

RAMON VINÍCIUS DE ALMEIDA

**PARÂMETROS GENÉTICOS E ALTERAÇÕES NAS FREQUÊNCIAS
ALÉLICAS EM TRÊS CICLOS DE SELEÇÃO DIVERGENTE PARA
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

RAMON VINÍCIUS DE ALMEIDA

**PARÂMETROS GENÉTICOS E ALTERAÇÕES NAS FREQUÊNCIAS
ALÉLICAS EM TRÊS CICLOS DE SELEÇÃO DIVERGENTE PARA
TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de agosto de 2007.

Dr. Jurandir Vieira de Magalhães
(Co-Orientador)

Prof. Cosme Damião Cruz
(Co-Orientador)

Prof. Derval Gomes Pereira

Dra. Maria José B.S. Granate
S.M.Marques

Prof. José Marcelo Soriano Viana
(Orientador)

“Dai-me um ponto de apoio e moverei o mundo.”

Arquímedes

Aos meus pais Iracy e Cely
À minha irmã Isis
À minha namorada Daniella.

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder o dom da vida e inspirar-me em todos instantes.

À Universidade Federal de Viçosa, pela minha formação acadêmica.

À Embrapa Milho e Sorgo, pelo apoio proporcionado para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de pesquisa.

Aos meus orientadores, Prof. José Marcelo Soriano Viana, Dra. Cláudia Teixeira Guimarães e Dr. Jurandir Vieira Magalhães, pela orientação imprescindível na realização deste trabalho, e por todo o apoio e ensinamento que me passaram nestes últimos meses.

Ao Professor Cosme Damião Cruz, pelas importantes sugestões, pelas críticas e pelos ensinamentos.

Aos membros da banca Prof. Derval Gomes Pereira e Dra. Maria José B.S. Granate S.M.M. pelas valiosas sugestões.

Aos pesquisadores Sidney Parentoni e Elto Gama por fornecer o

material genético, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos professores e colegas do curso de pós-graduação em genética, em especial Cândida Manfio, Cássia Predrozo, Helson Mário, Janaina Melo, Maíra Freitas, Mário Oda, Salvador Lima e Samuel Alvarenga.

Aos funcionários do galpão de melhoramento de milho pela amizade e disponibilidade.

Às minhas amigas, Gislene e Francine, pela ajuda imprescindível nos experimentos de fenotipagem.

Aos colegas da Embrapa Milho e Sorgo pelo grande apoio e companheirismo.

Aos meus amigos dos Centros Espíritas Camilo Chaves, em Viçosa, e Silva Jardim, em Sete Lagoas, pelas oportunidades de trabalho e estudo.

Aos amigos, Adelmo, André(s), Andréa, Antônio Carlos, Beth, Carol, Célio, Denise, Diógenes, Edilson, Edmar, Edna, Edmilson, Eliane, Fátima, Felipe, Fernanda, Fernando, Flávio, Gabriel, Gracielle, Ingrid, Isabel, Ivana, Jéssica, Sr. Joaquim, Lauro, Leandro(s), Livia, Maria José, Maíra, Marcelo, Mariana, Marília, Martinelli, Miguel, Nate, Newton, Paulo César, Renata, Rosângela, Rose, Ramon, Raymundo, Ricardo, Sílvia e Ubiraci pela convivência agradável, pelos ensinamentos e pelo auxílio nos experimentos.

Às meninas da república de minha irmã: Josiane, Ana Paula e Vanessa pela amizade e paciência.

Às minhas “famílias adotivas” de Sr. Pedro e Dona Lindaura; e de Edmilson (Juninho) por me apoiarem nesta passagem por Sete Lagoas.

À minha namorada, por toda amizade, pelo companheirismo, pelo apoio, e principalmente por tornar-me uma pessoa melhor.

À minha irmã Isis, por tantos anos de convivência feliz.

Aos meus pais, Iracy e Cely, pelo grande apoio e pelo incentivo na busca de conhecimento e sabedoria.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para uma vitória na minha vida.

BIOGRAFIA

RAMON VINÍCIUS DE ALMEIDA, filho de Iracy de Almeida e Cely Aparecida de Almeida, nasceu em 30 de dezembro de 1981, na cidade de Volta Redonda, Rio de Janeiro.

Morou até os dezenove anos nesta cidade, onde adquiriu o título de Técnico Metalúrgico pela Escola Técnica Padiá Calógeras em dezembro de 1999.

Em agosto de 2000, mudou-se para Lavras, Minas Gerais, onde formou-se Eng^o Agrônomo pela Universidade Federal de Lavras em julho de 2005.

Em agosto de 2005, iniciou no programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa. Cursou as disciplinas em um ano e em seguida desenvolveu a parte prática na Embrapa Milho e Sorgo.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Toxicidade do alumínio	3
2.2. Controle genético da tolerância Al em gramíneas	5
2.3. Avaliação da tolerância ao alumínio em plantas	8
2.4. Marcadores SSR ou microssatélites	9
2.5. Frequências alélicas	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Recurso genético	12
3.2. Avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva	15
3.3. Análise de variância para a tolerância ao alumínio	16
3.4. Estimação das variâncias fenotípica, genotípica e ambiental e da herdabilidade em cada ciclo de seleção	17

3.5. Cálculo dos ganhos por seleção	18
3.6. Genotipagem molecular	18
3.6.1. Extração e quantificação de DNA genômico	18
3.6.2. Marcadores microssatélites	20
3.7. Análises estatísticas dos dados moleculares	21
3.7.1. Estudo das frequências alélicas	21
3.7.2. Deriva genética	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Análises de variância e estimação de parâmetros genéticos	25
4.2. Relação entre a tolerância ao alumínio e o crescimento radicular sem alumínio	28
4.3. Ganhos genéticos preditos e realizados	30
4.4. Estimativas das frequências alélicas e deriva genética	32
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7. APÊNDICE	49

RESUMO

ALMEIDA, Ramon Vinícius de, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2007. **Parâmetros genéticos e alterações nas frequências alélicas em três ciclos de seleção divergente para tolerância ao alumínio em milho.** Orientador: José Marcelo Soriano Viana. Co-orientadores: Cláudia Teixeira Guimarães, Jurandir Vieira de Magalhães e Cosme Damião Cruz.

A toxicidade ao alumínio (Al) é um dos maiores problemas para a agricultura em solos ácidos, que ocupam grandes áreas agricultáveis no mundo. Em condições de baixo pH associado a estes solos, o Al^{3+} é solubilizado e se torna tóxico para as plantas, inibindo o crescimento de suas raízes e comprometendo a produtividade das culturas. Genótipos adaptados aos solos ácidos podem oferecer uma solução sustentável a este problema. Os objetivos deste trabalho foram (1) estimar parâmetros e ganhos genéticos obtidos ao longo de três ciclos de seleção divergente para a tolerância e (2) identificar alterações nas frequências alélicas em cinco locos próximos a um QTL no cromossomo 5 do milho que explica 13% da tolerância ao Al. O índice

fenotípico empregado, foi o Crescimento Líquido Relativo (CLR) obtido a partir do cultivo em solução nutritiva. Marcadores microssatélites (SSR) foram utilizados para detectar desequilíbrio de ligação entre as marcas e o QTL. Ocorreu um ganho genético expressivo da população base à primeira geração de 49,15%, diminuindo drasticamente para os ciclos posteriores. Tal evidência é patente de caráter de herança oligogênica. Variações nas frequências alélicas em 4 locos, na primeira geração, e em todos os locos, na segunda geração, foram explicadas exclusivamente pela deriva genética.

ABSTRACT

ALMEIDA, Ramon Vinícius de, M. Sc. Universidade Federal de Viçosa, August 2007. **Genetic parameters and allelic shifts in three cycles of divergent selection to aluminum tolerance in maize.** Adviser: José Marcelo Soriano Viana. Co-Advisers: Cláudia Teixeira Guimarães, Jurandir Vieira de Magalhães and Cosme Damião Cruz.

Aluminum (Al) toxicity is one of the major constraints for agriculture on acid soils, which occupy large regions of the world's agricultural area. At low pH values associated with these soils Al^{3+} is solubilized into soil solution and is toxic to plants inhibiting root growth and crop yield. Cultivars genetically adapted to acid soils may offer an environmental compatible solution. The aims of this work were (1) to estimate parameters and genetics gains in three cycles of divergent selection to aluminum tolerance and (2) to identify changes in allelic frequencies at five loci near a QTL in chromosome 5 of maize that explain 13% of the Al tolerance. The phenotypic index employed was relative seminal root length (CLR) obtained from nutrient solution. Simple sequence repeats (SSR) were used to detect linkage disequilibrium between marker and QTL. An

expressive genetic gain of 49,15% was observed from base population to first generation. This evidence is characteristic from traits that have oligogenic inheritance. Shifts in allelic frequencies in 4 loci in first generation and in all loci, in second generation were exclusively due to effects of genetic drift.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de grande importância econômica e social no mundo, sendo cultivado para alimentação humana e animal, e mais recentemente, como fonte de biocombustível. A cultura do milho possui lugar de destaque no Brasil, país predominantemente agrícola, uma vez que na safra 2005/2006, aproximadamente 12 milhões de hectares do território brasileiro foram dedicados ao cultivo desta gramínea, produzindo 35 milhões de toneladas de grãos (FAO, 2007).

Em razão da grande área plantada, tornam-se imprescindíveis os estudos a respeito dos fatores bióticos e abióticos que atuam no desenvolvimento da cultura. Dentre esses a toxicidade por alumínio é um dos fatores mais limitantes à produção de alimentos nos solos ácidos (Flaten, 1997), uma vez, que sob condições de baixo pH, o alumínio assume a forma do íon Al^{3+} , passando a ser solúvel e extremamente tóxico às plantas (Kochian e Jones, 1997). A calagem é uma prática agrônômica amplamente adotada para

minimizar esse problema, objetivando o aumento do pH e a conseqüente neutralização do Al^{3+} . No entanto, essa prática não soluciona o problema em camadas subsuperficiais e a calagem em profundidades inferiores a 20 cm apresenta problemas operacionais e econômicos. Assim, uma estratégia eficiente para o aumento da produção agrícola em solos ácidos e com problemas de toxicidade de alumínio é a utilização de cultivares tolerantes (Foy, 1984).

Os conhecimentos sobre os mecanismos de tolerância ao alumínio e o seu controle genético são fundamentais para auxiliar a obtenção de cultivares tolerantes. O melhoramento genético associado ao conhecimento de princípios de nutrição mineral e fisiologia vegetal tem contribuído para a exploração de regiões até então consideradas marginais ao cultivo agrícola (Bohnen, 1995). No entanto, a velocidade e a eficiência com que novas fontes de tolerância são identificadas e incorporadas aos programas de melhoramento é determinante para a manutenção e superação dos patamares atuais de produtividade agrícola nas condições tropicais do Brasil.

A identificação e a piramidação de alelos agronomicamente superiores podem contribuir para a melhoria contínua da adaptabilidade dos cultivares às condições dos solos ácidos, além de ampliar os conhecimentos sobre as bases genéticas da tolerância ao alumínio em milho. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estimar parâmetros genéticos, ganhos de seleção e alterações nas frequências alélicas ao longo de três ciclos de seleção divergente para a tolerância ao alumínio em solução nutritiva a partir de um sintético gerado pelo cruzamento de quatro linhagens de milho com diferentes níveis de tolerância ao alumínio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Toxicidade do alumínio

O Al pode ser encontrado em várias formas iônicas no solo, sendo estas dependentes do pH. Em valores de pH abaixo de 5,0, o Al pode ser encontrado como um complexo octaédrico hexahidratado, $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, que por convenção, é denominado comumente como cátion Al^{3+} . Embora existam as formas parcialmente protonadas $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, a forma Al^{3+} parece ser aquela de maior caráter fitotóxico (Kinraide, 1991), tornando-se grande problema em solos ácidos.

Após poucos minutos de exposição do sistema radicular ao Al, os primeiros efeitos de intoxicação são verificados (Wenzl *et al.*, 2001). A ação do Al no ápice radicular causa inibição do crescimento, podendo resultar em dano físico, dependendo do tipo de cátion, da concentração e do tempo de exposição ao estresse (Ryan *et al.*, 1993; Delhaize *et al.*, 1995; Sivaguru e Horst, 1998; Kollmeir *et al.*, 2001). Em consequência, as raízes pouco desenvolvidas

exploram menor volume de solo, o que limita a absorção de água e nutrientes, aumenta a susceptibilidade à seca e compromete o desenvolvimento da planta (Kochian, 1995).

O alumínio interfere em rotas metabólicas em que Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ são precursores (Rengel, 1996) e desencadeia a formação de formas reativas de oxigênio (Kochian *et al.*, 2004). O Al inibe a divisão celular (Huang *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2000) e induz à deposição de calose nos canais dos plasmodesmas, inibindo mecanicamente o transporte simplástico entre células (Sivaguru e Horst, 1998). O processo de formação de calose se deve aos polications, poliaminas e Al^{3+} , que ao se ligarem às cargas negativas da superfície de membrana, causam um decréscimo na sua fluidez, abrindo os canais de Ca^{2+} (Kauss, 1990). Logo, ocorrerá aumento na concentração de Ca^{2+} citoplasmático, o que pode ativar a síntese de calose.

Sabe-se que o Al se liga aos componentes da parede celular devido à sua alta afinidade por doadores de oxigênio, grupos carboxila e fosfato (Dale e Sutcliffe, 1986). Por este motivo, a parede celular perde sua estrutura, comprometendo a sua expansão.

Há evidências que o Al atravessa a membrana plasmática da raiz, alcançando o citoplasma (Lazof *et al.*, 1994), inibindo grande número de processos metabólicos essenciais regulados por Ca (Martin, 1988). Chegando ao núcleo celular (Matsumoto *et al.*, 1976), o Al pode interagir com os ácidos nucléicos, alterando o DNA e RNA, e, conseqüentemente, comprometendo o processo de mitose. E assim, os efeitos do alumínio na planta são vários, podendo comprometer severamente o desenvolvimento vegetal.

2.2. Controle genético da tolerância Al em gramíneas

O controle genético da tolerância ao Al tem sido bastante estudado em gramíneas, especialmente em membros da tribo Triticeae, representada pelo trigo (*Triticum aestivum* L.), centeio (*Secale cereale* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.). Em alguns cultivares de trigo, muitos genes com efeitos aditivos parecem estar envolvidos (Aniol e Gustafson, 1984; Aniol, 1991), sendo controlada por um único gene em outros cultivares (Aniol e Gustafson, 1984; Fisher e Scott, 1987; Larkin, 1987). Delhaize *et al.* (1993) demonstraram que o loco *Alt1* explicou a maior parte das diferenças na tolerância entre linhagens isogênicas de trigo contrastantes para essa característica, parecendo ser o mesmo loco identificado como *Alt2* por Luo e Dvorak (1996). Riede e Anderson (1996) mapearam o gene *Alt_{BH}*, localizado a 1,1 cM do marcador RFLP bcd1230 no cromossomo 4D, explicando 85% da variação fenotípica para a tolerância ao Al em uma população de RILs (*Recombinant Inbred Lines*) ou linhagens endogâmicas recombinantes, derivadas do cruzamento das linhagens BH1146 e Anahuac. O primeiro gene de tolerância ao Al foi clonado em trigo, o *ALMT1* (*Aluminum-activated Malate Transporter*), que codifica um transportador de malato ativado por Al (Sasaki *et al.*, 2004). Segundo estes autores, o gene *ALMT1* provavelmente corresponde ao loco *Alt1* descrito anteriormente.

Em centeio foram descritos quatro locos relacionados com a tolerância ao Al: *Alt1*, localizado no cromossomo 6RS; *Alt2*, localizado no cromossomo 3RS; *Alt3*, no cromossomo 4RL e *Alt4* no cromossomo 7RS (Aniol e Gustafson, 1984; Gallego *et al.*, 1998a; 1998b; Miftahudin *et al.*, 2002; 2005; Matos *et*

al., 2005).

Quatro QTLs (*Quantitative Trait Loci*) de tolerância ao Al foram descritos em aveia (*Avena strigosa* Schreb.), explicando 55% da variação fenotípica da tolerância (Wight *et al.*, 2006). O QTL de maior efeito, responsável por 39% da variação foi associado ao marcador bcd1250, ligado ao gene de tolerância *Alt_{BH}* de trigo. Assim, é provável que essa região genômica contenha o gene ortólogo ao principal gene de tolerância ao Al encontrado na tribo Triticeae.

A tolerância ao Al em arroz apresenta herança complexa e QTLs associados a essa característica foram mapeados em todos os 12 cromossomos de arroz (Wu *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2001; 2002; 2003). Ao todo foram identificados 40 QTLs em quatro populações diferentes, sendo que alguns QTLs foram consistentemente identificados em mais de uma população (Wu *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2001; 2002; 2003).

Em sorgo (*Sorghum bicolor* L.), a tolerância ao Al é controlada por um gene de efeito maior localizado no cromossomo 3, o gene *Alt_{SB}*, explicando em torno de 80% da variação fenotípica da tolerância (Magalhães *et al.*, 2004), embora haja evidências de outros genes além do *Alt_{SB}* controlando a tolerância ao alumínio em outros genótipos de sorgo (Caniato *et al.*, 2007). Recentemente, o gene *Alt_{SB}* foi clonado, e codifica um transportador responsável pelo efluxo de citrato (Magalhães *et al.*, 2007).

A tolerância ao Al em milho foi descrita como qualitativa (Rhue *et al.*, 1978; Garcia *et al.*, 1979; Miranda *et al.*, 1984). Rhue *et al.* (1978) verificaram herança monogênica após observarem a tendência de segregação 3:1 em uma população F₂ e uma segregação 1:1 em gerações de retrocruzamento (RC). Evidências adicionais encontradas por estes autores sugerem que a tolerância ao Al possa ser causada por uma série alélica (Rhue e Grogan, 1977).

Três linhagens tolerantes e duas sensíveis foram utilizadas para a obtenção de F_1 , F_2 e gerações de retrocruzamento (Garcia *et al.*, 1979). Estes autores avaliaram o crescimento relativo das raízes e concluíram que a herança da tolerância ao Al foi controlada por um gene com dominância completa.

A natureza quantitativa da tolerância ao Al em milho foi relatada por Magnavaca *et al.* (1987a), Sawasaki e Furlani (1987), Duque-Vargas *et al.* (1994), Pandey *et al.* (1994), Borrero *et al.* (1995) e Salazar *et al.* (1997). Magnavaca *et al.* (1987a) avaliaram o crescimento relativo da raiz seminal em seis gerações (P_1 , P_2 , F_1 , F_2 , RC_1 e RC_2) derivadas do cruzamento de entre linhagens tolerantes e sensíveis. Segundo estes autores, os efeitos aditivos dos genes explicaram a maior parte da variação genética e ocorreu uma distribuição contínua na frequência das plantas, dentro da geração F_2 . A variância genética aditiva foi mais relevante para produção em solos ácidos (Napolini-Filho *et al.*, 1981; Pandey *et al.*, 1994), contudo a variância devido aos desvios de dominância também foi importante (Duque-Vargas *et al.*, 1994; Borrero *et al.*, 1995).

Os estudos moleculares iniciais da tolerância ao Al em milho empregaram a análise de *bulks* segregantes ou BSA (*Bulk Segregant Analysis*) (Michelmore *et al.*, 1991), onde Brondani e Paiva (1996) e Torres *et al.* (1997) confirmaram a natureza quantitativa da característica. Sibov *et al.* (1999) identificaram dois locos associados com a característica nos cromossomos 6 e 10 de milho na linhagem Cat-100-6 e Ninamango-Cárdenas *et al.* (2003) mapearam cinco QTL nos cromossomos 2, 6, 8 utilizando uma população F_4 derivada do cruzamento de duas linhagens de milho tropical: Cateto237/67 e L53. Jardim (2007) mapeou seis QTL distribuídos nos cromossomos 3, 5, 6 e 8 do milho utilizando uma população de RILs oriunda do mesmo cruzamento

utilizado por Ninamango-Cárdenas *et al.* (2003).

2.3. Avaliação da tolerância ao alumínio em plantas

Vários métodos foram desenvolvidos para seleção de genótipos tolerantes ao Al. O cultivo em condições de campo é realizado em solos com diferentes níveis de saturação de alumínio, sendo avaliadas as características de interesse agrônômico. Por avaliar de forma indireta a tolerância ao alumínio, esta metodologia não é adequada para estudos básicos de herança, contudo é extremamente importante em programas de melhoramento (Furlani e Clark, 1981).

O cultivo em solução nutritiva tem sido amplamente utilizado em estudos da tolerância ao alumínio devido à facilidade de avaliação e da possibilidade de controlar as demais variáveis, isolando o efeito da toxidez do alumínio (Moore, 1976; Rhue e Grogan, 1977; Magnavaca, 1982; Aniol, 1991; Lima *et al.*, 1992; Minella e Sorrells, 1992). O critério mais utilizado para medir a toxicidade ao Al consiste na avaliação do crescimento líquido relativo da raiz seminal (CLR), que representa o crescimento radicular de plantas tratadas com Al em relação ao seu crescimento na ausência do Al. A quantificação da inibição do crescimento radicular tem sido amplamente utilizada para avaliar a tolerância ao Al em milho (Sibov *et al.*, 1999; Ninamango-Cárdenas *et al.*, 2003; Jardim, 2007), sorgo (Magalhães *et al.*, 2004; Caniato *et al.*, 2007) e arroz (Nguyen *et al.*, 2001; 2002; 2003), bem como em várias outras espécies.

A coloração radicular com hematoxilina é outra metodologia que permite discriminar genótipos tolerantes ao Al de forma não destrutiva (Polle *et al.*, 1978). Com esta técnica é possível selecionar os genótipos precocemente

em relação ao crescimento radicular (Delhaize *et al.*, 1993; Cançado *et al.*, 1999).

2.4. Marcadores SSR ou microsatélites

Com o advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), os marcadores microsatélites, também denominados de seqüência simples repetidas ou SSR (*Single Sequence Repeats*) têm mostrado um grande potencial em estudos genéticos devido ao elevado nível de polimorfismo detectado (Smith *et al.*, 1997), às possibilidades de automatização (Sharon *et al.*, 1997) e por possuírem elevada acurácia e repetibilidade (Heckenberger *et al.*, 2002).

Microsatélites são extensões em tandem de pequenas seqüências repetitivas que variam de um a seis nucleotídeos, comumente repetidas de 10 a 60 vezes (Brown *et al.*, 1996). Os microsatélites são flanqueados por segmentos de DNA únicos e conservados, o que torna possível o desenvolvimento de *primers* que amplifiquem especificamente um único loco microsatélite. O comprimento do fragmento amplificado normalmente se encontra entre 50 e 300 pares de base (Tautz, 1989).

A natureza altamente mutável de locos microsatélites aumenta o número de variantes alélicas em cada loco. A variabilidade de microsatélites provavelmente se origina de *crossing-over* desigual ou deslizamento da enzima DNA polimerase durante a replicação do DNA (Tautz *et al.*, 1986). A variação no comprimento do produto amplificado é função do número de unidades de seqüências repetidas.

2.5. Freqüências alélicas

O conhecimento das freqüências alélicas em uma população permite a identificação de regiões cromossômicas favorecidas pela seleção e o estudo de diversidade dentro e entre populações (Liu, 1998; Lynch e Walsh, 1998). Para comparar genótipos ou populações diferentes, é necessária uma medida quantitativa da variação genética. A variação genética pode ser quantificada utilizando os conceitos de freqüência alélica e de freqüência genotípica. Enquanto as freqüências genotípicas indicam unicamente o modo de organização dos alelos em genótipos, a freqüência alélica é a medida da variação genética dentro de um loco, em termos da proporção de cada alelo em um grupo de indivíduos (Weir, 1996).

A utilização de desvios nas freqüências alélicas para a identificação de genes de interesse baseia-se na identificação do desequilíbrio de ligação entre a marca e o gene. O desequilíbrio de ligação é relativo à ocorrência de gametas com freqüências diferentes daquelas esperadas sob segregação independente, sendo gerado pela deriva genética, migração, seleção, endogamia ou mutação (Hill e Robertson, 1968; Hill, 1975 *in* Liu, 1998). O desequilíbrio de ligação, decorrente da ligação física entre os locos, atinge seu máximo nas populações derivadas de cruzamentos controlados e, como consequência, a capacidade de detectar a ligação também é máxima (Tanksley, 1993). O desequilíbrio de ligação também pode ser detectado em populações de polinização aberta, no entanto, a taxa de desequilíbrio cai rapidamente com o avanço das gerações devido ao acasalamento ao acaso e à recombinação (Lynch e Walsh, 1998).

Vários estudos utilizaram aloenzimas para examinar variações nas frequências alélicas em ciclos de seleção recorrente. Frequências alélicas em locos de isoenzimas foram estudadas em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Delancy e Bliss, 1991) e milho (*Zea mays* L.) (Brown e Allard, 1971; Stuber e Moll, 1972; Stuber *et al.*, 1980). Stuber *et al.* (1980) relataram mudanças nas frequências alélicas em oito locos de isoenzimas em famílias de irmãos completos e em ciclos de seleção recorrente recíproca em duas populações de milho para produção, sugerindo que estes locos estejam relacionados a fatores genéticos responsáveis por esta característica.

Em uma população de linhagens recombinantes de aveia derivada do cruzamento entre Kanota (*Avena hyzantina* L.) e Ogle (*A. sativa* L.) foram identificados alguns QTLs associados a diferentes características agrônômicas (Siripoonwiwat, 1996). Com o objetivo de monitorar as alterações de frequências alélicas durante a seleção recorrente em aveia, De Koeper *et al.* (2001) verificaram variações significativas em oito regiões genômicas, sendo seis ligadas à produção de grãos e uma à altura de planta. Em ambos os trabalhos, foram detectados no cromossomo 6, uma região responsável pela produção de grãos e outras três regiões responsáveis pelo florescimento. Desta forma, validou-se os QTLs detectados na população de linhagens recombinantes por meio de variações alélicas nos ciclos de seleção recorrente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo localizada em Sete Lagoas, Minas Gerais, a 19°28' latitude sul, 44°15' longitude oeste de GrW e altitude de 732 metros.

3.1. Recursos genéticos

Foi utilizado um sintético, denominado de Sintético-Alumínio, derivado do intercruzamento de quatro linhagens de milho: Cateto237/67, SLP181/71, L1154 e L3, sendo que estas linhagens apresentam níveis médios a elevados de tolerância ao AI (Alves *et al.*, 2004). O sintético foi submetido a três ciclos de seleção divergente modificada em solução nutritiva.

As informações, a seguir, sobre as linhagens foram fornecidas por Sidney Parentoni (comunicação pessoal). A linhagem Cateto237/67 foi obtida em 1967 no Instituto de Pesquisa Agrícola do Centro-Oeste (IPEACO), atual

Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas – MG, a partir da população Cateto Água Limpa. Esta linhagem possui elevado nível de tolerância ao Al em solução nutritiva, sendo selecionada como o parental tolerante da população de mapeamento utilizada por Ninamango-Cárdenas *et al.* (2003) e Jardim (2007). No entanto, essa linhagem não apresenta boas características agronômicas.

SLP181/71 também é uma linhagem antiga, desenvolvida no IPEACO em 1971, a partir da população San Luiz de Potosi (SLP) originária do México, apresentando níveis médios de tolerância.

L1154 é uma linhagem obtida da população BR105, que foi produzida pela Embrapa Milho e Sorgo a partir de seleção no germoplasma Suwan 1, originário da Tailândia. Esta é uma linhagem mais moderna, com boas características agronômicas e boa tolerância a Al em solução nutritiva.

A linhagem L3 foi desenvolvida a partir de um sintético eficiente na utilização de fósforo pela Embrapa Milho e Sorgo na segunda metade dos anos 90. Esta linhagem participa de vários híbridos comerciais de milho, apresentando alta capacidade combinatória para produção de grãos e tolerância mediana ao Al em solução.

As variedades de polinização aberta CMS036 e BR106 foram utilizadas como testemunhas tolerante e sensível ao alumínio, respectivamente.

Na Figura 1 está apresentado o esquema de obtenção dos sete ciclos de seleção utilizados no presente trabalho.

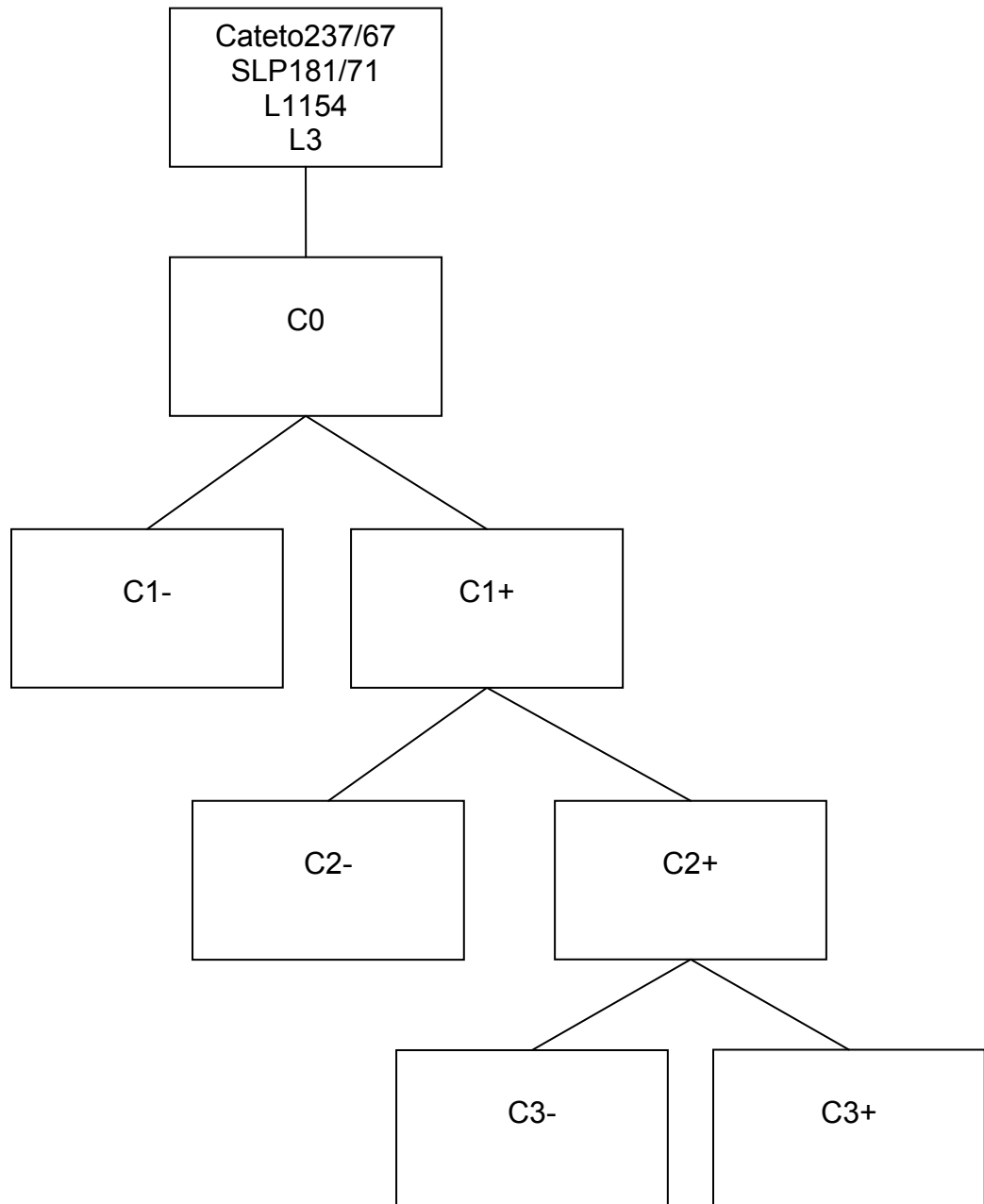


Figura 1 - Ciclos de seleção divergente para a tolerância ao Al a partir do intercruzamento entre as linhagens Cateto 237/67, SLP181/71, L1154 e L3. As siglas C0, C1, C2 e C3 correspondem aos ciclos 0, 1, 2 e 3, respectivamente; o sinal (-) indica que foram selecionados os indivíduos menos tolerantes e o sinal (+) indica que foram selecionados os mais tolerantes. O ciclo zero (C0) do Sintético-Alumínio foi obtido pelo intercruzamento das quatro linhagens no ano de 2003/2004.

No ciclo 0, 294 plântulas foram avaliadas em solução nutritiva contendo 222 μM de alumínio, sob condições controladas em câmara de crescimento. Desse experimento, as 30 plântulas mais tolerantes e as 30 mais sensíveis

foram transplantadas para um canteiro, onde todos os indivíduos dentro de cada um dos grupos foram recombinados por meio de *bulk* de pólen. Assim foram obtidos os ciclos C1+ (tolerante) e C1- (sensível) no ano agrícola 2004/2005. O ciclo C1+ foi selecionado e recombinado da mesma maneira, gerando os ciclos C2+ e C2-, em 2005/2006. No ano agrícola de 2006/2007, a partir da seleção e recombinação de C2+, foram gerados os ciclos C3+ e C3-.

3.2. Avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva

Sementes das linhagens parentais (L1154, L3, SLP181/71 e Cateto237/67), dos ciclos de seleção (C0, C1+, C1-, C2+, C2-, C3+ e C3-) e das testemunhas (CMS036 e BR106) foram germinadas em rolos de papel umedecidos com água deionizada. Após quatro dias de germinação, as plântulas com desenvolvimento uniforme dentro de cada população foram transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC escuras, dentro de bandejas plásticas opacas com capacidade para oito litros e meio de solução nutritiva completa contendo Ca (3527 μM), K (2354 μM), Mg (855 μM), N-NO₃ (10857 μM), NNH₄ (1300 μM), P (45 μM), S (587 μM), B (25 μM), Fe (77 μM), Mn (9,1 μM), Cu (0,63 μM), Mo (0,83 μM), Zn (2,29 μM), Na (1,74 μM), Fe-HEDTA (75 μM), Cl (596 μM), como sugerido por Magnavaca *et al.* (1987a). O pH inicial das soluções foi ajustado para 4,2, não sendo realizados ajustes no decorrer das avaliações. As bandejas foram mantidas em câmara de crescimento com temperatura diurna de 27 \pm 3°C, noturna de 20 \pm 3°C e fotoperíodo de 12 horas, sob aeração contínua.

Após um dia em solução nutritiva completa, mediu-se o Comprimento Inicial da Raiz Seminal (CIRS) de cada plântula. Em seguida, metade

das plântulas foi transferida para bandejas com solução nutritiva contendo 389 μM de Al^{3+} na forma de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$. As demais plântulas foram mantidas em solução completa sem adição de Al, como controle. Decorridos cinco dias, avaliou-se o comprimento final da raiz seminal das plântulas e o Crescimento Líquido da raiz seminal (CL) foi obtido pela diferença entre os comprimentos final e inicial, avaliados sob estresse de Al comprimento líquido com Al, CLcAl) e na condição de controle (comprimento líquido sem Al, CLsAl).

O índice fenotípico utilizado para avaliar a tolerância ao Al em cada ciclo de seleção foi obtido pela divisão da média do CLcAl pela média do CLsAl, sendo denominado Crescimento Líquido Relativo da raiz seminal dos ciclos de seleção (CLRc).

O Crescimento Líquido Relativo da raiz seminal ao nível de planta (CLRp) foi calculado pelo CLcAl/CIRS, conforme definidos como anteriormente.

3.3. Análise de variância para a tolerância ao alumínio

Os tratamentos foram formados pelas quatro linhagens parentais (Cateto237/67, L1154, SLP181/71 e L3), pelas sete populações derivadas dos ciclos de seleção (C0, C1-, C1+, C2-, C2+, C3- e C3+) e pelas duas testemunhas (CMS036 e BR106). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. As parcelas dos ciclos de seleção, das testemunhas e das linhagens parentais foram representadas por 35, 21 e 18 plantas, respectivamente. O CLRc de cada material foi obtido a partir divisão das médias de CLcAL em cada repetição pela média global do crescimento líquido da raiz seminal na condição controle para cada genótipo.

A análise de variância foi realizada pelo programa GENES (Cruz, 2007), segundo o modelo:

$$y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}$$

em que:

y_{ij} : observação do i -ésimo genótipo na repetição j ;

μ : média geral;

g_i : efeito do i -ésimo genótipo ($i = 1, 2, \dots, 13$);

e_{ij} : erro associado à observação y_{ij} .

A pressuposição associada ao modelo é: $e_{ij} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

3.4. Estimação das variâncias fenotípica, genotípica e ambiental e da herdabilidade em cada ciclo de seleção

A variância fenotípica ($\hat{\sigma}_p^2$) em cada ciclo (C0, C1+, C2+ e C3+) foi estimada baseada nos valores de CLR_p dos cento e cinco indivíduos oriundos das três repetições de cada parcela de 35 plantas. A variância ambiental ($\hat{\sigma}_E^2$) em cada ciclo foi calculada com base na média das variâncias fenotípicas das quatro linhagens, considerando-se que não exista variação de natureza genética entre plantas dentro de uma mesma linhagem. A variância genotípica ($\hat{\sigma}_G^2$) foi obtida pela diferença entre a variância fenotípica e a ambiental.

A herdabilidade (h^2) em sentido amplo foi estimada pela expressão:

$$h^2 = \frac{\hat{\sigma}_G^2}{\hat{\sigma}_p^2}$$

3.5. Cálculo dos ganhos por seleção

Neste trabalho utilizou-se uma intensidade seleção de 10%. Os ganhos genéticos preditos (GP) foram calculados pela seguinte expressão:

$$GP = p \cdot DS \cdot h^2$$

em que:

GP: ganho devido à seleção;

p: controle parental ($p=1$; unidade de seleção igual à de recombinação, com seleção antes do florescimento);

DS: diferencial de seleção (obtido a partir da diferença entre a média da população melhorada e a média da original); e

h^2 : herdabilidade em sentido amplo.

Os ganhos genéticos realizados (GR) foram obtidos pela diferença entre as médias dos ciclos.

3.6. Genotipagem molecular

3.6.1. Extração e quantificação de DNA genômico

Para as linhagens parentais, o DNA genômico foi extraído de um conjunto de dez plântulas. A genotipagem dos três ciclos de seleção foi realizada utilizando o DNA extraído individualmente de 48 plântulas de cada um dos ciclos C0, C1+ e C2+, sendo as mesmas plântulas fenotipadas previamente em solução nutritiva.

As amostras foram coletadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a o isolamento de DNA, que foi realizado de acordo com método

descrito por Saghai-Marroof *et al.* (1984). Aproximadamente cinco gramas das folhas congeladas foram maceradas com nitrogênio líquido e transferidas para microtubos de 1500 µL, aos quais foram adicionados 600 µL de tampão CTAB (CTAB 2%; Tris-HCl 0,2 M; NaCl 1,4 M; EDTA 0,02 M; β-Mercaptoetanol 2%). Após leve agitação manual, a mistura foi mantida a 54°C em banho-maria por uma hora, com agitação a cada 10 minutos. Logo após a retirada do banho-maria, os tubos ficaram 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado um volume 600 µL de solução de clorofórmio-octanol (24:1), com homogeneização constante por 10 minutos. O material foi centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para outro microtubo para uma nova lavagem com clorofórmio-octanol (24:1). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foram adicionados 800 µL isopropanol, sendo mantidos a -20°C por uma hora. Após uma centrifugação a 12000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados ao pellet 180 µL de etanol 70%, com posterior centrifugação a 12000 rpm por 2 minutos. Após a retirada do etanol, o pellet foi centrifugado a vácuo durante 3 minutos. O material foi ressuscitado em 80 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0), contendo 1 µL RNase (0,1 mg/mL).

O DNA genômico obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0), com um padrão de concentração conhecida para sua quantificação e avaliação de integridade. Após uma hora de eletroforese a 100 V, o gel foi incubado por 15 minutos em solução de brometo de etídio (1 µg/mL), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene®).

3.6.2. Marcadores microssatélites

As informações sobre os marcadores microssatélites foram obtidas a partir dos dados de mapeamento de QTLs associados com a tolerância ao alumínio em milho obtidos por Jardim (2007).

Para as análises de frequências alélicas, foram utilizados cinco marcadores localizados ao longo do cromossomo 5, onde foi detectado um QTL explicando em torno de 13% da variação fenotípica para a tolerância ao alumínio em uma população de RILs cujo parental tolerante é Cateto 237/67 (Jardim, 2007). Os marcadores selecionados foram phi113, bnlg105, umc1221, umc1537 e umc1792, localizados nos bins 5.00, 5.02, 5.04, 5.07 e 5.08, respectivamente, cujas posições no cromossomo estão apresentadas na Figura 4. As seqüências dos iniciadores estão disponíveis no *Maize Genetics and Genomics Database* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>).

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador modelo 9600 (Applied Biosystems), em um volume final de 10 µL, contendo 30 ng de DNA, 1,0 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,0 mM MgCl₂, 125 µM de cada um dos dNTPs, 0,6 µM de cada um dos *primers* e 1 U de enzima Taq polimerase. Os ciclos de amplificação consistiram de uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por dois minutos; nove ciclos de 94°C por 20 segundos, 68°C por 20 segundos com a redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 20 segundos; seguidos de 25 ciclos de amplificação a 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. Finalmente, a reação foi submetida a um período de extensão a 72°C por cinco minutos.

Os fragmentos amplificados foram diluídos em água de acordo com a intensidade das fluorescências nas proporções de 1:26, 1:10 e 1:10 para

6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarelo), respectivamente. Dessa diluição, 3 µL foram misturados a 0,8 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems®), 0,5µL de corante (BigBlue, Applied Biosystems®) e 0,2 µL do padrão de peso molecular GS-500 ROX (Applied Biosystems®). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo até o momento da aplicação no gel de poliacrilamida 5%. Os alelos amplificados foram submetidos a eletroforese, por um período de duas horas em uma voltagem de 3 kV, no seqüenciador automático ABI377 (Applied Biosystems). Após a eletroforese os fragmentos amplificados foram analisados com os programas GeneScan e GenoTyper (Applied Biosystems®) para a determinação do tamanho dos alelos de cada indivíduo.

3.7. Análises estatísticas dos dados moleculares

3.7.1. Estudos das freqüências alélicas

A freqüência dos alelos em cada loco foi calculada a partir do número de indivíduos observados que apresentam determinado alelo dividido pelo número total de alelos da população que é igual ao número total de indivíduos multiplicado por 2..

Assim, as freqüências alélicas foram obtidas da seguinte forma

$$p = N_{\text{obs}}/N_{\text{Total}}$$

em que

p_i : freqüência alélica do alelo i ;

N_{obs} : número de ocorrência do alelo i na população;

N_{Total} : número total de alelos na população.

3.7.2. Deriva genética

O teste de contingência de qui-quadrado (Gomes, 1981) foi realizado para averiguar a homogeneidade nas frequências alélicas entre os ciclos de seleção. O cálculo do qui-quadrado (χ_c^2) foi feito da seguinte maneira:

$$\chi_c^2 = \sum \frac{(Fo - Fe)^2}{Fe}$$

onde

Fo : Frequência observada e;

Fe : Frequência esperada.

O valor crítico para o qui-quadrado foi obtido segundo a metodologia Waples (1989a) e foi aplicado em cada loco para verificar se as mudanças nas frequências alélicas após um ciclo podem ser exclusivamente atribuídas à deriva genética.

A probabilidade é dada por

$$\Pr \left[\chi^2 \geq \frac{Q_{(k-1)}}{C} \right]$$

sendo $Q_{(k-1)}$ o valor crítico de χ^2 para $K - 1$ graus de liberdade, sendo K o número de alelos em cada loco, e

$$C = \frac{V(x-y)}{BV}$$

Sendo

$$V(x - y) = P(1 - P) \left[\frac{1}{2S_0} + 1 - \left(1 - \frac{1}{2S_t} \right) \left(1 - \frac{1}{2N_e} \right)^t \right];$$

$$BV = P(1 - P) \left(\frac{1}{2S_0} + \frac{1}{2S_t} \right)$$

em que:

x e y : freqüências alélicas nas amostras S_0 e S_t , respectivamente;

t : número de gerações;

BV : denota a variância de (x-y), se é uma amostra binomial;

N_e : tamanho populacional efetivo;

P : probabilidade de se escolher um determinado alelo nos dois eventos amostrais.

O tamanho efetivo populacional foi estimado de acordo com Waples (1989b), baseado no plano II, onde indivíduos são amostrados antes da reprodução e não reamostrados. Considerando S_0 e S_t como as respectivas amostras dos dois eventos amostrais, e F_c a variância das freqüências alélicas, N_e é dado por:

$$N_e = \frac{t}{2 \left[F_c - \left(\frac{1}{2S_0} + \frac{1}{2S_t} \right) \right]}$$

A variância das frequências alélicas para cada loco foi calculada como proposto por Nei e Tajima (1981):

$$F_c = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k \frac{(x_i - y_i)^2}{(x_i + y_i)/2 - x_i y_i}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises de variância e estimação de parâmetros genéticos

O índice CLRc empregado para avaliar a tolerância ao AI foi significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F (Quadro 1), evidenciando a existência de variabilidade genética quanto a tolerância ao AI entre os genótipos, incluindo as linhagens parentais e os ciclos de seleção. Tais resultados sugerem a ocorrência de alterações nas frequências alélicas dos genes que controlam a característica.

Quadro 1 - Análise de variância para o índice crescimento líquido relativo da raiz seminal dos ciclos (CLRc).

FV	GL	QM
Populações	12	0.1774**
Ciclos (C)	6	0.1161**
Linhagens (L)	3	0.2316**
Testemunhas (T)	1	0.0671**
C vs T	1	0.6293**
L vs T	1	0.1864**
Resíduo	26	0.0035
CVe(%)		8.55
CVg(%)		27.07
CVg/Cve		3.17

** significativo a 1% de probabilidade pelo teste de F.

Parentoni *et al.* (2003), avaliando 36 genótipos obtidos a partir um dialelo entre nove linhagens de milho, concluíram que o uso do crescimento radicular em condição controle para a obtenção do índice CLR, aumenta a razão entre os efeitos aditivos e dominantes de 0,50 para 2,67, confirmando que é sempre desejável utilizar o índice CLR para avaliar a tolerância ao Al em solução nutritiva. Os coeficientes de variação experimental (CVe) obtidos no presente experimento foram menores que o coeficiente de variação genético (CVg) e próximos aos relatados por Magnavaca *et al.* (1987b), Prioli (1987), Ninamango-Cárdenas *et al.* (2003) e Jardim (2007).

A razão entre os coeficientes de variação genético e experimental (CVg/CVe) foi maior que 1.0, indicando que os efeitos ambientais foram controlados apropriadamente nos experimentos, o que aumenta a confiabilidade da avaliação fenotípica (Vencovsky, 1987; Cruz, 2004).

Quadro 2 – Médias do índice CLRC dos ciclos de seleção, linhagens parentais e testemunhas.

Genótipos	Médias*
C0	0.3376 fg
C1+	0.7875 abc
C1-	0.6005 de
C2+	0.8923 a
C2-	0.708 bcd
C3+	0.8611 ab
C3-	0.8522 ab
L3	0.3557 fg
L1154	0.6696 cd
SLP181/71	0.3329 fg
Cateto237/67	0.9158 a
CMS036	0.4584 ef
BR106	0.2469 g

* As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Considerando-se a magnitude do CLRC, a linhagem Cateto237/67 foi a mais tolerante ao alumínio, seguida dos ciclos de seleção C2+, C3+, C3- e C1+, contudo não diferem-se estatisticamente(Quadro 2). A linhagem L1154 apresentou níveis intermediários de tolerância, enquanto as linhagens SLP181/71 e L3 juntamente com o C0 e a variedade BR106 (testemunha sensível) foram os genótipos que obtiveram os menores valores de CLR. Todos os ciclos de seleção divergente, exceto o C1-, superaram a tolerância ao alumínio apresentado pela variedade CMS036, considerada tolerante.

Como o objetivo do trabalho foi avaliar os ganhos genéticos advindos da seleção para tolerância ao alumínio ao longo de três ciclos de seleção, a avaliação da característica foi realizada com uma concentração de alumínio quase duas vezes superior (389 μ M) àquela normalmente utilizada para

avaliar a tolerância ao Al em milho.

Tal fato pode justificar, a baixa tolerância apresentada pela variedade CMS036 utilizada como testemunha tolerante ao Al, assim como da linhagem SLP181/71, considerada como tolerante segundo Alves *et al.* (2004). O uso desta elevada concentração de Al é necessária, pois, os ciclos têm como genitores linhagens com níveis de tolerância relevantes, logo a utilização de concentrações de Al ordinárias não discriminaria os materiais adequadamente. Dentro dos ciclos 1 e 2 houve diferença significativa nas médias do CLRc entre os indivíduos mais tolerantes (+) e mais sensíveis (-), o que não ocorreu entre tais indivíduos no ciclo 3 (Quadro 2). A inexistência de diferenças significativas entre as médias de C3+ e C3- pode indicar que houve a fixação dos genes, ou de grande parte deles, responsáveis por este caráter.

4.2. Relação entre a tolerância ao alumínio e o crescimento radicular sem alumínio

A importância relativa da utilização do CLR como índice de seleção para tolerância ao Al está definida na literatura (Magnavaca *et al.*, 1987; Prioli, 1987; Ninamango-Cárdenas *et al.*, 2003; Parentoni *et al.*, 2003; Jardim, 2007). Contudo, o crescimento líquido sem alumínio deve ser considerado em uma análise global. O CLsAl reflete o crescimento da raiz na ausência de níveis tóxicos de alumínio, e um sistema radicular maior sugere que um maior volume de solo será explorado, conferindo à planta maior capacidade para absorção de

nutrientes e água. Tal característica é desejável e deve ser considerada em programas de melhoramento, para a geração de cultivares superiores. Dentro deste contexto, o crescimento radicular (CLsAl) e a tolerância ao alumínio (CLR) foram avaliados conjuntamente, como pode ser visualizado na Figura 2.

Dentre as linhagens fundadoras do Sintético-Alumínio, a Cateto237/67 apresenta maior nível de tolerância ao Al e menor crescimento radicular na ausência de Al. No extremo oposto está a L3 que apresenta maior crescimento radicular, mas menor tolerância ao alumínio tóxico. De forma interessante, todos os ciclos sob seleção apresentaram uma combinação favorável de alelos com relação à tolerância ao Al e ao crescimento radicular, com destaque para os ciclos C2+ e C3+ cuja tolerância se aproximou do parental mais tolerante (Cateto237/67) e o crescimento radicular foi semelhante ao da linhagem L3.

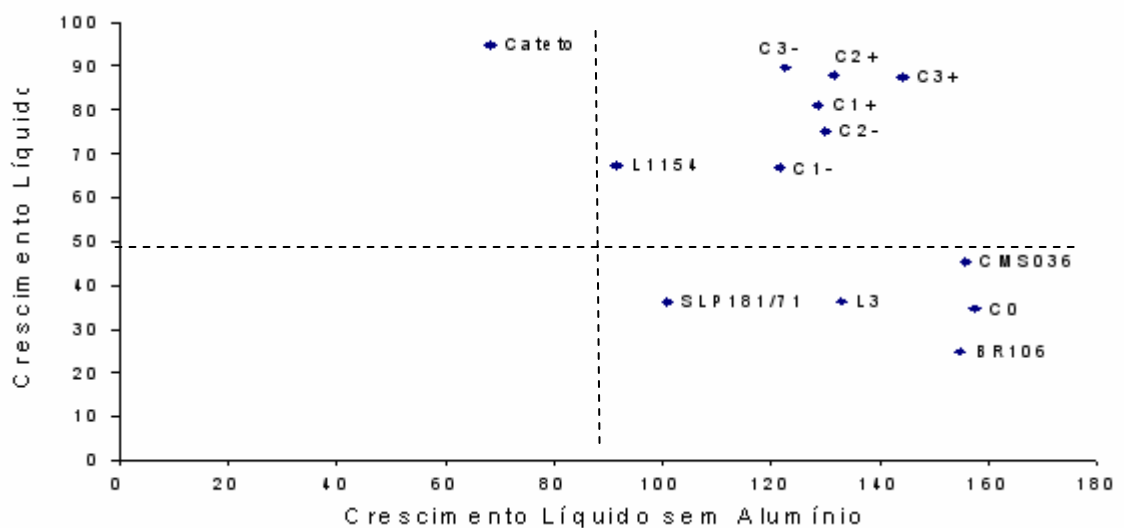


Figura 2 - Relação entre CLR após cinco dias de estresse de alumínio e CLsAl.

Isso sugere que a seleção direta para a tolerância ao Al tenha promovido uma seleção indireta para crescimento radicular na ausência de estresse. Assim, os ciclos de seleção avançados do Sintético-Alumínio (C3+ e C2+) apresentam grande potencial para a extração de linhagens e compostos de interesse para os programas de melhoramento.

4.3. Ganhos genéticos preditos e realizados

Verificou-se que em todos os ciclos ocorreram ganhos genéticos superiores aos preditos (Quadro 3), fato inesperado, pois a variância genotípica possui componentes que não são herdáveis, inflacionando as estimativas de herdabilidade em sentido amplo e de ganho predito. A utilização do índice CLRp pode levar a inferências errôneas quanto à classificação de genótipos para tolerância ao Al (Martins *et al.*, 1999), logo a herdabilidade perde a sua principal função que é de caráter preditivo (Falconer, 1987). Entre os ciclos C0 e C1+, C1+ e C2+, e C2+ e C3+ foram obtidos ganhos reais de 49,15, 6,6 e 8.24%, respectivamente (Figura 3).

Quadro 3 – Estimativas de parâmetros genéticos para o índice crescimento líquido relativo da raiz seminal ao nível de planta (CLRp).

	Ciclos			
	C0	C1+	C2+	C3+
σ_p^2	0.0482	0.0640	0.0631	0.0649
σ_e^2	0.0080	0.0238	0.0229	0.0247
h^2	16.54	37.20	36.27	38.03
\bar{x}	0.4072	0.8987	0.9647	1.0471
\bar{x}_e	0.8616	1.3750	1.4234	1.4020
GP(ac)	0.4072	0.4824	0.6596	0.8260
GR(ac)	0.4072	0.8987	0.9647	1.0471

	Linhagens			
	L1154	Cateto	L3	SLP
σ_p^2	0.0357	0.0754	0.0218	0.0280

* ac = acumulado

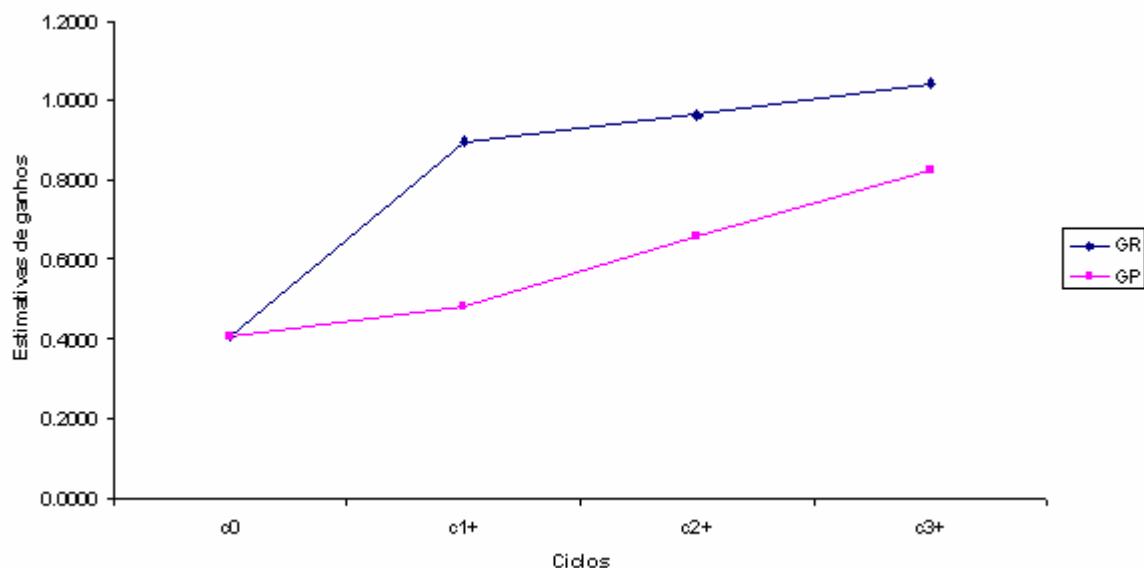


Figura 3 – Comparação entre ganhos reais e preditos para a tolerância ao alumínio com base no CLR.

Estatisticamente, não existiu diferença entre as médias de CLR_p dos ciclos C2+ e C3+, de onde pode ser levantada à hipótese de que grande parte dos alelos favoráveis tenham sido fixados no segundo ciclo de seleção. Tal hipótese corrobora com os dados da literatura que sugerem que a tolerância ao alumínio em milho é controlada por um pequeno número de genes (Prioli, 1987; Torres *et al.*, 1997; Ninamango-Cárdenas *et al.*, 2003; Jardim, 2007).

4.4. Estimativas das freqüências alélicas e deriva genética

Os cinco locos SSR foram avaliados entre as quatro linhagens fundadoras do Sintético-Alumínio e revelaram um total de 15 alelos, cujas freqüências alélicas foram avaliadas ao longo dos ciclos de seleção divergente, C0, C1+ e C2+ (Quadro 4). Uma vez que não foram observados ganhos genéticos significativos após o segundo ciclo de seleção estes não foram avaliados por meio de marcadores moleculares. O teste de neutralidade de Waples foi utilizado para avaliar se as alterações nas freqüências alélicas foram devido aos efeitos de erro de amostragem ou de deriva genética (Waples, 1989a) (Quadro 5).

Quadro 4 – Distribuição das freqüências alélicas ao longo dos ciclos e os respectivos alelos das linhagens.

Locos (bin)	Alelos (pb) e linhagem doadora	Freqüências alélicas		
		C0	C1+	C2+
phi113 (5.00)	119(1154. SLP e CAT)	0.5875	0.7340	0.5833
	128(L3)	0.4125	0.2660	0.4167
	Tamanho da amostra (S)	40	47	48
bnlg105 (5.02)	75(L3)	0.3936	0	0
	81(SLP)	0.1915	0	0
	93(1154)	0.3511	0.6702	0.8830
	99(CAT)	0.0638	0.3298	0.1170
	Tamanho da amostra (S)	47	47	47
umc1221 (5.04)	74(CAT e 1154)	0.1548	0.2292	0.1667
	86(1154)	0.1429	0.3542	0.2917
	89(L3)	0.0238	0.0208	0.0417
	92(SLP)	0.6786	0.3958	0.5000
	Tamanho da amostra (S)	42	48	48
umc1537 (5.07)	92(CAT, SLP, e 1154)	0.3333	0.6563	0.6667
	98(L3)	0.6667	0.3438	0.3333
	Tamanho da amostra (S)	48	48	48
umc1792 (5.08)	121(CAT e SLP)	0.2234	0.2396	0.3750
	124(1154)	0.5957	0.5208	0.4688
	127(L3)	0.1809	0.2396	0.1563
	Tamanho da amostra (S)	47	48	48

Quadro 5 – Teste de neutralidade de Waples para mudanças nas freqüências alélicas ao longo dos ciclos.

		Locos				
		phi113	bnlg105	umc1221	umc1537	Umc1792
C0/C1+	S0	40	47	44	48	47
	St	47	47	48	48	48
	χ^2	0.0479	0.8646**	0.1789	0.2086	0.0138
	gl	1	3	3	1	2
C1+/C2+	S0	47	47	48	48	48
	St	48	47	48	48	48
	χ^2	0.0505	0.1305	0.035	0.0002	0.0501
	gl	1	3	3	1	2

** significativo ao nível de 1% ($p < 0,01$). S0: número de indivíduos amostrados na população de origem. St: número de indivíduos amostrados na população derivada.

Os resultados obtidos pelo teste padrão de contingência de qui-quadrado, determinou que as alterações nas freqüências alélicas, em todos os locos, não foram significativas. Já os resultados obtidos pelo teste de Waples (1989a), determinaram que apenas no loco bnlg105 ocorram alterações significativas nas freqüências alélicas entre os ciclos C0 e C1+ (apêndice). A diferença entre as duas metodologias está no uso de um fator de correção adotado por Waples, sendo este fator dependente do número populacional efetivo (N_e). Como o modelo deste autor considera este parâmetro, as estimativas das probabilidades são mais acuradas, uma vez que a variação relacionada com a deriva genética é retirada do erro.

Com base no teste de Waples, podemos considerar que bnlg105 foi o único loco cujas alterações nas freqüências alélicas foram significativas (Quadro 5). O teste de Waples (1989a) considera em seu modelo apenas que o número efetivo populacional é influenciado por processos estocásticos, tais como erros de amostragem ou deriva genética. Assim, a significância do teste indica que eventos como seleção, mutação ou migração atuaram nas alterações das freqüências alélicas. Como a taxa de mutação é muito baixa e não houve migração, resultados significativos para esse teste sugerem que as alterações nas freqüências alélicas foram devidas à seleção.

Nota-se que as alterações nas freqüências alélicas no loco bnlg105 ocorreram em todos os ciclos de seleção (Quadro 4). Os alelos oriundos das linhagens menos tolerantes, L3 e SLP181/71, foram perdidos ao longo dos ciclos de seleção e os alelos das linhagens L1154 e Cateto237/67 tiveram suas freqüências aumentadas, principalmente após o primeiro ciclo de seleção. O alelo proveniente da linhagem mais tolerante ao Al (Cateto237/67) passou de uma freqüência de 6,38 para 32,98% entre os ciclos C0 e C1+, onde ocorreu o maior ganho genético (45%). No entanto, sua freqüência alélica foi reduzida para 11,7% no ciclo C2+. Já o alelo da L1154 teve um incremento crescente em termos de freqüência ao longo dos ciclos C0, C1+ e C2+, passando de 35,11 para 67,02 e 88,3%, respectivamente. As alterações expressivas nas freqüências de todos os alelos do loco bnlg105 sugerem que os desvios podem ter sido causados pela seleção, indicando a presença de fatores genéticos associados com a tolerância ao alumínio.

Tal resultado é corroborado pela identificação de um QTL explicando próximo a 13% da variância fenotípica para a tolerância ao AI entre os marcadores umc1056 - umc1935, localizado em torno de 16 cM do marcador bnlg105 (Figura 4). O referido QTL foi mapeado em uma população de RILs, cujo parental tolerante foi a linhagem Cateto 237/67 (Jardim, 2007). A grande vantagem da abordagem com base nas frequências alélicas é expandir o horizonte em termos de alelos avaliados, diferentemente do trabalho citado que a única fonte de tolerância foi a linhagem Cateto 237/67. Isto explica o fato de ter ocorrido um aumento na frequência do alelo oriundo da L1154 e não da Cateto 237/67, sugerindo que este alelo seja mais importante para o aumento da expressão fenotípica neste loco.

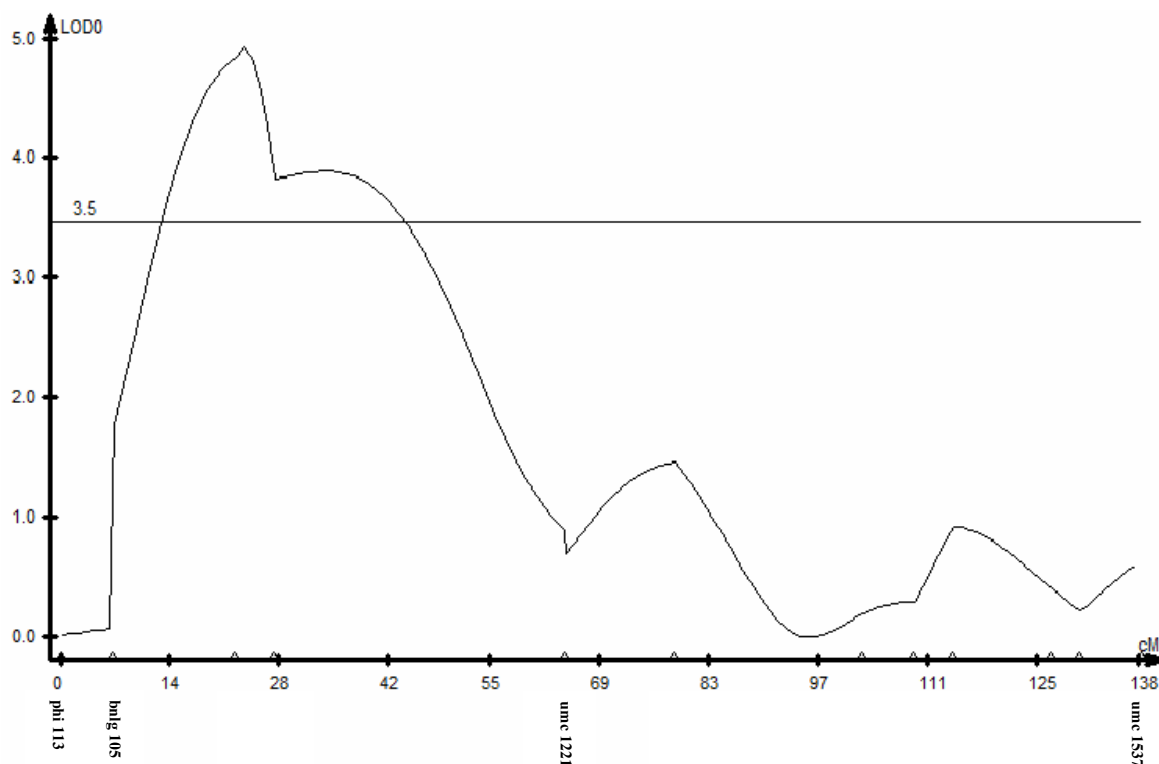


Figura 4 - Mapeamento de QTL por intervalo composto utilizando o programa QTL Cartographer v 2.5 no cromossomo 5 (Adaptado de Jardim, 36

2007). O marcador umc1792 está localizado a 49 cM do umc1537.

Com base nos desvios nas frequências alélicas observadas ao longo das gerações, sugerindo que existe um desequilíbrio de ligação entre o marcador bnlg105 e o QTL. Liu (1998) afirmou que a detecção de marcadores próximos a QTLs aumentam o desequilíbrio de ligação disponível para seleção, sendo que, para ligações muito próximas, a seleção para os alelos marcadores correspondem à seleção para os QTLs. Em espécies alógamas, que é o caso do milho, a tendência é que ao longo dos ciclos de seleção o desequilíbrio de ligação tenda a desaparecer devido à recombinação gênica. Entre os ciclos C0 e C1+ seria esperado um maior desequilíbrio de ligação, indicando que a marca estaria próxima ao QTL.

No loco phi113, a frequência do alelo oriundo das linhagens L1154, SLP181/71 e Cateto237/67 aumentou em 14,65% do C0 para C1+ e reduziu para praticamente a mesma frequência original no ciclo C2+. Uma possível explicação para o fato de as frequências alélicas se alterarem desta forma é que a marca está aproximadamente 27 cM do QTL, sendo uma marca localizada a uma distância considerável do QTL. Portanto, o desequilíbrio de ligação entre a marca e o gene tende a cair mais rapidamente. Nota-se que o loco phi113 não apresentou alterações significativas nas suas frequências alélicas, apesar de estar localizado a apenas 6 cM do bnlg105, sugerindo que essa estratégia possui uma elevada precisão mesmo considerando a análise de um número de indivíduos relativamente reduzido dentro de cada ciclo de seleção. No entanto, mais marcadores precisam ser avaliados dentro do QTL para avaliar como ocorre a queda do desequilíbrio de ligação nessa população e, conseqüentemente, qual a precisão em relação ao mapeamento de QTL.

Nos locos umc1221, umc1537 e umc1792 as alterações nas frequências alélicas, ao longo de todos os ciclos, foram devido a erro de amostragem ou deriva genética, uma vez que não foram significativas pelo teste de Waples. Ressalva-se que o tamanho amostral de 48 indivíduos foi suficiente para detectar alelos em baixas frequências, com o caso do alelo originário da L3 no loco umc1221 que foi em torno de 2% (Quadro 4), indicando que o tamanho amostral utilizado no presente trabalho foi adequado.

Assim, segundo o teste de Waples, as alterações das frequências alélicas nos locos phi113, umc1221, umc1537 e umc1792 foram devidas a erros de amostragem ou deriva genética, o que pode se justificado pela distância em relação à posição do QTL determinado por Jardim (2007). Já loco bnlg105 apresentou variações significativas nas frequências dos seus alelos entre o ciclo C0 e C1+, coincidindo tanto com o ciclo de maior ganho genético quanto com a proximidade do QTL de tolerância ao alumínio identificado por Jardim (2007).

Estudos complementares, tais como saturação de marcadores na região do QTL e estimativa direta do desequilíbrio de ligação, são necessários para averiguar a resolução do uso das alterações nas frequências alélicas para identificar regiões genômicas associadas com caracteres de interesse em comparação com o mapeamento de QTLs utilizando cruzamentos biparentais.

5. CONCLUSÕES

A tolerância ao Al avaliada por meio do CLRc apresentou variabilidade significativa dentro e entre ciclos, sendo maior no primeiro ciclo de seleção. Devido ao elevado ganho genético real obtido no primeiro ciclo de seleção, pode-se inferir que este caráter está sob controle de um número reduzido de genes.

A alteração nas frequências alélicas no loco bnlg105 foi verificada ao longo dos ciclos de seleção, sendo significativa apenas entre C0 e C1+, sugerindo a presença de desequilíbrio ligação entre o marcador e fatores genéticos que controlam a tolerância ao alumínio em milho. Esse resultado corrobora com a presença de um QTL de tolerância ao alumínio a 16 cM do loco bnlg105 e com o fato do maior ganho genético ter ocorrido no primeiro ciclo de seleção. Os desvios nas frequências alélicas dos demais locos foram devidos aos erros de amostragem ou deriva genética.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIOL, A. Genetics of acid tolerant plants. *In*: WRIGHT, R. J. **Plant Soil Interactions at Low pH**. Dordrecht : Kluwer, 1991. p. 1007-1017.

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

ALVES, V. M.; PITTA, G. V. E.; PARENTONI, S. N.; SCAHFFERT, R. E.; COELHO, A. M.; MAGALHÃES, J. V. Toxidez por alumínio e hidrogênio no crescimento de raízes de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 3, n. 2, p. 311-318, 2004.

BOHNEN, H. Acidez e calagem. *In*: GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; TEDESCO, M.J. (Ed.). **Princípios de fertilidade de solo**. Porto Alegre: UFRGS – Departamento de Solos 1995. p. 51-76.

BORRERO, J.; PANDEY, S.; CEBALLOS, H.; MAGNAVACA, R.; BAHIA FILHO, A. F. C. Genetic variances for tolerance to soil acidity in a tropical maize population. **Maydica**, Bergamo, v. 40, p. 283-288, 1995.

BRONDANI, C.; PAIVA, E. RFLP analysis of aluminum tolerance in chromosome 2 in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 575-579, 1996.

BROWN, A. H. D.; ALLARD, R.W. Effect of reciprocal recurrent selection for yield on isozyme polymorphisms in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 111, p. 888–893. 1971.

BROWN, S. M.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; KRESOVICH, S. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. In: JAUHAR, P. P. (Ed.). **Methods of genome analysis in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1996. Cap. 9, p. 147-159.

CANIATO, F. F.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V.; BORÉM, A.; KLEIN, P.E.; MAGALHÃES, J.V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, p. 863-876, 2007.

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. **Programa genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007.

DALE, J. E.; SUTCLIFFE, J. F. **Water relations of plant cells**. In: STEWARD, F. C.; SUTCLIFFE, J. F.; DALE, J.E. (Ed.). *Plant physiology: a treatise*. Water and solutes in plants. New York: Academic Press, 1986. v. 9, p.1-48.

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**, Minneapolis, v. 103, p. 685-693, 1993.

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

DE KOEYER, D. L.; PHILIPS, R. L.; STUTHMAN, D. D. Allelic shifts and quantitative trait loci in a recurrent selection population of oat. **Crop Science**, Madison, v. 41, p. 1228-1234, 2001.

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

FAO **Statistical Database**. Rome, 2002. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>> Acesso em: 23 fev 2007.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, MG: UFV, 1987. 279 p.

FISHER, J. A.; SCOTT, B. J. Response to selection for aluminum tolerance. In: Searle, P. G. E.; DAVEY, B. G. (Ed.). **Priorities in soil/plant relations research for plant production**. Australia: University of Sydney, 1987, p 135-137.

FLATEN, T. P. Status and future concerns of clinical and environmental aluminum toxicology. *In*: YOKEL R. A.; GOLUB, M. S. (Ed.). **Research Issues in Aluminum Toxicity**. Taylor e Francis, 1997, p. 1-15. Washington, DC.

FOY, C. D. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. *In*: ADAMS, F. (Ed.). **Soil acidity and liming**. Madison: ASA-CSSA-SSSA, 1984. p. 57-97. (ASA. Agronomy, 12).

FURLANI, P. R.; CLARCK, R. B. Screening sorghum for aluminum tolerance in nutrient solution. **Agronomy Journal**, Madison, v. 73, p. 587-594. 1981.

GALLEGO, F.J.; CALLES, B.; BENINTO, C. Molecular markers linked to the aluminum tolerance gene Alt1 in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 1104-1109, 1998a.

GALLEGO, F.J.; LÓPEZ-SOLANILLA, E.; FIGUEIRAS, A.M.; BENITO, C. Chromosomal location of PCR fragments as a source of DNA markers linked to aluminum tolerance genes in rye. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 426-434, 1998b.

GARCIA, O.; SILVA, W.J.; MASSEI, M.A.S. An efficient method for screening maize inbreds for aluminum tolerance. **Maydica**, Bergamo, v. 24, n. 2, p. 75-82, 1979.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: Nobel, 1981. 430p.

HECKENBERGER, M.; MELCHINGER, A. E.; ZIEGLE, J. S.; JOE, L. K.; HAUSER, J. D.; HUTTON, M.; BOHN, M. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines with regard to the identification of essentially derived varieties. I. Genetic and technical sources of variation in SSR data. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v, 10, p. 181–191. 2002.

HUANG, J.W.; PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A.; KOCHIAN, L.V. Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and resistant wheat cultivars. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 110, p. 561-569, 1996.

JARDIM, S. N. **Mapeamento comparativo de regiões genômicas de milho (*Zea mays* L.) associadas com a tolerância ao alumínio**. 2007. 70p. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

KINRAIDE, T. B. Identity of the rhizotoxic aluminum species. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 134, p. 167-178, 1991.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 237-260, 1995.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, 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.459-493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; JONES, D. L. Aluminum toxicity and resistance in plants. *In*: R. A.; YOKEL, M. S.; GOLUB, (Ed.). **Research Issues in Al Toxicity**. Washington: Taylor e Francis, 1997. p 69–89.

KAUSS, H. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, Bethesda, v. 38. p. 47-72, 1990.

LARKIN, P.J. Calmodulin levels are not responsible for aluminum tolerance in wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 14, p. 377-85, 1987.

LAZOF, D. B.; GOLDSMITH, J. G.; RUFTY, T. M. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectrometry. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 106, p. 1107-1114, 1994.

LIMA, M.; FURLANI, P. R.; MIRANDA FILHO, J. B. Divergent selection for aluminum tolerance in a maize (*Zea mays* L.) population. **Maydica**, Bergamo, v. 37, p. 123-132, 1992.

LIU, B. H. **Statistical genomics, linkage, mapping and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 611 p.

LUO, M.C.; DVORAK, J. Molecular mapping of an aluminum tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. **Euphytica**, Dordrecht, v. 91, p. 31-35, 1996.

LYNCH, M., WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980 p.

MAGALHÃES, J.V.; GARVIN, D.F.; WANG, Y.; SORRELLS, M.E.; 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**, Austin, v.167, p.1905-1914, 2004.

MAGALHÃES, J.V.; LIU, J.; GUIMARES, C.T.; ALVES, V. M.; LANA, U. G. P.; WANG, Y-H; COELHO, C. M.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; KLEIN, P. E.; KOCHIAN, L. V. Positional cloning and characterization of *Alt_{SB}*: A novel membrane transporter and major aluminum tolerance gene in *Sorghum bicolor*. **Nature Genetics**, v. 39, p. 1156–1161, 2007.

MAGNAVACA, R. **Genetic variability and inheritance of aluminum tolerance in maize**. 1982. (Tese de Doutorado) 135 p. University of Nebraska, Lincoln.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C.; CLARK, R. Evaluation of inbred maize lines for aluminum tolerance in nutrient solution. *In*: GABELMAN, H. L. B. (Ed.). **Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition**. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands. 1987b. p. 255-265.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O.; CLARK, R. B. Inheritance to aluminum tolerance in maize. *In*: GABELMAN, H. L.B. (Ed.). **Genetic Aspects of plant mineral nutrition**. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands. 1987a. p 201-212.

MARTIN, R. B. Bioinorganic chemistry of aluminum. *In*: SIGEL, H.; SIGEL, A. (Ed.). **Metal ions in biological systems**, v.24, **Aluminum and its role in biology**. New York: Marcel Dekker, 1988.

MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. Eficiência de índices fenotípicos de comprimento de raiz seminal na avaliação de plantas individuais de milho quanto à tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 34, n. 10, p. 1897-1904, 1999.

MATOS, M.; CAMACHO, M. V.; PÉREZ-FLORES, V.; PERNAUTE, B.; PINTO-CARNIDE, O.; BENITO, C. A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p. 360-369, 2005.

MATSUMOTO, H., HIRASAWA, F., TORIKAI, H. Localization of absorbed aluminium in pea root and its binding to nucleic acid. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 17, p. 627-631, 1976.

MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of National Academy of Science USA**, Washington, v. 88, p. 9828-9832, 1991.

MIFTAHUDIN; CHIKMAWATI, T.; ROSS, K.; SCOLES, G. J.; GUSTAFSON, J. P. Targeting the aluminum tolerance gene Alt3 region in rye, using rice/rye micro-colinearity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, p. 906–913, 2005.

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.

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, n. 58. p. 46-48, 1984.

MOORE, D. F.; KRONSTAD, W. E.; METZGER, R. J. Screening wheat for aluminum tolerance. *In*: WORKSHOP ON PLANT ADAPTATION TO MINERAL STRESS IN PROBLEM SOILS, 1976, Beltsville. **Proceedings**. Beltsville: USDA-Plant Stress Laboratory, 1976. p. 287-295.

NASPOLINI-FILHO, V.; GAMA, E. E. G.; VIANNA, R. T.; MORO, J. R. General and combining ability for yield in a diallel cross among 18 maize populations (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 4, p. 571-577, 1981.

NEI, M.; TAJIMA, F. Genetic drift and estimation of effective population size. **Genetics**, Maryland, v. 98, p. 625-640, 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 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.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; GUIMARÃES, C. T.; MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; CARNEIRO, N. P.; LOPES, M. A.; MORO, J. R.; PAIVA, E. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, p. 223-232, 2003.

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

PARENTONI, S. N.; ALVES, V. M. C.; OLIVEIRA, A. C.; MAGALHÃES, J. V.; COELHO, A. M.; SHAFFERT, R. E.; GUIMARÃES, C. T.; GAMA, E. E. G.; GODOY, C. L.; SANTOS, M. X.; GUIMARÃES, P. E. O.; PACHECO, C. P.; MEIRELLES, W. F.; RIBEIRO, P. H. E.; PITTA, G. E.; BAHIA FILHO, A. F. C. Genetics of aluminum tolerance in maize evaluated in nutrient solution with and without control experiments. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT BREEDING, 2003, Mexico. **Book of Abstracts**...Mexico: CIMMYT, 2003. p. 60. Editado por A. R. HALLAUER.

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

PRIOLI, A.J. **Análise genética da tolerância à toxidez do alumínio em milho (*Zea mays* L.)**. 1987. 182 p. Tese (Doutorado) – Universidade de Campinas, Campinas.

RENGEL, Z. Uptake of aluminum by plant cells. **New Phytologist**, Oxford, v. 134, p. 389-406, 1996.

RHUE, R. D.; GROGAN, C. O. Screening corn for Al tolerance using different Ca e Mg concentration. **Agronomy Journal**, Madison, v. 69, n. 5, p. 755-760, Sept./Oct. 1977.

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

RIEDE, C. R.; ANDERSON, J. A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 905-1028, 1996.

RYAN, P. R.; DI TOMASO, J. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 44, p. 437-446, 1993.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of National Academy of Science (USA)**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SALAZAR, F.; PANDEY, S.; NARRO, L.; PEREZ, J. C.; CEBALLOS, H.; PARENTONI, S.; BAHIA FILHO, A. F. C Diallel analysis of acid-soil tolerant and intolerant tropical maize populations. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 1457-1462, 1997.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S. H.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 645-653, 2004.

SHARON, E. M.; KRESOVICH, S.; JESTER, C. A.; HERNANDEZ, C. J.; SZEWC-MCFADDEN, A. K. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 617-624, 1997.

SIBOV, S. T.; GASPAR, M.; SILVA, M.J.; OTTOBONI, L.M.M.; ARRUDA, P.; SOUCA, A.P. Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. **Genome**, Ottawa, v. 42, p.1-8, 1999.

SILVA, I. R.; SMYTH, T. J.; MOXLEY, D. F.; CARTER, T. E.; ALLEN, N. S.; RUFTY, T. W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 123, p. 543-552, 2000.

SIRIPOONWIWAT, W.; O'DONOUGHUE, L. S.; WESENBERG, D. HOFFMAN, D.; BARBOSA-NETO, J. F.; SORRELLS, M. E. Chromosomal regions associated with quantitative traits in oat. **Journal of Quantitative Trait Loci**, v. 2, Article 3. 1996. Disponível em: <<http://www.ncgr.org/ag/jag/papers96/paper396/oatqtl3g.html>> Acesso: 17 fev 2001.

SMITH, J. S. C.; CHIN, E. C. L.; SHU, H.; SMITH, O. S.; WALL, S. J.; SENIOR, M. L.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S.; ZIEGLE, J. An evaluation of utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p.163–173, 1997.

STUBER, C. W.; MOLL, R. H. Frequency changes of isozyme alleles in a selection experiment for grain yield in maize (*Zea mays* L.). **Crop Science**, Madison, v. 12, p. 337–340, 1972.

STUBER, C. W.; MOLL, R. H.; GOODMAN, M. M.; SCHAFFER, H. E.; WEIR, B. S. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.) **Genetics**, Maryland, v. 95, p. 225–236, 1980.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 27, p.205-233, 1993.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.17, n.16, p.6463-6471, Aug. 1989.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, London, v. 322, p. 652-656, Aug. 1986.

TORRES, G. A.; PARENTONI, S. N.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. A search for RFLP markers to identify genes for aluminum tolerance in maize. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirao Preto, v. 3, p. 459-465, 1997.

VENCOVSKY, R., Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E.; VIEGAS, G. P. (Ed.). **Melhoramento e produção de milho**. Campinas: Fundação Cargil, 1987 p. 135-2142

WANG, S.; BASTEN, C. J.; ZENG, Z. B. **Windows QTL Cartographer 2.5**. Raleigh: North Carolina State University/Department of Statistics, 2007. Disponível em: < <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm> > Acesso em: 14 Jul 2007.

WAPLES, R. S. Temporal variation in allele frequencies: testing the right hypothesis. **Evolution**, Lancaster, v. 43, p.1236-1251, 1989a.

WAPLES, R. S. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. **Genetics**, Maryland, v. 121, p. 379-391, 1989b.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445 p.

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**, Bethesda, v. 125, p. 1473–1484, 2001.

WIGHT, C. P.; KIBITE, S.; TINKER, N. A.; MOLNAR, S. J. Identification of molecular markers for aluminum tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 222-231, 2006.

WU, P.; LIAO, C. Y.; HU, B.; YI, K. K.; NI, J. J.; HE, C. QTL 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.

7. APÊNDICE

A seguir será apresentado os cálculos dos testes de contingência de qui-quadrado e de Waples (1989a). Tomando como exemplo o loco phi113 e as frequências alélicas no C0 e C1+, tem-se:

Valores Observados

Ciclos	Alelos		Total
	119	128	
C0	0,5875	0,4125	1
C1+	0,734	0,266	1
Total	1,3215	0,6785	2

O cálculo das frequências esperadas é da seguinte maneira:

$$Fe = 1,3215 (1) / 2 = 0,661$$

De forma semelhante as demais frequências são calculadas.

Valores Esperados

Ciclos	Alelos		Total
	119	128	
C0	0,661	0,339	1
C1+	0,661	0,339	1
Total	1,3215	0,6785	2

$$\chi_c^2 = \sum \frac{(Fo - Fe)^2}{Fe} = (0,5875 - 0,661)^2 / 0,661 + \dots + (0,266 - 0,339)^2 / 0,339 = 0,0479$$

Os graus de liberdades para o teste é (C-1)(K-1), sendo C o número de ciclos e K o número de alelos. Neste exemplo tem-se: (2-1)(2-1) = 1. O valor crítico do qui-quadrado com 1 grau de liberdade ao nível de 5% de probabilidade é 3,84. Como o valor de qui-quadrado calculado é menor que o tabelado, pode-se concluir que as variações nas frequências alélicas não são significativas.

Para o teste de Waples tem-se:

$$F_c = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k \frac{(x_i - y_i)^2}{(x_i + y_i)/2 - x_i y_i} = 0,0936$$

$$N_e = \frac{t}{2 \left[F_c - \left(\frac{1}{2S_0} + \frac{1}{2S_t} \right) \right]} = 7,1$$

$$V(x - y) = P(1 - P) \left[\frac{1}{2S_0} + 1 - \left(1 - \frac{1}{2S_t} \right) \left(1 - \frac{1}{2N_e} \right)^t \right] = 0,0928$$

$$BV = P(1 - P) \left(\frac{1}{2S_0} + \frac{1}{2S_t} \right) = 0,0231$$

$$C = \frac{V(x - y)}{BV} = 4,0113$$

$$\Pr \left[\chi^2 \geq \frac{Q_{(k-1)}}{C} \right] = 3,84/4,0113 = 0,9577$$

Como o valor calculado de qui-quadrado (0,0479) é menor que o obtido por Waples (0,9577) diz-se que as alterações nas freqüências alélicas não são significativas.