et al., 2004). Outros métodos menos utilizados são empregados em estudos genéticos ou fisiológicos, como os baseados na simples visualização dos danos ocasionados por Al^{3+} no ápice das raízes (Moon et al., 1997; Sibov et al., 1999) ou na formação de calose, um indicador de sensibilidade ao alumínio em plantas (Horst et al., 1997; Larsen et al., 1998). São utilizadas também algumas técnicas mais sofisticadas e raramente empregadas como o uso de fluorescência (Larsen et al., 1998; Silva et al., 2000) e raio-x (Delhaize et al., 1993b).

Outros fatores relacionados por Wigh et al (2006) que devem ser considerados em estudos comparativos, são inerentes à variabilidade genética inter-específica ou intra-específica. Diferentes genes responsáveis pelo caráter, ou marcadores associados, podem não estar segregando na população a ser investigada, comparada a populações utilizadas em outros estudos, seja na mesma espécie ou em espécies diferentes (genes ortólogos). Além disso, apesar da aparente conservação genômica entre plantas, principalmente em relação as espécies da família Poaceae, eventos ocorridos durante a evolução nos genomas destas espécies (nível de ploidia, perda de genes, duplicações, deleções, translocações e etc.) podem ser um impedimento em estudos comparativos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Germoplasma

Foram utilizadas cinco linhagens de milho comum (L20, L10, L09, L08, L06) cedidas pela Empresa Agropecuária Oeste (Sementes Agroeste) de Santa Catarina, com sede no município de Xanxerê. Três linhagens foram previamente classificadas como sensíveis ao alumínio, L20 (em S₈), L08 (em S₁₀) e L06 (em S₉), e as duas linhagens restantes, L10 (em S₉), L09 (em S₁₂) como tolerantes (Mazzocato et al., 2002). Estas linhagens foram cruzadas em um esquema dialélico na estação de cultivo de 2000/01 em Xanxerê, SC, sendo obtidos 10 híbridos F₁. No mesmo local as sementes F₂ foram obtidas por autofecundações realizadas na estação de cultivo 2001/02. Como testemunha foram utilizados nos experimentos os híbridos comerciais DKB747, DKB350, classificados como tolerantes e o DKB205 como sensível, segundo informação da Empresa Monsanto que forneceu amostras dos mesmos. A Empresa Agroeste forneceu, além das linhagens genitoras, amostras do híbrido comercial AS1533, classificado como sensível segundo a própria empresa cedente, e do híbrido AS3466, sem uma classificação prévia. Ambos também utilizados como testemunhas durante a realização de alguns experimentos.

3.2. Adequação da técnica de recrescimento da raiz principal

Previamente foram realizados ensaios para melhor adequação da técnica de

recrescimento da raiz principal e correta calibração das concentrações de alumínio e cálcio a serem utilizadas em solução. Para estes ensaios foram utilizados apenas os híbridos comerciais DKB 205 (sensível) e DKB747 (tolerante). Os experimentos foram realizados em tanque banho-maria. O delineamento utilizado foi o completamente casualizado com diferentes números de repetições. A melhor combinação de concentrações de alumínio e cálcio encontrada para identificação de plântulas tolerantes e sensíveis e utilizada nos experimentos foi 0,1mM de Al^{3+} e 0,2mM de Ca^{2+} .

3.3. Dialélico - F₂

Foram avaliadas em as gerações F₂ das 10 combinações híbridas (96 indivíduos cada) resultantes do dialélico e os genitores envolvidos nos cruzamentos (10 indivíduos cada) juntamente com os híbridos testemunhas (10 indivíduos de cada híbrido comercial, DKB205 e DKB747). Após rápida seleção pelo tamanho das sementes (sementes muito pequenas foram descartadas), as mesmas foram germinadas em placas de Petri, limpas e esterilizadas, e os indivíduos a serem avaliados foram rigorosamente selecionados 5-6 dias após a germinação, pelo comprimento inicial de raiz (~3,5cm). As plântulas permaneceram sob condições controladas de temperatura (25°C) e fotoperíodo (16h luz). Foi medido o comprimento inicial de todas as plantas e, imediatamente, as mesmas foram colocadas em solução contendo cálcio e alumínio, pH 4,5, permanecendo por 48h. Após 48h a solução foi substituída por outra contendo apenas cálcio, onde as plantas permaneceram por mais 48h. Por fim, foi medido o comprimento final. A variável analisada foi DIF (comprimento final – comprimento inicial).

3.4. Estabelecimento do protocolo para coloração com hematoxilina

Com o intuito de testar o método de hematoxilina, foram realizadas duas pequenas baterias, utilizando dez plântulas de cinco híbridos (DKB205, AS1533, DKB747, DKB350 e AS3466) e cinco plântulas das cinco linhagens (L20, L10, L09, L08 e L06) por 48h a 0,1mM de Al^{3+} e 0,2mM de Ca. Todas as raízes coraram, não



Figura 1 - As raízes foram classificadas de acordo com a intensidade e distribuição da coloração em 1, 2 e 3. FA-UFRGS. 2005.

havendo diferenças visuais entre os genótipos, apenas uma pequena variação principalmente nos híbridos (dados não apresentados). Sendo assim, foram realizados testes variando tempo de exposição (2, 4, 6, 24, e 48h) e concentração de alumínio (0,06, 0,08 e 0,1mM) a serem empregados. As plântulas foram pontuadas conforme a intensidade e distribuição da coloração. Coloração mais intensa (3), coloração intermediária (2) e coloração fraca (1) (Figura 1). Para esta técnica em especial, foram utilizados apenas os híbridos comerciais DKB747, DKB350, DKB205, AS1533 e AS3466 (~9 plântulas por combinação tempo/concentração), devido à escassez de sementes de linhagens. Após o tratamento com alumínio as raízes

foram lavadas duas vezes (cinco minutos e 2,5 litros de água destilada a cada lavada). Em seguida as plântulas foram imersas em 1000mL de uma solução contendo 0,2% (w/v) de hematoxilina e 0,02% (w/v) de KIO_3 por 40 minutos. Novamente as plântulas foram lavadas três vezes seguindo o procedimento de lavagem conforme o primeiro passo, em seguida eram realizadas as avaliações conforme classificação citada acima.

3.5. Fenotipagem - F₃

Após a avaliação do dialélico, foram escolhidas duas populações com base na capacidade geral de combinação (CGC), capacidade específica de combinação (CEC), desempenho dos genitores e variabilidade genética para tolerância ao alumínio. A fenotipagem foi realizada para dois cruzamentos L10xL08, em 60 famílias F₃, e L09xL06, para 30 famílias. A técnica utilizada foi o recrescimento da raiz principal, com o tempo de exposição ao alumínio de 24h. Após a exposição ao alumínio a outra técnica utilizada para fenotipagem nos cruzamentos trabalhados foi a coloração com hematoxilina, realizada após as 24h de exposição antes da troca da solução por cálcio, seguindo o procedimento descrito no tópico anterior conforme Polle et al. (1978) introduzidas algumas modificações. Os experimentos foram distribuídos em 4 baterias, com 8 plântulas das cinco linhagens em estudo e 10 plântulas dos cinco híbridos testemunha (DKB747, DKB350, DKB205, AS1533 e AS3466) em cada bateria.

3.6. Extração do DNA

Foram coletados em torno de 0,3g de tecido por amostra e macerados com nitrogênio líquido em tubos de 2,0mL adicionando tampão de extração (água miliQ,

Tris HCl, EDTA e NaCl) contendo β mercaptoetanol e SDS e incubados por 40 minutos. Após, foi adicionado acetato de potássio e centrifugado, o DNA contido no sobrenadante foi transferido para outro tubo e precipitado com acetato de sódio mais isopropanol. Foi realizada nova centrifugação e o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* formado sofreu uma lavagem com etanol 70% e colocado a secar por 24h a 20°C na incubadora previamente limpa. Posteriormente o *pellet* foi incubado com TE 0,1X contendo RNaseA por 1h a 37°C e novamente precipitado com acetato de sódio e etanol 95% e centrifugado. Após centrifugação, o *pellet* foi lavado novamente com etanol 70% deixando secar por 1h a 25°C. Por fim, o *pellet* foi diluído em água miliQ autoclavada onde permaneceu por 24h a 4°C e em seguida estocado a -20°C.

3.7. Mapeamento com marcadores moleculares

Para o mapeamento genético foram utilizados 60 *bulks* (misturas de DNA) de indivíduos das famílias F₃ do cruzamento L10xL08 analisados para recrescimento da raiz principal e coloração com hematoxilina. Foram testados 124 locos de microsatélites distribuídos aleatoriamente nos 10 cromossomos que constituem o genoma do milho, além de marcadores próximos a regiões previamente mapeadas para o caráter por outros autores, em consulta a base de dados MaizeGDB. Apenas 36 locos foram polimórficos para as linhagens genitoras, os quais foram utilizados para genotipagem nos 60 *bulks*. As amplificações foram realizadas no termociclador Eppendorf Mastercycler. O protocolo para reações de PCR (polymerase chain reaction) utilizado foi para um volume final de 20 μ L por amostra contendo: Tampão 10X; 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de dNTP; 1U de Taq-DNA Polimerase e 0,3 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (pares de *primer*). A programação para amplificação

dos fragmentos de DNA foi específica para cada par de *primer*, de acordo com a temperatura média de anelamento entre os pares, iniciando com uma desnaturação a 96°C por 5 minutos, e 40 ciclos com uma etapa de 96°C por 30 segundos, uma etapa de anelamento variando de 55 a 65°C por 1 minuto dependendo do par de *primer*, e uma etapa de extensão 72°C por 1 minuto, seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos e armazenamento a 10°C. Para alguns *primers* com dificuldade para amplificação foi elaborado um programa *touchdown* com decréscimo de 0,5°C na temperatura de anelamento iniciando a 65 até atingir 55°C em 20 ciclos, seguido então por 40 ciclos com a temperatura de anelamento fixada em 55°C, as demais etapas foram iguais a cada ciclo como citado anteriormente. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2,5%. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada com brometo de etídio em transluminador com lâmpadas ultravioletas. As imagens dos géis foram capturadas com o programa Kodak Digital Science 1D v.3.0.1. Para marcadores onde a determinação do polimorfismo entre os genitores (durante o teste de polimorfismo) ou a diferenciação dos fragmentos amplificados (quando utilizados na população) foi dificultada pela proximidade dos fragmentos em tamanho, estes foram visualizados em gel de acrilamida.

Os marcadores foram considerados polimórficos quando detectada presença de bandas com informação diferenciada entre os genitores. Os fragmentos amplificados foram identificados conforme a similaridade com os genitores, sendo considerados homocigotos iguais ao genitor L10, homocigotos iguais ao genitor L08 ou heterocigotos.

3.8. Experimento a campo

Foi realizado um experimento a campo com as famílias F₃ dos cruzamentos L09xL06 e L10xL08, com testemunhas (cinco cultivares comerciais) dispostas em um delineamento de blocos casualizados com duas repetições. O objetivo foi verificar se os dados encontrados eram condizentes aos resultados de laboratório. Cinquenta dias após o florescimento foram realizadas avaliações dos caracteres rendimento da parcela (REND PARC), número total de espigas na parcela (N ESP), número de espigas por planta (N ESP PLA), peso de espiga (PES ESP) e estatura (EST). As parcelas foram semeadas em linhas de 5,0m (1 linha por família) espaçadas por 0,75m com 0,20m de espaçamento entre plantas. A semeadura foi realizada no dia 10 de novembro de 2005. A emergência ocorreu seis dias depois. Foram realizados os seguintes tratamentos culturais: adubação de base com 250kg/ha de N-P-K (fórmula 12-30-20), adubação de cobertura com 150kg/ha de uréia, duas aplicações de herbicidas (sanson - 0,5L/ha e atrazina - 3,0L/ha) e três de inseticidas (match – 300mL/ha, karate – 200mL/ha e engeo – 300mL/ha). Foi realizada a análise do solo no local do experimento (Fundacep-Cruz Alta) na profundidade de 0,20cm. Dentre as relevantes determinações os valores obtidos foram: pH 4,3, argila 58%, matéria orgânica 3,4%, saturação de bases 8,5%, saturação de Al³⁺ 64,2%, cálcio trocável 1,1cmol_c/dm³ e alumínio trocável 3,6cmol_c/dm³.

3.9. Análise estatística

Para a análise de variância, para os trabalhos de adequação da técnica recrescimento da raiz principal e fenotipagem realizada na geração F₃, e experimento à campo, foi utilizado o procedimento ANOVA com hipótese de nulidade testada pelo

teste $F(\alpha=0,01)$, do *software* The SAS system v.8.1 (SAS Institute, 2000) com complementação pelo teste Tukey e Duncan ($\alpha=0,05$). O grau de associação entre as variáveis DIF e HEM, nos dois cruzamentos avaliados, foi estimado através de correlação de Pearson ($P<0,01$), pelo procedimento CORR, utilizando o mesmo *software*. O mesmo procedimento foi utilizado nas análises de correlação entre as variáveis avaliadas a campo.

Os dados do experimento dialélico foram submetidos à análise de variância conforme o modelo de Gardner & Eberhart (1966) proposto para geração F_2 , $Y_{ij} = \mu + \frac{1}{2}(v_i + v_j) + \frac{1}{2}\theta(\bar{h} + h_i + h_j + s_{ij}) + \bar{e}_{ij}$ onde $\theta = 0$ para variedades e $\theta = 1$ para híbridos; μ é a média das variedades, v_i é o efeito de variedades, que expressam a contribuição dos genitores homozigotos, e \bar{e}_{ij} é o erro $\sim N(0, \sigma^2)$. A partição do efeito de heterose foi distribuída nos seguintes componentes: \bar{h} , a heterose média; h_i , a heterose de variedade, e s_{ij} , a heterose específica. As fórmulas para média (μ) e efeitos de variedades foram as mesmas descritas por Gardner (1967) para o modelo original. Porém, as estimativas para os componentes da heterose (\bar{h} , h_i , e s_{ij}) são duas vezes estas obtidas, usando as fórmulas de Gardner (1967). As estimativas de efeitos de capacidade geral de combinação (g_i) e capacidade específica de combinação (s_{ij}) foram calculadas baseado nas fórmulas de acordo com método 4 apresentado por Griffing (1956) representadas por g_i^* e s_{ij}^* . Para o presente trabalho g_i e s_{ij} foram obtidas por $g_i = \frac{1}{2} v_i + h_i$, enquanto $g_i^* = \frac{1}{2} v_i + \frac{1}{2} h_i$, e $s_{ij}^* = \frac{1}{2} s_{ij}$.

Para a construção do mapa de ligação foi utilizado o programa MAPMAKER (Lander et al., 1987). Após a obtenção dos mapas, cada marcador foi testado individualmente na população de *bulks* F_3 com o objetivo de detectar associação

genética entre os marcadores moleculares e a tolerância ao alumínio. A detecção de associação genética foi realizada através do modelo de regressão linear $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \xi_i$, onde Y_i =valor fenotípico (média de 10 indivíduos) da i ésima família F_3 para os caracteres DIF, HEM, X_i =valor genotípico do i ésimo *bulk* F_3 (mistura do material genético de 10 indivíduos), β_0 e β_1 =parâmetros da análise e ξ_i =erro experimental $\sim N(0, \sigma^2)$. Sempre que a estimativa do parâmetro foi significativa pelo teste F ($\alpha=0,05$) o marcador em questão foi considerado como associado ao fenótipo ou à herança do caráter. O coeficiente de determinação foi utilizado como indicativo da porcentagem da variação fenotípica total explicada por cada marcador individualmente (Draper & Smith, 1981).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Adequação da técnica de recrescimento da raiz principal

Os trabalhos foram iniciados com a adequação da técnica de recrescimento da raiz, os quais proporcionaram embasamento aos trabalhos posteriores. Os objetivos principais desta fase inicial foram encontrar a melhor combinação das concentrações de cálcio e alumínio (nas formas CaCl_2 e AlCl_3) para diferenciar e identificar genótipos sensíveis e tolerantes e verificar qual a variável mais adequada a ser utilizada na continuidade do estudo. Diversos trabalhos têm demonstrado que a razão Al/Ca é extremamente importante na separação de genótipos de diferentes reações à toxidez de Al^{3+} (Andrade, 1976; Nodari, 1980, Camargo, 1985). Cambria & Cambria, (1995) verificaram que o Al^{3+} na presença de Ca^{2+} reduzia significativamente o comprimento da raiz principal apenas no híbrido de milho sensível, no entanto, para o híbrido tolerante, a redução ocorria apenas na ausência de Ca^{2+} .

Foram utilizados dois híbridos comerciais cedidos pela empresa Monsanto, previamente classificados como tolerante (DKB747) e sensível (DKB205), segundo informações da própria empresa. A primeira variável analisada foi a diferença do comprimento final relativo ao controle (DCFRC), onde o comprimento final da raiz principal dos genótipos (tolerante ou sensível) na ausência de alumínio, foi subtraído

pelo comprimento final dos genótipos tratados com alumínio (comprimento final sem alumínio – comprimento final com alumínio = DCFRC). Na análise conjunta dos experimentos houve diferenças significativas entre os genótipos avaliados e ocorrência de interação entre genótipos e experimentos (Tabela 1), entretanto, esta interação não foi complexa, havendo consistência da superioridade do genótipo tolerante com a variação das combinações testadas. Os experimentos basicamente variaram as concentrações de Al^{3+} (0,2, 0,1 e 0,05mM) e Ca^{2+} (0,2 e 0,1mM). Apenas quando foi empregada a concentração de 0,2mM de Ca^{2+} foi possível diferenciar o híbrido tolerante do sensível (Figura 2). O aumento da dose de cálcio colaborou para o crescimento das raízes, principalmente em relação ao genótipo tolerante, com exceção das combinações em que o Al^{3+} foi empregado na maior concentração, o que restringiu o crescimento de ambos genótipos. A combinação de concentrações 0,1mM de Al^{3+} e 0,2mM de Ca^{2+} (0,1Al/0,2Ca) foi a melhor na identificação dos genótipos contrastantes. A combinação de concentrações 0,05Al/0,2Ca também foi

Tabela 1 - Resumo da análise de variância conjunta dos experimentos para as variáveis diferença do comprimento final relativo ao controle (DCFRC) e diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial (DIF). FA-UFRGS. 2002.

Causas da Variação	GL	Quadrados Médios	
		DCFRC	DIF
Experimentos	5	5,32*	0,19*
Genótipos	1	14,33*	2,79*
Exper. X Gen.	5	2,87*	0,13*
Erro	24	0,62	0,04

*: Significativo a 5% de probabilidade segundo teste F

significativa, entretanto a combinação 0,1Al/0,2Ca foi onde o híbrido tolerante apresentou menor diferença em relação ao controle comparado ao híbrido sensível (Figura 2). A segunda variável analisada foi a diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial (DIF) dentro de cada genótipo tratado com alumínio, desconsiderando o controle (comprimento final – comprimento inicial = DIF). Na análise conjunta dos experimentos além de diferenças significativas entre os genótipos, houve a ocorrência de interação significativa entre genótipos e experimentos (Tabela 1).

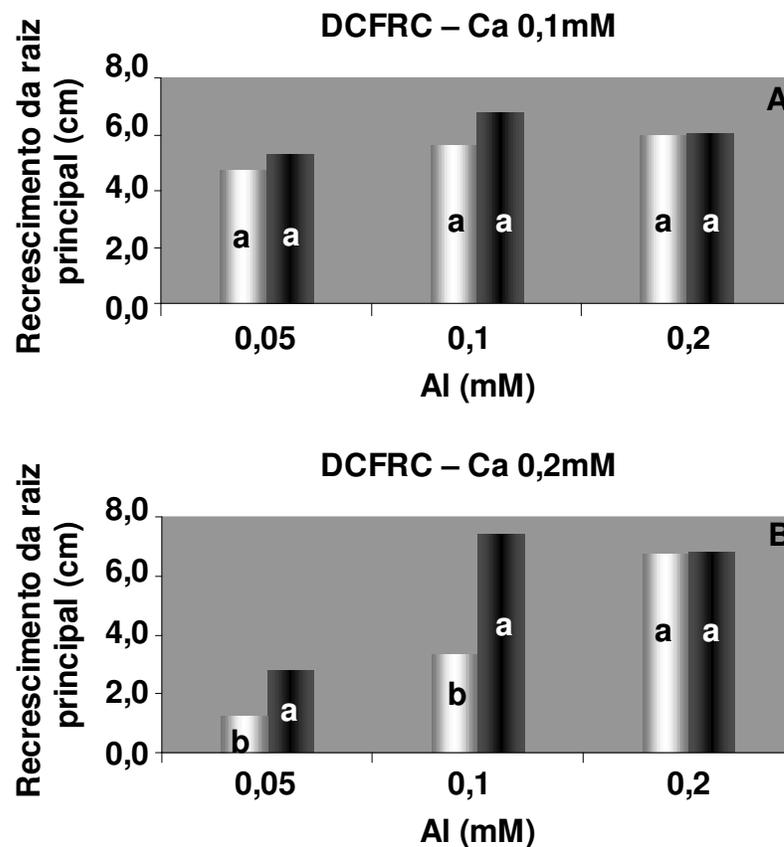


Figura 2 - Diferença do comprimento final relativo ao controle (DCFRC). As barras brancas representam o genótipo tolerante (DKB747) e as barras pretas representam o genótipo sensível (DKB205). Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FA-UFRGS. 2002.

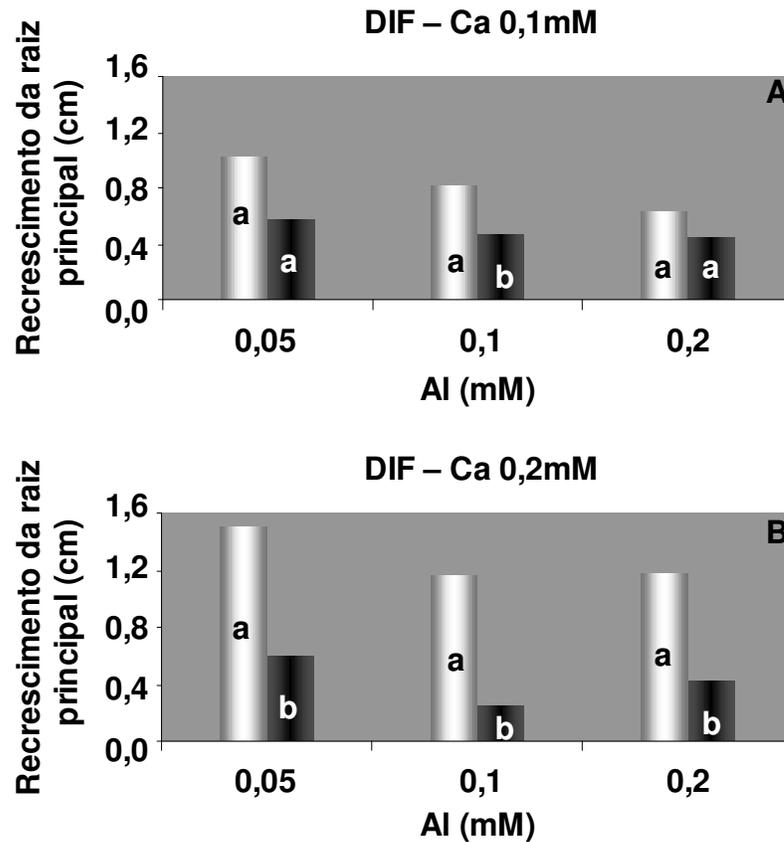


Figura 3 - Diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial (DIF). As barras brancas representam o genótipo tolerante (DKB747) e as barras pretas representam o genótipo sensível (DKB205). Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FA-UFRGS. 2002.

Houve diferenças significativas em quatro dos seis experimentos analisados, onde novamente o melhor resultado foi observado na combinação e concentrações 0,1Al/0,2Ca. O aumento da concentração de Ca^{2+} na solução contribuiu para o aumento das diferenças entre os genótipos testados (Figura 3). O objetivo desta primeira fase do trabalho não incluiu investigar algum possível mecanismo de tolerância ou base fisiológica da toxicidade causada pelo Al^{3+} relacionado com a participação do Ca^{2+} em nível celular, e sim identificar qual a melhor combinação,

ressaltando a importância do Ca^{2+} na elaboração de uma solução mínima. Trabalhos realizados em milho por Canal & Mielniczul (1993a; 1993b) salientaram que para o contínuo crescimento da raiz era exigido um suprimento permanente de Ca^{2+} da solução externa. Os mesmos autores também observaram que o aumento do Ca^{2+} na solução contribuía para o aumento do comprimento da raiz, tanto o tratamento com Al^{3+} , como no sem Al^{3+} , o que condiz com os resultados apresentados.

A variável mais adequada para diferenciação entre os genótipos avaliados foi DIF, sendo mais eficiente na diferenciação dos genótipos (diferenças encontradas em quatro experimentos). Além disso, na melhor combinação Al/Ca o coeficiente de variação foi menor comparado à primeira variável, embora tenha se mantido, em média, acima dos valores encontrados dentro dos experimentos em relação à primeira variável (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficiente de variação das variáveis analisadas, diferença do comprimento final relativo ao controle (DCFRC) e diferença entre o comprimento final e o comprimento inicial (DIF), para as seis combinações de concentrações (mM) de Al e Ca testadas para adequação da técnica recrescimento da raiz principal. FA-UFRGS. 2002.

Experimento	DCFRC	DIF
0,05 Al / 0,2 Ca	27,38	19,14
0,1 Al / 0,2 Ca	19,71	33,78
0,2 Al / 0,2 Ca	24,39	20,66
0,05 Al / 0,1 Ca	36,69	27,01
0,1 Al / 0,1 Ca	8,38	9,05
0,2 Al / 0,1 Ca	26,37	21,32

4.2. Análise Dialélica

Definida a combinação de Al^{3+} e Ca^{2+} a ser utilizada, foi realizada uma análise dialélica envolvendo cinco genitores, sendo três linhagens tolerantes e duas sensíveis, juntamente com as populações F_2 de todos os cruzamentos possíveis. O objetivo secundário era decidir por dois cruzamentos (populações) que poderiam dar sustentação aos trabalhos de identificação de regiões cromossômicas associadas ao caráter tolerância ao alumínio. No entanto, a análise dialélica tem por finalidade analisar o delineamento genético, provendo estimativas de parâmetros úteis à seleção de genitores para hibridação e no entendimento dos efeitos genéticos envolvidos na determinação dos caracteres (Cruz e Regazzi, 1997), sendo este o objetivo principal para realização desta análise.

Tabela 3 - Média (cm) para recrescimento da raiz (DIF), variância (VAR), desvio padrão (DP), após tratamento com alumínio por 48h em cinco linhagens e dois híbridos testemunhas (DKB747, tolerante, e DKB205, sensível). FA-UFRGS. 2004.

Genótipo	DIF	VAR	DP
Tolerante	0,92 a	0,048	0,22
L20	0,60 b	0,007	0,09
L10	0,57 bc	0,010	0,10
L09	0,48 c	0,005	0,07
Sensível	0,28 d	0,006	0,07
L08	0,24 d	0,012	0,11
L06	0,24 d	0,009	0,09

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As médias das cinco linhagens formaram dois grupos distintos, um tolerante, logo abaixo à testemunha tolerante (DKB 747), para as linhagens L20, L10 e L09, e outro sensível, juntamente com a testemunha sensível (DKB 205), para as linhagens L08 e L06 (Tabela 3). Mazzocato et al. (2002) analisando 24 genótipos, incluindo as cinco linhagens em estudo, classificaram apenas L10 e L09 no grupo tolerante, entretanto o critério utilizado para esta classificação foi a diferença significativa de DIF em relação aos híbridos testemunhas (P32R21 e C929), sendo que a L20 permaneceu no limite entre o grupo tolerante e sensível. Além disso, causas como as diferentes formas de alumínio utilizadas, assim como as concentrações de Al/Ca podem ter contribuído para estas diferenças. Apesar dos baixos valores de variância houve a ocorrência de alguns valores de desvio padrão elevados em relação à respectiva média dentro de alguns genótipos, o que refletiu em um coeficiente de variação de 26,21% (Tabela 3). A enorme variabilidade inerente para o crescimento da raiz em milho tem sido um sério problema para a obtenção de avaliações precisas (Polle et al., 1978).

A análise de variância para o recrescimento da raiz principal, foi baseada em um trabalho escrito por Miranda Filho & Chaves (1996) adaptado do modelo 4 proposto por Gardner & Eberhart (1966), para gerações F_2 . O modelo 4 é utilizado quando há diferenças significativas entre os valores médios da tabela dialélica proporcionadas por todas as causas de variação descritas no modelo, que são: heterogeneidade entre variedades genitoras (no caso linhagens) e a manifestação da heterose tanto nos cruzamentos (ou conjunto de cruzamentos de um determinado genitor) quanto em cruzamentos específicos (Cruz & Regazzi, 1997). Os quadrados

médios, associados aos efeitos de variedade e de heterose, foram significativos, evidenciando que as linhagens não constituíam um grupo homogêneo e que havia manifestação da heterose em seus cruzamentos (Tabela 4). Pelo desdobramento

Tabela 4 - Resumo da análise de variância para recrescimento da raiz (DIF) de milho em cruzamento dialélico 5x5 de acordo com o modelo de Gardner & Eberhart (1966) adaptado pro Miranda Filho & Chaves (1996). FA-UFRGS. 2004.

Causas da Variação	GL	QM	
Populações	14	0,1217	*
Variedades	4	0,0818	*
Heterose	10	0,0992	*
Heterose Média	1	0,7146	*
Het. Variedade	4	0,0264	*
Het.Específica	5	0,0344	*
Erro	147	0,0089	

*: Significativo a 5% segundo teste F.

dos efeitos houve a significância da heterose média, da heterose de variedade (equivalente à capacidade geral de combinação) e da heterose específica (equivalente à capacidade específica de combinação), indicando que a heterose não foi a mesma para todos os cruzamentos e que algumas combinações possuíam elevado potencial genético, evidenciando também a existência de variabilidade genética aditiva e não-aditiva nos genótipos avaliados. Em milho, assim como para outras culturas, diversos trabalhos têm demonstrado a existência de elevada variabilidade genética para o caráter tolerância ao alumínio (Bahia Filho et al., 1978;

Naspolini Filho et al., 1981; Lima et al., 1992; Pandey et al., 1994).

Os híbridos apresentaram médias superiores em relação às linhagens genitoras para a variável DIF (Tabela 5). A superioridade dos híbridos em relação

Tabela 5 - Média (cm) para recrescimento de raiz (DIF) após tratamento de alumínio em cinco linhagens (diagonal) e a geração F_2 de todos os possíveis cruzamentos (diagonal acima). FA-UFRGS. 2004.

Linhagens	L06	L08	L09	L10	L20
L06	0,24	0,67	1,15	0,88	0,94
L08		0,24	0,46	0,84	0,75
L09			0,48	1,21	1,12
L10				0,57	0,87
L20					0,60

aos genitores pode ser explicada devido à ação da heterose para tolerância ao alumínio baseada na ação aditiva de genes complementares. A heterose, é por definição, a superioridade da média do híbrido em comparação com o valor médio entre as médias dos genitores (Miranda Filho & Chaves, 1996). Segundo Allard (1960), híbridos entre certos genótipos podem ser muito superiores aos genitores, entretanto, híbridos entre outros genótipos aparentemente semelhantes aos primeiros podem manifestar fenótipos inferiores aos genitores. Neste contexto o método de análise dialélica permite justamente identificar genitores ou híbridos capazes de gerar uma progênie superior. Um excelente exemplo de elevada manifestação de heterose em cruzamentos com outras raças é o milho Cateto, uma raça brasileira extensivamente utilizada em programas de melhoramento de milho

híbrido (Sawazaki & Furlani, 1987) e provedora de genes de tolerância ao alumínio (Miranda et al., 1984). Furlani et al. (1986) avaliando 98 genótipos comerciais relataram que todos os cultivares foram menos tolerantes que um híbrido Cateto utilizado como testemunha. Algumas linhagens de milho originadas desta raça estão presentes em estudos fisiológicos e na identificação de genes relacionados ao caráter tolerância em importantes grupos de pesquisa do Brasil e Estados Unidos (Torres et al., 1997; Moon et al., 1997; Sibov et al., 1999; Piñeros et al. 2002; Ninamango-Cárdenas et al. 2003; Piñeros et al., 2005).

As linhagens L20 e L10 apresentaram maior potencial de uso “per se”, no entanto, a reduzida capacidade geral de combinação do genitor L20 sugere que sua utilização em cruzamentos provavelmente não resultará em híbridos superiores (Tabela 6). As combinações híbridas mais heteróticas foram obtidas pelo uso dos

Tabela 6 - Estimativa do efeito de variedade (v_i), heterose de variedade (h_i) e heterose específica (s_{ij}), variância (σ^2) e capacidade geral de combinação (g_i) no cruzamento dialélico 5x5. FA-UFRGS. 2004.

#	L06	L08	L09	L10	L20	v_i	h_i	g_i^*
L06	-	0,354	0,366	0,369	0,528	-0,18	0,242	0,149
L08	0,06	-	0,003	0,406	0,138	-0,18	-0,371	-0,464
L09	0,21	-0,56	-	0,587	0,365	0,05	0,202	0,229
L10	-0,24	0,30	0,22	-	0,276	0,14	0,018	0,091
L20	-0,04	0,20	0,12	-0,28	-	0,17	-0,091	-0,004

#: s_{ij} : Diagonal abaixo; σ^2 : Diagonal acima

*: Estimativa adaptada de Griffing (1956)

genitores L06 e L09, cujos valores de h_i (heterose de variedade) foram os de maiores

magnitudes (Tabela 6). Isto é reforçado pelos valores positivos e elevados (em relação aos demais) de g_i (capacidade geral de combinação), onde a maioria dos cruzamentos que envolvem estes genitores mostrou que a dominância tem pouco efeito no controle do caráter, ou seja, que a tolerância é baseada na ação aditiva de genes complementares. Em relação à linhagem sensível L06 é provável que apresente genes distintos responsáveis por uma maior tolerância ao alumínio. O modo de herança da tolerância ao Al^{3+} em milho não está bem definido. Prioli et al. (1985) verificaram que a capacidade geral de combinação foi o parâmetro de maior magnitude no estudo de cruzamentos dialélicos entre populações de milho tolerantes e não tolerantes à toxicidade do alumínio, sugerindo efeito de ação gênica aditiva na herança do caráter. Num estudo realizado sobre a genética da tolerância ao alumínio em milho Cateto, Sawazaki & Furlani (1987) identificaram uma linhagem altamente tolerante (linhagem Ip 48-5-3) e constataram que a tolerância no genótipo estudado era devido à ação gênica aditiva de genes menores. Diversos outros autores têm mostrado que o caráter é quantitativamente herdado, com predominância de efeitos genéticos aditivos (Magnavaca, 1982; Lopes et al., 1987; Pandey & Gardner, 1992; Lima et al., 1995). Os dois cruzamentos com maior combinação específica foram entre L10xL08 e L09xL10 (Tabela 6). O efeito da capacidade específica de combinação é interpretado como o desvio do híbrido em relação ao que seria esperado com base na capacidade geral de combinação de seus genitores, as estimativas de s_{ij} (heterose específica) evidenciam a importância dos genes com efeitos não-aditivos. sendo estas as combinações mais promissoras para elevação do caráter em estudo. Brondani & Paiva (1996) observaram que o caráter tolerância

ao alumínio apresentava herança quantitativa, havendo ocorrência de interações alélicas de dominância. A existência de um gene maior dominante para tolerância à toxicidade ao alumínio foi relatada por Rhue et al. (1978) e Garcia Júnior & Silva (1979). Em estudo realizado por Magnavaca & Bahia Filho (1995) os autores demonstraram que a tolerância ao Al^{3+} era um caráter de herança quantitativa, ressaltando a importância de genes de efeitos aditivos, no entanto, não descartaram uma menor influência de efeitos de dominância.

O primeiro passo, em geral, em trabalhos de mapeamento, relaciona-se à escolha de cruzamentos, de forma a maximizar a probabilidade de detectar polimorfismos no DNA. No contexto de mapeamento de caracteres quantitativos, a seleção de genitores está baseada na utilização de pais fenotipicamente contrastantes para o caráter de interesse (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O objetivo secundário da análise dialélica foi dar subsídios para definição dos cruzamentos a serem possivelmente utilizados nos trabalhos de análise com marcadores moleculares, como dito anteriormente. Desta forma, com o intuito de mapear o caráter tolerância ao alumínio em milho, observando a variância dos dados nos resultados encontrados dentro de cada cruzamento, a média de cada genitor envolvido, a capacidade geral de combinação e heterose específica, os cruzamentos L09xL06 e L10xL08 foram previamente escolhidos para este objetivo. O cruzamento L09xL06, por estas linhagens apresentarem elevado potencial para gerar incremento no caráter tolerância aos seus descendentes, e L10xL08, por ser a combinação específica superior entre todos os cruzamentos estudados.

4.3. Estabelecimento do protocolo para coloração com hematoxilina

Identificados os cruzamentos a serem trabalhados, o próximo passo foi a fenotipagem das populações de famílias F_3 . A fenotipagem é uma etapa crítica do processo de mapeamento, o método a ser empregado deve imprimir um elevado grau de associação entre o fenótipo e o genótipo, ou seja, o erro experimental deve ser reduzido ao máximo possível, desta forma, as variações de fenótipo corresponderão a variações do genótipo e não devido ao ambiente. Neste sentido, foi empregada a utilização combinada de dois métodos. Somado ao recrescimento da raiz principal, foi utilizado também o método de coloração com hematoxilina. Quando uma planta sensível é desenvolvida em níveis fitotóxicos de Al^{3+} , o primário efeito observado é a inibição do crescimento das raízes (Foy et al., 1978), por consequência da infiltração ocorrida no ápice (Ryan et al., 1993). A hematoxilina é um corante comumente usado em estudos citogenéticos. Este corante tem a propriedade de tornar-se azul ao formar um complexo com o Al^{3+} , desta forma, a penetração e retenção deste íon nas raízes podem ser visualizadas (Polle et al., 1978; Rincón & Gonzalez, 1992; Cançado et al., 1999).

Nos testes para estabelecer um protocolo para hematoxilina, não houve diferenças entre os genótipos para os períodos de 2, 4 e 6h, mesmo variando a concentração de Al^{3+} . Para o período 48h não houve diferenças visuais entre os genótipos, apenas uma pequena variação principalmente nos híbridos. No período de 24h, na concentração de 0,1mM, houve uma diferença visível de coloração entre os híbridos sensíveis e tolerantes mesmo havendo uma variação de classes para hematoxilina dentro de cada híbrido (Figura 4). Entretanto, o aumento do tempo de

exposição contribuiu para o aumento gradual da coloração das raízes tanto nos genótipos tolerantes como nos genótipos sensíveis, sendo este com maior intensidade após 24h. Da mesma forma, este aumento da intensidade de coloração foi percebido em ambos os genótipos com o aumento da concentração de alumínio na solução para os períodos de 24 e 48h. Delhaize et al. (1993) observaram comportamento semelhante com o aumento da exposição ao Al^{3+} (0-1h), que proporcionou maior acúmulo do mesmo acompanhado por um gradual aumento da coloração. para os genótipos tolerantes. Porém, o cultivar tolerante avaliado por Rincón & Gonzalez (1992) apresentou uma coloração inicial do ápice das raízes após 1h de exposição. A intensidade diminuiu com o progresso da exposição, havendo um decréscimo da concentração de Al^{3+} no ápice das raízes após uma intensidade máxima inicial. Em estudos realizados por Jorge & Arruda (1997) com plantas de milho tolerantes selecionadas da variedade de polinização aberta Taiúba, através do monitoramento da infiltração do Al^{3+} com o uso de hematoxilina, os autores observaram um padrão semelhante a este encontrado por Rincon & Gonzalez (1992), após 24h de exposição ao Al^{3+} , ambos genótipos tolerantes e sensíveis apresentaram intensa coloração, após 72h apenas o genótipo sensível permaneceu com as raízes coradas. Para os híbridos avaliados no presente estudo, não houve diferença visual dentro de cada concentração testada no período de 48h (Figura 4), apesar das diferenças significativas constatadas em recrescimento da raiz principal entre o híbrido DKD747 e o híbrido DKB205, quando utilizados como testemunhas na realização da análise dialélica para geração F_2 , e genitores na fase de adequação da técnica de recrescimento. Houve uma intensa coloração em grande parte das raízes

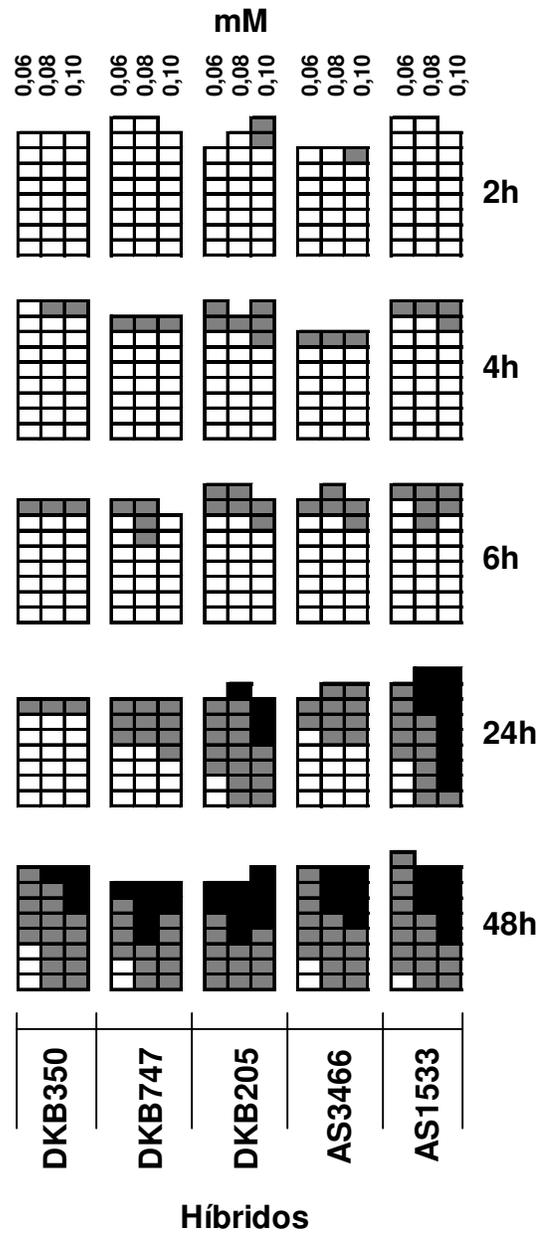


Figura 4 - Teste do método coloração com hematoxilina nos híbridos testemunhas (DKB350, DKB747, DKB205, AS3466 e AS1533) variando a concentração de alumínio (0,06, 0,08 e 0,1mM de $AlCl_3$ e tempo de exposição (2, 4, 6, 24, 48h). As categorias 1, 2 e 3 (Figura 2, Material e Métodos) estão representadas pelas cores branco, cinza e preto, respectivamente. Cada retângulo representa uma plântula avaliada. FA-UFRGS. 2005.

das plântulas testadas nestes dois híbridos. O período de 24h de exposição ao alumínio na concentração de 0,1mM de Al e 0,2mM de Ca^{2+} foi o melhor na separação dos genótipos tolerantes e sensíveis para coloração com hematoxilina. O híbrido AS3466 permaneceu na classe tolerante. No dialélico realizado na geração F_2 o tempo de exposição utilizado para o método recrescimento da raiz principal (DIF) foi de 48h, segundo metodologia empregada por Mazzocato et al. (2002). Para este tempo de exposição os híbridos DKB747 e DKB205 atingiram os valores 0,92 e 0,28cm para variável DIF. Para verificar qual resposta em termos de recrescimento da raiz principal e coloração com hematoxilina simultaneamente na separação dos genótipos contrastantes, empregando o tempo de exposição ao Al^{3+} de 24h, foi realizado um pequeno experimento utilizando os mesmos híbridos comerciais (entre eles DKB747 e DKB205, duas repetições, ~10 indivíduos de cada híbrido por repetição). Observando os valores da Tabela 7 os híbridos comerciais DKB747 e DKB205 atingiram 2,81 e 1,41cm, respectivamente. Houve uma melhor recuperação

Tabela 7 - Teste realizado com os híbridos testemunhas para os métodos coloração com hematoxilina (HEM) e recrescimento da raiz principal (DIF) simultaneamente após 24h de exposição. FA-UFRGS. 2005.

Variáveis	Híbridos Comerciais				
	DKB350	DKB747	AS3466	DKB205	AS1533
DIF	3,10 a	2,81 a	2,73 a	1,41 b	1,08 b
HEM	1,25 a	1,90 b	1,22 a	2,30 bc	2,66 c

Médias seguidas por mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

destes dois híbridos, com uma maior diferenciação na magnitude dos valores de recrescimento comparado ao tempo de exposição de 48h, e conseqüentemente uma melhor separação do tolerante (DKB747) e sensível (DKB205). Além disso, houve uma separação dos grupos de genótipos tolerantes e sensíveis (em relação ao conjunto de híbridos testados) para variável DIF correspondentes aos valores médios para intensidade de coloração. Desta forma, com o intuito de padronizar as condições a serem empregadas nas duas técnicas no processo de fenotipagem, visando o mapeamento do caráter, foi estabelecido o tempo de exposição a ser utilizado de 24h. A combinação de concentrações de Al/Ca empregada foi a mesma identificada nos trabalhos de adequação da técnica já apresentados e discutidos (0,1mM de Al³⁺ e 0,2mM de Ca²⁺).

4.4. Fenotipagem

Uma estratégia adotada para redução de fontes de variação ambiental, aumentando a precisão da fenotipagem, é a replicação de genótipos individuais a serem avaliados no experimento (Ferreira & Gratapaglia, 1998), entre os tipos de replicações incluem, por exemplo, famílias F₃. Com este objetivo, as análises de recrescimento da raiz principal (DIF) e coloração com hematoxilina (HEM) foram realizadas em 60 famílias F₃ do cruzamento L10xL08 e 30 famílias do cruzamento 09x06, onde dez indivíduos dentro de cada família foram avaliados. Os cinco híbridos comerciais foram utilizados como testemunhas (DKB205 e AS1533, sensíveis e DKB350, DKB747 e AS3466 tolerantes), assim como todas as cinco linhagens (L20, L10, L09, L08 e L06) também foram incluídas nos experimentos. Os híbridos DKB350, DKB747 e AS3466 mantiveram-se na categoria tolerante diferenciando-se

significativamente dos dois híbridos sensíveis, havendo uma associação visual com o método hematoxilina em relação à variável DIF (Figura 5). As linhagens L10 e L09 tiveram melhor desempenho em DIF e as linhagens L08 e L06 mantiveram-se na classe sensível (Figura 6). Entretanto, a linhagem L20, que de acordo com a análise

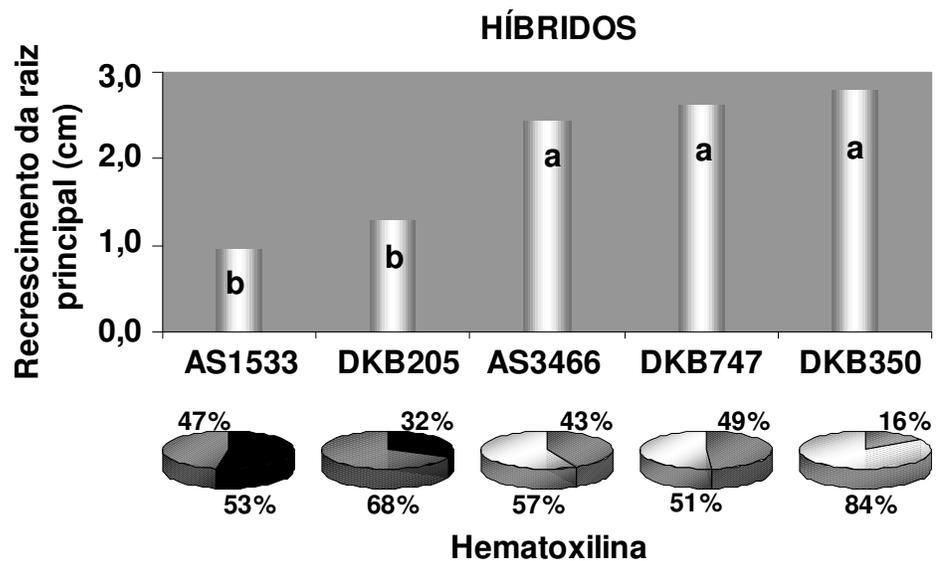


Figura 5 - Médias dos valores de recrescimento para os híbridos comerciais testemunhas. Abaixo, cada gráfico representa a porcentagem de plântulas na categoria 1 (branco), 2 (cinza) e 3 (preto) para cada híbrido avaliado em hematoxilina após 24h de exposição ao alumínio na concentração de 0,1mM de $AlCl_3$. Médias seguidas por mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FA-UFRGS. 2005.

dialélica realizada com as populações F_2 e genitores foi superior às demais linhagens, permaneceu em um nível intermediário de tolerância o que concorda com os trabalhos realizados por Mazzocato et al. (2002). Ocorreram alterações de ordem e magnitude nos valores encontrados para variável DIF nos híbridos e linhagens, ao

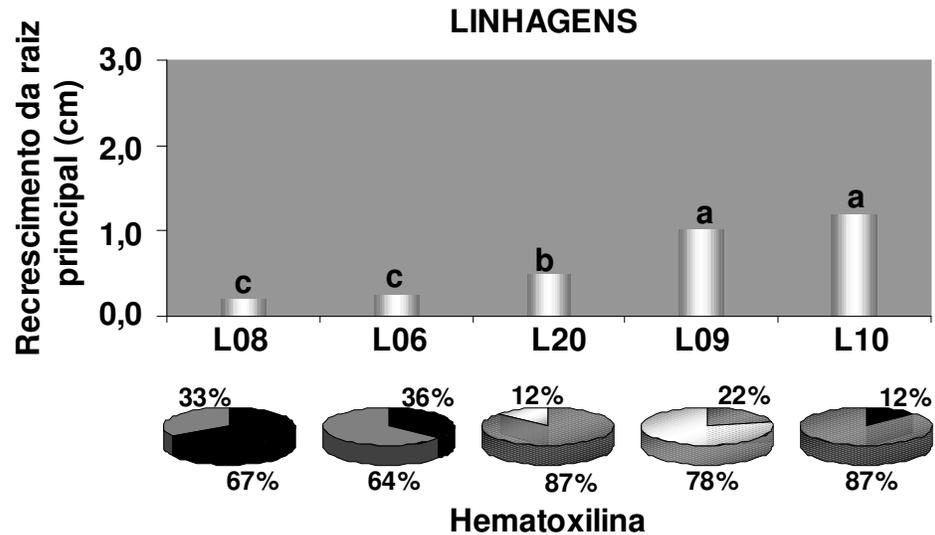


Figura 6 - Médias dos valores de recrescimento para as linhagens. Abaixo, cada gráfico representa a porcentagem de plântulas na categoria 1 (branco), 2 (cinza) e 3 (preto) para cada linhagem avaliada em hematoxilina após 24h de exposição ao alumínio na concentração de 0,1mM de $AlCl_3$. Médias seguidas por mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade. FA-UFRGS. 2005.

diminuir o tempo de exposição para 24h. Houve interações entre genótipos e tempo de exposição, interações simples isolando apenas os valores dos híbridos testemunha, avaliados nos dois tempos de exposição (DKB747 e DKB205), e interações complexas isolando o grupo de linhagens (Figura 7). Possivelmente a diminuição do tempo de exposição permitiu uma expressão mais nítida do potencial dos genótipos em relação ao caráter avaliado. Entretanto, as diferenças encontradas nos valores dos híbridos em relação às linhagens podem ser explicadas devido ao maior vigor das plântulas em relação à taxa de crescimento das raízes. Houve uma associação visual de intensidade de coloração com hematoxilina e os valores de DIF para as linhagens, à exceção da linhagem L10, que mesmo tendo um recrescimento

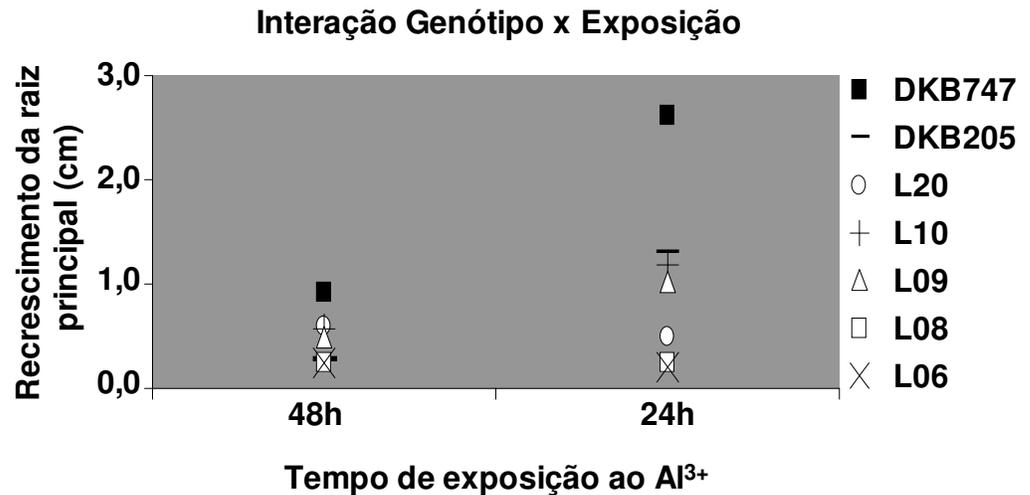


Figura 7 - Interação genótipo x tempo de exposição ao alumínio tóxico. FA-UFRGS. 2004-2005.

superior, em relação a variável HEM, teve um comportamento intermediário. Em todos os genótipos (híbridos comerciais e linhagens) foi observada a presença de duas classes para HEM.

Para verificar esta associação visual entre HEM e DIF foram realizadas análises de correlação entre os valores médios das duas variáveis dentro das famílias para os dois cruzamentos. O coeficiente de correlação foi significativo para os dois cruzamentos, entretanto a maior associação foi encontrada no cruzamento L09xL06 ($R=-0,79$, Figura 8, gráfico A) em relação ao cruzamento L10xL08 ($R=-0,67$, Figura 8, gráfico B). A correlação negativa encontrada nos dois cruzamentos foi devida aos valores designados às classes de coloração com hematoxilina (1, 2 e 3), que aumentam com a maior suscetibilidade ao alumínio, correspondendo aos menores valores observados para variável DIF dentro dos cruzamentos. Cançado et

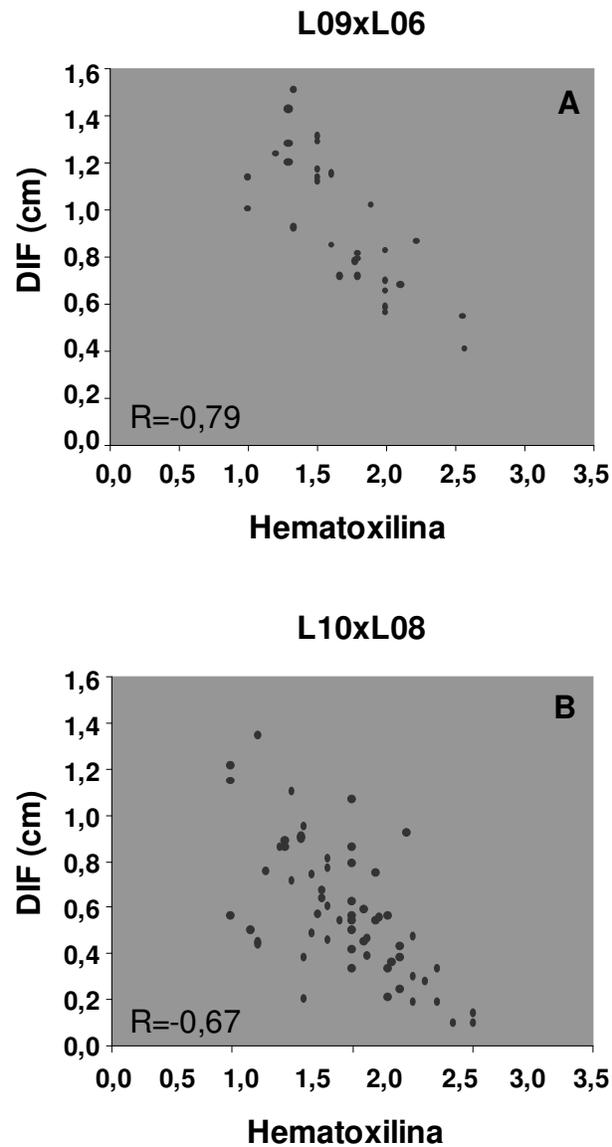


Figura 8 - Diagrama de dispersão para análise de correlação entre os valores médios das variáveis DIF e HEM após 24h de exposição ao Al^{3+} (0,1mM). Foram avaliadas 30 famílias F_3 do cruzamento das linhagens L09xL06 (Gráfico A) e 60 famílias F_3 do cruzamento das linhagens L10xL08 (Gráfico B). FA-UFRGS. 2005.

al. (1999) realizaram estudos comparando a técnica hematoxilina com outras variáveis geradas do mensuramento do crescimento radicular de plântulas de milho desenvolvidas em solução hidropônica contendo Al^{3+} . A coloração com hematoxilina

revelou maior capacidade para discriminar entre genótipos tolerantes e sensíveis ao Al^{3+} . Os autores realizaram análises de correlação entre as variáveis estudadas utilizando 20 famílias S_3 do cruzamento entre linhagens contrastantes em relação ao caráter tolerância. Houve correlação significativa com os outros dois índices analisados, com os valores de $R=-0,81$ e $R=-0,69$ para o comprimento relativo da raiz seminal (RSRL) e comprimento líquido da raiz seminal (NSRL), respectivamente.

Estudos de tolerância ao Al^{3+} demonstraram que o caráter era de herança quantitativa, mas que poderia haver a ocorrência de genes maiores (Brondani & Paiva, 1996). As Figuras 9 e 10 contribuem para esta afirmação. Na população do cruzamento L09xL06 a distribuição da frequência dos indivíduos de acordo com os valores da variável DIF apresentou uma disposição próxima a bimodal com uma grande variação nas duas classes, claramente observado, principalmente no gráfico relacionado às famílias F_3 do mesmo cruzamento (Figura 9, gráfico b), o que pode ser um indício de um gene de maior efeito atuando em conjunto com um maior número de genes de pequeno efeito no controle do caráter. Por outro lado, o cruzamento L10xL08 apresentou uma distribuição contínua, típica de caracteres de herança quantitativa, com uma tendência a um maior número de indivíduos suscetíveis, nitidamente visível nas famílias F_3 (Figura 10, gráfico b). Existem relatos mostrando este tipo de comportamento em populações analisadas para o caráter em questão. Torres et al. (1997) em um estudo de marcadores RFLP ligados a QTL que controlam tolerância ao alumínio em milho, observaram um comportamento contínuo e unimodal com tendência para suscetibilidade na distribuição da frequência dos

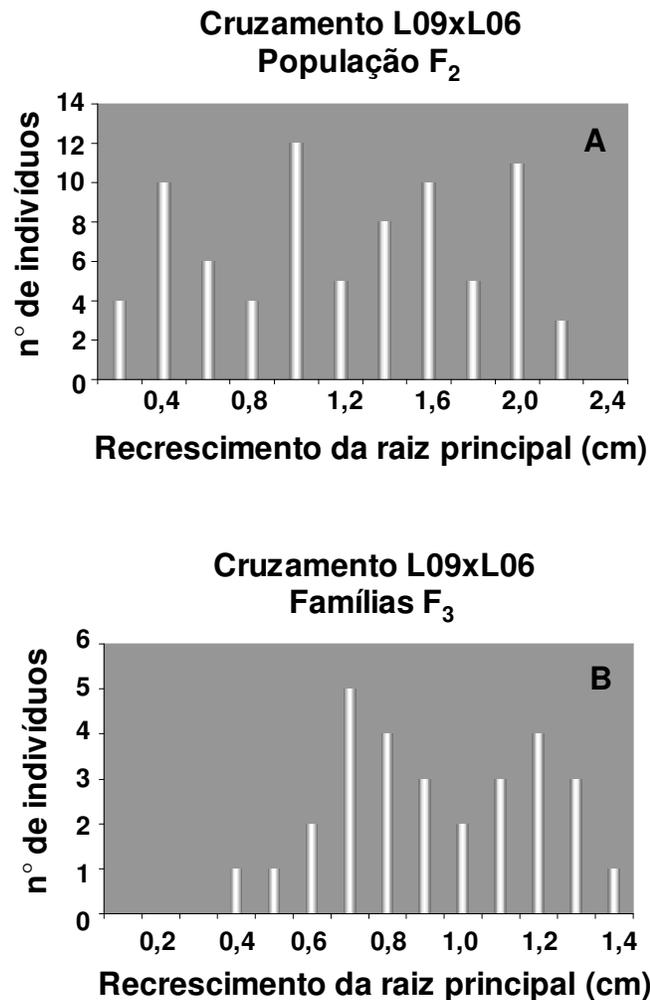


Figura 9 - Distribuição da frequência dos indivíduos a cada acréscimo de milímetro (Gráfico B, média das famílias F₃) e a cada 2 milímetros (Gráfico A, média de plântulas F₂) nos valores da variável DIF para o cruzamento L09xL06. FA-UFRGS. 2005.

valores do índice do comprimento relativo da raiz seminal (RSRL) na população F₂ do cruzamento entre L53 (linhagem suscetível) e L1327 (linhagem tolerante derivada do Cateto Colômbia). Outros relatos reforçam a hipótese de um caráter quantitativo de herança complexa e que a tolerância ao alumínio é devida à ação gênica aditiva

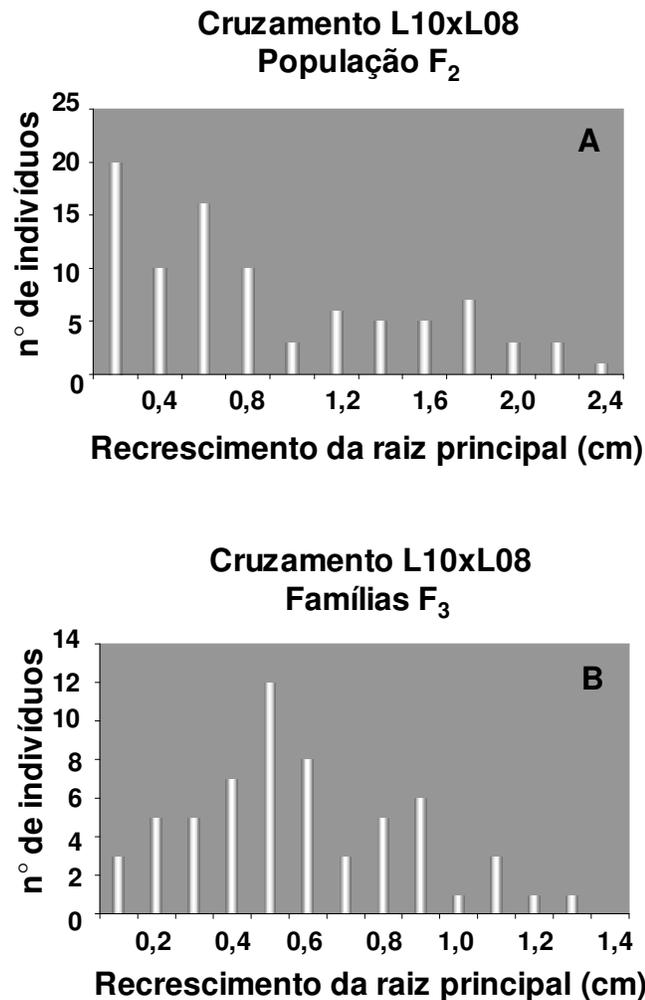


Figura 10 - Distribuição da frequência dos indivíduos a cada acréscimo de milímetro (gráfico B, média das famílias F₃) e a cada 2 milímetros (gráfico A, média de plântulas F₂) nos valores da variável DIF para o cruzamento L10xL08. FA-UFRGS. 2005.

de genes menores (Rhue et al., 1978; Garcia Júnior & Silva 1979; Sawazaki & Furlani, 1987; Magnavaca & Bahia Filho, 1995; Brondani & Paiva, 1996). Somando-se a este contexto, um dos trabalhos mais completos de associação de marcadores ligados a QTL em milho para o caráter tolerância foi realizado por Ninamango-Cárdenas et al. (2003), onde foram identificadas cinco regiões genômicas relacionadas ao caráter. Nos gráficos das populações F₂ houve uma distorção para

uma maior frequência de indivíduos nas classes mais suscetíveis, provavelmente devido ao maior tempo de exposição (48h) ao tratamento com alumínio utilizado nos experimentos para esta geração.

Apesar de não haver diferenças significativas em relação a variável DIF entre L10 e L09, ficou evidente durante a realização dos experimentos o diferente grau de coloração com hematoxilina entre as duas linhagens, o que sugere uma possível diferença em relação ao mecanismo de tolerância atuante. Segundo Delhaize et al. (1993) a excreção de ácido málico, considerado um mecanismo de exclusão em trigo, pode dar uma explicação para as diferentes intensidades de coloração observadas em ápices de raízes de plântulas de trigo com diferentes níveis de tolerância ao alumínio, o que é condizente com relatos semelhantes de diversos autores em outras culturas (Minella & Sorrells, 1992; Mõo et al., 1997; Jorge & Arruda, 1997; Piñeros et al., 2002; Tang et al.; 2002). A exclusão do alumínio do ápice da raiz via exudação de citrato ativada pela presença de Al^{3+} , é amplamente reconhecida como principal mecanismo de tolerância operando em milho (Piñeros et al., 2005). Entretanto, alguns trabalhos têm revelado indícios da participação de outros mecanismos atuando em conjunto com a exudação de ácidos orgânicos, reforçando a idéia, em contraste a outras espécies semelhante ao trigo, que a tolerância é relativamente simples, que em milho a tolerância ao alumínio é uma característica geneticamente e fisiologicamente complexa (Piñeros et al., 2002; Kochian et al. 2004; Piñeros et al., 2005). Piñeros et al. (2005) em um estudo fisiológico comparativo mostraram que a tolerância ao alumínio em milho não poderia ser explicada somente pela exudação de ácidos orgânicos. Os autores verificaram

que três dos quatro genótipos sensíveis exudavam citrato na presença de Al em igual ou maior quantidade que os genótipos tolerantes. Desta forma, provavelmente um mecanismo de exclusão deve estar relacionado a grande parte da tolerância da linhagem L09, devido a menor intensidade de coloração com hematoxilina. Porém, na linhagem L10 existe a possibilidade de um mecanismo de detoxificação interna atuando em conjunto com um mecanismo de exclusão, e isto se refletiu no menor valor para o coeficiente de correlação entre DIF e hematoxilina na análise para o cruzamento L10xL08.

4.5. Mapeamento com marcadores moleculares

Entre os cruzamentos pré-selecionados foi escolhido L10xL08 (60 famílias) devido ao maior número de famílias obtidas em relação ao L09xL06 (30 famílias), e pela superioridade do cruzamento em relação ao L09xL06 (maior capacidade específica de combinação). O tipo de marcador escolhido para as análises moleculares foi o microssatélite, tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo. Da mesma forma, os marcadores microssatélites são os que possuem o conteúdo de informação de polimorfismo mais elevado, quando comparados com outros marcadores que utilizam a PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Foram testados 124 pares de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores), gerando 37 marcadores polimórficos com padrão mendeliano (Tabela 8), distribuídos nos 10 cromossomos que constituem o genoma do milho, atingindo um percentual de 29,83% de polimorfismo. Este percentual é considerado baixo, visto que, este tipo de marcador apresenta um elevado grau de polimorfismo para a espécie em estudo (Chin et al., 1996). Entretanto, outros trabalhos de mapeamento para tolerância,

Tabela 8 - Informações sobre marcadores microssatélites polimórficos, loco, localização cromossômica do marcador (BIN), seqüência repetitiva (motivo) e temperatura de anelamento (T.A.). FA-UFRGS. 2005-2006.

Loco	BIN*	Motivo	T.A. (°C)
p-bnlg439	1,03	-	65
p-umc1397	1,03	(ATGCA)4	55-65
p-bnlg1338	2,01	AG(30)	55-65
p-bnlg1297	2,02	AG(32)	55-65
p-mmc006	2,04	(CA)16(TA)6(CA)2	55-65
p-mmc0401	2,05	(GGA)2(AG)27	55-65
p-bnlg1520	2,09	AG(22)	55-65
p-bnlg1325	3,03	AG(18)	55-65
p-phi073	3,05	(AGC)	55-65
p-umc1594	3,09	(TA)10	62
p-nc004	4,03	AC	55-65
p-umc1550	4,03	(TC)6	64
p-bnlg1265	4,05	AG(33)	55-65
p-phi079	4,05	AGATG	65
p-umc1173*	4,09	(AC)7	55-65
p-bnlg1382	5,01	AG(25)	55-65
p-umc2302	5,04	(AGAAAGAA)4	55-65
p-umc1753	6,01	(CT)7	55-65
p-bnlg1154	6,05	AG(27)	55-65
p-bnlg1740	6,07	AG(21)	55-65
p-bnlg1521	6,08	AG(27)	55-65
p-umc1545	7,00	(AAGA)4	55-65
p-umc1799	7,06	(TG)12	55-65
p-umc1034	8,03	GA(12)	64
p-umc1741	8,03	(TC)7	64
p-umc1172	8,04	(CCA)4	64
p-umc1202	8,05	(GGC)7	63
p-bnlg1724	9,01	AG(31)	55-65
p-umc2084	9,01	(CTAG)4	55-65
p-bnlg1401	9,02	AG(22)	55-65
p-umc1636	9,02	(ACTGC)4	65
p-umc1318	10,01	(GTC)5	55-65
p-bnlg1451	10,01	AG(34)	55-65
p-umc1576	10,02	(TG)6	64
p-bnlg1655	10,03	AG(21)	55-65
p-umc1506	10,05	(AACAA)4	55-65

*: Localização cromossômica do marcador disponível no *site* www.maizegdb.org/ssr.php.

envolvendo marcadores moleculares, têm apresentado polimorfismo inferior em relação ao esperado. Ninamango-Cárdenas et al. (2003), utilizando a estratégia de

bulked segregant analysis (BSA), testaram 340 marcadores microssatélites aleatoriamente distribuídos no genoma do milho e utilizaram para as análises de QTL apenas 31 marcadores polimórficos (9,11%) com padrão mendeliano. Sibov et al. (1999) utilizando marcadores do tipo RFLP para a mesma estratégia (BSA), de 138 marcadores, apenas 21 apresentaram polimorfismo entre os *bulks* tolerante e sensível testados, para 552 combinações sonda-enzima.

Os dados gerados pelos 37 marcadores foram analisados no programa Mapmaker versão 3.0. Houve a formação de oito grupos de ligação, sendo que cinco grupos estavam constituídos por apenas dois marcadores e os outros três grupos eram formados por 4, 4 e 5 marcadores, todos dos cromossomos 4, 8 e 10, respectivamente. Quatorze marcadores não apresentaram ligação. Uma das razões para o elevado número de marcadores sem ligação, pode ser o baixo polimorfismo encontrado entre os genitores, o que reduziu o número de marcadores que puderam ser utilizados na população. Seria necessário testar um maior número de locos para obtenção de um mapa de ligação ideal com 10 grupos, correspondente aos dez cromossomos do milho. Entretanto, além de uma seleção prévia de marcadores para cobrir o genoma da espécie em questão, na tentativa de obter novos QTL, foram utilizados marcadores próximos a regiões previamente mapeadas para o caráter por outros autores, desta forma, o trabalho não tinha como objetivo a formação de um mapa de ligação completo, e sim a identificação de regiões associadas a marcadores, visto a excelente fonte de dados encontrada em milho para obtenção do posicionamento de tais marcadores. Para identificação de marcadores associados a QTL responsáveis pela tolerância ao alumínio em milho, foram realizadas análises de

regressão de duas formas. Uma tomando como variável dependente as médias de DIF para as 60 famílias F_3 do cruzamento L10xL08 e a outra, utilizando como variável dependente os valores médios de HEM para as mesmas 60 famílias. Houve significância na associação entre os marcadores umc1550, bnlg1382, bnlg1154, umc1202 e umc1318 localizados nos cromossomos 4, 5, 6, 8 e 10, respectivamente, segundo informações obtidas na base de dados específica para a cultura do milho MaizeGDB (www.maizegdb.org/ssr.php). Porém, os marcadores umc1550 e bnlg1382 tiveram associação significativa apenas para uma variável analisada (DIF e HEM, respectivamente), os demais marcadores tiveram associação significativa com as duas variáveis (Tabela 9). Existem relatos de associação ao caráter tolerância ao alumínio em regiões localizadas em todos os outros cromossomos relacionados, com exceção do cromossomo 4, no qual o marcador associado explicou 10% da variação fenotípica encontrada em DIF. Os QTL identificados explicaram 41 e 37% da variação para as variáveis DIF e HEM, respectivamente. Para DIF a associação mais significativa foi obtida no cromossomo 10, explicando 15% da variação fenotípica observada ($P=0,003$), enquanto para HEM a maior associação encontrada foi localizada no cromossomo 5, com 12% da proporção da variação fenotípica ($P=0,008$) (Tabela 9).

Sibov et al. (1999) mapearam dois locos associados à tolerância ao alumínio utilizando marcadores do tipo RFLP. Os locos se localizavam nos cromossomos 6 (loco *Alm2*) e 10 (loco *Alm1*), sendo que o segundo loco tinha um efeito três vezes maior do que o do cromossomo 6. Os marcadores bnlg1154 e umc1318 localizam-se nos bins 6,05 e 10,01, enquanto as sondas de RFLP CSU70 e UMC130 associadas

Tabela 9 - Marcadores associados a QTL, localização cromossômica do marcador (BIN), probabilidade e coeficientes de correlação (em %) em relação as variáveis analisadas. FA-UFRGS. 2005-2006.

Marcador	BIN*	DIF		HEM	
		Valor P	R ² (%)	Valor P	R ² (%)
umc1550	4,03	0,017	10	-	-
bnlg1382	5,01	-	-	0,008	12
bnlg1154	6,05	0,021	9	0,019	10
umc1202	8,05	0,044	7	0,047	7
umc1318	10,01	0,003	15	0,031	8
Total			41		37

*: Localização cromossômica do marcador disponível no *site* www.maizegdb.org/ssr.php.

às regiões mapeadas por Sibov et al. (1999) encontram-se nos bins 6,01 e 10,03 segundo mapa consenso IBM neighbors v.2 (MaizeGDB, 2002) para os respectivos cromossomos (Tabela 10). Bins são posições cromossômicas definidas por um grupo de marcadores centrais e são nomeados pelo número cromossômico, seguido por unidades decimais ao longo de cada cromossomo, iniciando da posição mais telomérica do braço curto (Ninamango-Cárdenas, 2003). Estas unidades decimais correspondendo a pequenos intervalos no cromossomo são subdivididas por coordenadas de valores acumulativos, desde o primeiro marcador para cada cromossomo. Somando-se a proximidade em que os marcadores foram mapeados comparado ao trabalho de Sibov et al. (1999), principalmente em relação a umc1318 no cromossomo 10, neste mesmo mapa consenso localiza-se o loco csu359 (bin 10,01), obtido via sonda RFLP, com seqüência homóloga ao gene que codifica para uma proteína induzida pelo alumínio em trigo (Davis et al., 1999). Esta proteína é

codificada por *wali7*, um gene com sua expressão aumentada em ponta de raízes, induzida pela exposição ao alumínio (Richards et al., 1994) (Figura 11). A participação na variação fenotípica das variáveis avaliadas foi de 9% e 15% na variável DIF e 10% e 8% em HEM para os marcadores localizados nos cromossomos 6 e 10 respectivamente. Ainda em relação ao marcador do cromossomo 6, segundo mapa consenso IBM neighbors v.2 (MaizeGDB, 2002), está localizado no bin 6,05 (Tabela 10), na mesma região onde foi mapeado o QTL₃ associado à tolerância ao alumínio por Ninamango-Cárdenas et al. (2003). A Embrapa do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, de Sete Lagoas – Brasil, tem empenhado esforços para identificar regiões associadas ao caráter tolerância ao alumínio em milho (Brondani & Paiva, 1996; Torres et al., 1997; Ninamango-Cárdenas et al., 2003). Neste mesmo trabalho realizado por Ninamango-Cárdenas et al. (2003), considerado por outros autores o mais completo mapeamento para tolerância ao alumínio na espécie, utilizando marcadores do tipo microssatélites e RFLP os autores mapearam outras regiões associadas à tolerância ao alumínio. Além de dois QTL detectados no cromossomo 6, foi associada uma região no cromossomo 5 e outros três QTL foram definidos por mapeamento de intervalo composto, um na região do cromossomo 2 e dois em regiões do cromossomo 8. Em consulta ao mapa SSR concensus 1998 (MaizeGDB, 1998) o marcador bnlg1382, responsável por 12% da variação fenotípica em relação a variável HEM, localiza-se no cromossomo 5 (bin 5,01) próximo ao marcador umc043 (bin 5,03) da região associada ao caráter conforme Ninamango-Cárdenas (2003) (Tabela 10). O marcador associado ao cromossomo 8, segundo mapa consenso IBM neighbors v.2 (MaizeGDB, 2002) para este cromossomo

Tabela 10 - Comparação de relatos de regiões cromossômicas (BIN) associadas ao caráter tolerância. FA-UFRGS. 2005-2006.

Marcadores	BIN**	Tipo	Publicação***	Mapa consenso**
umc139	2,06	RFLP	Ninamango-Cárdenas et al.	SSR consensus 1998
umc1550	4,03	SSR	Conceição et al.	IBM neighbors v.2
bnlg1382	5,01	SSR	Conceição et al.	SSR consensus 1998
umc043*	5,03	RFLP	Ninamango-Cárdenas et al.	SSR consensus 1998
bnlg238	6,00	SSR	Ninamango-Cárdenas et al.	IBM neighbors v.2
csu70	6,01	RFLP	Sibov et al.	IBM neighbors v.2
mmc241	6,05	SSR	Ninamango-Cárdenas et al.	IBM neighbors v.2
bnlg1154	6,05	SSR	Conceição et al.	IBM neighbors v.2
csu155	8,04	RFLP	Ninamango-Cárdenas et al.	IBM neighbors v.2
umc1202	8,05	SSR	Conceição et al.	IBM neighbors v.2
bnlg1828	8,07	SSR	Ninamango-Cárdenas et al.	IBM neighbors v.2
umc1318	10,01	SSR	Conceição et al.	IBM neighbors v.2
umc130	10,03	RFLP	Sibov et al.	IBM neighbors v.2

*: Marcador associado ao caráter, porém, não descrito como QTL no trabalho citado.

** : Mapas e localização cromossômica disponíveis no *site* www.maizegdb.org/ssr.php.

***: Conceição et al. trata-se do presente estudo, sem publicação.

, umc1202 localiza-se no bin 8,05 coordenada 270,38 na mesma região do marcador próximo a um dos QTL mapeados neste cromossomo, o marcador CSU155 (bin 8,04, coordenada 270,38) (Tabela 10). Este marcador (umc1202) explicou 7% da variação fenotípica nas duas variáveis estudadas. Nesta região (bin 8,05, segundo o mesmo mapa consultado) está localizado o gene *idh1* (Ninamango-Cárdenas, 2003), que codifica para isocitrato desidrogenase, uma enzima do ciclo de ácidos tricarbóxicos

(TCA) e outras reações envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos (Ryan et al. 2001) (Figura 11).

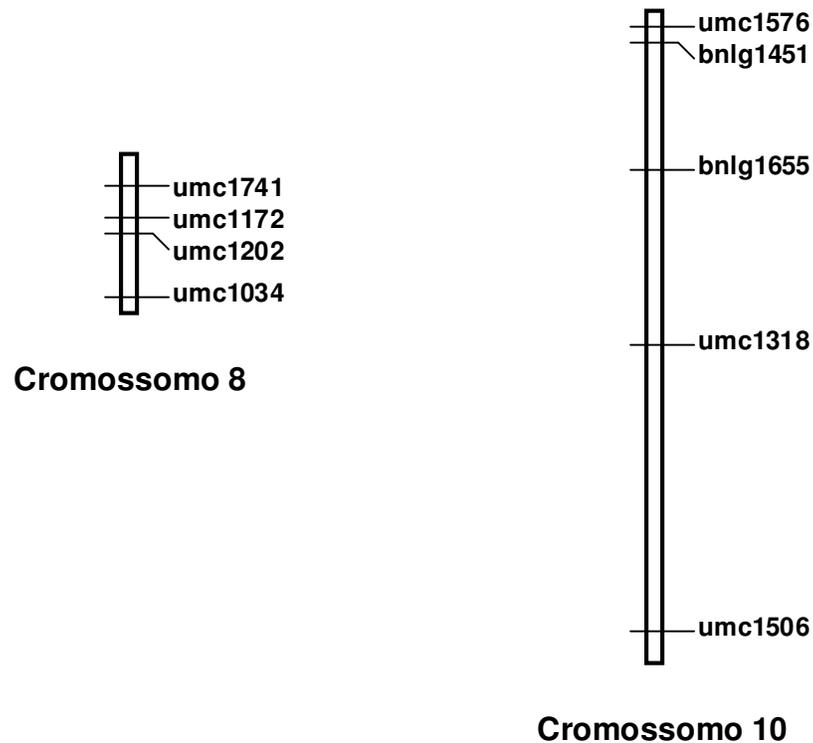


Figura 11 - Grupos referentes aos cromossomos 8 e 10 obtidos pela análise de ligação. Marcadores umc1202 e umc1318 estão associados as variáveis DIF e HEM e localizados no mesmo BIN de *idh1* e *csu359* (homólogo a *wali7*), respectivamente. FA-UFRGS. 2005-2006.

4.6. Experimento a campo

Diversos estudos relacionados à tolerância ao Al^{3+} em milho envolvem a utilização de solução nutritiva contendo este elemento, onde são mensurados seus efeitos fitotóxicos no desenvolvimento da raiz. Entretanto, a toxicidade do Al^{3+} em solos ácidos, não é o único fator a ser considerado no cultivo de plantas em solos ácidos (Duque-Vargas et al., 1994). As plantas tornam-se mais sensíveis à seca

devido ao menor crescimento radical condicionado pelo Al^{3+} , impossibilitando a obtenção de água das camadas mais profundas do solo. Além disso, o alumínio interfere na absorção e movimentação do fósforo e cálcio entre outros nutrientes (Foy et al, 1978). Nodari et al. (1982), avaliando genótipos de trigo sensíveis e tolerantes ao alumínio em solo ácido, concluíram que a seleção para o caráter por métodos convencionais de melhoramento poderia gerar progressos genéticos rápidos e expressivos. Neste trabalho, os autores realizaram um total de 15 cruzamentos entre oito genótipos contrastantes em níveis de tolerância. Foram realizadas observações dos sintomas típicos da toxicidade do Al^{3+} em plantas sensíveis (crestamento em trigo) durante o ciclo da cultura e determinado o peso seco da parte aérea e das raízes de todas as gerações avaliadas de cada um dos cruzamentos (genitores, híbridos e gerações segregantes). O estudo encontrou elevada correlação entre as observações das reações de plantas ao Al^{3+} e peso seco da parte aérea e raízes. Foram observadas diferenças marcantes entre genótipos tolerantes e sensíveis, demonstrando elevada variabilidade genética para os genótipos pesquisados. Além disso, foram detectados elevados efeitos de aditividade na estimativa dos componentes da variância genética o que determinou alta herdabilidade para o caráter.

Na comparação de médias, dos caracteres avaliados no experimento realizado a campo, isolando apenas as testemunhas (híbridos comerciais tolerantes e sensíveis utilizados nos experimentos de laboratório) foram encontradas diferenças significativas apenas para o rendimento da parcela. Houve associação com os resultados encontrados nos experimentos em solução contendo Al^{3+} , havendo uma

divisão dos genótipos tolerantes e sensíveis. O maior rendimento encontrado foi do híbrido DKB 350 (2,71kg) não havendo diferenças significativas em relação ao DKB747 (2,22kg). Para os demais caracteres, apesar da separação entre os grupos tolerante e sensível na ordem de magnitude dos valores médios encontrados (com exceção do número de espigas por plantas), não houve diferenças significativas (Tabela 11).

Tabela 11- Médias das variáveis observadas a campo rendimento da parcela (REND PARC), número de espigas (N ESP), número de espigas por planta (N ESP PLA), peso de espiga (PES ESP) e estatura (EST). Fundacep-Cruz Alta. 2005-2006.

Genótipo	REND PES ESP	N ESP	N ESP PLA	PES ESP	EST
	kg			kg	cm
DKB350	2,71 a	19,50 a	0,86 a	0,14 a	131,67 a
DKB747	2,22 a b	14,50 a	1,07 a	0,15 a	146,67 a
AS3466	2,00 b	18,00 a	0,87 a	0,11 a	132,92 a
AS1533	1,28 c	13,33 a	0,72 a	0,09 a	126,67 a
DKB205	1,11 c	11,50 a	0,89 a	0,09 a	117,50 a

Médias seguidas pela mesma letra não apresentam diferenças significativas, segundo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Entretanto, na análise de correlação entre os caracteres avaliados a campo, dentro das mesmas famílias avaliadas em condição de laboratório dos cruzamentos L09xL06 e L10xL08, houve associação significativa entre REN PARC e os demais caracteres. As maiores associações encontradas foram com as variáveis N ESP e N ESP PLA para os dois cruzamentos estudados (Tabelas 12 e 13).

Salomon et al (2003), observando o desempenho de plantas de trigo em solução nutritiva e em solos ácidos, afirmaram que a possibilidade de selecionar para tolerância ao Al^{3+} , em condição de laboratório, antes que sejam avaliados em campo, torna o processo de obtenção de linhagens tolerantes mais eficiente. Os autores encontraram correlações significativas entre o comprimento da raiz, nas diferentes concentrações de Al^{3+} observadas em solução nutritiva, e as avaliações de rendimento de grãos e estatura de planta realizadas a campo em solo ácido. Na análise de correlação entre as variáveis analisadas em laboratório e as variáveis analisadas a campo no presente estudo, não houve associações significativas para nenhum dos dois cruzamentos investigados (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Correlações entre as variáveis diferença de crescimento da raiz principal (DIF), coloração com hematoxilina (HEM), rendimento da parcela (REND PARC) e variáveis observadas a campo para as famílias F_3 do cruzamento L09xL06. Fundacep-Cruz Alta. 2005-2006.

Variáveis	REND PARC	N ESP	N ESP PLA	PES ESP	EST
	kg			kg	cm
DIF	0,27	0,19	0,34	0,02	0,28
HEM	-0,26	-0,18	-0,27	0,00	-0,28
REND PES ESP	1,00	0,79*	0,81*	0,55*	0,65*

*: significativo a 5% de probabilidade.

É difícil controlar este complexo mineral do solo para que determinado nível de alumínio seja reproduzido. Além disso, a toxicidade ao alumínio não é o único fator limitante em solos ácidos (Camargo, 1981). Diversos fatores podem ter colaborado para a carência de associações significativas entre os trabalhos a campo e os

Tabela 13 - Correlações entre as variáveis diferença de crescimento da raiz principal (DIF), coloração com hematoxilina (HEM), rendimento parcela (REND PARC) e variáveis observadas a campo para as famílias F₃ do cruzamento L10xL08. Fundacep-Cruz Alta. 2005-2006.

Variáveis	REND PARC	N ESP	N ESP PLA	PES ESP	EST
	kg			kg	cm
DIF	-0,08	-0,11	-0,11	-0,13	-0,01
HEM	-0,04	0,01	-0,03	0,02	-0,05
REND PES ESP	1,00	0,86*	0,84*	0,37*	0,57*

*: significativo a 5% de probabilidade.

trabalho de laboratório. Primeiramente o nível de saturação de Al³⁺ no solo foi de 64,2% a um pH de 4,3, ou seja, os trabalhos foram realizados em um solo extremamente ácido. Nos experimentos realizados em laboratório, o maior tempo de exposição (48h) prejudicou a expressão do real potencial das linhagens trabalhadas. Além disso, a distribuição da freqüência dos indivíduos a cada milímetro de crescimento de raiz na população segregante para os dois cruzamentos, tendeu a suscetibilidade. O mesmo ocorreu na distribuição da freqüência das médias das famílias a cada acréscimo de 0,1kg no rendimento em peso total de espiga (Figura 12). Outro fator que pode ter colaborado para estes resultados foi a estiagem ocorrida nos primeiros 20 dias do ciclo. Os efeitos da seca são mais elevados em uma condição de solo ácido. O tamanho médio de população ao final do ciclo em relação à densidade de semeadura, dentro das parcelas para os cruzamentos L09xL06 e L10xL08, foi de 59,38% e 59,22%, respectivamente. Provavelmente muitas plantas sensíveis e tolerantes morreram no início do ciclo pelos fortes efeitos da seca associados à elevada acidez, gerando assim relevante perda de informação.

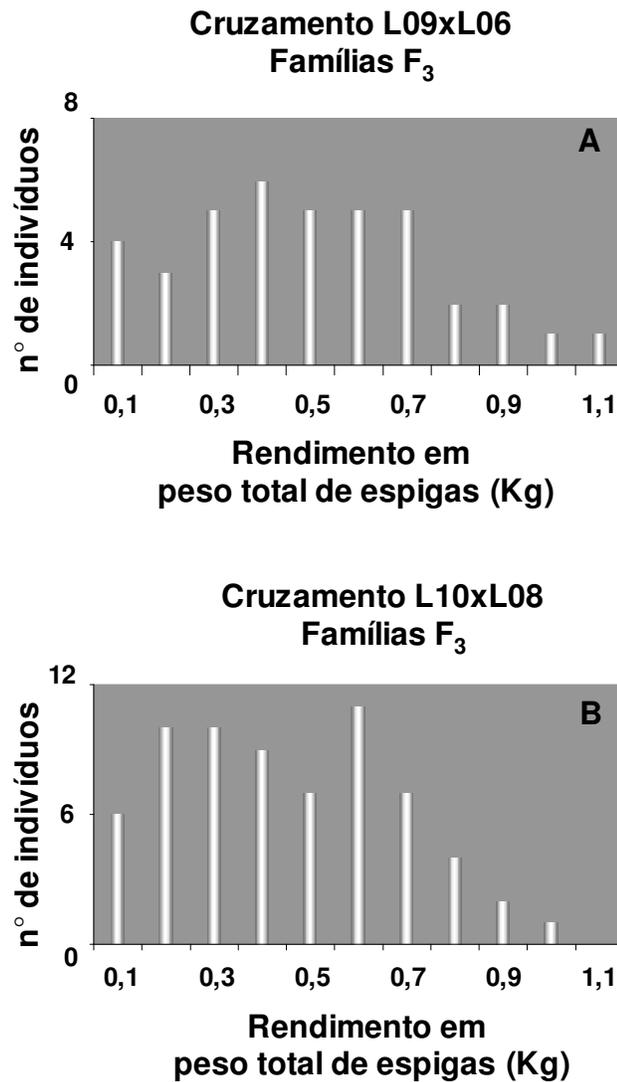


Figura 12 - Distribuição da freqüência dos indivíduos a cada acréscimo de 0,1kg na média das famílias F₃ nos valores da variável rendimento em peso total de espigas (REND PARC) para os cruzamentos L09xL06 (Gráfico A) e L10xL08 (Gráfico B). Fundacep-Cruz Alta. 2005-2006.

Em estudo realizado com progênies de irmãos inteiros de uma população melhorada de milho tropical (SA-3), Duque-Vargas et al. (1994) avaliaram os efeitos do alumínio tóxico em solos com diferentes graus de saturação de Al³⁺. Entre os caracteres avaliados estavam rendimento de grãos, número de espigas por planta e

estatura. Todos os caracteres foram afetados quando avaliados em ambiente ácido quando comparado ao solo em condições normais. Os autores indicaram que embora houvesse uma elevada correlação genético-aditiva entre rendimento de grãos e número de espigas por planta em ambientes com presença de Al^{3+} (0,84), a seleção direta para rendimento de grãos seria mais efetiva em condições de solos ácidos.

Apesar de não ter havido correlação entre as variáveis analisadas em laboratório e os dados de experimento a campo para as famílias dos cruzamentos estudados, o gráfico da distribuição da frequência das médias das famílias a campo sugeriu a presença de variabilidade genética para o caráter tolerância ao alumínio em milho (Figura 12).

5. CONCLUSÕES

O estudo da herança para tolerância ao alumínio indica a existência de variabilidade genética para o caráter nos genótipos trabalhados e que a tolerância é baseada na ação aditiva de genes complementares. Entretanto, a superioridade de certas combinações específicas evidencia a importância de genes não-aditivos.

Os resultados da análise molecular sugerem o envolvimento de pelo menos cinco regiões cromossômicas no controle da tolerância ao alumínio, tratando-se de um caráter de herança complexa e quantitativa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD, R.W. **Principles of plant breeding**. New York: John Wiley, 1960. 381p.

ANDRADE, J.M.V. **Identificação e seleção, em casa de vegetação, de genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) tolerantes ao alumínio e ao manganês com modificações das características químicas do solo**. 1976. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1976.

ANIOL, A.; GUSTAFSON, J.P. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. **Canadian Journal of Genetic and Cytology**, Ottawa, v.26, p.701-705, 1984.

BAHIA FILHO, A.F.C.; FRANÇA, G.E.; PIVA, G.V.E. et al. Avaliação de linhagens e populações de milho em condições de elevada acidez. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MILHO E SORGO, 11., 1978, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Departamento de Genética da ESALQ, 1978. p.51-58.

BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: **Annual Review of Environmental Experimental Botany**, Elmsford, v.48, p.75-92, 2002.

BENNET, R.J.; BREEN, C.M. The aluminium signal: new dimensions to mechanisms of aluminium tolerance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.134, p.153-166, 1991.

BISOTTO, V. Algumas Considerações sobre a cultura do milho. In: INDICAÇÕES técnicas para cultura do milho no RS. Porto Alegre: EMATER/RS; FEPAGRO/RS; Passo Fundo: EMBRAPA.CNPT, 2001. p.6-16, (Boletim Técnico 7).

BISSANI, C.A.; TEDESCO, M.J.; Enxofre, Cálcio e Magnésio. In: PRINCÍPIOS de fertilidade de solo. Porto Alegre: Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. p.139-151.

BOHNEN, H. Acidez e Calagem. In: PRINCÍPIOS de fertilidade de solo. Porto Alegre: Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. p.51-76.

BRONDANI, C.; PAIVA, E. Análise de RFLP da tolerância à toxidez do alumínio no cromossomo 2 do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.8, p.575-579, 1996.

CAMARGO, C.E.O. Efeitos de níveis de cálcio combinados com diferentes concentrações de sais na tolerância de trigo à toxicidade de alumínio, em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v.44, p.659-668, 1985.

CAMARGO, C.E.O. Melhoramento de trigo. 1. Hereditariedade da tolerância à toxicidade do alumínio. **Bragantia**, Campinas, v.40, n.4, p.33-45, 1981.

CAMBRAIA, J.; CAMBRAIA, M.C. Avaliação de híbridos de milho quanto à tolerância ao alumínio, em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.241, p.297-307, 1995.

CANAL, I.N.; MIELNICZUK, J. Parâmetros de absorção de potássio em milho (*Zea mays* L.), afetadas pela interação alumínio-cálcio. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.35, n. 3, p. 336-340, 1983b.

CANAL, I.N.; MIELNICZUK, J. Translocação de cálcio e alumínio em raízes intactas de milho (*Zea mays* L.). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.35, n.3, p.331-336, 1983a.

CANÇADO, G.M.A.; LOGUERCIO, L.L.; MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; PAIVA, E.; BORÉM, A.; LOPES M.A. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.99, p.747-754, 1999.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1997. 390p.

DAVIS, G.L.; MCMULLEN, M.D.; BAYSDORFER, C.; MUSKET, T.; GRANT, D.; STAEBELL, M.; XU, G.; POLACCO, M.; KOSTER, L.; MELIA-HANCOCK, S.; HOUCHINS, K.; CHAO, S.; COE, JR., E.H. A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points and 932 expressed sequence tagged sites (ESTs) in a 1736-locus map. **Genetics Society of America**, Pittsburgh, v.152, p.1137-1172, 1999.

DE LA FUENTE, J.M.; RAMÍREZ-RODRIGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J.L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Plant Science**, Limerick, v.276, p.1566-1568, 1997.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, Lancaster, v.117, p.19-27, 1998.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, Lancaster, v.103, p.695-702, 1993.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C.D.; BENNET, R.J.; JAGADISH, V.C.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, Lancaster, v.103, p.685-93, 1993a.

DELHAIZE, E.; HEBB, D.M.; RYAN, P.R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology**, Lancaster, v.125. p.2059-2067, 2001.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v.107, p.315-321, 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; HEBB, D.M.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, nv.101, n.42, p15249-15254, 2004.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, Lancaster, v.103, p.695-702, 1993b

DORNELLES, A.L.C.; CARVALHO, F.I.F.; FEDERIZZI, L.C.; SERENO, M.J.C.M.; AMARAL, A.; LAGLOIS, P. Avaliação de genótipos de trigo hexaplóide quanto a tolerância a toxicidade do alumínio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.1, p.19-22, 1996.

DRAPER, J.M.; SMITH, H. **Applied Regression Analysis**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1981. 709p.

DUQUE-VARGAS, J.; PANDEY, S.; GRANADOS, G.; CEBALLOS, H.; KNAPP, E. Inheritance of tolerance to soil acidity in tropical maize. **Crop Science**, Madison, v.34, p.50-54, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

- FISKEJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of allium. **Physiology Plant**, Copenhagen, v.59, p.508-511, 1983.
- FOY, C.; FLEMMING, A.; SCHWARTZ, J. Opposite aluminum and manganese tolerances in two wheat varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v.65, p.123-26, 1973.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Bethesda, v.29, p.511-566, 1978.
- FURLANI, P.R.; LIMA, M.; MIRANDA, L.T. Avaliação de linhagens, materiais comerciais e duas populações de milho para tolerância a alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.6, p.655-660, 1986.
- GALLEGO, F.J.; BENITO, C. Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.393–399, 1997.
- GALLEGO, F.J.; CALLES, B.; BENITO, C. Molecular markers linked to the aluminium tolerance gene *alt1* in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, p.1104-1109, 1998.
- GARCIA JÚNIOR, O.; SILVA, W.J. Análise genética da tolerância ao alumínio em milho. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.31, p.585, 1979.
- GARDNER, C.O.; EBERHART, S.A. Analysis and interpretation of the variety cross dialled and related populations. **Biometrics**, Washington, v.22, p.439-452, 1966.
- GIAVENO, G.D.; MIRANDA, F.J.B.; FURLANI, P.R.. Inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Genetics Breeding**, Roma, v.55, p.51-56, 2001.
- GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. **Australian Journal of Biological Sciences**, East Melbourne, v.9, n.4, p.463-493, 1956.
- HORST, W.J. The role of the apoplast in aluminum toxicity and resistance of higher plants: a review. **Zeitschrift für Pflanzenernähr**, Bodenk, v.158, p.419-428, 1995.
- HORST, W.J.; PÜSCHEL, A.K.; SCHMOHL, N. Induction of callose formation is a sensitive marker for genotypic aluminium sensitivity in maize. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.192, p.23-30, 1997.
- HORST, W.J.; SCHMOHL, N.; KOLLMEIER, M.; BALUSKA, F.; SIVAGURU, M. Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall – plasma membrane – cytoskeleton continuum? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.215, p.163-174, 1999.

- HUANG, J.W.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. **Planta**, Heidelberg, v.188, p.414-421, 1992.
- JORGE, R.A.; ARRUDA, P. Aluminium- induced organic acids exudation by roots of an aluminium-tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, Oxford, v.45, n.4, p.675-681, 1997.
- JORGE, R.A.; MENOSSI, M.; ARRUDA P. Probing the role of calmodulin in Al toxicity in maize. **Phytochemistry**, Oxford, v.58, p.415-422, 2001.
- KERRIDGE, P.C.; KRONSTAD, W.E. Evidence of genetic resistance to Al Uptake and Distribution in Root Apices of Wheat 693 aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* Vill, Host). **Agronomy Journal**, Madison, v.60, p.710-711, 1968.
- KIDD, P.S.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B., BARCELO, J. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52 p.1339-1352, 2001.
- KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.55, p.459-93, 2004.
- LAGOS, M.B.; FERNANDES, M.I.M.; CAMARGO, C.E.O.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.14, p.1011-1020, 1991.
- LANDER, E.S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M.J.; LINCOLN, S.E.; NEWBURG, L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v.1, p.174-181, 1987.
- LARKIN, P.J. Calmodulin levels are not responsible for aluminium tolerance in wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.14, p.377-385, 1987.
- LARSEN, P.B.; DEGENHARDT, J.; TAI, C.Y.; STENZLER, L.M.; HOWELL, S.H.; KOCHIAN, L.V. Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v.117, p.9-18, 1998.
- LAZOF, D.B.; GOLDSMITH, J.G.; RUFTY, T.W., LINTON, R.W. The early entry of Al into cells of intact soybean roots. A comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging. **Plant Physiology**, Lancaster, v.112, p.1289-1300, 1996.

- LI, X.F.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. Pattern of Aluminum-Induced Secretion of Acids Differs between Rye and Wheat. **Plant Physiology**, Lancaster, v.123, p.1537-1543, 2000.
- LIMA, M.; FURLANI, P.R.; MIRANDA FILHO, J.B. Divergent selection for aluminum tolerance in a maize (*Zea mays* L.) population. **Maydica**, Roma, v.37, p.123-132, 1992.
- LIMA, M.; MIRANDA FILHO, J.B.; FURLANI, P.R. Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. **Brazil Journal of Genetic**, Ribeirão Preto, v.4, p.579-584, 1995.
- LOPES, M.A.; MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A.F.C.; GAMA, E.E.G. Avaliação de populações de milho e seus cruzamentos para tolerância à toxidez de alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.22, n.3, p.257-263, 1987.
- LÓPEZ-BUCIO, J.; NIETO-JACOBO, F.; RAMÍREZ-RODRIGUEZ, V.; HERRERA-ESTRELLA, L. Organic acid metabolism in plants: from adaptative physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soil. **Plant Science**, Limerick, v.160, p.1-13, 2000.
- LUO, M.; DVORAK, J. Molecular mapping of an aluminum tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. **Euphytica**, Wageningen, v.91, p.31-35, 1996.
- MA, J.F.; FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v.97, p.46-51, 2003.
- MA, J.F.; HIRADATE, S. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Planta**, Heidelberg, v.211, p.355-360, 2000b.
- MA, J.F.; HIRADATE, S.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiology**, Lancaster, v.117, p.753-759, 1998.
- MA, J.F.; HIRADATE, S.; NOMOTO, K.; IWASHITA, T.; MATSUMOTO, H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea: Identification of Al form in the leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v.113, p.1033-1039, 1997a.
- MA, J.F.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.6, n.6, p.273-278, 2001.

MA, J.F.; NAGAO, S.; SATO, K.; ITO H., FURUKAWA, J.; TAKEDA, K. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.401, p.1335-1341, 2004.

MA, J.F.; SHEN, R.; ZHAO, Z.; WISSUWA, M.; TAKEUCHI, Y.; EBITANI, T.; YANO, M. Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v.43, p.652-659, 2002.

MA, J.F.; TAKETA, S.; YANG, Z.M. Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. **Plant Physiology**, Lancaster, v.122, p.687-694, 2000a.

MA, J.F.; ZHENG, S.J.; MATSUMOTO, H.; HIRADATE, S. Detoxifying aluminum with buckwheat. **Nature**, London, v.390, p.569-570, 1997b.

MAGALHÃES, J.V.; GARVIN, D.F.; WANG, Y.; SORRELS, M.A.; KLEIN, P.E.; SCHAFFERT, R.E.; LI, L.; KOCHIAN, L.V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics Society of America**, Pittsburgh, v.167, p.1905-1914, 2004.

MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A.F.C. Seleção de milho para tolerância a alumínio. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL, 1992, Belo Horizonte, MG. **Anais: O milho em perspectiva**. México: CIMMYT/UNDP, 1995. p. 369-394.

MAIZE GDB. **[Informações]** Disponível em: <http://www.maizegdb.org/ssr.php>. Acesso em: 01/10/2005 a 01/03/2006.

MAO, C.; YI, K.; YANG, L.; ZHENG, B.; WU, Y.; LIU, F.; WU, P.. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium regulated genes for the metabolism of cell wall components. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.137-143, 2004.

MATSUMOTO, H.; HIRASAWA, E.; MORIMURA, S.; TAKAHASHI, E. Localization of aluminum in tea leaves. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v.17, p.627-631, 1976.

MATSUMOTO, H.; MORIMURA, S. Repressed template activity of chromatin of pea roots treated by aluminum. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v.21, n.6, p. 951-959, 1980.

MAZZOCATO, A.C. **Tolerância ao alumínio em genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 2000. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

MAZZOCATO, A.C.; ROCHA, P.S.G.; SERENO, M.J.C.M.; BOHNEM, H.; GRONGO, V.; BARBOSA NETO, J.F. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.19-24, 2002.

McCANN, M. C. et al. Changes in pectin structure and localization during the growth of unadapted and NaCl-adapted tobacco cells. **Plant Journal**, Oxford, v.5, p.773-785, 1994.

MIFTAHUDIN; SCOLES, G.J.; GUSTAFSON, J.P. AFLP markers tightly linked to the aluminum-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.104, p.626-631, 2002.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Departamento de Plantas de Lavoura Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.187p.

MILLA, M.A.R.; GUSTAFSON, J. P. Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. **Genome**, Ottawa, v.44, p.883-892, 2001.

MINELLA, E.; SORRELLS, M.E. Aluminum tolerance in barley genetic relationships among genotypes of diverse origin. **Crop Science**, Madison, v.32, p.593-98, 1992.

MIRANDA FILHO, J.B.; CHAVEZ, L.J. Analysis of diallel crosses with F2 generations. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.19, n.1, p.127-132, 1996.

MIRANDA, L.T.; FURLANI, P.R.; MIRANDA, L.E.C.; SAWAZAKI, E. Genetics of environmental resistance and super genes: latent aluminum tolerance. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v.58, p.46-48, 1984.

MOON, H.D.; OTTOBONI, L.M.M.; SOUZA, A.P.; SIBOV, S.T.; GASPAR, M.; ARRUDA, P. Somaclonal variation-induced aluminum-sensitive mutant from an aluminum-tolerant maize inbred line. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.16, p. 686-691, 1997.

MORIMURA, S.; MATSUMOTO, H. Effect of aluminum on some properties and template activity of purified pea DNA. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v.9, n.3, p.429-436, 1978.

NASPOLINI FILHO, V.; BAHIA FILHO, A.F.C.; VIANNA, R.T. et al. Comportamento de linhagens e de híbridos simples de milho (*Zea mays* L.) em solos sob vegetação de cerrado. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.33, n.5, p.722-727, 1981.

NGUYEN, B.D.; BRAR, D.S.; BUI, B.C.; NGUYEN, T.V.; PHAM, L.N.; NGUYEN, H.T. Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.106, p.583-593, 2003.

NGUYEN, V.T.; BUROW, M.D.; NGUYEN, H.T.; LE, B.T.; LE, T.D.; PATERSON, A.H. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, p.1002-1010, 2001.

NGUYEN, V.T.; NGUYEN, B.D.; SARKARUNG, S.; MARTINEZ, C.; PATERSON, A.H.; NGUYEN, H.T. Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.267, p.772-780, 2002.

NICHOL, B.E.; OLIVEIRA, L.A. Effects of aluminum on the growth and distribution of calcium in roots of an aluminum-sensitive cultivar of barley (*Hordeum vulgare*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, p.1849-1858, 1995.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F.E.; GUIMARAES, C.T.; MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; CARNEIRO, N.P.; LOPES, M.A.; MORO, J.R. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, Wageningen, v.130, p.223-32, 2003.

NODARI, R.O. **Bases genéticas da herança do caráter tolerância ao crestamento em genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.)**. 1980. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1980.

NODARI, R.O.; CARVALHO, F.I.F.; FEDERIZZI, L.C. Genetic bases of the inheritance of Al-toxicity tolerance in wheat genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.269-280, 1982.

OFEI-MANU, P.; WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; TAWARAYA, K. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokio, v.47, p.359-76, 2001.

PANDEY, S.; CEBALLOS, H.; MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A.F.C.; DUQUE-VARGAS, J.; VISCO, L.E. Genetics of tolerance to soil acidity in tropical maize. **Crop Science**, Madison, v.34, p.1511-1514, 1994.

PANDEY, S.; GARDNER, C.O. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.48, p.1-87, 1992.

PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Heidelberg, v.196, p.788-795, 1995.

PIÑEROS, M.A.; KOCHIAN, L.V. A patchclamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize, identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. **Plant Physiology**, Lancaster, v.125, p.292-305, 2001.

PIÑEROS, M.A.; MAGALHAES, J.V.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v.129, p.1194-1206, 2002.

PIÑEROS, M.A.; SHAFF, J.E.; MANSLANK, H.S.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. **Plant Physiology**, Lancaster, v.137, p.231-241, 2005.

PINTRO, J.; BARLOY, J.; FALLAVIER, P. Aluminium toxicity in corn plants cultivated in a low ionic strength nutrient solution. I. Discrimination of two corn cultivars. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.7, n.2, p. 121-128, 1995.

POLLE, E.; KONZAK, C.F.; KITTRICK, J.A. Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. **Crop Science**, Madison, v.18, p.823-827, 1978.

PRIOLI, S.M.A.P.; SILVA, J.C.; GALVÃO J.D.; MONNERAT, P.H.; PRIOLI, A.J. Seleção da tolerância à toxidez de alumínio em milho (*Zea mays* L.). **Revista Ceres**, Viçosa, v.32, n.183, p.441-451, 1985.

RENGEL, Z. Role of calcium in aluminum toxicity. **The New Phytologist**, Cambridge, v.121, p.499-513, 1992.

RHUE, R.D.; GROGAN, C.O.; STOCKMEYER, E.W.; EVERETT, H.L. Genetic control of aluminum tolerance in corn. **Crop Science**, Madison, v.18, p.1063-1067, 1978.

RICHARDS, K.D.; SNOWDEN, K.C.; GARDNER, R.C. *Wali6* and *Wali7* genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v.105, p.1455-1456, 1994.

RIEDE, C.R.; ANDERSON, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. **Crop Science**, Madison, v.36, p.905-909, 1996.

RINCÓN, M.; GONZALEZ, R.A. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Plant Physiology**, Lancaster, v.99, p.1021-1028, 1992.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52 p.527-560, 2001.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL P.J. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminium are highly correlated in wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.22, p.531-536, 1995b.

- RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, Heidelberg, v.196, p.103-110, 1995a.
- RYAN, P.R.; DITOMASO, J.M.; KOCHIAN, L.V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, p.437-446, 1993.
- RYAN, P.R.; KINRAIDE, T.B.; KOCHIAN, L.V. Al³⁺ -Ca²⁺ interactions in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. **Planta**, Heidelberg, v.192, p.98-103, 1994.
- RYAN, P.R.; REID, R.J.; SMITH, F.A. Direct evaluation of the Ca²⁺ -displacement hypothesis for Al toxicity. **Plant Physiology**, Lancaster, v.113, p.1351-1357, 1997b.
- RYAN, P.R.; SKERRETT, M.; FINDLAY, G.P.; DELHAIZE, E.; TYERMAN S.D. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.94, p.6547-6552, 1997a.
- SALOMON, M.V.; CAMARGO, C.E.O.; FERREIRA FILHO, A.W.P.; PENTTINELLI JÚNIOR, A.; CASTRO, J.P. Desempenho de linhagens diaplóides de trigo obtidas via cultura de anteras quanto à tolerância ao alumínio, produção de grãos e altura de planta. **Bragantia**, Campinas, v.62, n.2, p.189-198, 2003.
- SÁNCHEZ-CHACÓN, C.D.; FEDERIZZI, L.C., MILACH, S.C.K.; PACHECO, M.T. Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.1797-1808, 2000.
- SAS Institute. **The SAS system for windows v.8e**. Cary, NC, 2000.
- SAWAZAKI, E.; FURLANI, P.R. Genética da tolerância ao alumínio em milho cateto. **Bragantia**, Campinas, v.46, p.269-278, 1987.
- SCHÖTTELNDREIER, M.; NORDDALHL, M.M.; STRÖM, L.; FALKENGREN-GRERUP, U. Organic acid exudation by wild herbs in response to elevated Al concentrations. **Annals of Botany**, London, v.87, p.769-775, 2001.
- SHEN, R.; MA, J.F.; KYO, M.; IWASHITA, T. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fogopyrum esculentum* Moench. **Planta**, Heidelberg, v.215, p.394-398, 2002.
- SIBOV, S.T.; GASPAR, M.; SILVA, M.J.; OTTOBONI, L.M.M.; ARRUDA, P.; SOUZA, A.P. Two genes control aluminum tolerance in maize: Genetic and molecular mapping analyses. **Genome**, Ottawa, v.42, p.475-482, 1999.

- SILVA, I.R. SMYTH, T.J.; MOXLEY, D.F.; CARTER, T.E.; ALLEN, N.S.; RUFTY. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, Lancaster, v.123, p.543-552, 2000.
- SIVAGURU, V.M.; HORST, W.J. The distal part of the transition zone is most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v.116, p.155-163, 1998.
- SNOWDEN, K.C.; GARDNER, R.C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v.103, p.855-861, 1993.
- TANG, Y.; SORRELLS, M.E.; KOCHIAN, L.V.; GARVIN, D.F. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. **Crop Science**, Madison, v.40, p.778-782, 2000.
- TAYLOR, G.J. Current views of the aluminum stress response: The physiological basis of tolerance. **Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology**, Rockville, v.10, p.57-93, 2001.
- TAYLOR, G.J. Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.171, p. 89-103, 1995.
- TESFAYE, M.; TEMPLE, S.J.; ALLAN, D.L.; VANCE, C.P.; SAMAC, D.A. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. **Plant Physiology**, Lancaster, v.127, p.1836-1844, 2001.
- TORRES, G.A.; PARENTONI, S.N.; LOPES, M.A.; PAIVA, E. A search for RFLP markers to identify genes for aluminium tolerance in maize. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.20, p.1-2, 1997.
- WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; OBATA, H; TAWARAYA, K.; KATOHDA, S. Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminium in roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.171, p.105-112, 1995.
- WAGNER, C.M.; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Genetic inheritance of aluminum tolerance in oat. **Crop Breeding Applied Biotechnology**, Londrina, v1, p.22-26, 2001.
- WALLACE, S.U.; ANDERSON, I.C. Aluminum toxicity and DNA synthesis in wheat roots. **Agronomy Journal**, Madison, v.76, p.5-8, 1984.
- WENZL, P.; CHAVES, A.L.; PATIÑO, G.M.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. Aluminum stress stimulates the accumulation of organic acids in root apices of *Brachiaria* species. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tokio, v.165, p.582-588, 2002.

WENZL, P.; PATIÑO, G.M.; CHAVES, A.L.; MAYER, J.E.; RAO, I.M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices. **Plant Physiology**, Lancaster, v.125, p.1473-1484, 2001.

WHEELER, D.M.; WILD, D.J.C.; EDMEADES, D.C. Preliminary results from a microscopic examination on the effects of aluminum on the root tips wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.146, p.83-87, 1992.

WIGHT, C.P.; KIBITE, S.; TINKER, N.A.; MOLNAR, S.J. Identification of molecular markers for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, p.222-231, 2006.

WU, P.; LIAO, C.Y.; HU, B.; YI, K.K.; JIN, W.Z.; NI, J.J.; HE, C. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.1295-1303, 2000.

YANG, Z.; SIVARURU, M.; HORST, W.; MATSUMOTO, H. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.110, p.72-77, 2000.

ZHANG, W.; RYAN, P.R.; TYERMAN, S.D. Malate-permeable Channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v.125, p.1459-1472, 2001.

ZHAO, Z.; MA, J.F.; SATO, K.; TAKEDA K. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta**, Heidelberg, v.217, p.794-800, 2003.

ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiology**, Lancaster, v.117, p.745-751, 1998.