

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO EM AGRONOMIA

CAROLINE DE JESUS COELHO

TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM MILHO TROPICAL: HERANÇA GENÉTICA,
MAPEAMENTO DE QTLs E EXPRESSÃO GÊNICA

PONTA GROSSA - PR
2015

CAROLINE DE JESUS COELHO

TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM MILHO TROPICAL: HERANÇA GENÉTICA,
MAPEAMENTO DE QTLs E EXPRESSÃO GÊNICA

Tese apresentada para a obtenção do
título de Doutor em Agronomia na
Universidade Estadual de Ponta Grossa,
área de concentração Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Mara Cristina de Almeida

PONTA GROSSA - PR
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Coelho, Caroline de Jesus

C672t Tolerância ao alumínio em milho
tropical: herança genética, mapeamento de
QTLs e expressão gênica/ Caroline de Jesus
Coelho. Ponta Grossa, 2015.
99f.

Dissertação (Doutorado em Agronomia -
Área de Concentração: Agricultura),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues
Matiello.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Mara Cristina
de Almeida.

1.Herança. 2.Capacidade de combinação.
3.Locos de tolerância. 4.Mapeamento
intervalo composto. 5.ZmMATE1. I.Matiello,
Rodrigo Rodrigues. II. Almeida, Mara
Cristina de. III. Universidade Estadual de
Ponta Grossa. Doutorado em Agronomia. IV.
T.

CDD: 631.523



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

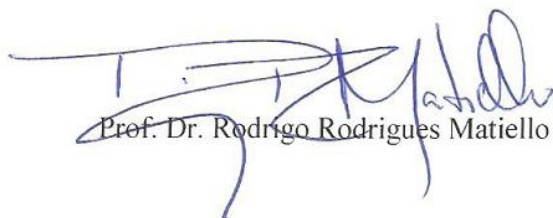
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Tese: “Tolerância ao alumínio em milho tropical: herança genética, mapeamento de QTLs e expressão gênica”.

Nome: Caroline de Jesus Coelho

Orientador: Rodrigo Rodrigues Matiello

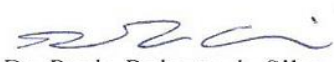
Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello



Prof. Dr. Marcos Ventura Faria



Prof. Dr. Paulo Roberto da Silva



Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires



Prof. Dr. Roberto Ferreira Artioni

Data da Realização: 22 de dezembro de 2015.

Ao meu marido e filhos.
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu Pai querido, pelo amor incondicional, por ser minha fortaleza, por me manter firme na caminhada e por me levar a alcançar sonhos mais altos. Toda honra e toda glória sejam dadas a Ti Senhor.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao curso de pós-graduação em Agronomia e a todas as pessoas sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

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

Ao Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello, pela orientação e dedicação durante toda a realização deste trabalho. Deixo aqui o meu respeito, admiração e gratidão por ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo de todos estes anos de orientação. Obrigada pelo apoio e amizade.

À minha co-orientadora, Prof. Dr^a. Mara Cristina de Almeida, pela ajuda fundamental no decorrer da realização deste trabalho e por todo o tempo dedicado.

Agradeço especialmente ao meu marido, Thiago e meus filhos, Rafael e Gabriel, por toda compreensão, ajuda e amor dispensado. Sem o apoio de vocês eu jamais teria alcançado êxito. Expresso aqui meu grande amor por vocês. Obrigada por tudo.

Aos meus pais, Ivan e Teresinha, pelo amor, apoio e incentivo em todas as fases da minha vida. Agradeço, particularmente, à minha mãe, pelo tempo doado, pela ajuda prestada em vários momentos e pelo grande exemplo que sempre foi para mim.

Aos queridos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Cristiane Romanek, Lilian Schafascheck, Samantha Cenci, Daniele Tasior, Danilo Guimarães, Hellen Prochno, Débora Máximo, Eduardo Oliveira, William dos Anjos, Guilherme de Jong, Rodrigo Hilbert, Vanessa Oliveira, Taís da Silva, Brenda Luiza, Renato Bombardelli, Guilherme Schulze e Thiago Ferreira Portes pela ajuda fundamental na realização deste trabalho, pela amizade e companheirismo.

A todos os funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, principalmente à Zima Richter e Luciane Hennemberg, pela indispensável ajuda durante a realização deste trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Se podes?”, disse Jesus. “Tudo é possível àquele que crê”

Marcos 9. 23

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram determinar a herança genética, mapear os QTLs de tolerância ao Al e quantificar a expressão gênica diferencial de genes de tolerância ao Al em milho de origem tropical. Para determinar o controle genético da tolerância ao Al foram avaliados cruzamentos dialélicos entre genótipos contrastantes dentro do germoplasma de milho híbrido e dentro do germoplasma de milho crioulo. As gerações filiais dos cruzamentos dialélicos e os respectivos parentais dos cruzamentos foram avaliados quanto à tolerância ao Al através da metodologia de solução mínima. Os dados do DIF (diferença de crescimento radicular) foram submetidos à análise dialélica pelo modelo de Griffing (1956) método 2 (parentais, híbridos e recíprocos). Posteriormente, foi determinada a herança da tolerância a partir da análise de médias de gerações segregantes. Os genótipos de milho crioulo demonstraram média geral de DIF superior ao germoplasma híbrido, confirmando a maior tolerância neste grupo. Os cruzamentos dialélicos que envolveram a variedade crioula V 06 destacaram-se pela alta capacidade específica e geral de combinação para a tolerância ao Al. Os resultados da análise de média de gerações indicaram, para o conjunto de famílias estudadas, herança quantitativa da tolerância ao Al, com predomínio da variância genética explicada pelos efeitos aditivos. A herdabilidade no sentido restrito foi de magnitude intermediária, indicando a possibilidade de ganhos genéticos com a seleção artificial de genótipos tolerantes ao Al na geração F₂. O mapeamento de QTLs foi realizado com base na análise fenotípica de 114 progênies F_{2:3}, avaliadas em solução mínima na presença de 4 mgL⁻¹ de Al. Os locos microssatélites e AFLPs polimórficos entre as linhagens parentais da população de mapeamento foram utilizados para a construção do mapa de ligação com o auxílio do programa MAPMAKER versão 3.0 e a detecção dos QTLs realizada pelo mapeamento por intervalo composto. Foram mapeados nove QTLs de tolerância em oito grupos de ligação (cromossomos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), os quais explicaram 70,3% da variação fenotípica em tolerância ao Al. Os resultados confirmaram os três principais QTLs (bins 6.00, 8.05 e 10.01) descritos na literatura para a tolerância ao Al, os quais foram responsáveis pela maior parte da variação fenotípica (40,3%). O elevado número de QTLs mapeados na população segregante F_{2:3} confirma a herança quantitativa da tolerância ao Al neste germoplasma de milho tropical. O *screening* molecular dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* nos germoplasmas de milho híbrido e de variedades crioulas não evidenciou associação dos fragmentos amplificados com os índices de tolerância ao Al. Para os estudos de expressão gênica, os genótipos tolerantes (H 44 e V 18) e os sensíveis (H 22 e V 25) foram submetidos à solução mínima por diferentes períodos de exposição (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h). Após a extração de RNA total de cada um dos genótipos e a síntese dos cDNAs de cada amostra foram realizados ensaios de qRT-PCR para quantificar a expressão dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1*. Os resultados demonstraram a maior expressão diferencial da variedade crioula tolerante V 18 para o gene *ZmMATE1*, indicando que, possivelmente, a exsudação de citrato deva ser o principal mecanismo de tolerância ao Al neste genótipo. Os resultados também evidenciaram a possibilidade de outro tipo de mecanismo de tolerância ao Al para o híbrido tolerante H 44, pois apresentou expressão diferencial apenas para o gene *ZmNrat1* na fase inicial da exposição (1 a 3 h). Os mesmos genótipos utilizados na quantificação da expressão gênica foram avaliados para a coloração diferencial de raízes com hematoxilina. Os genótipos foram submetidos à solução mínima com Al por períodos de exposição de 6, 12, 24 e 48 h, avaliando-se a coloração diferencial das raízes nos respectivos períodos. Não foi possível observar coloração diferencial com hematoxilina entre genótipos de milho tolerantes e sensíveis ao Al.

Palavras-chave: Herança. Capacidade de combinação. Locos de tolerância. Mapeamento intervalo composto. *ZmMATE1*. *ZmMATE2*. *ZmNrat1*.

ABSTRACT

The objectives of this work were to determine the genetic inheritance, map QTL Al tolerance and quantify the differential gene expression of Al tolerance genes in tropical origin maize. To determine the genetic control of Al tolerance were evaluated diallel crosses between contrasting genotypes in the hybrid maize germplasm and maize landrace germplasm. Affiliates generations of diallel crosses and parental of respective crosses were evaluated for Al tolerance through minimal solution methodology. The DIF data (root growth difference) were analyzed by diallel Griffing model (1956) Method 2 (parental, hybrid and reciprocal). Later was determined the tolerance inheritance from average analysis of segregating generations. The landrace genotypes showed overall higher DIF average to hybrid germplasm, confirming the greater tolerance in this group. The diallel crosses involving the V 06 landrace stood out by the high specific and general combining ability for Al tolerance. The results of the generation average analysis indicated, for all families studied, quantitative inheritance of Al tolerance with predominance of genetic variance explained by additive effects. The heritability in the narrow sense was of intermediate magnitude, indicating the possibility of genetic gains to artificial selection of Al tolerant genotypes in F₂ generation. The QTL mapping was performed based on phenotypic analysis of 114 F_{2:3} progenies, evaluated at minimum solution in presence of 4 mg L⁻¹ Al. Microsatellite and AFLPs polymorphic loci between the parental lines of the mapping population were used for construction of the linkage map with the help of MAPMAKER program version 3.0 and QTL detection performed by the composite interval mapping. Nine tolerance QTLs were mapped in eight linkage groups (chromosomes 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10), which explained 70.3% of phenotypic variation in Al tolerance. The results confirmed the three major QTL (bins 6.00, 8.05 and 10.01) described in the literature for Al tolerance, which were responsible for the most of phenotypic variation (40.3%). The high number of mapped QTLs in F_{2:3} segregating population confirms the quantitative inheritance of Al tolerance in the tropical maize germplasm. The molecular screening of *ZmMATE1* and *ZmMATE2* genes in hybrid and landraces maize germplasm showed no association of the amplified fragments with Al tolerance index. For studies of gene expression, the tolerant (H 44 and V 18) and sensitive genotypes (V H 22 and 25) were subjected to minimal solution for different exposure periods (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h). After total RNA extraction from each genotype and the synthesis of cDNAs from each sample, were performed qRT-PCR assays to quantitate the expression of *ZmMATE1*, *ZmMATE2* and *ZmNrat1* genes. The results showed the highest differential expression of tolerant landrace V 18 for *ZmMATE1* gene, indicating that, possibly, the exudation of citrate should be the main mechanism of Al tolerance in this genotype. The results also demonstrated the possibility of another type Al tolerance mechanism for the tolerant hybrid H 44, since showed differential expression only for *ZmNrat1* gene in initial phase of exposure (1 to 3 h). The same genotypes used in the gene expression quantification were evaluated for roots differential staining with hematoxylin. The genotypes were submitted to minimal solution with Al for 6, 12, 24 and 48 h exposure times, evaluating the differential staining of roots in the respective periods. It was not possible to observe differential staining with hematoxylin among maize tolerant and sensitive genotypes to Al.

Keywords: Inheritance. Combining ability. Tolerance Loci. Composite interval mapping. *ZmMATE1*. *ZmMATE2*. *ZmNrat1*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição de frequência (%) dos indivíduos da geração F_2 em cada classe de DIF (diferença de crescimento radicular) nas famílias segregantes: (A) L_T 99-4 x L_S 04-2, (B) L_T 03-2 x L_S 95-1, (C) L_T 99-4 x L_S 23-1, (D) L_T 118-8 x L_S 71-1 e (E) L_T 118-8 x L_S 95-1. L_T = linhagem de milho tolerante, L_S = linhagem de milho sensível, F_1 = geração filial (L_T x L_S). Ponta Grossa, 2015. 37
- Figura 2 - Distribuição das progênies $F_{2:3}$ de milho do cruzamento L_T 99-4 x L_S 04-2 nas classes de DIF (diferença de crescimento radicular. L_T = parental tolerante, L_S = parental sensível e F_1 = geração F_1 . Ponta Grossa, 2015..... 53
- Figura 3- Mapa genético gerado pelos marcadores SSRs e AFLPs em uma população de mapeamento de milho. À direita estão os locos marcadores (SSR e/ou AFLP) e a esquerda as distâncias em cM segundo a função de mapeamento de Haldane. Os pontos vermelhos indicam as posições de QTLs de tolerância ao Al. Ponta Grossa, 2015. 55
- Figura 4- Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QTLs de tolerância ao Al em milho. No eixo das abscissas é representado o grupo de ligação (cromossomos) e no eixo das ordenadas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2015. 57
- Figura 5– Agrupamento em função dos valores de ITR (Índice de Tolerância Relativa) e dos fragmentos amplificados para o primer ZmMATE1. (A) germoplasma de milho híbrido e (B) germoplasma de variedades crioulas de milho mais os tratamentos controles tolerante e sensível (H 44 e H 22, respectivamente) 73
- Figura 6– Agrupamento em função dos valores de ITR (Índice de Tolerância Relativa) e dos fragmentos amplificados para o primer ZmMATE2. (A) germoplasma de híbridos de milho e (B) germoplasma de variedades crioulas milho mais os tratamentos controles tolerante e sensível (H 44 e H 22, respectivamente)..... 75
- Figura 7 – Ideograma dos cromossomos 5 e 6, indicando as regiões onde as sequências obtidas para cada genótipo de milho (H 22, H 44, V 18 e V 25) estão mais fortemente ligadas. (A) Sequência obtida com o primer ZmMATE2. (B) Sequência obtida para o primer ZmMATE1. 77
- Figura 8– Expressão relativa dos genes ZmMATE1 (A), ZmMATE2 (B) e ZmNrat1 (C), nos híbridos (H 22 e H 44) e nas variedades crioulas de milho (V 18 e V 25), em função dos períodos de exposição ao Al (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h). Ponta Grossa, 2015. 79
- Figura 9– Valores médios de DIF (diferença de crescimento radicular) para os genótipos de milho H 22, H 44, V 18 e V 25, em função dos períodos de exposição ao Al (6, 12, 24 e 48 h). Ponta Grossa, 2015. 80
- Figura 10– Visualização da coloração com hematoxilina para os híbridos de milho (H 22 e H 44) após 6, 12, 24 e 48 h de exposição a 4 mg L^{-1} de Al (A, B, C, D, respectivamente) e na ausência de Al (E); e para as variedades crioulas (V 18 e V 25) após 6, 12, 24 e 48 h de exposição a 4 mg L^{-1} de Al (F, G, H, I, respectivamente) e na ausência de Al (J)..... 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação das variedades crioulas e híbridos de milho, com o respectivo índice de tolerância relativa ao alumínio (ITRAI) e a classificação para à tolerância ao Al.	27
Tabela 2- Resumo da análise de variância para a variável DIF (diferença de crescimento radicular de plântulas de milho) em função dos tratamentos (genitores, cruzamentos e da interação genitores vs cruzamentos). Ponta Grossa, 2015.	30
Tabela 3- Valores médios de DIF (diferença de crescimento radicular) para os genitores (5 híbridos e 5 variedades crioulas de milho) e os respectivos cruzamentos dialélicos. Ponta Grossa, 2015.	31
Tabela 4 - Quadrados médios da análise de variância dialélica (GRIFFING, 1956) para DIF (diferença de crescimento radicular) dos tratamentos relativos ao germoplasma híbrido e de variedades crioulas de milho. Ponta Grossa, 2015.	32
Tabela 5- Estimativas dos efeitos da capacidade geral de combinação (CGC) para o DIF (diferença de crescimento radicular) dos 5 genitores (híbridos e variedades crioulas de milho). Ponta Grossa, 2015.	32
Tabela 6- Estimativas dos efeitos da capacidade específica de combinação (CEC) do DIF (diferença de crescimento radicular) para os genitores e cruzamentos do 1º e 2º experimentos (híbridos e variedades de milho, respectivamente). Ponta Grossa, 2015. ...	33
Tabela 7- Valores médios da variável DIF (diferença de crescimento radicular) das 17 linhagens endogâmicas de milho e dos híbridos controles (H 44 – tolerante e H 22 – sensível). Ponta Grossa, 2015.	34
Tabela 8- Resumo da análise de variância para a variável DIF em função das famílias, gerações e de gerações dentro de famílias. Ponta Grossa, 2015.	35
Tabela 9- Efeito do desdobramento das gerações (L_T , L_S , F_1 , F_2 , RC_1 e RC_2) e estimativas dos parâmetros genéticos herdabilidade no sentido restrito h^2 , heterose % H e número de genes nas respectivas famílias para a variável DIF (diferença de crescimento radicular de plântulas de milho) e percentagem da variação do DIF explicada pelos efeitos aditivos a, dominante d e das interações epistáticas aa, ad, dd para cada família. Ponta Grossa, 2015.	36
Tabela 10- Resumo da análise de variância de DIF (diferença de crescimento radicular) em função dos parentais (L_T 99-4 x L_S 04-2), geração F_1 e progênes $F_{2:3}$ de milho e parâmetros genéticos associados à variável. Ponta Grossa, 2015.	52
Tabela 11- Distribuição dos locos microsatélites polimórficos e monomórficos entre as linhagens parentais L_{99-4} e L_{04-2} , nos grupos de ligação do mapa consenso de milho. Ponta Grossa, 2015.	53

Tabela 12 - Número total de fragmentos amplificados (monomórfico e polimórfico) e porcentagem de polimorfismo para 12 combinações de primers EcoRI + MseI genotipadas na população de mapeamento de milho. Ponta Grossa, 2015.	54
Tabela 13- Resultados da análise de ligação dos marcadores SSRs e AFLPs na construção do mapa genético da população F _{2:3} de milho. Número de marcas agrupadas, ordenadas, comprimento dos grupos de ligação (cM) e distância média entre marcas (DM). Ponta Grossa, 2015.	54
Tabela 14- LOD score, posição (cM), proporção da variação fenotípica (R ²), estimativa dos efeitos aditivos (a) e de dominância (d) explicados pelos QTLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto em uma população de 114 progêies F _{2:3} de milho. Ponta Grossa, 2015.	56
Tabela 15– Descrição dos genes de referência utilizados nos experimentos de expressão gênica.	71
Tabela 16– Valores médios do índice de tolerância relativa (ITR) ao Al e tamanho de fragmento amplificado (FA) para os respectivos grupos formados da análise de agrupamento, para o germoplasma híbrido e de variedades crioulas de milho. Ponta Grossa, 2015.	74
Tabela 17– Resultados da análise de homologia de sequências estudadas em quatro genótipos de milho com as sequências nucleotídicas depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI). Ponta Grossa, 2015.....	76
Tabela 18– Estabilidade de expressão dos genes de referência calculado pelo NormFinder, GeNorm e BestKeeper.	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 HIPÓTESES	12
3 OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4.1 Mecanismos de tolerância ao alumínio	14
4.2 Metodologias de avaliação da tolerância ao alumínio em solução	15
4.3 Genética da tolerância	16
4.4 Marcadores moleculares e o mapeamento genético	18
4.4.1 Marcador microssatélite (SSR).....	18
4.4.2 Marcador AFLP	19
4.4.3 Mapeamento genético utilizando marcadores moleculares	20
4.5 Expressão gênica diferencial	20
5 CAPÍTULOS	23
CAPÍTULO 1 - CONTROLE GENÉTICO DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM GERMOPLASMA DE MILHO TROPICAL	23
CAPÍTULO 2 - MAPEAMENTO DE QTLs DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM MILHO TROPICAL	45
CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AO AL EM GENÓTIPOS DE MILHO TROPICAL CONTRASTANTES POR MEIO DE ESTUDOS DA EXPRESSÃO GÊNICA, SEQUENCIAMENTO E COLORAÇÃO DIFERENCIAL 65	
6 CONCLUSÕES	87
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE	98

1 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que restringem o crescimento de plantas em solos ácidos, verifica-se que a toxidez por alumínio (Al) é um dos mais limitantes. É estimado que em mais de 50% do território brasileiro os solos sejam ácidos (OLMOS; CAMARGO, 1976). O milho é uma das culturas agrícolas mais afetadas pelo efeito tóxico do Al, sendo verificadas reduções na produtividade em níveis superiores a 80%. Contudo, a utilização de genótipos tolerantes ao Al, tem sido a melhor estratégia para o cultivo deste cereal em solos com alta saturação por Al.

O conhecimento e o entendimento da herança da tolerância ao Al são de extrema importância para o desenvolvimento de procedimentos mais adequados para a seleção de genótipos com maior tolerância. No Brasil, os estudos de tolerância ao Al iniciaram-se com a cultura do trigo, na qual em princípio, atribuiu-se a algumas cultivares herança complexa para o caráter. Após estudos envolvendo determinadas cultivares, além de outras espécies pertencentes à tribo *Triticeae* (centeio e cevada) verificou-se herança simples envolvendo 1 ou 2 genes (NODARI et al., 1982; LAGOS et al., 1991). Em contrapartida, em milho, a tolerância ao Al é um fenômeno complexo que envolve múltiplos genes e provavelmente inúmeros mecanismos fisiológicos estão envolvidos para a expressão da tolerância.

A partir de 2004, novas investigações sobre a base molecular da tolerância ao Al em plantas motivaram a publicação de estudos envolvendo as proteínas MATE (Multidrug and Toxic Compounds Extrusion), como determinantes da tolerância ao Al em plantas. Os genes *ZmMATE1* (homólogo do gene *SbMATE* em sorgo) e *ZmMATE2*, representam fortes candidatos na tolerância ao Al em milho (MARON et al., 2010). Estudos realizados em arroz demonstraram que o gene *Nrat1*, que codifica um transportador de Al (Nramp), está altamente correlacionado com a tolerância ao Al nesta cultura (SIMÕES et al., 2012). Recentemente, foi identificado um homólogo do gene *Nrat1* em linhagens de milho (*ZmNrat1*). Estes resultados encorajam maiores investigações do envolvimento do gene *ZmNrat1* na tolerância ao Al em milho (GUIMARÃES et al., 2014). O aprofundamento de linhas investigativas sobre os genes das famílias MATE e Nramp pode ser considerado uma estratégia molecular bastante interessante, pois através do relacionamento entre a estrutura destes genes e sua função poderá ser elucidada a tolerância ao Al em plantas.

2 HIPÓTESES

As diferenças no crescimento radicular observadas na avaliação fenotípica da tolerância ao Al em germoplasmas de milho híbrido e de variedades crioulas está associada à diferentes genes como, por exemplo, *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1*.

As diferenças entre os germoplasmas de milho (híbridos e variedades crioulas) estão relacionadas à distintas regiões genômicas (QTLs) associadas à tolerância ao Al nestes genótipos.

Os genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1* são diferentemente expressos em genótipos de milho tropical com diferentes níveis de tolerância ao Al.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a genética da tolerância ao Al em germoplasma de milho tropical.

3.2 Objetivos específicos

Determinar a ação gênica principal, o número de genes, as interações alélicas envolvidas, a capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação para a tolerância ao Al em milho tropical.

Estimar a herança genética da tolerância ao Al a partir da análise de médias de gerações de famílias obtidas do cruzamento entre linhagens endogâmicas contrastantes para tolerância ao Al.

Mapear as regiões genômicas associadas à QTLs de tolerância ao Al em milho tropical e quantificar o efeito destas regiões na variação fenotípica da tolerância.

Avaliar a homologia das sequências dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* nos germoplasmas de milho crioulo e híbrido contrastantes para a tolerância ao Al com àquelas depositadas nos bancos internacionais de sequências.

Quantificar a expressão diferencial dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1* em germoplasmas de milho crioulo e híbrido submetidos ao estresse por alumínio em solução mínima.

Caracterizar a tolerância ao Al através da coloração com hematoxilina em germoplasmas de milho crioulo e híbrido submetidos ao estresse por alumínio (Al) em solução mínima.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A toxicidade de alumínio (Al) tem sido investigada por mais de 90 anos. O Brasil foi um dos pioneiros neste trabalho. No início do século XX, iniciou no país um programa de seleção de tolerância ao Al em trigo, mesmo antes de se identificar uma relação entre causa e efeito da sintomatologia observada em genótipos de trigo cultivados em solos com alta acidez e elevada saturação por Al (PARENTONI et al., 2001). Apesar dos grandes avanços tecnológicos e a possibilidade de análises em nível celular, ainda não se tem o total entendimento dos mecanismos fisiológicos e genéticos envolvidos na fitotoxidez por Al.

4.1 Mecanismos de tolerância ao alumínio

A tolerância é uma característica específica que confere vantagem a um genótipo na presença do estresse, podendo atuar em diversos níveis: celular, de tecido, da planta e da interação da planta com o solo. No caso do Al é compreendido que a tolerância deve ser mediada a nível celular. De maneira geral, os mecanismos de tolerância ao Al em plantas são divididos em mecanismos de exclusão ou apoplásticos e em mecanismos simplásticos ou de desintoxicação interna (PARENTONI et al., 2001).

Os mecanismos conhecidos de exclusão do Al incluem a ligação do elemento na parede das células, modificação do pH na rizosfera e exsudação de compostos orgânicos. Por outro lado, na desintoxicação interna pode ocorrer a fixação do Al na parede celular, seguido da complexação no simplasma via ligantes orgânicos e sequestro deste elemento para os vacúolos (KOCHIAN et al., 2004).

A exclusão do Al via exsudação de ácidos orgânicos das células da raiz é o mais comum, melhor documentado e mais difundido mecanismo de tolerância, principalmente nas espécies cultivadas de importância econômica (DELHAIZE; RYAN, 1995; RYAN et al., 2001; RYAN et al., 2009; HORST et al., 2010). Ácidos orgânicos como o malato, o citrato e o oxalato são compostos de baixo peso molecular que formam quelatos com o Al na rizosfera, liberando complexos estáveis e atóxicos (MARON et al., 2010).

Baseado nas propriedades físico-químicas, o citrato³⁻ (ácido tricarboxílico) quelata o Al mais eficientemente que o ânion dicarboxílico malato²⁻, tornando mais efetiva a detoxificação do Al. Vários estudos têm classificado a exsudação de citrato ativada pelo Al como o principal mecanismo de exclusão do Al em milho (PELLET et al., 1995). Com a técnica de patch-clamp

ficou bem determinado que o Al induz a liberação de malato em genótipos tolerantes de trigo (ZHANG et al., 2001) e de citrato em milho, sendo mediado por canais de ânions na membrana plasmática na presença do Al (PIÑEROS; KOCHIAN, 2001). Os resultados observados na literatura indicam que a frequência e a magnitude com que o Al induz os ânions são maiores em genótipos tolerantes do que nos sensíveis.

Piñeros et al. (2005) sugeriram que, embora a exsudação de citrato desempenhe maior papel na tolerância ao Al em milho, outros mecanismos não envolvidos com a exsudação de ácidos orgânicos também poderiam estar agindo no sistema radicular desta espécie. Estas informações vêm ao encontro com a afirmativa de que no milho estão presentes no mínimo, dois padrões de resposta ao mecanismo de exclusão, mostrando a complexidade envolvida na tolerância ao Al nesta espécie (MA et al., 2001).

4.2 Metodologias de avaliação da tolerância ao alumínio em solução

Diferentes métodos de seleção têm sido utilizados para a avaliação de plantas tolerantes ao Al: em campo, em casa de vegetação e em solução nutritiva. Porém, devido às limitações da seleção em campo ou em casa de vegetação, a maioria dos trabalhos que visam a seleção de genótipos tolerantes ao Al são conduzidos utilizando metodologias que envolvam solução nutritiva (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001).

Alguns autores têm proposto a utilização de solução mínima para a caracterização de genótipos (MAZZOCATO et al., 2002; CONCEIÇÃO et al., 2009; COELHO et al., 2015). Neste tipo de solução estão presentes apenas concentrações de Al^{3+} e Ca^{2+} . Além da economia com relação à quantidade de nutrientes utilizados e facilidade na utilização, verifica-se eficiência na detecção de tolerância ao Al com esse método. Apesar de não existirem estudos de comparação entre os dois tipos de solução, tem sido demonstrada a possibilidade de caracterizar genótipos através da solução mínima. Além da facilidade na condução e avaliação de grande número de genótipos, este tipo de metodologia evita a interferência de fatores não controláveis presentes nos solos e na solução nutritiva.

Nesta metodologia, as características avaliadas são o crescimento e/ou a massa seca radicular. Um dos principais efeitos tóxicos do Al nas raízes é a inibição do crescimento radicular, limitando não somente a divisão celular como também o alongamento das células (CAMBRAIA et al., 1991). Outro parâmetro utilizado frequentemente na avaliação é o recrescimento da raiz após a exposição ao Al. Em alguns genótipos sensíveis, a raiz principal

não cresce, tornando-se engrossada no ápice. Assim, é possível avaliar o recrescimento radicular após o dano causado pelo elemento (ECHART; CAVALLI-MOLINA, 2001).

Várias metodologias têm sido desenvolvidas para caracterizar a tolerância ao Al em espécies agrícolas. Polle et al. (1978) adaptaram a metodologia da coloração de raízes com hematoxilina para o *screening* de genótipos de trigo tolerantes ao Al. Através de estudos histológicos e análises das raízes foi possível compreender que alguns genótipos possuem a capacidade de acumular menos Al nas raízes, apresentando maior tolerância ao elemento. Hoffer e Carr (1923) demonstraram ser perceptível visualmente a coloração de tecidos de plantas após fervê-los em uma solução saturada de carbonato de amônio contendo hematoxilina. Utilizando o mesmo procedimento, McLean e Gilbert (1927) observaram diferenças entre genótipos tolerantes e sensíveis ao Al pela intensidade de coloração visualizada no córtex da raiz. A coloração baseia-se na propriedade da hematoxilina apresentar coloração violeta, quando complexada com Al, permitindo detectar o acúmulo do elemento nos tecidos da raiz.

Diversas culturas como cana-de-açúcar, arroz e milho têm sido submetidas a avaliações da tolerância ao Al através da coloração de raízes com hematoxilina, demonstrando resultados satisfatórios na diferenciação de genótipos tolerantes ao elemento (CONCEIÇÃO, 2006; RIBEIRO, 2011; OLIVEIRA, 2012). Por outro lado, Braccini et al. (2000), verificaram que a utilização da coloração com hematoxilina isoladamente não foi adequada para a seleção de genótipos de café tolerantes ao Al, pois o resultado obtido variou conforme o mecanismo de tolerância envolvido. De modo semelhante, Massot et al. (1991), estudando a tolerância ao Al em feijão, não verificaram correlação positiva entre menor intensidade de coloração das raízes e maior comprimento radicular (característica de genótipos tolerantes ao Al). Em alguns casos, genótipos que acumulam o Al, porém, com capacidade para detoxificá-lo após a absorção, podem ser considerados sensíveis pelo teste de coloração. Neste sentido, a metodologia de coloração de raízes em estresse por Al com hematoxilina para o *screening* de genótipos deve ser utilizada com cautela, associada a outras metodologias de avaliação da tolerância ao Al.

4.3 Genética da tolerância

O conhecimento e o entendimento da herança da tolerância ao Al em plantas são de extrema importância para o desenvolvimento de procedimentos mais adequados para a seleção de genótipos com maior tolerância (CONCEIÇÃO, 2006). Devido ao grande número de rotas bioquímicas envolvidas na tolerância a estresses, é esperado que diferentes genes possam estar envolvidos na tolerância a diferentes níveis de estresse (PARENTONI et al., 2001).

A partir de 2004, pesquisas envolvendo as proteínas MATE (*Multidrug and Toxic Compounds Extrusion*) foram determinantes no maior entendimento da tolerância ao Al em plantas. As proteínas MATE possuem aproximadamente 400-700 resíduos de aminoácidos e uma característica típica desta família é a presença de 12 hélices transmembrana (OMOTE et al., 2006). Em adição, longas caudas N-terminal e C-terminal expostas no citoplasma sugerem a possibilidade de interações com outras proteínas (MORIYAMA et al., 2008).

Em sorgo, o gene que determina o loco de maior tolerância ao Al, *Alt_{SB}*, é membro da família MATE (*SbMATE*) (MAGALHÃES et al., 2007). Em cevada, outra proteína MATE, *HvAACT1* tem sido estudada e caracterizada. Quando esta proteína é ativada pelo Al induz o transporte de citrato que confere tolerância ao elemento (FURUKAWA et al., 2007).

Maron et al. (2010) identificaram e caracterizaram dois membros da família MATE, *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, como genes maiores de tolerância ao Al em milho. O *ZmMATE1* foi localizado na região telomérica do cromossomo 6. O efeito deste gene explicou 16,2% da variação fenotípica pela presença do *ZmMATE1* no mapa de ligação. Já o *ZmMATE2* foi mapeado entre os marcadores microssatélites Bnlgl105 e Umc1056, localizados no cromossomo 5, explicando 16% da variação fenotípica para a tolerância ao Al. A adição dos dois genes ao mapa de ligação aumentou a variância fenotípica de 50 para 67%, indicando a importância relativa destes genes para a base genética da tolerância ao Al nesta população.

O *ZmMATE1* é um homólogo funcional do gene de tolerância ao Al em sorgo, *SbMATE*. Similarmente ao *SbMATE*, a expressão do gene *ZmMATE1* em plantas transgênicas de *Arabidopsis* confere um aumento significativo na tolerância ao Al e na exsudação de citrato pelas raízes. A expressão do *ZmMATE1* é concentrada nos tecidos da raiz sendo consideravelmente maior em genótipos tolerantes, assim como acontece com o *SbMATE*. Entretanto, a exsudação de citrato somente é ativada após a exposição das raízes ao Al (MARON et al., 2010).

A caracterização do *ZmMATE2* demonstrou que este gene é diferente do *ZmMATE1* e de outros MATE's envolvidos na tolerância ao Al em vários aspectos. O *ZmMATE2* não compartilha da mesma identidade na sequência dos aminoácidos com os MATE's, indicados para o transporte de citrato (MARON et al., 2010). Possivelmente, o *ZmMATE2* pode estar envolvido com um mecanismo diferente de tolerância. Até hoje não se conhece outra rota além da exsudação de citrato em milho. As raízes de milho também podem exsudar malato e fosfato, que possivelmente quelam o Al, porém a taxa de exsudação não parece responder a exposição ao Al (PIÑEROS et al., 2002).

A partir da combinação da análise de ligação e o mapeamento associativo, Krill et al. (2010) selecionaram quatro candidatos possivelmente associados com a tolerância ao Al em milho. Os genes *ZmASL* (*Zea mays AltSB like*), *ZmALMT2* (*Zea mays aluminum-activated malate transporter2*), *SAHH* (*S-adenosyl-L-homocysteinase*) e *ME* (*Malic Enzyme*) explicaram de 13 a 20% da variação fenotípica do crescimento radicular líquido, demonstrando que estes são excelentes candidatos para estudos futuros sobre a tolerância Al em milho.

Estudos recentes indicam que o transportador de Al (*Nrat1*) da família Nrap (*natural resistance-associated macrophage protein*) está associado à tolerância ao Al em arroz. As proteínas Nrap são conservadas em diferentes espécies e estão envolvidas no transporte de íons bivalentes (COURVILLE et al., 2006; XIA et al., 2010). O *Nrat1* está localizado na membrana plasmática das células do ápice radicular, demonstrando atividade de transporte para o Al, porém o mesmo não ocorre para outros metais bivalentes ou para o Al complexado pelo citrato. A expressão do *Nrat1* é induzida pelo Al especificamente nas raízes, ocorrendo em todas as células radiculares, exceto para as da epiderme. Em linhagens onde o gene foi nocauteado verificou-se grande sensibilidade ao Al, acúmulo de Al na parede celular e baixa concentração de Al nas células radiculares na presença do elemento na forma trivalente (Al^{3+}). Estes resultados sugerem que o *Nrat1* controla a absorção intracelular de Al^{3+} , com subsequente detoxificação via transporte e acúmulo de Al nos vacúolos celulares (HUANG et al., 2012).

Guimarães et al. (2014) identificaram o gene *ZmNrat1* que codifica uma proteína que compartilha uma grande sequência de aminoácidos similar ao identificado para o transportador de Al em arroz (*Nrat1*). Neste estudo, verificou-se que o Al foi regulado primeiramente no ápice radicular, com padrão de expressão similar ao arroz. Entretanto, a principal diferença observada entre linhagens de milho contrastantes para a tolerância ao Al esteve na maior expressão do gene *ZmNrat1* nos estágios iniciais da exposição ao elemento no genótipo tolerante (1 h de exposição) enquanto no genótipo sensível a maior expressão foi observada após 3 h de exposição.

4.4 Marcadores moleculares e o mapeamento genético

4.4.1 Marcador microssatélite (SSR)

Marcador microssatélite, também denominado de SSR (*Simple Sequence Repeats*), foi descrito inicialmente em humanos por Litt e Luty (1989). Em plantas, estão amplamente distribuídos nos cromossomos, com frequência média de um a cada 50 mil pares de base. Consistem em sequências curtas de nucleotídeos, geralmente de 2-10 pb, repetidas em tandem

e flanqueadas por sequências únicas não repetidas, sendo o elemento repetido mais comum o di-nucleotídeo AT (MORGANTE; OLIVIERI, 1993). Ocorrem de maneira relativamente dispersa nos cromossomos de milho, expressão codominante e apresentam um satisfatório grau de polimorfismo (CHIN et al., 1996). A grande vantagem deste marcador é que ele pode ser visualizado em géis de agarose e poliacrilamida após sua amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase) usando iniciadores (*primers*) de sequências específicas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). Além disso, apresentam localização definida nos grupos de ligação do mapa consenso de milho que, por sua vez, possuem correspondência conhecida com os cromossomos. Atualmente, mais de 2000 *primers* SSRs de milho estão disponíveis (www.agron.missouri.edu). Os microssatélites têm sido identificados em um grande número de espécies vegetais, sendo indicados como uma das melhores opções para o mapeamento molecular de genes de interesse agrônomo (MILACH, 1998).

4.4.2 Marcador AFLP

O marcador AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) permite obter um grande número de fragmentos amplificados (locos marcadores) a partir de uma única reação de PCR (VOS et al., 1995). Esta tecnologia combina a especificidade, a resolução e o poder de amostragem da digestão com enzimas de restrição com rapidez e praticidade de detecção de polimorfismos via reação de PCR (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995). O AFLP gera um elevado número de fragmentos por gel, permitindo rápida saturação de mapas de ligação (CASTIGLIONI et al., 1999). Constitui, assim, poderosa ferramenta para o mapeamento de genes que controlam características de importância agrônoma em plantas (VAN DER VOORT et al., 1999; XU et al., 1999). Porém, estes fragmentos amplificados não possuem uma localização prévia no genoma em estudo.

A análise molecular com este tipo de marcador envolve a digestão do DNA genômico com combinações de enzimas de restrição de corte raro (reconhecem sítios de 6-8 bases, ex.: *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*) e corte frequente (reconhecem sítios de 4 bases, ex. *MseI* e *TaqI*), as quais geram fragmentos com extremidades denominadas protuberantes ou coesivas. A estas são ligados adaptadores específicos e, uma vez que as sequências dos adaptadores e dos sítios de restrição são conhecidas, iniciadores (*primers*) específicos complementares a essas sequências são utilizados para amplificação dos fragmentos de restrição. Este procedimento é realizado em duas etapas, sendo que na primeira, denominada pré-seletiva, um subconjunto de fragmentos é amplificado com *primers* apresentando um nucleotídeo seletivo na extremidade 3'.

Posteriormente, é feita uma seleção mais intensiva dos fragmentos pré-amplificados, sendo adicionados mais dois nucleotídeos seletivos na extremidade 3' dos iniciadores. A resolução dos fragmentos amplificados é realizada em gel de poliacrilamida (VOS et al., 1995) e a visualização dos fragmentos através da coloração com nitrato de prata (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

4.4.3 Mapeamento genético utilizando marcadores moleculares

O mapeamento genético via marcadores moleculares requer uma seleção prévia de locos polimórficos entre os genitores de uma população segregante e posterior análise da segregação na população. A estratégia de associar marcadores microssatélites como “âncoras” nos grupos de ligação permite a localização cromossômica dos fragmentos AFLPs (VUYLSTEKE et al., 1999; AJMONE-MARSAN et al., 2001).

O princípio básico que fundamenta o mapeamento de QTLs é a existência de desequilíbrio de ligação decorrente da baixa frequência de recombinação entre locos proximamente ligados. Várias metodologias podem ser utilizadas como: a análise de agrupamentos segregantes (BSA; MICHELMORE et al., 1991), análise de marcas simples (Single Point Analysis; EDWARDS et al., 1987), mapeamento por intervalo (Interval Mapping; LANDER; BOTSTEIN, 1989), mapeamento por intervalo composto (Composite Interval Mapping; ZENG, 1993; JANSEN, 1993; ZENG, 1994; JANSEN; STAM, 1994) e o mapeamento por intervalo múltiplo (Multiple Interval Mapping; KEARSEY; HYNE, 1994; HYNE; KEARSEY, 1995; WU; LI, 1994; WU; LI, 1996).

A metodologia de mapeamento por intervalo composto foi desenvolvida com o intuito de eliminar a interferência de QTLs adjacentes ao intervalo e com isto aumentar a eficiência na detecção de QTLs. O método agrega, num único modelo, a análise de regressão linear múltipla e o mapeamento por intervalo (JANSEN, 1993; ZENG, 1994). Individualmente, a análise de regressão múltipla não é a melhor metodologia, pois o coeficiente de regressão parcial é uma estimativa enviesada do efeito do QTL (ZENG, 1993). A base do método consiste em testar um determinado intervalo para um QTL sem que ocorra a interferência de outro QTL localizado em regiões adjacentes ao teste (ZENG, 1994).

4.5 Expressão gênica diferencial

O estudo da expressão dos genes responsáveis pela tolerância ao Al é de extrema importância, e abordagens genômicas podem contribuir consideravelmente para compreender

os mecanismos envolvidos na tolerância. Tecnologias de análise de expressão gênica diferencial são muito importantes em estudos de comparação de processos biológicos. Uma tecnologia bastante aplicada é a PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction), técnica que permite uma análise precisa da expressão de genes em diferentes tecidos ou sujeitos a diferentes condições de estresses. A quantificação da expressão dos genes por qRT-PCR é muito sensível e reprodutível, apresentando grande especificidade na análise de transcritos (QUEIROZ, 2010).

O princípio da técnica é o mesmo de uma PCR tradicional, ou seja, tem como base o processo de transcrição reversa (RT) seguida da reação em cadeia da DNA polimerase. A diferença consiste na inclusão de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas ou não a nucleotídeos, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação (em tempo real). Os produtos formados são monitorados a cada ciclo de reação, o que permite uma detecção rápida e específica dos produtos de amplificação (GACHON et al., 2004).

Recentemente, para padronizar os experimentos de qPCR, foram divulgadas orientações estabelecendo informações mínimas para a publicação de resultados envolvendo a expressão gênica diferencial (BUSTIN et al., 2009). No entanto, cuidados devem ser tomados ao realizar RT-qPCR, pois, inúmeros problemas críticos podem surgir ao longo de todo o fluxo de trabalho, os quais influenciam a exatidão dos resultados e a confiabilidade das conclusões (BUSTIN; NOLAN, 2004). Por exemplo, a qualidade e a quantidade de material inicial, as variações na eficiência do RT e a ocorrência de erros técnicos durante a instalação da PCR podem afetar drasticamente a validação dos resultados da RT-qPCR (VANDESOMPELE et al., 2002; UDVARDI et al., 2008). Além disso, a utilização de uma estratégia de normalização adequada é um dos pontos mais críticos para a acurácia das medidas de expressão gênica (GUÉNIN et al., 2009).

Para a normalização, são necessários genes que apresentem transcritos com expressão uniforme na maioria das células do organismo, em diferentes fases de desenvolvimento, submetidos a estresses bióticos/abióticos ou ainda entre diferentes espécies sujeitas a estudos de expressão gênica. Esses genes constitutivos podem ser chamados de genes de referência ou normalizadores, ou seja, genes responsáveis por funções essenciais para a manutenção da estrutura ou do funcionamento celular (metabolismo primário). No entanto, vários estudos utilizam genes de referência sem a prévia validação da estabilidade da expressão, o que pode conduzir a interpretações errôneas dos resultados obtidos (CZECHOWSKI et al., 2005). Adicionalmente, deve ser considerado que o uso de apenas um único controle interno não é tão

satisfatório e a normalização com múltiplos genes de referência é altamente desejável nestes experimentos (THELLIN et al., 1999; VANDESOMPELE et al., 2002; REMANS et al., 2008).

Manoli et al. (2011) avaliaram 20 candidatos a genes de referência num conjunto de 20 amostras de milho oriundas de diferentes condições experimentais. Foram analisados diferentes tecidos, estádios de desenvolvimento e a exposição a diferentes tipos de estresses (ausência de N, alta temperatura, cultivo no escuro e ciclo dia/noite de 6h/18h). Os autores verificaram que a expressão de genes frequentemente utilizados na literatura especializada como genes de referência (*ACT*, *TUB* e *18S* rRNA) foi significativamente menos constante sob as condições analisadas quando comparada com a estabilidade de expressão de alguns genes novos (*CUL*, *FPGS*, *LUG*, *MEP* e *UBCP*). Através de três algoritmos e das análises dos experimentos, os autores demonstraram que a utilização de dois destes genes (*LUG* e *MEP*) foi suficiente para a normalização precisa dos experimentos de expressão gênica.

5 CAPÍTULOS

CAPÍTULO 1 - CONTROLE GENÉTICO DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM GERMOPLASMA DE MILHO TROPICAL

Resumo – Os objetivos do trabalho foram determinar a herança, a ação gênica, o número de genes, a capacidade geral (CGC) e específica de combinação (CEC) para a tolerância ao Al em milho. Primeiramente, foram avaliados cruzamentos dialélicos provenientes de germoplasma de milho crioulo e de milho híbrido. A geração resultante dos cruzamentos dialélicos dos dois germoplasmas e seus parentais foram avaliados quanto à tolerância ao alumínio através da metodologia de solução mínima. O delineamento utilizado foi o de blocos aleatorizados, com duas repetições. Os dados do DIF (diferença de crescimento radicular) foram submetidos à análise dialélica pelo modelo de Griffing (1956) método 2 (parentais, híbridos e recíprocos). Posteriormente, foi determinado a herança da tolerância a partir da análise de médias de gerações segregantes entre linhagens endogâmicas contrastantes. O experimento foi instalado no delineamento de blocos aleatorizados, com três repetições. Os tratamentos foram arranjos em esquema de parcelas subdivididas. Nas parcelas avaliou-se o efeito de famílias e nas subparcelas o de gerações de segregação. Os efeitos genéticos foram estimados através do modelo genético aditivo-dominante proposto por Mather e Jinks (1971). Os resultados da análise dialélica evidenciaram maior variabilidade associada às estimativas da CEC para os dois germoplasmas. Os genótipos de milho crioulo revelaram média geral de DIF superior ao germoplasma híbrido, confirmando a maior tolerância ao Al neste grupo. Os cruzamentos dialélicos que envolveram a variedade crioula V 06 destacaram-se pela alta CEC e CGC para a tolerância ao Al. A análise de média de gerações indicou herança quantitativa da tolerância ao Al neste germoplasma, com a maior parte da variância genética explicada pelos efeitos aditivos. A herdabilidade no sentido restrito foi de magnitude intermediária, indicando a possibilidade de ganho genético com a seleção de genótipos tolerantes na geração F₂. Ação gênica aditiva associada a herdabilidade intermediária e herança quantitativa indicam possibilidade de ganhos genéticos com a seleção artificial para tolerância ao Al neste germoplasma de milho.

Palavras-chave: Herdabilidade. Herança. *Zea mays* L. Capacidade de combinação. Genes.

GENETIC CONTROL OF ALUMINUM TOLERANCE IN TROPICAL MAIZE GERMPLASM

Abstract - The objectives of this work were to determine the inheritance, the gene action, the number of genes, the general (GCA) and specific combining (SCA) for Al tolerance in maize. First, were evaluated diallel crosses of maize from landrace and hybrid germplasms. The resulting generation of diallel crosses of both germplasms and their parents were evaluated for Al tolerance through the minimal solution methodology. The design was a randomized block with two replications. The DIF data (root growth difference) were analyzed by Griffing diallel model (1956) Method 2 (parental, hybrid and reciprocal). Later the inheritance of tolerance was determined from analysis of the average of segregating generations between contrasting inbred lines. The experiment was conducted in the design of randomized block with three replications. The treatments were arranged in a split plot design, in plot was evaluated the effect of families and subplots segregation generations. The additive-dominant genetic model proposed by Mather and Jinks (1971) estimated the genetic effects. The results of the diallel analysis showed greater variability associated with the estimates of the SCA for both germplasm. The landrace maize genotypes revealed overall average higher DIF to hybrid germplasm, confirming the greater tolerance in this group. The diallel crosses involving the V 06 landrace stood out by high SCA and GCA for Al tolerance. The generation average analysis indicated quantitative inheritance of Al tolerance in this germplasm, with most of the variance explained by the effects additions. The heritability in the narrow sense was of intermediate magnitude, indicating the possibility of genetic gain with selection of tolerant genotypes in F₂ generation. Additive gene action associated with intermediate heritability and quantitative inheritance indicate possibility of genetic gains with artificial selection for Al tolerance in this maize germplasm.

Keywords: Heritability. Inheritance. *Zea mays* L. Combination capacity. Genes.

1 Introdução

A toxidez por alumínio (Al) é um dos fatores mais limitantes ao cultivo em solos ácidos. Em pH baixo ($\text{pH} < 4,5$) o Al é solubilizado na solução do solo, favorecendo a absorção do elemento pelas raízes das plantas (EZAKI et al., 2013). O ápice radicular é o primeiro sítio da ação tóxica do Al, o qual interfere não somente na divisão celular como também no alongamento das células da raiz, causando a redução do crescimento radicular e consequente redução na produção das culturas (DONCHEVA et al., 2005).

A cultura do milho, dentre outras poáceas, apresenta elevada sensibilidade à toxidez causada pelo Al no solo, uma vez que, em sua maioria, o germoplasma elite com potencial produtivo superior é extremamente sensível ao elemento. Entretanto, alta variabilidade genética para a tolerância ao Al tem sido verificada em diversos germoplasmas de milho (NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003; COELHO et al., 2016). Neste sentido, os programas de melhoramento têm visado a seleção de genótipos tolerantes ao Al, tornando a utilização destes uma alternativa para o cultivo do milho em regiões com alta saturação por Al. O conhecimento e o entendimento da herança genética envolvida na tolerância ao Al em milho são de primordial importância no desenvolvimento de procedimentos metodológicos mais adequados para a seleção de genótipos tolerantes.

Sabe-se que a tolerância ao Al em milho é determinada geneticamente e que a grande maioria dos trabalhos de herança é baseado no crescimento radicular. Alguns estudos indicam herança qualitativa envolvida na tolerância ao Al em milho, definida por um gene de efeito maior (GARCIA; SILVA, 1979; JORGE; ARRUDA, 1997; RHUE et al., 1978). Por outro lado, existem relatos de herança quantitativa em algumas populações, evidenciando um maior número de alelos de tolerância associados nestas populações e ou germoplasmas estudados (MAGNAVACA et al., 1987; PRIOLI, 1987; SAWAZAKI; FURLANI, 1987, KOCHIAN et al. 2004).

Ninamango-Cárdenas et al. (2003) identificaram cinco regiões genômicas relacionadas à tolerância ao Al em milho. Os autores mapearam quatro QTLs (quantitative trait loci) para a tolerância nos cromossomos 2, 6 e 8. Maron et al. (2010) identificaram e caracterizaram dois genes membros da família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, como genes maiores de tolerância ao alumínio em milho. O *ZmMATE1*, foi mapeado na região telomérica do cromossomo 6. O efeito deste QTL explicou 16,2% da variação fenotípica pela presença do *ZmMATE1* no mapa de ligação. Já o *ZmMATE2* foi mapeado entre os marcadores microssatélites Bnlg105 e Umc1056, localizados no cromossomo 5, explicando 16% da variação fenotípica para a tolerância ao Al neste germoplasma.

Recentemente, Guimarães et al. (2014) identificaram o gene *ZmNrat1*, homólogo ao gene *OsNrat1*, que codifica um transportador específico de Al previamente envolvido na tolerância na cultura do arroz. Esta região genômica foi mapeada no cromossomo 5 de milho em local adjacente ao gene *ZmMATE2*.

A grande divergência de resultados alcançados para a tolerância ao Al em milho pode estar correlacionada ao tipo de germoplasma utilizado e as constituições genotípicas diferenciadas, que podem gerar, aparentemente, expressões fenotípicas conflitantes (PRIOLI et al., 2002; BONI et al., 2009). Portanto, tornam-se necessários maiores esclarecimentos científicos da herança genética envolvida na tolerância ao Al em milho. Neste sentido, os objetivos do trabalho foram determinar a herança, a ação gênica, o número de genes, a capacidade geral (CGC) e específica de combinação (CEC) para a tolerância ao Al, através da análise de cruzamentos dialélicos em germoplasma de milho crioulo e de milho híbrido e da análise de médias de gerações descendentes de cruzamentos contrastantes para tolerância ao Al.

2 Material e Métodos

2.1 Análise dialélica

A partir dos resultados obtidos com a caracterização do germoplasma crioulo e de milho híbrido para a tolerância ao alumínio (COELHO et al., 2016), foram realizados cruzamentos artificiais em esquema dialélicos incluindo os cruzamentos recíprocos entre cinco genótipos contrastantes para tolerância ao Al selecionados de cada germoplasma (Tabela 1). O esquema de cruzamento envolveu as seguintes combinações: tolerante x tolerante; tolerante x intermediário; tolerante x sensível; intermediário x intermediário; intermediário x sensível para os dois germoplasmas de milho. Os cruzamentos dialélicos controlados foram desenvolvidos na safra agrícola 2012/2013 na Fazenda Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

2.2 Avaliação fenotípica dos cruzamentos dialélicos

A geração resultante dos cruzamentos dialélicos dos dois germoplasmas e seus parentais foram avaliados quanto à tolerância ao alumínio através da metodologia de solução mínima. O delineamento experimental foi de blocos aleatorizados, com duas repetições, sendo utilizados 24 plântulas por repetição. Os dados fenotípicos foram tomados com base em plântulas individuais (VENCOVSKY, 1987).

Tabela 1- Relação das variedades crioulas e híbridos de milho, com o respectivo índice de tolerância relativa ao alumínio (ITRAI) e a classificação para à tolerância ao Al.

Variedade	Nome	Local de Coleta	ITRAI	Classificação
V 6	Dente de Ouro 2	Pelotas – RS	7,5	Tolerante
V 3	Catete Amarelo	Canguçu – RS	4,2	Intermediário
V 50	Fortaleza	Muqui – ES	3,7	Intermediário
V 29	Crioulo Cunha Roxo	Veranópolis – RS	2,8	Intermediário
V 41	Caiano	Rio Azul – PR	2,1	Sensível
Híbrido	Tipo	Empresa	ITRAI	Classificação
H 44	Simples modificado	Dow AgroSciences	5,0	Tolerante
H 27	Simples	Syngenta	4,8	Tolerante
H 34	Simples	Syngenta	3,3	Intermediário
H 18	Simples	Pioneer	2,5	Intermediário
H 22	Simples	Syngenta	1,0	Sensível

Fonte: Coelho et al. (2016)

As sementes pré-germinadas (cruzamentos e parentais) foram avaliadas para o comprimento inicial da raiz principal em centímetros (PL – primeira leitura). Logo após, as plântulas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido e então depositadas em um tanque contendo solução mínima composta de 4 mg L⁻¹ de Al + 40 mg L⁻¹ de Ca. Após 48 h de exposição foi avaliado novamente o comprimento da raiz principal (SL - segunda leitura). A diferença entre as variáveis PL e SL (SL - PL) foi denominada de DIF (cm) (MAZZOCATO et al., 2002). Os dados do DIF foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos submetidos à análise de agrupamento de Scott e Knott a 5% de probabilidade através do software R (R CORE TEAM, 2013).

2.3 Estimativas da capacidade geral e específica de combinação

Os dados de DIF foram submetidos à análise dialélica pelo modelo de Griffing (1956) método 2 (parentais, híbridos e recíprocos), obtendo-se as estimativas da capacidade geral (CGC) e específica (CEC) de combinação. Para estimar a ação gênica e o número de genes envolvidos na tolerância ao alumínio, as frequências observadas foram testadas em relação às frequências esperadas para a hipótese de um gene diferenciando genótipos tolerantes de sensíveis ao Al pelo teste de χ^2 (STEEL; TORRIE, 1980), através do programa GENES (CRUZ, 2013).

2.4 Análise de média de gerações

2.4.1 Tolerância ao Al em linhagens de milho

Dezesseis linhagens endogâmicas (S₅) de milho tropical, do programa de melhoramento da UEPG, foram avaliadas quanto à tolerância ao Al em solução mínima. As

linhagens endogâmicas são originadas de germoplasma de milho crioulo, sendo elas: L 03-2, L 04-2, L 22-1, L 23-1, L 70-2, L 70-4, L 71-1, L 71-2, L 87-3, L 95-1, L 99-3, L 99-4, L 118-4, L 118-8, L 129-4 e L 141-1. Foi utilizado o delineamento experimental de blocos aleatorizado, com 3 repetições. Foram avaliadas 12 plântulas por repetição para cada linhagem de milho.

A metodologia de avaliação da tolerância ao Al seguiu a mesma descrita no item 5.2.2. Os dados de DIF foram submetidos à análise de variância e as médias das linhagens à análise de agrupamento de Scott e Knott a 5% de probabilidade através do software R (R CORE TEAM, 2013).

2.4.2 Herança da tolerância ao Al

A partir da caracterização fenotípica da tolerância ao Al nas linhagens endogâmicas foram desenvolvidas cinco famílias oriundas de cruzamentos entre linhagens contrastantes para tolerância (L 99-4, L 118-8 e L 03-2) e sensibilidade ao Al (L 04-2, L 95-1, L 71-1 e L 23-1). As cinco famílias segregantes foram obtidas a partir dos seguintes cruzamentos: (1) L 04-2 x L 99-4, (2) L 03-2 x L 95-1, (3) L 23-1 x L 99-4, (4) L 118-8 x L 71-1 e (5) L 118-8 x L 95-1.

O experimento foi instalado no delineamento de blocos casualizados com três repetições. Os tratamentos foram arranjados em esquema de parcela subdividida, onde, na parcela avaliou-se o efeito de famílias e nas subparcelas o efeito das gerações de segregação. As parcelas foram representadas por uma bandeja de poliestireno expandido com 288 células (12 colunas x 24 linhas). Nas subparcelas as gerações consideradas geneticamente uniformes (P_1 , P_2 e F_1) de cada família, foram representadas por uma linha cada com 12 plântulas por repetição, as populações segregantes da geração F_2 com 17 linhas (204 plântulas) por repetição e as gerações de retrocruzamento (RC_1 e RC_2) por duas linhas (24 plântulas) por repetição. A metodologia de avaliação seguiu a mesma descrita no item 5.2.2.

Os dados de DIF foram submetidos à análise de variância. Na presença de efeito significativo da fonte de variação geração dentro de família, procedeu-se o desdobramento das gerações dentro de cada família. As médias das gerações foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do software R (R CORE TEAM, 2013).

Os efeitos genéticos foram estimados através da análise das médias das gerações por meio do modelo genético aditivo-dominante proposto por Mather e Jinks (1971) sendo: $Y_k = \mu + w_1a + w_2d + \theta_k$, no qual Y é a média da geração k , μ é a média geral, a representa os efeitos genéticos aditivos, d os efeitos genéticos dominantes, w_1 e w_2 as contribuições relativas destes efeitos para cada média da geração e θ_k corresponde aos desvios do modelo para cada família.

As estimativas dos parâmetros $\hat{\mu}$, $\hat{a}$ e $\hat{d}$ foram obtidas através da matriz diagonal $\beta = (X'X)^{-1}(X'Y)$ pela resolução do sistema $y = X\beta + \varepsilon$, onde y é o vetor das médias observadas das gerações para cada família, X a matriz dos coeficientes, β o vetor dos parâmetros e ε o vetor dos erros associados a cada média. As análises de variância para o estudo das médias de gerações foram pelo método dos quadrados mínimos (MIRANDA FILHO, 1991).

A partir os dados de DIF individuais foram obtidas as estimativas para cada população segregante da geração F_2 : a variância fenotípica $\hat{\sigma}_{f(F_2)}^2 = \hat{\sigma}_{F_2}^2$, sendo $\hat{\sigma}_{F_2}^2$ a variância fenotípica total da geração F_2 ; a variância genotípica $\hat{\sigma}_{g(F_2)}^2 = \hat{\sigma}_{f(F_2)}^2 - \hat{\sigma}_{m(F_2)}^2$, sendo $\hat{\sigma}_{m(F_2)}^2$ a variância ambiental; a variância genética aditiva $\hat{\sigma}_{a(F_2)}^2 = \frac{1}{2}a^2 = 2\hat{\sigma}_{g(F_2)}^2 - (\hat{\sigma}_{g(RC_1)}^2 + \hat{\sigma}_{g(RC_2)}^2)$, onde $\hat{a}$ representa a variância devido aos efeitos aditivos; e a variância genética de dominância $\hat{\sigma}_{d(F_2)}^2 = \frac{1}{4}d^2 = \hat{\sigma}_{g(F_2)}^2 - \hat{\sigma}_a^2$, onde $\hat{d}$ corresponde à variância devido aos desvios de dominância. A herdabilidade no sentido restrito foi estimada pela fórmula: $\hat{h}_r^2 = \frac{\hat{\sigma}_{a(F_2)}^2}{\hat{\sigma}_{f(F_2)}^2} \times 100$ (CRUZ, 2009).

A heterose percentual ($\hat{H}_\%$) foi estimada por: $\hat{H} (\%) = \frac{\hat{H} \times 100}{MP}$, sendo $\hat{H}$ dada pela fórmula: $\hat{H} = \bar{F}_1 - MP$, em que $\bar{F}_1$ representa a média fenotípica da geração F_1 e MP a média das linhagens parentais (tolerante e sensível). O número mínimo de genes efetivos para a tolerância ao Al (n) foi estimado pela fórmula $n = \frac{R^2(1 + 0,5k^2)}{8\hat{\sigma}_g^2}$, onde R representa a amplitude dos valores de DIF da geração F_2 e $k = \sqrt{\frac{2\hat{\sigma}_d^2}{\hat{\sigma}_a^2}}$, sendo k o grau médio de dominância baseado em variâncias, onde $\hat{\sigma}_d^2$ corresponde à variância genética dos desvios de dominância e $\hat{\sigma}_a^2$ a variância genética devido aos efeitos aditivos dos genes (CRUZ, 2009).

3 Resultados

3.1 Análise dialélica

Os resultados da análise de variância demonstraram efeito altamente significativo ($p < 0,01$) dos tratamentos para os dois germoplasmas de milho (híbridos e variedades crioulas) para a variável DIF. Diferenças significativas foram observadas entre os genitores utilizados nos cruzamentos, bem como entre os cruzamentos dialélicos. Adicionalmente, também houve efeito significativo do contraste genitor vs cruzamentos para os dois germoplasmas (Tabela 2). Os coeficientes de variação foram de baixa magnitude, sendo de 4,6 para o germoplasma híbrido e de 3,4% para as variedades crioulas (Tabela 2).

O agrupamento das médias de DIF pelo teste de Scott e Knott a 5% possibilitou a formação de seis grupos estatísticos para o germoplasma híbrido e de sete grupos para o germoplasma crioulo (Tabela 3). Para o germoplasma híbrido as médias do DIF evidenciaram amplitude de 0,74 (H 22) a 2,38 cm (H 18 x H 44). Destaque positivo para a maior tolerância pode ser observado para os cruzamentos que envolveram o híbrido H 44, como: H 18 x H 44 (2,38 cm) e H 44 x H 34 (2,28 cm), os quais foram, em média, mais tolerantes que o genitor tolerante (1,77 cm). Os cruzamentos H 22 x H 44, H 27 x H 18 e H 44 x H 27 também foram superiores ao genitor H 44 com crescimento radicular acima de 2,0 cm. Os demais genitores híbridos (H 27, H 34, H 18, e H 22), obtiveram os menores valores de DIF (1,23, 1,21, 1,01, e 0,74 cm, respectivamente) (Tabela 3).

Tabela 2- Resumo da análise de variância para a variável DIF (diferença de crescimento radicular de plântulas de milho) em função dos tratamentos (genitores, cruzamentos e da interação genitores vs cruzamentos). Ponta Grossa, 2015.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio - DIF (cm)	
		Híbridos	Variedades
Blocos	1	0,969	1,391
Tratamentos	24	6,954 **	13,529 **
Genitores	4	15,123 **	30,214 **
Cruzamentos	19	1,256 **	3,137 **
Genitores vs Cruzamentos	1	23,365 **	40,401 **
Resíduo entre parcelas	24	0,364	0,199
Resíduo dentro de parcelas	1150	0,264	0,586
C.V. (%)		4,6	3,4
Média		1,74	2,67

*** significativo a 1% de probabilidade.

Em contraste com o germoplasma híbrido, verificou-se que o germoplasma de milho crioulo apresentou na média dos genótipos amplitude de 1,82 (V 06 x V 29) a 3,91 cm (V 06 x V 41), sendo, em média, 0,93 cm superior aos genótipos híbridos. Os cruzamentos V 06 x V 41 (3,91 cm) e V 06 x V 03 (3,80 cm), destacaram-se com o maior crescimento radicular, sendo considerados altamente tolerantes ao Al. Apesar de estatisticamente diferentes dos cruzamentos anteriormente citados, V 03 x V 06 e V 03 x V 29, também devem ser considerados, uma vez que obtiveram DIF superior à 3,0 cm. Por outro lado, os cruzamentos V 41 x V 50, V 50 x V 41 e V 06 x V 29 obtiveram menor crescimento radicular, com apenas 1,98, 1,83 e 1,82 cm de DIF, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3- Valores médios de DIF (diferença de crescimento radicular) para os genitores (5 híbridos e 5 variedades crioulas de milho) e os respectivos cruzamentos dialélicos. Ponta Grossa, 2015.

Híbridos		Variedades Crioulas	
Tratamentos	DIF (cm)	Tratamentos	DIF (cm)
H 18 x H 44	2,38 a *	V 06 x V 41	3,91 a *
H 44 x H 34	2,28 a	V 06 x V 03	3,80 a
H 22 x H 44	2,11 b	V 03 x V 06	3,65 b
H 27 x H 18	2,02 b	V 03 x V 29	3,30 c
H 44 x H 27	2,02 b	V 03 x V 41	2,88 d
H 34 x H 18	1,90 c	V 29 x V 50	2,86 d
H 22 x H 18	1,90 c	V 06	2,84 d
H 22 x H 27	1,86 c	V 29 x V 41	2,83 d
H 44 x H 18	1,86 c	V 03	2,77 d
H 27 x H 22	1,84 c	V 29	2,65 e
H 44	1,77 c	V 41 x V 03	2,64 e
H 18 x H 27	1,72 c	V 50 x V 03	2,60 f
H 18 x H 34	1,69 c	V 50	2,54 f
H 34 x H 22	1,69 c	V 06 x V 50	2,54 f
H 18 x H 22	1,68 c	V 29 x V 06	2,53 f
H 22 x H 34	1,66 c	V 41 x V 06	2,51 f
H 27 x H 44	1,60 c	V 50 x V 29	2,50 f
H 34 x H 44	1,56 c	V 03 x V 50	2,45 f
H 34 x H 27	1,55 c	V 29 x V 03	2,44 f
H 44 x H 22	1,43 d	V 41	2,40 f
H 27 x H 34	1,28 d	V 50 x V 06	2,34 f
H 27	1,23 d	V 41 x V 29	2,30 f
H 34	1,21 d	V 41 x V 50	1,98 g
H 18	1,01 e	V 50 x V 41	1,83 g
H 22	0,74 f	V 06 x V 29	1,82 g
Média	1,74		2,67

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

A análise de variância dos cruzamentos dialélicos demonstrou que os quadrados médios referentes à capacidade geral de combinação (CGC) foram significativos ($p < 0,05$) para a variável DIF tanto para o germoplasma híbrido quanto para germoplasma crioulo (Tabela 4). Da mesma forma, os efeitos da capacidade específica de combinação (CEC) foram significativos para híbridos ($p < 0,05$) e variedades crioulas ($p < 0,01$). Nos dois germoplasmas avaliados não houve significância para os cruzamentos recíprocos. Para os componentes quadráticos da análise dialélica, os valores observados para CEC (fixo) foram superiores aos da CGC (fixo) e recíprocos para os dois germoplasmas (Tabela 4).

Tabela 4 - Quadrados médios da análise de variância dialélica (GRIFFING, 1956) para DIF (diferença de crescimento radicular) dos tratamentos relativos ao germoplasma híbrido e de variedades crioulas de milho. Ponta Grossa, 2015.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio – DIF (cm)	
		Híbridos	Variedades
Tratamentos	24	0,3800	0,7189
CGC	4	0,6926 *	2,1215 *
CEC	10	0,4576 *	0,5535 **
Recíprocos	10	0,1774	0,3231
Resíduo	1150	0,2640	0,5860
Componentes Quadráticos			
CGC (Fixo)		0,0214	0,0163
CEC (Fixo)		0,0968	0,0768
Recíprocos		- 0,0217	- 0,0657

*, **, significativo a 5 e a 1%, respectivamente.

A maior estimativa positiva dos efeitos da capacidade geral de combinação (CGC) do DIF no germoplasma híbrido foi observada para o híbrido tolerante H 44 e a negativa de maior magnitude obtida pelo H 34. Para o germoplasma crioulo, a maior estimativa dos efeitos da CGC foi visualizada para a variedade tolerante V 06 e a menor para a variedade crioula V 50 (Tabela 5). Para as estimativas dos efeitos da capacidade específica de combinação (CEC), germoplasma híbrido, a maioria dos genitores apresentou estimativas negativas, com exceção do híbrido H 44 (0,4004).

Tabela 5- Estimativas dos efeitos da capacidade geral de combinação (CGC) para o DIF (diferença de crescimento radicular) dos 5 genitores (híbridos e variedades crioulas de milho). Ponta Grossa, 2015.

Híbridos		Variedades Crioulas	
Genitores	Efeito	Genitores	Efeito
H 44	0,3066	V 06	0,4188
H 27	- 0,0444	V 50	- 0,2972
H 34	- 0,1524	V 03	0,2768
H 18	0,0266	V 29	- 0,1512
H 22	- 0,1364	V 41	- 0,2472
DP (gi)	0,1028	DP (gi)	0,1531
DP (gi-gj)	0,1625	DP (gi-gj)	0,2421

Os cruzamentos que envolveram o híbrido H 22, H 34 x H 22 (0,3224), H 18 x H 22 (0,2934), H 27 x H 22 (0,2844) apresentaram as maiores estimativas de CEC. Por outro lado, o cruzamento entre os genótipos mais contrastantes para tolerância ao Al, H 44 x H 22 (- 0,1966), evidenciou estimativa de CEC negativa de maior magnitude (Tabela 6). Para o germoplasma de milho crioulo, as variedades V 06 (0,3852) e V 50 (0,5172) obtiveram os maiores valores de CEC. Os cruzamentos dialélicos que demonstraram CEC superior positiva foram: V 06 x V 03 (0,3022), V 06 x V 41 (0,3762) e V 03 x V 29 (0,2222). Enquanto o cruzamento V 06 x V 50

(- 0,4088) apresentou a capacidade específica de combinação negativa de maior magnitude (Tabela 6).

Tabela 6- Estimativas dos efeitos da capacidade específica de combinação (CEC) do DIF (diferença de crescimento radicular) para os genitores e cruzamentos do 1º e 2º experimentos (híbridos e variedades de milho, respectivamente). Ponta Grossa, 2015.

Híbridos			Variedades Crioulas		
Genótipos	CEC	Recíprocos	Genótipos	CEC	Recíprocos
H 44	0,4004		V 06	0,3852	
H 27	- 0,4176		V 50	0,5172	
H 34	- 0,4216		V 03	- 0,4108	
H 18	- 0,6796		V 29	0,1152	
H 22	- 0,7036		V 41	- 0,4528	
H 44 x H 27	- 0,0936	0,115	V 06 x V 50	- 0,4088	0,100
H 44 x H 34	- 0,1606	0,170	V 06 x V 03	0,3022	0,075
H 44 x H 18	0,0504	- 0,260	V 06 x V 29	- 0,6548	- 0,520
H 44 x H 22	- 0,1966	- 0,400	V 06 x V 41	0,3762	0,135
H 27 x H 34	0,0754	0,065	V 50 x V 03	- 0,1818	0,075
H 27 x H 18	0,1514	0,150	V 50 x V 29	0,1912	0,030
H 27 x H 22	0,2844	0,001	V 50 x V 41	- 0,1178	- 0,235
H 34 x H 18	0,1844	0,105	V 03 x V 29	0,2222	0,225
H 34 x H 22	0,3224	- 0,080	V 03 x V 41	0,0682	0,055
H 18 x H 22	0,2934	- 0,360	V 29 x V 41	0,1262	0,055
DP (sij)	0,2118		DP (sij)	0,3156	
DP (sii)	0,2907		DP (sii)	0,4330	
DP (sii – sjj)	0,3980		DP (sii – sjj)	0,5930	
DP (sii – sij)	0,4142		DP (sii – sij)	0,6172	
DP (sii – sjk)	0,3447		DP (sii – sjk)	0,5135	
DP (sij – sik)	0,3250		DP (sij – sik)	0,4841	
DP (sij – skl)	0,2814		DP (sij – skl)	0,4193	

3.2 Tolerância ao Al em linhagens endogâmicas de milho

O resultado da análise de variância para a variável DIF demonstrou diferenças altamente significativas ($p < 0,01$) entre as linhagens endogâmicas de milho. O coeficiente de variação experimental foi de baixa magnitude (2,69%) e adequado para este tipo de experimento (dados não apresentados).

O teste de agrupamento de médias permitiu caracterizar as linhagens endogâmicas de milho quanto à tolerância/ sensibilidade ao Al. Os resultados da análise demonstraram a formação de 10 grupos estatísticos com amplitude de 0,70 cm (H 22, testemunha sensível) à 1,93 cm (H 44, testemunha tolerante). A linhagem endogâmica L 99-4 destacou-se no segundo grupo estatístico com a maior tolerância ao Al (1,42 cm), seguida do grupo composto pelas linhagens L 118-8, L 118-4 e L 03-2, as quais obtiveram DIF de 1,27, 1,26 e 1,25 cm, respectivamente (Tabela 7). Por outro lado, a linhagem L 04-2 evidenciou a maior sensibilidade

ao Al do conjunto de genótipos estudados, com DIF de apenas 0,70 cm, estando no mesmo grupo estatístico do controle sensível (H 22). As linhagens endogâmicas L 95-1, L 141-1, L 23-1 e L 71-1 evidenciaram crescimento radicular variando de 0,74 a 0,80 cm, sendo consideradas sensíveis ao Al (Tabela 7).

Tabela 7- Valores médios da variável DIF (diferença de crescimento radicular) das 17 linhagens endogâmicas de milho e dos híbridos controles (H 44 – tolerante e H 22 – sensível). Ponta Grossa, 2015.

Tratamentos	DIF (cm)
H 44	1,93 a*
L 99-4	1,42 b
L118-8	1,27 c
L118-4	1,26 c
L 03-2	1,25 c
L 99-3	1,17 d
L 131-1	1,09 e
L 87-3	1,04 f
L 71-2	0,96 g
L 70-2	0,92 g
L 129-4	0,88 h
L 221	0,87 h
L 70-4	0,87 h
L 71-1	0,80 i
L 23-1	0,79 i
L 141-1	0,75 i
L 95-1	0,74 i
H 22	0,70 j
L04-2	0,70 j

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

3.3 Herança da tolerância ao Al

Os resultados da análise de variância demonstraram efeito altamente significativo para as fontes de variação famílias, gerações e para gerações dentro de famílias da variável DIF. O coeficiente de variação na parcela foi de 11,94%, e o da subparcela de 9,68% (Tabela 8). Em função da significância estatística da fonte gerações dentro de famílias, realizou-se o desdobramento das gerações dentro de cada família para o caráter tolerância ao Al.

O desdobramento das gerações (L_T , L_S , F_1 , F_2 , RC_1 e RC_2) nas respectivas famílias confirmou a presença de contraste fenotípico para tolerância ao Al entre as linhagens parentais das famílias. O crescimento radicular das linhagens tolerantes expostas à solução mínima contendo o Al (L_T 99-4, L_T 03-2 e L_T 118-8) variou de 1,25 a 1,57 cm. Por outro lado, as linhagens sensíveis ao Al, L_S 04-2, L_S 95-1, L_S 23-1 e L_S 71,1 evidenciaram médias de DIF de apenas 0,59 a 0,80 cm (Tabela 9).

Tabela 8- Resumo da análise de variância para a variável DIF em função das famílias, gerações e de gerações dentro de famílias. Ponta Grossa, 2015.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio - DIF (cm)
Blocos	2	0,258
Famílias	4	1,510 **
Resíduo (a)	8	0,156
Gerações (Famílias)	25	7,086 **
Resíduo (b)	50	0,644
C.V. parcela (%)		11,94
C.V. subparcela (%)		9,68
Média		1,17

** significativo a 1% de probabilidade.

O crescimento radicular médio das gerações F_1 's das cinco famílias, tendeu para maior tolerância ao Al, com amplitude do DIF de 1,19 (família 5) a 1,35 cm (família 1). A caracterização da tolerância ao Al das cinco gerações F_2 's evidenciou tendência para o desempenho intermediário em relação às linhagens parentais utilizadas nos respectivos cruzamentos. Para quatro das cinco famílias estudadas, os resultados do teste de comparação de médias de Tukey, demonstraram que as gerações F_2 's não diferiram estatisticamente das linhagens parentais utilizadas como fontes de tolerância (L_T 99-4, L_T 03-2 e L_T 118-8). Apenas para a família 5 a média de DIF da geração F_2 não diferiu estatisticamente da linhagem sensível (L_S 95-1) (Tabela 9).

As médias fenotípicas de DIF das cinco gerações de retrocruzamento RC_1 's ($F_1 \times L_T$) demonstraram em todas as famílias médias de DIF similares estatisticamente às linhagens parentais tolerantes ao Al. Nas cinco famílias estudadas foi observado desempenho fenotípico clássico esperado para as gerações de retrocruzamento envolvendo uma fonte de tolerância ao Al. Os valores médios de DIF variaram de 1,17 a 1,82 cm, sendo que nas famílias em que a linhagem tolerante L_T 99-4 foi utilizada para produzir o retrocruzamento (Famílias 1 e 2), em média obtiveram as maiores diferenças de crescimento radicular (1,82 e 1,63 cm, respectivamente) (Tabela 9). Em contrapartida, as gerações RC_2 's, oriundas dos retrocruzamentos das gerações F_1 's com os respectivos parentais sensíveis ao Al apresentaram crescimento radicular reduzido, evidenciando um padrão fenotípico com tendência para maior sensibilidade ao elemento (Tabela 9).

Para visualizar o padrão de segregação da geração F_2 são apresentados os gráficos de distribuição de frequência dos indivíduos das respectivas famílias estudadas (Figura 1). O padrão de segregação para as cinco famílias, evidenciou uma tendência de distribuição simétrica entre as classes fenotípicas de DIF, de forma semelhante à uma curva de distribuição

Tabela 9- Efeito do desdobramento das gerações (L_T, L_S, F₁, F₂, RC₁ e RC₂) e estimativas dos parâmetros genéticos herdabilidade no sentido restrito ($\hat{h}_r^2$), heterose % ($\hat{H}$) e número de genes nas respectivas famílias para a variável DIF (diferença de crescimento radicular de plântulas de milho) e percentagem da variação do DIF explicada pelos efeitos aditivos ($\hat{a}$), dominante ($\hat{d}$) e das interações epistáticas ($\hat{aa}$, $\hat{ad}$, $\hat{dd}$) para cada família. Ponta Grossa, 2015.

Gerações	DIF (cm)				
	Família 1	Família 2	Família 3	Família 4	Família 5
	L _T 99-4 x Ls 04-2	L _T 03-2 x Ls 95-1	L _T 99-4 x Ls 23-1	L _T 118-8 x Ls 71-1	L _T 118-8 x Ls 95-1
L _T	1,57 ab *	1,25 ab *	1,44 ab *	1,31 a *	1,39 a *
L _S	0,80 d	0,66 d	0,61 c	0,59 c	0,80 c
F ₁	1,35 bc	1,33 ab	1,23 b	1,24 a	1,19 ab
F ₂	1,48 bc	1,09 bc	1,41 ab	1,07 ab	0,89 c
RC ₁	1,82 a	1,47 a	1,63 a	1,20 a	1,17 ab
RC ₂	1,23 c	0,82 cd	1,23 b	0,83 bc	1,00 bc
Estimativas	Família 1	Família 2	Família 3	Família 4	Família 5
	L _T 99-4 x Ls 04-2	L _T 03-2 x Ls 95-1	L _T 99-4 x Ls 23-1	L _T 118-8 x Ls 71-1	L _T 118-8 x Ls 95-1
$\hat{h}_r^2$ (%)	71,02	51,87	68,71	66,21	46,65
$\hat{H}$ (%)	23,72	21,43	27,58	13,52	9,02
Nº de genes	7,4	9,8	9,4	5,6	11,1
Efeito	Percentagem de Variação (%)				
	Família 1	Família 2	Família 3	Família 4	Família 5
	L _T 99-4 x Ls 04-2	L _T 03-2 x Ls 95-1	L _T 99-4 x Ls 23-1	L _T 118-8 x L 71-1	L _T 118-8 x Ls 95-1
m	15,62	8,54	24,09	42,05	0,35
$\hat{a}$	71,85	75,17	57,29	39,63	40,90
$\hat{d}$	4,10	3,70	6,27	4,89	14,53
$\hat{aa}$	0,37	2,72	0,73	5,06	35,70
$\hat{ad}$	2,86	8,84	0,54	1,11	3,37
$\hat{dd}$	5,19	1,02	11,09	7,26	5,16

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

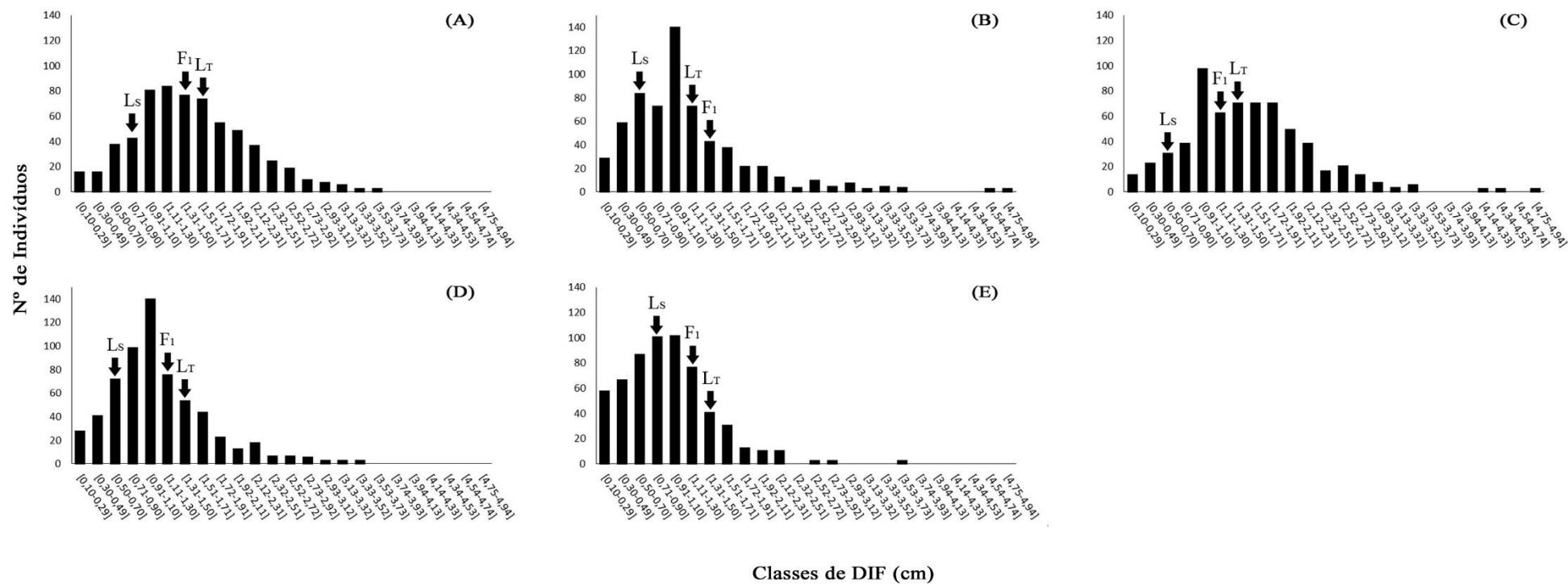


Figura 1 - Distribuição de frequência (%) dos indivíduos da geração F_2 em cada classe de DIF (diferença de crescimento radicular) nas famílias segregantes: (A) L_T 99-4 x L_S 04-2, (B) L_T 03-2 x L_S 95-1, (C) L_T 99-4 x L_S 23-1, (D) L_T 118-8 x L_S 71-1 e (E) L_T 118-8 x L_S 95-1. L_T = linhagem de milho tolerante, L_S = linhagem de milho sensível, F_1 = geração filial (L_T x L_S). Ponta Grossa, 2015.

normal, com classes de DIF variando de 0,10 a 4,94 cm. As famílias 1 (L_T 99-4 x L_S 04-2) e 3 (L_T 99-4 x L_S 23-1), em que, a linhagem tolerante L 99-4 foi um dos parentais, foram observadas distribuições de frequência mais simétricas dos DIFs. Nestas famílias, a frequência de genótipos considerados sensíveis (até 0,90 cm) foi de 17 e 16 %, respectivamente, indicando um alto padrão de tolerância ao Al nos indivíduos destas gerações F₂'s (Figura 1 – A,C). De maneira inversa, para as famílias 2 (L_T 03-2 x L_S 95-1) e 5 (L_T 118-8 x L_S 95-1), nas quais o parental sensível foi a L 95-1, foram observadas distribuições de frequência com menor simetria para o DIF. Fato que pode ser comprovado pela maior frequência de indivíduos sensíveis nestas gerações F₂'s, com 39 e 53 % para as famílias 2 e 5, respectivamente (Figura 1 – B,C).

Os coeficientes de herdabilidade no sentido restrito ($\hat{h}_r^2$) para a tolerância ao Al variaram de 46,65 (L_T 118-8 x L_S 95-1) à 71,02 % (L_T 99-4 x L_S 04-2) (Tabela 9). As estimativas de heterose percentual foram positivas e variaram de 9,02 a 27,58 % (Tabela 9). A estimativa do número de genes efetivos nas cinco famílias, evidenciou para a maioria delas um grande número de genes de tolerância. O menor número foi observado para a família 4 (L_T 118-8 x L_S 71-1) com 5,6, enquanto que a família 5 (L_T 118-8 x L_S 95-1) evidenciou o maior número com 11,1 genes (Tabela 9).

Os resultados da análise genética para os dados de DIF, demonstraram a maior contribuição dos efeitos genéticos aditivos no controle da tolerância ao Al em milho, com valores percentuais significativos variando de 39,63 (L_T 118-8 x L_S 71-1) a 75,17% (L_T 03-2 x L_S 95-1) (Tabela 9). Apenas para a família 5 (L_T 118-8 x L_S 95-1), verificou-se além do efeito genético aditivo (40,9%), uma contribuição significativa da interação epistática aditivo x aditivo ($\hat{\alpha}\alpha$), com 35,7% da variância genética atribuída a esta interação (Tabela 9).

5.4 Discussão

5.4.1 Análise dialélica

A superioridade do crescimento radicular dos cruzamentos que envolveram o híbrido tolerante H 44, indicam a presença de alelos favoráveis à tolerância ao Al neste genótipo. Da mesma forma, os cruzamentos com a variedade crioula tolerante V 06 obtiveram o maior crescimento radicular. Os valores médios de DIF das variedades crioulas evidenciaram a maior tolerância ao Al neste germoplasma em relação aos genótipos híbridos de milho. As estimativas da capacidade específica de combinação (CEC) entre híbridos simples servirão como parâmetros para prever o desempenho médio das suas linhagens após os cruzamentos. Isto é, os híbridos com maior CEC gerariam populações potenciais para a extração de linhagens, de tal forma que, as linhagens originadas destes pares de híbridos, apresentaria elevada CEC e uma

melhor exploração do vigor híbrido (BALESTRE et al., 2008). Neste sentido, a análise destes dois tipos de cruzamentos dialélicos, além de auxiliar no entendimento dos efeitos genéticos envolvidos na determinação da tolerância ao Al em milho, servirá para prover estimativas de parâmetros úteis na seleção de genitores para hibridação em função do germoplasma de origem.

A variabilidade da capacidade geral de combinação (CGC) permite inferir que os genitores contribuíram diferentemente nos cruzamentos nos quais foram envolvidos e a variabilidade entre os efeitos da CEC indicam a existência de combinações que possuem desempenho diferente do que era esperado somente com base nos efeitos da CGC (AGUIAR et al., 2004). A significância para a capacidade combinatória revela a existência de variabilidade resultante de efeitos genéticos aditivos e não aditivos. Nos dois germoplasmas (híbridos e variedades crioulas) os componentes quadráticos demonstraram maior variabilidade associada às estimativas da CEC, indicando associação aos efeitos gênicos não-aditivos (epistasia e dominância), sendo interpretada como o desvio de um cruzamento em relação ao que seria esperado com base na capacidade geral de combinação de seus genitores (CRUZ; REGAZZI, 1997). Estes resultados diferem dos obtidos por Paterniani e Furlani (2002), os quais verificaram, a partir da avaliação de um dialelo completo com 10 linhagens endogâmicas de milho, maior porção da variabilidade da tolerância ao Al devido à CGC. Embora efeitos não-aditivos também tenham sido observados, os autores concluíram que a expressão da tolerância ao Al naquele germoplasma deve-se, principalmente, aos efeitos gênicos aditivos.

Segundo Vencovsky (1970) a maior magnitude associada ao efeito da CGC será apresentada pelo genitor que possuir maior frequência de alelos favoráveis da característica alvo. Individualmente, os híbridos H 44 e H 27, apresentaram elevada tolerância ao Al, mas a reduzida CGC do H 27 sugere que a utilização deste genótipo em cruzamentos provavelmente não resultará em genótipos superiores para a tolerância ao Al. Por outro lado, para o H 44 o inverso pode ser observado, sendo a utilização deste genótipo perfeitamente recomendada para a obtenção de cruzamentos com maior tolerância ao elemento. Resultados semelhantes foram obtidos por Conceição et al. (2009) na avaliação da CGC de cinco linhagens endogâmicas de milho. Os autores sugerem que os alelos favoráveis à tolerância ao Al estão em baixa frequência em cruzamentos com baixa CGC. De acordo com Sprague e Tatum (1942), baixas estimativas de CGC (próximas a 0) indicam genótipos com combinações que não diferem muito da média de todos os cruzamentos no sistema dialélico, enquanto altos valores (positivos ou negativos) indicam genótipos melhores ou piores que os demais, evidenciado, portanto, a presença de genes de efeitos aditivos.

A estimativa da CEC é interpretada como o desvio de um cruzamento em relação ao que seria esperado com base na capacidade geral de combinação de seus genitores (GOMES et al., 2000). Deste modo, baixos valores para CEC, sejam positivos ou negativos, indicam que os cruzamentos gerados apresentaram desempenho de acordo com o esperado com base na capacidade geral de combinação dos genitores. Para Vencovsky (1970), os maiores valores da CEC ocorrem entre os genótipos mais divergentes nas frequências dos genes com dominância, embora sejam também influenciados pela frequência alélica.

As estimativas de CEC negativas, para a maioria dos genitores, considerando o crescimento radicular, indica que a heterose que será manifestada na geração filial, obtida do cruzamento entre estes indivíduos, será em média positiva, sendo desejável no sentido de aumentar a tolerância ao Al. Para os cruzamentos em que as estimativas foram superiores e positivas, os efeitos da CEC sugerem a importância de genes com efeitos não-aditivos para esta característica. Destaca-se que no dialelo de variedades crioulas, as combinações foram as mais promissoras para o aumento da tolerância, pelos maiores DIFs observados. Segundo Aguiar et al. (2004), cruzamentos que se destacam com maiores valores de CEC em análises dialélicas, devem ser selecionados, sobretudo, se os parentais que os constituem apresentarem altas estimativas de CGC. Neste sentido, os cruzamentos envolvendo a variedade V 06 merecem destaque, uma vez que, além de apresentarem altos valores de CEC, este parental evidenciou a maior estimativa da CGC.

4.2 Herança da tolerância ao Al em milho

A diferença de crescimento radicular (DIF) tem sido utilizada com eficiência na avaliação fenotípica da tolerância ao Al em milho (MAZZOCATO et al., 2002; CONCEIÇÃO et al., 2009; COELHO et al., 2015; COELHO et al., 2016). A partir da avaliação desta variável foi possível ordenar as linhagens endogâmicas de milho do programa de melhoramento genético da UEPG quanto à tolerância ao Al. Este ranqueamento possibilitou a geração, por cruzamentos artificiais, de cinco famílias segregantes originadas a partir genótipos contrastantes para tolerância, as quais foram estudadas visando conhecer a herança genética envolvida na tolerância ao Al neste germoplasma de milho.

A partir da avaliação das cinco famílias foi possível confirmar os resultados obtidos na caracterização das linhagens endogâmicas de milho baseando-se na diferença de crescimento radicular dos parentais de cada família. Como esperado, os valores de DIF das linhagens tolerantes foram superiores às linhagens sensíveis, confirmando a diferença de crescimento radicular na presença do alumínio nas linhagens fonte de tolerância. Da mesma forma, Prioli et

al. (2002) e Boni et al. (2009), estudando a herança genética da tolerância ao Al no cruzamento das linhagens L922 x Ast214, confirmaram o contraste entre as mesmas através da diferença de crescimento radicular.

O padrão de distribuição de frequência próxima a uma curva normal e unimodal dos indivíduos F_2 , fornece indícios de que a herança da tolerância neste germoplasma seja quantitativa, possivelmente pela presença de vários alelos de tolerância nas respectivas linhagens parentais fontes da tolerância ao Al. Adicionalmente, visualiza-se para a grande maioria das famílias uma distribuição dos indivíduos nas classes fenotípicas do DIF, próximo da simetria, o que indica um predomínio da ação gênica aditiva no controle genético da tolerância ao Al (BERNARDO, 2010). Possivelmente, a ausência de simetria perfeita nos gráficos de distribuição de frequência poderia estar associada ao efeito ambiental na expressão da tolerância dos indivíduos, possibilidade de erros dos avaliadores na fenotipagem, tamanho das populações F_2 avaliadas e em algumas famílias a presença de ação gênica de dominância no controle genético da tolerância ao Al.

Prioli et al. (2002) e Boni et al. (2009), relataram padrão de distribuição de frequências bimodal para os indivíduos da geração F_2 do cruzamento de linhagens contrastantes para a tolerância. Os autores enfatizam que este tipo de distribuição é um indicativo de herança monogênica com dominância completa para o alelo de tolerância. Estes resultados são análogos aos observados por Rhue et al. (1978), os quais concluíram que alelos dominantes condicionam a tolerância ao Al em milho. Através de experimentos conduzidos em vasos com areia Garcia e Silva (1979) também observaram herança monogênica, sendo a tolerância ao Al controlada por um alelo dominante. Por outro lado, padrão de herança quantitativa para a tolerância ao alumínio é frequentemente relatada na literatura. Prioli (1987) avaliou populações F_2 's obtidas de 4 cruzamentos. O autor relata distribuições de frequências contínuas e unimodais dos indivíduos F_2 nas classes de crescimento radicular para todas as populações em diferentes concentrações de Al (0; 2,25; 6,75 e 9,0 mg L⁻¹). Adicionalmente, verificaram ausência de simetria das distribuições de frequência em concentrações de Al mais elevadas (6,75 e 9,0 mg L⁻¹).

Para Magnavaca et al. (1987), o tipo de assimetria observada pode ser evidência de preponderância de genes de sensibilidade em relação aos de tolerância. Prioli (1987) enfatiza que, se esta explicação for tomada como correta, deve-se considerar, pelo menos em parte, a possibilidade de alelos de tolerância não atuarem ou serem ineficientes em altas concentrações de Al. Deste modo, a frequência de alelos de tolerância seria alta em baixas concentrações de Al, enquanto que em altas concentrações, seriam mais frequentes os alelos de sensibilidade.

Neste sentido, pode-se admitir que existem mais de um loco participando na expressão da tolerância ao Al em milho. Sawasaki e Furlani (1987), confirmaram estes resultados ao avaliar a tolerância ao Al em gerações resultantes do cruzamento de linhagens de milho cateto. Os autores observaram que a distribuição da geração F_2 foi contínua e unimodal com assimetria negativa, apresentando apenas as classes onde estavam alocadas as médias da geração F_1 e do parental tolerante. Apesar deste não ser um indicativo da presença de genes de efeitos aditivos, complementarmente, foram verificados, através das estimativas de parâmetros genéticos, que os efeitos aditivos explicaram a maior parte da variação genética da tolerância ao Al em milho cateto. Através da baixa estimativa do grau de dominância, também concluíram que existem indícios de uma tendência da sensibilidade ao alumínio ser parcialmente dominante sobre a tolerância.

A estimativa dos parâmetros genéticos associados à herança da tolerância ao Al em populações segregantes é de fundamental importância para os programas de melhoramento vegetal. Estes parâmetros permitem direcionar os esforços para a incorporação de genes de tolerância no germoplasma do programa, bem como auxiliar na escolha do método de seleção a ser utilizado. As estimativas de herdabilidade no sentido restrito foram consideradas elevadas quando comparadas a outros estudos (SAWAZAKI; FURLANI 1987, PRIOLI et al., 2000). Este fato sugere que grande parte da proporção da variabilidade genética seja aditiva, evidenciando amplas possibilidades de seleção de genótipos tolerantes na geração F_2 , baseando-se nestas condições experimentais. Os percentuais positivos de heterose, indicam que a variância das frequências gênicas entre os parentais é suficientemente grande, sendo desejáveis os valores positivos, uma vez que se pretende a obtenção de plantas com maior crescimento radicular na presença do fator estressante.

As estimativas do número de genes, indicaram herança quantitativa para a tolerância ao Al em milho, para o germoplasma avaliado. Através de estudos com o marcador RFLP, Sibov et al. (1999), observaram indícios do envolvimento de duas regiões genômicas localizadas nos cromossomos 6 e 10, associadas à tolerância ao Al em uma população de milho cateto. Esta mesma técnica permitiu que Brondani e Paiva (1996), associassem a tolerância ao Al à uma região genômica no cromossomo 2 do milho, enquanto Torres et al. (1997), localizaram uma região no cromossomo 8. Maron et al. (2010), identificaram dois genes, *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, como genes maiores de tolerância ao alumínio em milho. Estes genes são membros da família MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion), sendo o *ZmMATE1* mapeado no cromossomo 6 e o *ZmMATE2* no cromossomo 5 do milho.

Recentemente, Guimarães et al. (2014) mapearam uma região genômica associada à tolerância ao Al adjacente ao gene *ZmMATE2* (cromossomo 5). Este gene *ZmNrat1* é homólogo ao gene *OsNrat1*, que codifica um transportador específico de Al previamente envolvido na tolerância da cultura do arroz. A partir da combinação da análise de ligação e do mapeamento associativo, Krill et al. (2010), identificaram quatro genes associados à tolerância ao Al em populações F₂ de milho. Estes genes candidatos, *ZmASL*, *ZmALMT2*, *ME* e *SAHH*, identificados a partir de sequências depositadas no projeto MAGI (Maize Assembled Genomic Islands), estão localizados nos cromossomos 1, 10, 6 e 4, respectivamente. Até o presente momento, o maior número de regiões genômicas envolvidas na tolerância ao Al em milho, foi relatado por Ninamango-Cárdenas et al. (2003), os quais mapearam através de marcadores moleculares cinco QTLs de tolerância, explicando 60% da variância fenotípica associada ao crescimento radicular líquido.

No presente estudo as médias das gerações foram analisadas utilizando o modelo completo de Mather e Jinks (1971), com o intuito de conhecer a variabilidade genética das populações segregantes e determinar a herança e a ação gênica envolvida na tolerância ao Al em milho. Para a maioria das famílias, a análise genética evidenciou o efeito aditivo explicando a maior parte da variação genética da tolerância ao Al. Embora, na família 5 (L_T 118-8 x L_S 95-1), foi observado uma contribuição significativa da interação epistática aditivo x aditivo. Segundo Holland (2001), se atribui à epistasia a razão para o contínuo sucesso do ganho com seleção obtido em alguns programas de melhoramento. O componente aditivo x aditivo da variância epistática é um dos mecanismos pelo qual o progresso com a seleção é mantido em espécies com base genética estreita.

Magnavaca et al. (1987), analisaram as gerações (P₁, P₂, F₁, F₂, RC₁ e RC₂) de seis conjuntos de cruzamentos, sendo quatro entre linhagens contrastantes para a tolerância ao Al e dois entre linhagens sensíveis. De maneira análoga a este trabalho, os autores verificaram efeitos genéticos aditivos explicando a maior parte da variância genética para os conjuntos oriundos de linhagens contrastantes. Entretanto, os autores também observaram contribuições significativas dos desvios de dominância e, em menor magnitude, efeitos epistáticos de dominância x dominância foram verificados em uma das famílias. Para os conjuntos oriundos das linhagens sensíveis, foram observados efeitos genéticos de dominância e de interações epistáticas de dominância x dominância, explicando a maior parte da variância fenotípica. Os autores enfatizam que o grande número de mecanismos de tolerância ao Al, descritos na literatura para a cultura do milho, dão suporte ao conceito de herança complexa, ou seja, um maior número de genes, possam estar envolvidos no controle genético deste caráter. Entretanto,

a possibilidade de mecanismos estarem atuando especificamente mais do que outros em função de determinado estágio do ciclo de desenvolvimento da planta, poderia suportar a hipótese de herança monogênica em algumas situações para a tolerância ao Al.

Através do estudo da genética da tolerância ao Al em milho cateto, Sawazaki e Furlani (1987), verificaram que apenas efeitos aditivos foram significativos. Estes autores concluíram que a alta tolerância ao alumínio da linhagem de milho cateto é condicionada principalmente por genes de efeitos aditivos, os quais se concentram, provavelmente, na variedade de origem, tendo em vista que o cultivo desse milho foi feito por indígenas e antigos agricultores, em áreas de solo com alto teor de alumínio. Os resultados obtidos por Sawazaki e Furlani (1987), corroboram com as hipóteses de que a raça de milho Cateto, de origem antiga, é considerada uma importante fonte de tolerância ao Al (PRIOLI; SILVA, 1984; MIRANDA et al., 1984; PRIOLI, 1987; SIBOV et al., 1999; PRIOLI et al., 2000; PRIOLI et al., 2002; BONI et al., 2009). Segundo Prioli e Silva (1984), as linhagens tolerantes são, em sua maioria, de endosperma duro, originárias da raça Cateto, enquanto que as mais sensíveis, são dentadas, do tipo Tuxpeño. Prioli (1987), explica que as linhagens oriundas da raça Cateto, não desenvolvem radículas tão longas quanto as linhagens oriundas do tipo Tuxpeño. Assim, na presença do Al em níveis tóxicos, o efeito prejudicial do elemento é mais intenso em linhagens do tipo Tuxpeño.

As linhagens endogâmicas do programa de melhoramento da UEPG possuem como base genética variedades crioulas de milho coletadas em diferentes regiões do sul do Brasil (Rio Grande do Sul e Paraná). Este germoplasma é proveniente de regiões agrícolas de baixo nível tecnológico, portanto, estas variedades crioulas foram sendo selecionadas naturalmente para a alta adaptação a ambientes agrícolas com alto teor de Al. Pela origem antiga destas variedades crioulas, acredita-se que, em boa parte deste germoplasma seja composto por raças Cateto, fato que pode explicar a maior tolerância destas variedades crioulas em relação aos híbridos comerciais/pré-comerciais utilizados no presente trabalho.

Para Boni et al. (2009) a grande divergência de resultados quanto à genética da tolerância ao Al em milho, pode ser explicada em função dos diferentes tipos de germoplasmas utilizados nas avaliações. Neste sentido, a origem das linhagens utilizadas neste estudo também serve para confirmar os resultados obtidos por Sawazaki e Furlani (1987), sustentando a hipótese de que herança para a tolerância ao Al em milho Cateto é controlada por vários genes, havendo predominância dos efeitos genéticos aditivos na expressão fenotípica da tolerância ao elemento estressante.

CAPÍTULO 2 - MAPEAMENTO DE QTLs DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM MILHO TROPICAL

Resumo - Os objetivos deste trabalho foram mapear regiões genômicas associadas à QTLs de tolerância ao alumínio (Al) em milho e determinar os efeitos fenotípicos dos locos sobre a tolerância. Os indivíduos da geração F_2 foram autofecundados a fim de gerar as progênies $F_{2:3}$, as quais foram avaliadas para tolerância ao Al em solução mínima. Os tratamentos foram constituídos de 114 progênies $F_{2:3}$, as linhagens parentais (L_T 99-4 e L_S 04-2) e a geração F_1 , implantados no delineamento de blocos aleatorizados com 3 repetições. As parcelas foram constituídas por 12 plântulas de cada genótipo. Os tratamentos foram submetidos à solução mínima com 4 mg L^{-1} de Al por 48 h. A variável analisada (DIF), foi obtida através da diferença de crescimento radicular. Os locos SSRs e AFLPs foram utilizados para a construção do mapa de ligação com o auxílio do programa MAPMAKER versão 3.0 e a detecção dos QTLs pela análise de mapeamento por intervalo composto. Os resultados experimentais evidenciaram grande variabilidade genética entre as progênies $F_{2:3}$ de milho para a tolerância ao Al. A análise de ligação possibilitou agrupar e ordenar 246 marcas (SSRs e AFLPs) nos 10 grupos de ligação (cromossomos). O comprimento total do mapa de ligação foi de 1897,3 cM e a distância média entre as marcas de 8,8 cM. Foram mapeados nove QTLs de tolerância em oito grupos de ligação (cromossomos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10), os quais explicaram 70,3% da variação fenotípica. Os resultados confirmaram os três principais QTLs (bins 6.00, 8.05 e 10.01) descritos na literatura para a tolerância ao Al, os quais foram responsáveis pela maior parte da variação fenotípica (40,3%). O elevado número de QTLs mapeados nesta população segregante $F_{2:3}$ confirma a herança quantitativa da tolerância ao Al neste germoplasma de milho tropical.

Palavras-chave: Locos de tolerância. Mapeamento intervalo composto. Marcadores. Aditivo. Mapa de ligação.

MAPPING OF QTLs TO AL TOLERANCE IN TROPICAL MAIZE

Abstract - The objectives of this work were to map genomic regions associated with QTLs for aluminum (Al) tolerance in maize and determine the phenotypic effects of tolerance loci. Individuals of F₂ generation were self-fertilized to generate the F_{2:3} progenies, which were evaluated for Al tolerance in minimal solution. The treatments consisted of 114 progenies F_{2:3}, the parental lines (L_T 99-4 and L_S 04-2) and the F₁ generation, implemented in the design of randomized blocks with 3 repetitions. The plot consisted of 12 plants of each genotype. The treatments were submitted to minimal solution with 4 mg L⁻¹ Al for 48 h. The variable analyzed (DIF) was obtained from the root growth difference. SSR loci and AFLPs were used for the construction of the linkage map with MAPMAKER program version 3.0 and the detection of QTL mapping analysis by composite interval. The experimental results showed high genetic variability among F_{2:3} progenies of maize for Al tolerance. Linkage analysis allowed grouping and ordering 246 marks (SSRs and AFLPs) in 10 linkage groups(chromosomes). The total length of the linkage map was 1897.3 cM and the average distance between the marks of 8.8 cM. Nine tolerance QTLs were mapped to eight linkage groups (chromosomes 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10), which explained 70.3% of the phenotypic variation. The results confirmed the three major QTL (bins 6.00, 8.05 and 10.01) described in the literature for Al tolerance, which accounted for most of the phenotypic variation (40.3%). The high number of mapped QTLs in this segregating F_{2:3} population confirms the quantitative inheritance of Al tolerance in the tropical maize germplasm.

Keywords: Tolerance loci. Composite interval mapping. Markers. Additive. Linkage map.

1 Introdução

A toxidez por alumínio (Al) tem sido reconhecida como o fator mais limitante para a produção de culturas em solos ácidos. Estudos indicam que aproximadamente 50% das terras cultivadas no mundo são constituídas por solos ácidos (VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995). No Brasil, os solos ácidos ocupam uma área de aproximadamente 205 milhões de hectares, dos quais 112 milhões são considerados apropriados para a agricultura (CAMARGO, 1991). A toxidez do Al reduz o crescimento do sistema radicular das plantas, tornando as culturas mais suscetíveis ao estresse hídrico e deficiências minerais e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade. A cultura do milho pode ser afetada drasticamente pelo efeito tóxico do Al que pode ocasionar reduções na produtividade em níveis superiores a 80% (DONCHEVA et al., 2005).

Nas últimas décadas, grandes esforços têm sido empregados na compreensão dos mecanismos responsáveis pela tolerância à toxicidade do Al em plantas. Genótipos tolerantes ao Al têm sido identificados em diferentes espécies vegetais, porém, os mecanismos fisiológicos e fatores genéticos responsáveis pela tolerância ao Al ainda são pouco compreendidos. Estudos genéticos sugerem que a tolerância ao Al em milho é uma característica de herança complexa (MAGNAVACA et al., 1987; PANDEY et al., 2007), envolvendo provavelmente múltiplos genes e, conseqüentemente vários mecanismos fisiológicos (SIBOV et al., 1999; NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003; PIÑEROS et al., 2005).

Diversos caracteres quantitativos em milho têm sido elucidados com sucesso através da utilização de marcadores moleculares e estratégias de mapeamento de QTLs, os quais têm contribuído significativamente para o melhor entendimento da herança genética de características agronômicas importantes, dentre elas a tolerância a estresses abióticos (STUBER et al., 1987; STUBER et al., 1992; VELDBOOM; LEE, 1996; LÜBBERSTEDT et al., 1998, NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003). Através da utilização do crescimento radicular como índice fenotípico, os estudos de mapeamento de QTLs para a tolerância ao Al resultaram na identificação de regiões genômicas associadas a tolerância nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 6, 8 e 10 de milho (SIBOV et al., 1999; NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2009, KRILL et al., 2010). Contudo, poucas destas regiões podem ser consideradas coincidentes entre os estudos realizados, devido à baixa saturação dos mapas de ligação de marcadores moleculares e das grandes distâncias físicas entre eles (cM).

A partir da combinação da análise de ligação e o mapeamento associativo, Krill et al. (2010) selecionaram quatro genes candidatos possivelmente associados com a tolerância ao Al

em milho. Os genes *ZmASL* (*Zea mays AltSB like*), *ZmALMT2* (*Zea mays aluminum-activated malate transporter2*), *SAHH* (*S-adenosyl-L-homocysteinase*) e *ME* (*Malic Enzyme*) explicaram de 13 a 20% da variância fenotípica do crescimento radicular líquido. Em outro estudo, Maron et al. (2010) identificaram e caracterizaram dois membros da família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, como genes maiores de tolerância ao Al em milho. O gene *ZmMATE1*, mapeado na região telomérica do cromossomo 6, codifica uma proteína transmembrana que media a exsudação de citrato no ápice radicular em milho. Esse resultado genético comprova os estudos fisiológicos que apontam a exsudação de citrato pelas raízes como o principal mecanismo de tolerância ao Al em milho (PIÑEROS et al., 2002). Por outro lado, a caracterização do *ZmMATE2* (mapeado no cromossomo 5) demonstrou que este gene é diferente do *ZmMATE1* e de outros MATEs envolvidos na tolerância ao Al em vários aspectos. Como não compartilha da mesma identidade na sequência dos aminoácidos com os MATEs, indicados para o transporte de citrato, possivelmente o *ZmMATE2* pode estar envolvido como um mecanismo diferente de tolerância (MARON et al., 2010). Entretanto, Piñeros et al. (2005) sugerem a existência de outros mecanismos complementares para tolerância ao Al nessa espécie. Recentemente, Guimarães et al. (2014) identificaram o gene *ZmNrat1*, homólogo ao gene *OsNrat1* que codifica um transportador específico de Al previamente envolvido na tolerância em arroz. Esta região foi mapeada no cromossomo 5 de milho nas proximidades do gene *ZmMATE2*.

O mapeamento de QTLs é relatado como uma das formas mais eficientes de associar características fenotípicas às genéticas, as quais contribuem de maneira significativa para os programas de melhoramento genético. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram identificar as regiões genômicas associadas à QTLs de tolerância ao Al e quantificar os efeitos fenotípicos destes QTLs para a tolerância ao estresse deste elemento em germoplasma de milho tropical.

2 Material e Métodos

2.1 Avaliação fenotípica das progênes F_{2:3}

A partir do cruzamento das linhagens endogâmicas L 04-2 (sensível) e L 99-4 (tolerante), foram obtidas as gerações F₁ e F₂. Os indivíduos da geração F₂ foram autofecundados, dando origem as progênes F_{2:3}, as quais foram avaliadas fenotipicamente para a tolerância ao Al em solução mínima.

Os tratamentos foram constituídos de 114 progênes F_{2:3}, além dos genitores (L_T 99-4 e L_S 04-2) e da geração F₁, os quais foram utilizados como controle experimental. O

experimento foi instalado no delineamento de blocos aleatorizados com três repetições. Foram avaliadas 12 plântulas de cada progênie por repetição. As sementes pré-germinadas foram avaliadas para o comprimento inicial da raiz principal em centímetros (PL – primeira leitura). Logo após, as plântulas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido e, então, depositadas em um tanque contendo solução composta de 4 mg L⁻¹ de Al + 40 mg L⁻¹ de Ca. Após 48 h de exposição, foi avaliado novamente o comprimento da raiz principal (SL - segunda leitura). A diferença entre as variáveis PL e SL (SL - PL) foi denominada de DIF (cm) (MAZZOCATO et al., 2002).

Os dados médios de DIF das progênies F_{2:3} foram submetidos à análise de variância, através do software R (R CORE TEAM, 2013). Adicionalmente, foram estimados os parâmetros genéticos através da esperança matemática dos quadrados médios da análise de variância de acordo com Vencovsky e Barriga (1992). A estimativa da variância genética foi obtida por: $\hat{\sigma}^2_g = 1/r(QMt - QMe)$, sendo (*r*) o número de repetições, (*QMt*) o quadrado médio das progênies e (*QMe*) o quadrado médio do erro, obtidos da análise de variância. A variância ambiental foi calculada através: $\hat{\sigma}^2_e = QMe$. A herdabilidade no sentido amplo foi estimada através: $\hat{h}^2 = \frac{\hat{\sigma}^2_g}{[\hat{\sigma}^2_g + (\hat{\sigma}^2_e/r)]}$. A partir das médias de DIF das 114 progênies F_{2:3} de milho, procedeu-se a análise de distribuição de frequência. O número de classes fenotípicas (*k*) foi estimado pela fórmula $k = \sqrt{n}$, onde *n* refere-se ao número total de progênies (*n*=114). A amplitude fenotípica de cada classe (AFC) foi determinada por $AFC = \frac{A}{K}$, onde *A* representa a amplitude de DIF observada entre as progênies de milho.

2.2 Genotipagem das progênies F_{2:3}

2.2.1 Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de folhas de plantas individuais da geração F₂, das linhagens endogâmicas (L_T 99-4 e L_S 04-2) e da geração F₁. A extração do DNA genômico seguiu o protocolo de Hoisington et al. (1994). O DNA foi ressuspenso em 40 µL de água ultrapura estéril e tratados com 2 µL de RNase (1,0 mg mL⁻¹) por 2 h à 37 °C em banho-maria.

2.2.2 Marcador SSR

Setenta e nove (79) locos microssatélites (SSR), distribuídos nos 10 grupos de ligação do mapa consenso de milho, foram amplificados nas linhagens endogâmicas (L_T 99-4 e L_S 04-2) a fim de selecionar locos polimórficos entre as linhagens parentais (Apêndice – Tabela 1A).

Os locos SSR foram selecionados do *Maize Genetics and Genomics Data Base – MaizeGDB* (<http://www.maizegdb.org>).

As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Biocycler Biosystems® baseadas nos protocolos de Senior et al. (1996) e de Ogliari et al. (2000). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi preparada em microtubos de 0,2 mL, contendo: 1X tampão (200 mM Tris-HCl - pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen); 2,0 mM MgCl₂; 0,1 mM de solução de dNTP (100 mM, Amresco®); 0,2 µM de cada *primer* (*forward e reverse*); 0,75 U de *Taq* DNA polimerase (5 U µL⁻¹, Invitrogen) e 40 ng de DNA molde para um volume final de reação de 20 µL. Para a otimização dos diferentes locos SSR foram utilizados 3 programas de PCR, sendo 2 do tipo *touchdown* (OGLIARI et al., 2000) e um de ciclagem normal (YAO et al., 2007).

As amostras amplificadas foram coradas com 4 µL de GelRed 0,1X mais tampão de carregamento (1:1) e separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X por aproximadamente 3 h a 80 V. Foi adicionado à extremidade esquerda do gel uma amostra de 5 µL do marcador de peso molecular de 100 pb (NORGEN®), visando determinar o tamanho dos fragmentos amplificados.

Os 114 indivíduos da população de mapeamento (F₂) foram genotipados para cada loco polimórfico com a codificação: (- 1) fragmento amplificado correspondente ao alelo SSR oriundo da linhagem sensível L_S 04-2, (1) fragmento amplificado correspondente ao alelo SSR oriundo da linhagem tolerante L_T 99-4 e (0) presença dos dois fragmentos correspondentes aos alelos das linhagens parentais L_S 04-2 e L_T 99-4.

2.2.3 Marcador AFLP

Inicialmente, foram testadas 25 combinações de *primers* *Eco*RI e *Mse*I, visando selecionar aquelas combinações com melhor padrão de amplificação e maior polimorfismo entre as linhagens parentais. Utilizando este critério foram escolhidas 12 combinações para genotipar a população de mapeamento.

A metodologia de amplificação do marcador AFLP foi realizada de acordo com Vos et al. (1995), sendo composta de quatro etapas: 1º) A dupla digestão enzimática do DNA com *Eco*RI + *Mse*I, 2º) Ligação dos adaptadores, 3º) Pré-amplificação dos fragmentos com *primers* contendo um nucleotídeo seletivo na posição 3' e 4º) Amplificação seletiva através da combinação de *primer* *Eco*RI e *Mse*I com 3 bases seletivas na posição 3'. Os produtos da amplificação seletiva foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) em cuba vertical modelo Sequi-Gen GT da BIORAD®. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X a 80W de potência por aproximadamente 3 h e 30 min. Para determinar o tamanho dos

fragmentos foram adicionados às extremidades do gel 10 µL do marcador de 50pb (NORGEN). Os géis foram corados com impregnação pelo íon prata segundo Creste, Tulmann Neto e Figueira (2001). Os fragmentos polimórficos amplificados para cada combinação de *primers* *EcoRI* + *MseI* na população de mapeamento foram genotipados para presença (1) ou ausência (0) do fragmento.

2.3 Análise de ligação e mapeamento por intervalo composto

Os locos SSRs e AFLPs que apresentaram segregação mendeliana esperada (não distorcidos) foram utilizados para a construção do mapa de ligação com o auxílio do programa MAPMAKER versão 3.0 (LANDER et al., 1987). A construção dos grupos de ligação baseou-se no comando “group” utilizando um LOD de 3,0 (método da máxima verossimilhança) e frequência máxima de recombinação $\theta = 0,20$. As frequências de recombinação foram convertidas em distâncias de mapa utilizando a função de mapeamento de Haldane (1919). Após a definição dos grupos de ligação, os marcadores dentro de cada grupo foram ordenados pelo comando “order” com um LOD maior que 3,0. Para garantir a correta ordenação dos marcadores, foi utilizado o comando “ripple”.

As análises de mapeamento dos QTLs foram realizadas utilizando-se as médias de DIF das 114 progênies $F_{2:3}$ do cruzamento L_T 99-4 x L_S 04-2 avaliadas para tolerância ao Al. Para o mapeamento dos QTLs foi utilizada a análise de mapeamento por intervalo composto (MIC) com o auxílio do programa *QTLCartographer*® (Basten et al., 2000). Para o posicionamento dos QTLs a análise MIC utilizou o mapa de ligação dos marcadores moleculares gerado no programa MAPMAKER versão 3.0. A estimativa da posição, efeito genético e porcentagem da variação fenotípica (dada pelo coeficiente de correlação parcial, R^2) dos QTLs foi estabelecida nos picos de LOD acima do nível de significância considerado (2,5), de acordo com o programa *QTLCartographer*®.

3 Resultados

3.1 Fenotipagem das progênies $F_{2:3}$

Os resultados da análise de variância demonstraram efeito altamente significativo ($p < 0,01$) dos tratamentos (progênies $F_{2:3}$, linhagens parentais e geração F_1) para a variável DIF. O coeficiente de variação foi baixo (6,9%) e adequado para experimentos de fenotipagem. A decomposição dos componentes da variância fenotípica indicou predomínio da variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$) em relação à variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$). O coeficiente de herdabilidade no sentido amplo ($\hat{h}_a^2$) estimado foi de grande magnitude (Tabela 10).

Tabela 10- Resumo da análise de variância de DIF (diferença de crescimento radicular) em função dos parentais (LT 99-4 x LS 04-2), geração F₁ e progênes F_{2:3} de milho e parâmetros genéticos associados à variável. Ponta Grossa, 2015.

Fontes de Variação	GL	Quadrados Médios (QM)
		DIF (cm)
Blocos	2	0,1541**
Tratamentos	116	0,4096**
Resíduo	232	0,0139
CV (%)		6,9
Média		1,7
Parâmetro genéticos		
$\hat{\sigma}_e^2$		0,0139
$\hat{\sigma}_g^2$		0,8403
$\hat{h}_a^2$		0,9946

$\hat{\sigma}_e^2$: variância ambiental; $\hat{\sigma}_g^2$: variância genética; $\hat{h}_a^2$: herdabilidade no sentido amplo.

Os resultados da distribuição de frequência das progênes F_{2:3} de milho nas classes de DIF, podem ser visualizados na Figura 2. Foi possível identificar uma tendência de distribuição simétrica entre as classes fenotípicas de DIF, de forma semelhante à uma curva de distribuição normal, apresentando classes que variaram de 0,75 a 2,62 cm. A análise confirmou o contraste fenotípico para a tolerância ao Al entre as linhagens parentais L_T 99-4 (tolerante) e L_S 04-2 (sensível) a partir da diferença de crescimento radicular. A linhagem tolerante L_T 99-4, permaneceu na classe fenotípica de 1,27 a 1,43 cm, juntamente com a geração F₁. Por outro lado, a linhagem sensível L_S 04-2, ranqueou na 1ª classe fenotípica (0,75 a 0,92 cm). Verificou-se que apenas quatro (3,5%) progênes foram ranqueadas nas classes sensíveis (até 1,09 cm). Por outro lado, 82% (93) das progênes permaneceram nas classes superiores à 1,43 cm, sendo também, superiores ao parental tolerante L_T 99-4 e a geração F₁ (Figura 2).

3.2 Genotipagem das progênes F_{2:3}

3.2.1 Marcador SSR e AFLP

Dos 79 locos SSR analisados, 60 (76 %) não foram informativos, isto é, não revelaram polimorfismo e 19 (24 %) foram polimórficos entre as linhagens (Tabela 11). O maior número de locos polimórficos foi observado no grupo de ligação 8, com 5 locos SSR (Tabela 11). O maior polimorfismo foi associado principalmente na região genômica compreendida entre os grupos/bins 8.04 a 8.08.

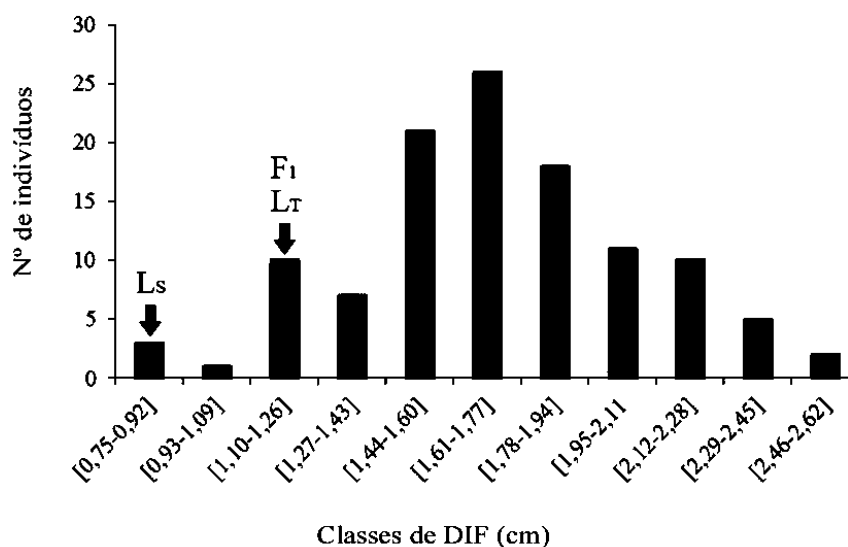


Figura 2 - Distribuição das progêneses F_{2:3} de milho do cruzamento L_T 99-4 x L_S 04-2 nas classes de DIF (diferença de crescimento radicular. L_T = parental tolerante, L_S = parental sensível e F₁ = geração F₁. Ponta Grossa, 2015.

Tabela 11- Distribuição dos locos microssatélites polimórficos e monomórficos entre as linhagens parentais L99-4 e L04-2, nos grupos de ligação do mapa consenso de milho. Ponta Grossa, 2015.

Locos SSR	Grupos de Ligação										Total	%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Polimórficos	1	1	1	2	2	2	2	5	1	2	19	24
Monomórficos	6	4	9	9	7	8	3	6	4	4	60	76
Total	7	5	10	11	9	10	5	11	5	6	79	100

Das 25 combinações de primers *EcoRI* + *MseI*, 12 foram escolhidas para genotipar os 114 indivíduos da população de mapeamento. As 12 combinações de primers amplificaram 695 fragmentos, com tamanho variando de 70 a 2000 pb. Dos fragmentos amplificados, 460 (66%) foram monomórficos e 235 (34%) polimórficos entre as linhagens parentais (L_T 99-4 e L_S 04-2), com média de 20 locos polimórficos por combinação de primers. O polimorfismo variou entre as combinações, sendo a E35M51 (E-ACA/M-CCA) com maior polimorfismo (79,4%), ao passo que a E42M48 (E-AGT/M-CCA) com o menor polimorfismo (41,2%) (Tabela 12).

3.3 Mapa de ligação

Dos 444 fragmentos polimórficos (SSRs e AFLPs), somente 254 foram utilizados na construção do mapa de ligação (Tabela 13). Duzentos e quarenta e seis (246) marcas foram agrupadas entre os 10 grupos de ligação (cromossomos) do milho, utilizando como critério de

Tabela 12 - Número total de fragmentos amplificados (monomórfico e polimórfico) e porcentagem de polimorfismo para 12 combinações de primers *EcoRI* + *MseI* genotipadas na população de mapeamento de milho. Ponta Grossa, 2015.

Nº	Código Primer	Combinação <i>EcoRI</i> + <i>MseI</i>	Fragmentos	Monomórficos	Polimórficos	Polimorfismo (%)
1	E42/M48	E-AGT/M-CCA	51	30	21	41,2
2	E42/M51	E-AGT/M-CCA	52	23	29	55,8
3	E42/M60	E-AGT/M-CTC	58	31	27	46,6
4	E42/M50	E-AGT/M-CAT	48	18	30	62,5
5	E44/M48	E-ATC/M-CAC	51	26	25	49,0
6	E44/M51	E-ATC/M-CCA	69	18	51	73,9
7	E40/M48	E-AGC/M-CAC	53	15	38	71,7
8	E40/M50	E-AGC/M-CAT	57	18	39	68,4
9	E35/M51	E-ACA/M-CCA	63	13	50	79,4
10	E32/M48	E-AAC/M-CAC	61	13	48	78,7
11	E32/M60	E-AAC/M-CTC	64	27	37	57,8
12	E32/M50	E-AAC/M-CAT	68	38	30	44,1
Total			695	270	425	61,2

agrupamento LOD de 3,0 e frequência máxima de recombinação de $\theta = 0,20$ e função de mapeamento de Haldane. Como os locos SSRs possuem localização genômica conhecida, foi possível estabelecer correspondência dos grupos de ligação obtidos da análise com os 10 cromossomos do milho (Figura 3). Das marcas agrupadas, 218 (88%) foram ordenadas nos 10 grupos de ligação, utilizando $\text{LOD} > 3,0$. O número de marcas ordenadas oscilou de 18 no cromossomo 7 a 31 no cromossomo 8, com média de 21,8 marcas por cromossomo. O comprimento total do mapa de ligação foi de 1897,0 cM, com distância média entre marcas de 8,8 cM. O comprimento dos grupos de ligação variou de 116,7 no grupo 7 a 244,8 cM no grupo 4 (Tabela 13).

Tabela 13- Resultados da análise de ligação dos marcadores SSRs e AFLPs na construção do mapa genético da população $F_{2:3}$ de milho. Número de marcas agrupadas, ordenadas, comprimento dos grupos de ligação (cM) e distância média entre marcas (DM). Ponta Grossa, 2015.

Grupo de Ligação/Cromossomo	Marcas		Comprimento (cM)	DM (cM)
	Agrupadas	Ordenadas		
1	26	23	198,8	8,6
2	22	21	177,3	8,4
3	26	22	230,9	10,5
4	25	23	244,7	10,6
5	21	20	207,2	10,4
6	22	19	167,3	8,8
7	24	18	116,9	6,5
8	33	31	175,9	5,7
9	21	19	196,8	10,3
10	26	22	181,7	8,3
Não agrupadas	8	-	-	-
Não Ordenadas	-	28	-	-
Total	246	218	1897,3	8,8

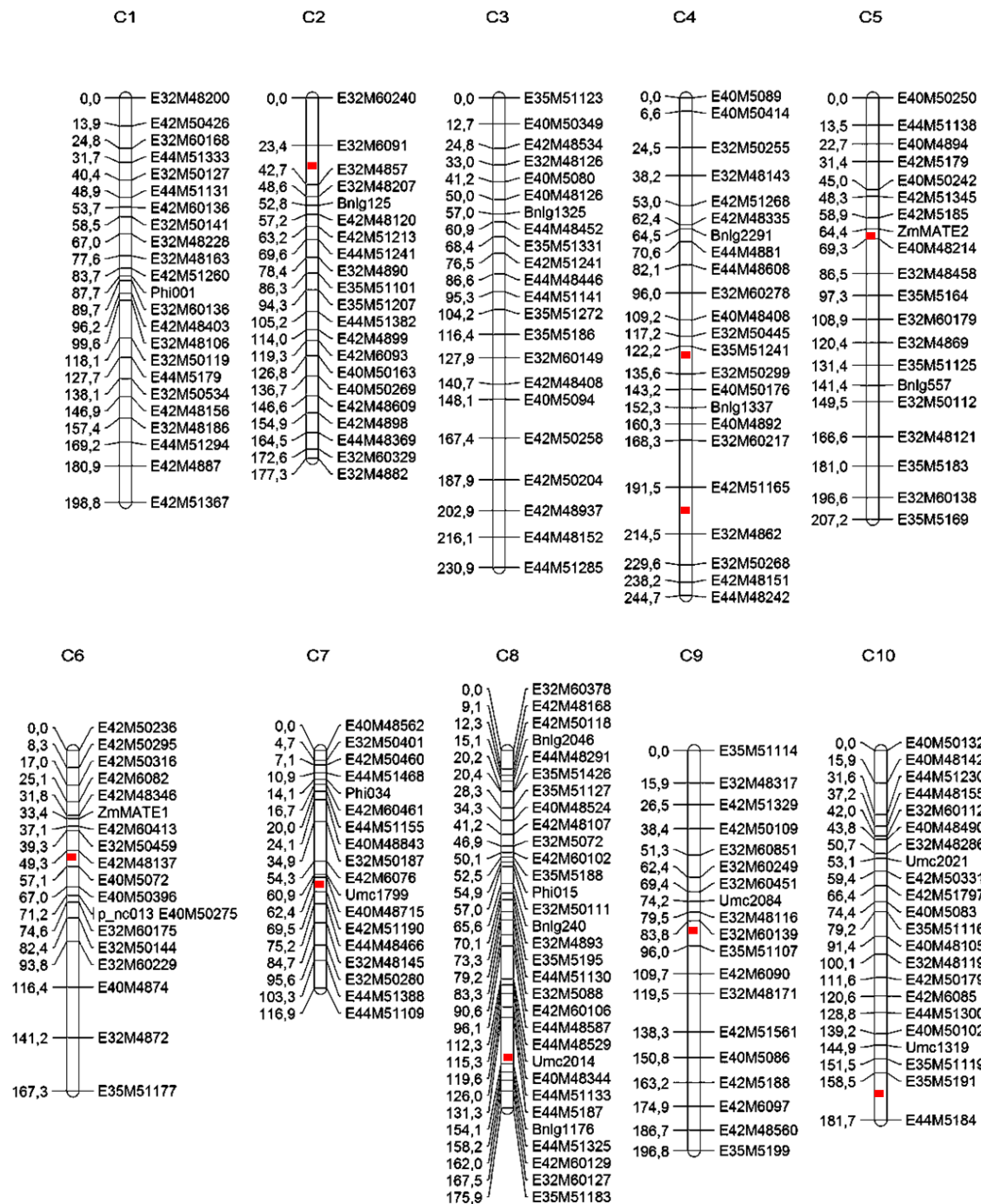


Figura 3- Mapa genético gerado pelos marcadores SSRs e AFLPs em uma população de mapeamento de milho. À direita estão os locos marcadores (SSR e/ou AFLP) e a esquerda as distâncias em cM segundo a função de mapeamento de Haldane. Os pontos vermelhos indicam as posições de QTLs de tolerância ao Al. Ponta Grossa, 2015.

3.4 Mapeamento dos QTLs

As estimativas das posições e dos efeitos aditivos e de dominância dos QTLs estão apresentadas na Tabela 14. O gráfico com os valores do LOD score ao longo dos grupos de ligação (cromossomos) pode ser visualizado na Figura 4. Foram detectados QTLs em nove intervalos distribuídos em oito cromossomos (2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10). A proporção da variação fenotípica explicada por estes QTLs variou de 2,1 % para o QTL do grupo de ligação 2 na posição 34,0 cM à 17,7 % para o QTL no grupo 8 (149,0 cM), o qual obteve também o maior valor de LOD score no intervalo E44M5187 - Bnlg1176, com LOD de 20,8. Juntos, os nove QTLs explicaram 70,3% da variação fenotípica para a variável DIF. Os efeitos aditivos para o DIF variaram de - 0,56 para o QTL do grupo de ligação 4 na posição 125 cM a 0,55 no QTL mapeado na posição 149,0 cM do cromossomo 8 (Tabela 14).

Tabela 14- LOD score, posição (cM), proporção da variação fenotípica (R^2), estimativa dos efeitos aditivos (a) e de dominância (d) explicados pelos QTLs mapeados pela metodologia de mapeamento por intervalo composto em uma população de 114 progênies $F_{2:3}$ de milho. Ponta Grossa, 2015.

GL*	Intervalo entre Marcadores		LOD	Posição (cM)	R^2 (%)	a	d
2	E32M6091 23,4	E32M48207 42,7	15,4	34,0	2,11	- 0,52	- 0,54
4	E35M51241 122,2	E32M50299 135,6	17,9	125,0	5,57	- 0,56	- 0,46
4	E42M51165 185,0	E32M4862 208,0	16,7	197,0	8,70	- 0,51	- 0,56
5	<i>ZmMATE2</i> 64,4	E40M48214 69,3	3,21	68,0	7,78	- 0,43	1,01
6	E42M48137 49,3	E40M5072 57,1	13,0	51,0	10,57	0,01	1,05
7	E40M48715 62,4	E42M51190 69,5	15,7	63,0	2,71	0,03	0,91
8	E44M5187 131,3	Bnlg1176 154,1	20,8	149,0	17,68	0,55	- 0,47
9	E32M60139 83,8	E35M51107 96,0	6,6	85,0	3,13	- 0,51	- 0,58
10	E35M5191 158,5	E44M5184 181,7	14,5	166,0	12,08	0,09	1,11
R^2_T **					70,3		

*GL= Grupo de Ligação. ** R^2_T = proporção da variância fenotípica total explicada pelos QTLs.

4 Discussão

O alto valor de herdabilidade associado ao predomínio da variância genética em relação à ambiental indica que a seleção de genótipos de milho tolerantes ao Al pode ser facilmente realizada em solução mínima, utilizando-se a diferença de crescimento radicular como índice fenotípico. A grande amplitude de DIF (0,75 a 2,62 cm) nas progênies $F_{2:3}$ avaliadas demonstra a presença de elevada variabilidade genética para a tolerância ao Al na população de estudo. Este fato pode estar correlacionado com a hipótese de que mais de um tipo de mecanismo de

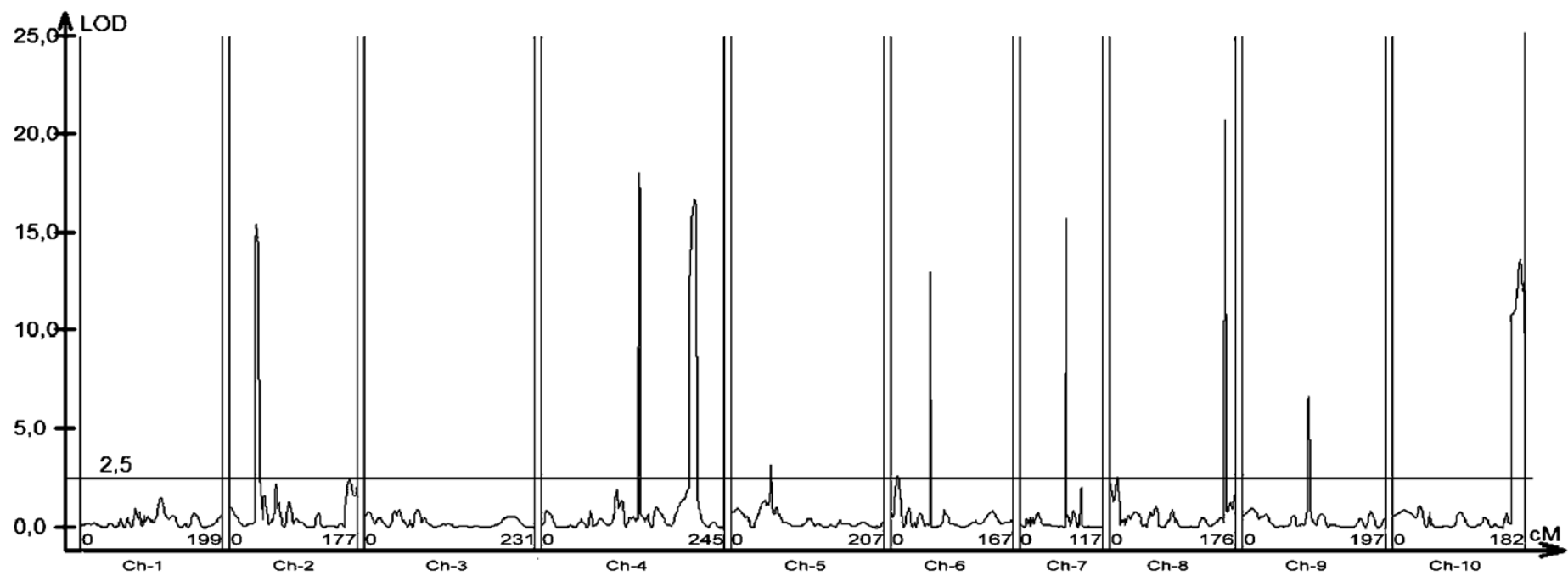


Figura 4- Distribuição do LOD score ao longo dos cromossomos onde foram mapeados QTLs de tolerância ao Al em milho. No eixo das abscissas é representado o grupo de ligação (cromossomos) e no eixo das ordenadas os valores de LOD score. Ponta Grossa, 2015.

tolerância pode estar atuando na tolerância ao Al. Piñeros et al. (2005) descrevem que, além da exsudação de citrato pelas raízes, outros mecanismos fisiológicos, como a complexação do Al nos vacúolos celulares e a modificação do pH na rizosfera, podem estar envolvidos. Entretanto, para melhores esclarecimentos dos mecanismos de tolerância ao Al em milho, uma abordagem envolvendo estudos genéticos, biologia molecular e investigações fisiológicas deve ser realizado.

A localização cromossômica dos fragmentos AFLPs foi obtida a partir dos resultados da análise de ligação com os locos microssatélites, os quais possuem localização conhecida no mapa consenso do milho (SENIOR et al., 1996). Dessa forma, os locos SSRs atuaram como “âncoras” para os fragmentos AFLPs sem localização prévia. Assim, é possível desenvolver mapas de ligação com alta saturação, uma vez que o custo atrelado ao marcador AFLP é menor e o número de locos amostrados por reação para este marcador é bastante superior ao marcador microssatélite (SSR). Os 19 locos SSRs possibilitaram co-localizar 227 fragmentos AFLPs no mapa consenso de milho. Os resultados permitiram atribuir referência cromossômica aos 10 grupos de ligação do milho, por meio da presença de, pelo menos, um loco SSR por grupo de ligação. A amplitude do comprimento dos grupos de ligação (116,7 a 244,7 cM) e o comprimento total do mapa de ligação (1897,3 cM) estão de acordo com outros mapas genéticos obtidos de populações segregantes de milho (LOPES, 2003; MATIELLO, 2004; TASIOR, 2014; ROMANEK, 2014; JARDIM, 2007).

De maneira geral, para a construção de mapas de ligação com marcadores, o ideal é que a distância média entre marcas seja aproximadamente de 20,0 cM (FANG; WU, 2003). Neste sentido, a saturação média obtida para o presente mapa de ligação demonstra boa cobertura do genoma analisado na população segregante oriunda do cruzamento das linhagens contrastantes para tolerância ao Al (L_T 99-4 x L_S 04-2), uma vez que a distância média alcançada entre as marcas foi de 8,8 cM. Sibov et al. (2003), ao genotiparem uma população F_2 de milho tropical com 117 locos SSRs, obtiveram um mapa com 1643 cM de comprimento e distância média entre marcas de 14 cM. Mangolin et al. (2004), a partir de 75 locos SSRs genotipados numa população segregante de milho tropical, geraram mapa com 1438 cM de comprimento e distância média entre marcas de 18,1 cM. Jardim (2007), avaliando a tolerância ao Al em linhagens endogâmicas recombinantes (*RILs* – *Recombinant Inbred Lines*) a partir de marcadores SSRs e RFLPs, obteve um mapa de ligação com 1657 cM de comprimento e distância média entre os marcadores de 11,75 cM. Ninamango-Cárdenas et al. (2003) geraram

um mapa de marcadores SSRs e RFLPs com 296,7 cM de comprimento, com distância média entre marcadores de 9,0 cM.

O mapeamento por intervalo composto (MIC) possibilitou mapear nove QTLs em diferentes regiões genômicas associadas com tolerância ao Al neste germoplasma de milho. Além do grande número de QTLs mapeados, em nenhum outro trabalho de mapeamento foi possível observar ampla distribuição dos QTLs ao longo do genoma do milho, sendo localizados nos cromossomos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Sibov et al. (1999) mapearam 2 regiões genômicas associadas à QTLs de tolerância ao Al (*Alm1* e *Alm2*) nos cromossomos 10 e 6, respectivamente, a partir de uma população F₂ obtida do cruzamento entre linhagens contrastantes para a tolerância. Os autores relataram que o gene *Alm1* explicou a maior parte da variação fenotípica do comprimento radicular líquido (24,2%), sendo três vezes superior ao *Alm2* (7,7%). Ninamango-Cárdenas et al. (2003) mapearam cinco regiões genômicas envolvidas com tolerância ao Al, a partir da análise de mapeamento por intervalo composto. Os QTLs foram localizados nos cromossomos 2, 6 e 8, explicando 60% da variação fenotípica da tolerância. Da mesma forma, Conceição et al. (2009) identificaram cinco regiões genômicas associadas à QTLs de tolerância nos cromossomos 4, 5, 6, 8 e 10. Juntos, os QTLs explicaram 41% da variação fenotípica, sendo a maior associação com o crescimento radicular obtida pelo QTL do cromossomo 10, responsável por 15% da variação fenotípica para tolerância ao Al.

A partir de abordagens genômicas e fisiológicas, Krill et al. (2010), selecionaram 22 genes candidatos à tolerância ao Al, os quais foram avaliados por análise de associação. Dos 22 genes estudados, seis apresentaram resultados significantes para a expressão da tolerância pela análise de associação, entretanto, apenas quatro foram confirmados pela análise de ligação. Os genes candidatos, *ZmASL*, *ALMT2*, *SAHH* e *ME*, foram mapeados nos cromossomos 1, 10, 6 e 4, respectivamente, sendo responsáveis por 13 a 20% da variância fenotípica do crescimento radicular líquido. Recentemente, Guimarães et al. (2014) identificaram cinco regiões genômicas significativamente associadas à QTLs de tolerância ao Al, utilizando 54.455 marcadores SNPs (*Single-Nucleotide Polymorphism*) em uma população de RILs derivada da linhagem Cateto Al237. Estas regiões foram mapeadas nos cromossomos 2, 3, 5, 6 e 8, responsáveis por 62,8% da variação fenotípica em tolerância.

De maneira geral, os vários trabalhos de mapeamento de QTLs associados à tolerância ao Al em milho apontam o cromossomo 6 com o maior número de QTLs identificados (SIBOV et al., 1999; NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2009; KRILL et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2014). Neste estudo, o QTL mapeado na posição 51 cM do

cromossomo 6, está a apenas 17,6 cM de distância do marcador *ZmMATE1*, o qual refere-se ao gene mapeado na região telomérica do cromossomo 6 (bin 6.00) por Maron et al. (2010).

Ninamango-Cárdenas et al. (2003) localizaram no final do cromossomo 6 (bin 6.00) o *QTL₂*, o qual foi primeiramente identificado através da metodologia BSA e, posteriormente, confirmado pela análise de regressão linear e pelo mapeamento por intervalo composto. Os autores associaram este QTL ao descrito por Sibov et al. (1999) e identificado como *Alm2*, confirmando que esta região pode ancorar genes envolvidos na tolerância ao Al. Maron et al. (2010) atribuíram esta região ao gene *ZmMATE1*, que codifica uma proteína transmembrana que media a exsudação de citrato no ápice radicular em milho. A exclusão do Al pelo ápice radicular através da exsudação de citrato é amplamente reconhecido como o principal mecanismo de tolerância ao Al na cultura do milho (PIÑEROS et al., 2005). Em contraste com estas afirmações, Matiello et al. (2012) reportaram outro tipo de mecanismo que pode estar associado com a tolerância ao Al em milho. A partir de uma análise de associação de dados de *microarrays* à QTLs de tolerância ao Al descritos na literatura, os autores mapearam nesta mesma região do cromossomo 6 um gene constitutivo que apresentou alta identidade com o gene *SMP1* (*Sweellmap 1 gene*). Em estudos de organogênese e crescimento celular, Clay e Nelson (2005) verificaram que um genótipo mutante de *Arabidopsis* nocauteado para este gene apresentou folhas com menor tamanho e com menor número de células, fenótipo causado pela parada precoce da divisão celular nos primórdios foliares. Entretanto, a superexpressão deste gene reduziu o tamanho das folhas, porém, aumentou o número de células finais. Conforme observado por Doncheva et al. (2005), o Al interfere no ciclo celular e na diferenciação das células do ápice radicular do milho. Portanto, a expressão constitutiva do gene *SMP1* em um genótipo tolerante pode favorecer a manutenção da divisão celular mesmo quando as raízes estão sujeitas ao estresse.

Posteriormente, Guimarães et al. (2014) confirmaram a presença de um QTL (*qALT6*) nesta região, associada ao gene *ZmMATE1*. Os autores demonstraram que a elevada expressão deste gene possibilitou o dobro de tolerância em linhagens de milho quase isogênicas (*NILs* – *Near-Isogenic Lines*) quando o *qALT6* foi introgridido em linhagens sensíveis. Estas NILs apresentaram três cópias do gene *ZmMATE1*, confirmando que o alelo de tolerância havia sido transferido. Os resultados deste trabalho dão suporte às investigações de Maron et al. (2010) em que o *ZmMATE1*, adjacente à região do *qALT6*, aumentou a tolerância ao Al, sendo regulado pela presença do estresse abiótico (Al).

Além da região genômica do bin 6.00, Ninamango-Cárdenas et al. (2003) também mapearam um QTL no bin 6.05 deste mesmo cromossomo, explicando 15,6% da variação

fenotípica do crescimento radicular. Esta mesma região foi mapeada mais tarde por Conceição et al. (2009). Através da combinação da análise de ligação e o mapeamento associativo, Krill et al. (2010) associaram esta região ao gene *ME* (*Malic Enzyme*), o qual catalisa a conversão do malato em piruvato. Este gene pode ajudar a regular a concentração de malato no citosol, o qual foi descrito como o principal mecanismo de tolerância ao Al em trigo. Neste sentido, o malato, associado à exsudação de outros ácidos orgânicos, atuaria quelando o Al absorvido via apoplasto, detoxificando o ápice radicular.

No presente trabalho, a maior percentagem da variação fenotípica do DIF (17,7 %), foi explicada pelo QTL mapeado no cromossomo 8, associado ao marcador microssatélite Bnlgl1176, localizado no bin 8.05. Similarmente, Ninamango-Cárdenas et al. (2003) mapearam um QTL associado à tolerância ao Al próximo a este bin (bin 8.04). Mais tarde, esta mesma região foi confirmada nos trabalhos de mapeamento desenvolvidos por Conceição et al. (2009) e Guimarães et al. (2014). Os autores associaram esta região ao gene *idh1*, o qual codifica a Isocitrato deidrogenase, uma enzima relacionada ao ciclo do ácido tricarboxílico (citrato) e outras reações envolvendo o metabolismo de ácidos orgânicos. Da mesma forma, Matiello et al. (2012) identificaram um QTL na região descrita por Ninamango-Cárdenas et al. (2003). Entretanto, esses autores, associaram esta região ao gene que codifica proteínas do tipo *Pirin*. Em estudos com suspensão de células de tomate tratadas com indutor de morte celular, Orzaez et al. (2001) verificaram expressão significativa do gene *LePirin*. Este gene é ortólogo à proteína PIRIN presente em humanos, envolvida na transcrição do fator *NE-kB*, o qual promove a transcrição de diversos genes anti-apoptose (FOO; NOLAN, 1999). Em estudos com duas linhagens endogâmicas de milho contrastantes para a tolerância ao Al, Boscolo et al. (2003) demonstraram que as células do ápice radicular da linhagem sensível morreram após o tratamento com Al. Em contrapartida, o mesmo não foi observado para a linhagem tolerante. Estes resultados indicam que as proteínas tipo *Pirin* estão envolvidas na ativação de genes anti-apoptose, os quais atuam prolongando a viabilidade celular durante o período de exposição ao Al.

O QTL mapeado no cromossomo 10, distante 21 cM do marcador SSR Umc1319 (bin 10.01), também apresentou elevada contribuição para a variação fenotípica (12,1 %). Nesta mesma região, Conceição et al. (2009) identificaram um QTL envolvido na tolerância ao Al em milho, associado ao marcador SSR Umc1318. Os autores relatam que esta região está muito próxima ao QTL mapeado por Sibov et al. (1999) no bin 10.03, denominada de *Alm1*. Da mesma forma, Krill et al. (2010) identificaram um QTL no bin 10.04 deste cromossomo. Os autores atribuíram este QTL ao gene *ZmALMT2* (*Zea mays aluminum-activated malate*

transporter 2). As proteínas da família ALMT2 estão relacionadas com a tolerância ao Al em trigo, *Arabidopsis* e canola. Quando ativadas pela presença do Al em níveis tóxicos, as proteínas codificam um transportador de malato que quela o elemento e induz uma mudança conformacional, abrindo os canais de ânions para a posterior exsudação pelas células da raiz (KRILL et al., 2010). Recentemente, Matiello et al. (2012) confirmaram, através de *microarrays*, que esta região pode ancorar genes de tolerância ao Al. A marcação Zm.5637.1.A1_at, localizada dentro do QTL *Alm1* (SIBOV et al., 1999), codifica o precursor 8 da proteína endotransglicolase xiloglucano, a qual interage com novos xiloglucanos sintetizados nas paredes celulares que contribuem para o crescimento radicular. Os autores enfatizam que a expressão constitutiva deste gene em genótipos tolerantes indica que o contínuo processo de renovação da parede celular pode ser relevante na tolerância ao Al em milho.

Os estudos de Maron et al. (2010) mapearam um segundo membro da família MATE (denominado *ZmMATE2*) explicando grande parte da variação fenotípica (16%) para a tolerância ao Al em milho. Este gene foi mapeado entre os marcadores Bnlg105 e Umc1056, localizados nos bins 5.02 e 5.03, respectivamente. Entretanto, o estudo demonstrou que este gene é diferente do *ZmMATE1* e de outros MATEs envolvidos na tolerância ao Al em vários aspectos. Além de não ser regulado pela presença do Al, o *ZmMATE2* não compartilha da mesma identidade na sequência dos aminoácidos com os MATEs, indicados para o transporte de citrato, podendo estar envolvido com um mecanismo diferente de tolerância. Neste estudo, foi possível a identificação de um QTL mapeado à apenas 3,6 cM do marcador *ZmMATE2*, explicando 7,8 % da variação fenotípica para a tolerância. Apesar da menor contribuição deste QTL quando comparado àquele relatado por Maron et al. (2010), pode-se inferir que esta região está associada à tolerância ao Al em milho. Em contrapartida, o trabalho descrito por Guimarães et al. (2014) revelou que a tolerância ao Al relacionada ao QTL mapeado nesta região (*qALT5*) não é controlada pelo gene *ZmMATE2*. Além de não observar expressão diferencial do gene entre as linhagens tolerante e sensível, os autores confirmaram que as sequências de aminoácidos em ambos os genótipos para o *ZmMATE2* são idênticas. Adicionalmente, este mesmo estudo identificou fora do intervalo de confiança do *qALT5*, mas próximo a um pico de QTL conhecido, um gene do milho homólogo ao *Nrat1* do arroz. O *OsNrat1* codifica um transportador específico de Al (Nrap) envolvido na absorção intracelular do Al em arroz. Os estudos demonstraram que a expressão do gene *ZmNrat1* é rapidamente induzida em genótipos de milho tolerantes, enquanto que em genótipos sensíveis ela é mais tardia. Apesar da ausência de significância do QTL que contém o *ZmNrat1*, a homologia com o *Nrat1* do arroz e a

expressão diferencial em genótipos tolerantes e sensíveis, justificam maiores investigações do envolvimento deste gene no mecanismo de detoxificação interna do Al em milho.

O QTL mapeado no cromossomo 2, na posição 34,0 cM, representou a menor contribuição para a variação fenotípica, com apenas 2,1 % da tolerância ao Al na população avaliada. Esta região foi mapeada à 18,8 cM do marcador SSR Bnlg125, com posição reconhecida no bin 2.02. Neste mesmo cromossomo, Ninamango-Cárdenas et al. (2003) identificaram um QTL no bin 2.06, o qual explicou 10,9% da variação fenotípica. Matiello et al. (2012) revelaram não haver funções conhecidas para os genes presentes nesta região genômica.

Outros dois QTLs foram mapeados no cromossomo 4 nas posições de 125,0 e de 197,0 cM. Apesar de apresentarem distância de 72 cM entre si, ambos os QTLs possuem como referência mais próxima o marcador SSR Bnlg1337, posicionado no bin 4.11. Nenhum outro trabalho científico relatou QTLs de tolerância ao Al associados à esta região do cromossomo 4. Entretanto, Conceição et al. (2009) e Krill et al. (2010) identificaram QTLs significativos no bin 4.03. Krill et al. (2010) associaram a tolerância ao Al deste QTL ao gene *SAHH* (*S-adenosyl-L-homocysteine*), o qual ativa um inibidor de SAM (*S-adenosylmethionine*) que media a metilação de qualquer organismo. Estudos publicados por Eticha et al. (2005) e Yang et al. (2008) relataram correlação da metilação da pectina da parede celular com a tolerância e exclusão do Al em raízes de milho e arroz, respectivamente. Este fato confirma a possibilidade do *SAHH* estar envolvido na expressão da tolerância através da modificação da parede celular.

Os últimos dois QTLs mapeados neste estudo nos cromossomos 7 e 9, demonstraram baixa contribuição na variação fenotípica da tolerância ao Al (2,7 e 3,1 %, respectivamente). O QTL no cromossomo 7 foi mapeado a apenas 2,1 cM de distância do marcador SSR Umc1799, localizado no bin 7.06. O QTL do cromossomo 9 foi mapeado a 10,8 cM do marcador SSR Umc2084 (bin 9.01). Este é o primeiro trabalho que mapeou QTLs de tolerância ao Al nestes cromossomos/posições. De acordo com o mapa consenso dos locos microssatélites de milho do *Maize Genetics and Genomics Data Base – MaizeGDB*, não existem referências de genes de tolerância ao Al para estas duas regiões genômicas.

Em síntese, três regiões genômicas do milho foram confirmadas no presente trabalho, coincidindo com a maioria dos estudos de mapeamento de QTLs envolvidos na tolerância ao Al. Adicionalmente, verificou-se que além de explicarem grande parte da variação fenotípica para a tolerância, estas regiões estiveram associadas a genes referenciados no genoma do milho à possíveis mecanismos de tolerância ao Al. O cromossomo 6 apresenta a principal e mais bem descrita região genômica (bin 6.00), seguido do cromossomo 8 (bins 8.04 a 8.07) e do

cromossomo 10 (bins 10.01 à 10.04). O elevado número de QTLs mapeados nesta população segregante, confirma o padrão de herança quantitativa para a tolerância ao Al em milho de origem tropical.

CAPÍTULO 3 - ANÁLISE DA TOLERÂNCIA AO AL EM GENÓTIPOS DE MILHO TROPICAL CONTRASTANTES POR MEIO DE ESTUDOS DA EXPRESSÃO GÊNICA, SEQUENCIAMENTO E COLORAÇÃO DIFERENCIAL

Resumo – Os objetivos deste trabalho foram avaliar a homologia das sequências dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* com aquelas depositadas nos bancos internacionais de sequências; quantificar a expressão diferencial dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1*; e caracterizar a tolerância ao alumínio (Al) através da coloração com hematoxilina em germoplasmas de milho crioulo e híbrido submetidos ao estresse por alumínio (Al) em solução mínima. Cinquenta e dois híbridos de diferentes empresas e 50 variedades crioulas de milho do programa de melhoramento da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) foram genotipados para os genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2*. Adicionalmente, os dados da genotipagem e do ITR (Índice de Tolerância Relativa) foram utilizados na análise de agrupamento. O *screening* molecular dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* nos germoplasmas de milho híbrido e de variedades crioulas não evidenciou associação dos fragmentos amplificados com os índices de tolerância ao Al. Entretanto, o padrão de amplificação dos controles tolerantes e sensíveis para o *ZmMATE1* (H 44 e V 18, H 22 e V 25, respectivamente), possibilitou identificar possíveis diferenças de tolerância associadas ao polimorfismo existente entre os genótipos. Utilizando-se os algoritmos *GeNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper*, verificou-se a maior estabilidade de expressão para o gene normalizador LUG. Para os estudos de expressão gênica, os genótipos tolerantes (H 44 e V 18) e os sensíveis (H 22 e V 25) foram submetidos à solução mínima contendo 4 mg L⁻¹ de Al por diferentes períodos de exposição (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h). O RNA total de cada um dos genótipos foi extraído para cada período de exposição ao Al. Após a síntese dos cDNAs de cada amostra foram realizados ensaios de qRT-PCR para quantificar a expressão dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1*. Os dados de qPCR foram normalizados e analisados pela metodologia do ddCT. Os resultados demonstraram maior expressão diferencial da variedade crioula tolerante V 18 para o gene *ZmMATE1*, indicando que, possivelmente, a exsudação de citrato deva ser o principal mecanismo de tolerância ao Al neste genótipo. Os resultados também evidenciaram a possibilidade de outro tipo de mecanismo de tolerância ao Al para o híbrido tolerante H 44, pois o mesmo apresentou expressão diferencial apenas para o gene *ZmNrat1* na fase inicial da exposição (1 a 3 h). Os mesmos genótipos utilizados na quantificação da expressão gênica foram avaliados para a coloração diferencial de raízes com hematoxilina. Os genótipos foram submetidos à solução mínima com Al pelos períodos de 6, 12, 24 e 48 h, avaliando-se a coloração diferencial das raízes nos respectivos períodos de exposição. Não foi possível observar coloração diferencial com hematoxilina entre genótipos de milho tolerantes e sensíveis ao Al.

Palavras-chave: *ZmMATE1*. *ZmMATE2*. *ZmNrat1*. Genes normalizadores. Sequências homólogas. Hematoxilina.

ANALYSIS OF AL TOLERANCE IN CONTRASTING TROPICAL MAIZE GENOTYPES THROUGH GENE EXPRESSION, SEQUENCING AND DIFFERENTIAL STAINING

Abstract - The objectives of this study were to evaluate the homology of sequences of *ZmMATE1* and *ZmMATE2* genes with those deposited in international banks sequences; quantify the differential expression of *ZmMATE1*, *ZmMATE2* and *ZmNrat1* genes; and characterize the Al tolerance by staining with hematoxylin in maize landrace and hybrid germplasms subjected to aluminum (Al) stress at minimal solution. Fifty-two hybrid of different companies and 50 local varieties of corn breeding program of UEPG were genotyped for *ZmMATE1* and *ZmMATE2* genes. In addition, the genotyping data and the RTI (Relative Tolerance Index) were used in the cluster analysis. The molecular screening of *ZmMATE1* and *ZmMATE2* genes in hybrid maize germplasm and landraces showed no association of fragments amplified with the contents of Al tolerance. However, the pattern amplification of tolerant and sensitive control (H 44 and V 18, H 22 and V 25, respectively) to *ZmMATE1*, enabled the identification of possible differences in tolerance associated with existing polymorphism between genotypes. Using the *GeNorm*, *NormFinder* and *BestKeeper* algorithms, was found a greater expression stability for normalizing gene *LUG*. For studies of gene expression, the tolerant genotypes (H 44 and V 18) and sensitive (H 22 and V 25) were submitted to minimal solution containing 4 mg L⁻¹ Al for different periods of exposure (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h). The total RNA from each genotype was extracted for each period of exposure to Al. After synthesis of cDNA from each sample were performed qRT-PCR assays to quantitate the expression of *ZmMATE1*, *ZmMATE2* and *ZmNrat1* genes. The qPCR data were normalized and analyzed by ddCT methodology. The results showed a greater differential expression of tolerant landrace V 18 for *ZmMATE1* gene, indicating that possibly the exudation of citrate should be the main mechanism of Al tolerance in this genotype. The results also demonstrated the possibility of another type Al tolerance mechanism for the tolerant hybrid H 44, therefore presented differential expression only for *ZmNrat1* gene in the early stage of exposure (1 to 3 h). The same genotypes used in gene expression quantification were evaluated for differential staining with hematoxylin roots. The genotypes were submitted to minimal solution with Al by periods of 6, 12, 24 and 48 h, evaluating the differential staining of roots in the respective periods of exposure. It was not possible to observe differential hematoxylin staining among maize genotypes tolerant and sensitive to Al.

Keywords: *ZmMATE1*. *ZmMATE2*. *ZmNrat1*. Normalizing genes. Homologous sequences. Hematoxylin.

1 Introdução

A toxidez causada pelo alumínio (Al) representa um dos maiores obstáculos ao cultivo de plantas em solos ácidos. Nesses solos, em que o pH normalmente está abaixo de 5,0, o Al encontra-se na forma solúvel Al^{+3} , sendo facilmente absorvido pelas raízes (KOCHIAN et al., 2004). O ápice radicular é o primeiro sítio da ação tóxica do elemento, o qual interfere não somente na divisão celular como também no alongamento das células da raiz, causando a redução do crescimento radicular e consequente perdas na produtividade das culturas (DONCHEVA et al., 2005).

Um importante mecanismo fisiológico de tolerância ao Al em plantas envolve a exsudação de ácidos orgânicos, ativada pela presença do fator estressante. Os ácidos orgânicos são compostos de baixo peso molecular que formam quelatos com o Al, liberando complexos estáveis e atóxicos na rizosfera. Em milho, a exclusão do Al pelo ápice radicular através da exsudação de citrato é amplamente reconhecido como o principal mecanismo de tolerância ao Al (PIÑEROS et al., 2002). Entretanto, Piñeros et al. (2005), descrevem que além da exsudação de citrato pelas raízes, outros mecanismos fisiológicos, como a complexação do Al nos vacúolos celulares e a modificação do pH da rizosfera, podem estar envolvidos na tolerância ao elemento.

Tentando elucidar as bases moleculares da tolerância ao Al em milho, Maron et al. (2010) identificaram e caracterizaram dois membros da família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*), *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, como genes de efeito maior na tolerância ao Al em milho. O gene *ZmMATE1* é um homólogo funcional do gene de tolerância ao Al em sorgo, *SbMATE*. Este gene codifica uma proteína transmembrana que media a exsudação de citrato no ápice radicular em milho. Por outro lado, a caracterização do *ZmMATE2* demonstrou que este gene é diferente do *ZmMATE1* e de outros MATEs envolvidos na tolerância ao Al em vários aspectos. Como não compartilha da mesma identidade na sequência dos aminoácidos com os MATEs, indicados para o transporte de citrato, possivelmente o *ZmMATE2* pode estar envolvido em um mecanismo diferente de tolerância.

Recentemente, Guimarães et al. (2014) identificaram o gene *ZmNrat1*, homólogo ao gene *OsNrat1* que codifica um transportador específico de Al previamente envolvido na tolerância em arroz. Os estudos demonstraram que a expressão do gene *ZmNrat1* é rapidamente induzida em genótipos de milho tolerantes, enquanto que em genótipos sensíveis ela é tardia. Estes resultados incentivam maiores investigações do envolvimento deste gene na tolerância ao Al em milho.

Tecnologias de análise de expressão gênica diferencial são muito importantes em estudos de comparação de processos biológicos. O estudo da expressão dos genes responsáveis pela tolerância ao Al é de extrema importância, e abordagens genômicas podem contribuir consideravelmente para a compreensão dos mecanismos envolvidos na tolerância. Neste sentido, é esperado, em hipótese, que em genótipos com maior tolerância ao Al a expressão de genes de tolerância ao elemento seja maior em comparação aos genótipos sensíveis. Assim como diferenças de tolerância ao Al entre germoplasmas (variedades crioulas e híbridos) podem estar relacionadas a distintas regiões genômicas associadas à tolerância nestes germoplasmas.

Os objetivos deste trabalho foram quantificar a expressão diferencial dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1* em genótipos contrastantes de milho para a tolerância ao Al, visando correlacionar as diferenças entre os genótipos às distintas regiões genômicas associadas com tolerância para este elemento.

2 Material e Métodos

2.1 Genotipagem com os genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2*

Os germoplasmas de milho híbrido, composto de 50 híbridos de diferentes empresas (Monsanto, Pioneer, Syngenta e Dow AgroSciences) e de milho crioulo (50 variedades coletadas da região Sudeste e Sul do Brasil), foram previamente classificados segundo o Índice de Tolerância Relativa (ITR) ao Al (COELHO et al., 2016) e submetidos à genotipagem para avaliação da presença e do possível polimorfismo entre os genótipos de milho para os genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2*. Visando correlacionar os dados fenotípicos com os genotípicos, os dados de ITR e de polimorfismo foram padronizados e obteve-se a matriz de dissimilaridade entre os genótipos pela distância quadrada generalizada de Mahalanobis. A partir da matriz de dissimilaridade genética procedeu-se a análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average*) proposto por Sneath e Sokal (1973). As análises foram realizadas no software R versão 3.1.3 (R CORE TEAM, 2013).

2.1.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de uma amostra de folhas jovens de 15 plântulas de cada genótipo analisado (milho crioulo e milho híbrido). A extração do DNA seguiu a metodologia de Hoisington et al. (1994). O DNA foi ressuspensionado em 40 µL de água ultrapura e tratados

com 1 µL de RNase por 2 h a 37°C. As amostras de DNA foram quantificadas em aparelho espectrofotômetro Nanovue GE Healthcare® e diluídos para concentração de 10 ng µL⁻¹.

2.1.2 Detecção molecular dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2*

As regiões genômicas em torno dos oligonucleotídeos que representam os genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* identificados por Maron et al. (2010) foram utilizados para detectar a presença dos fragmentos amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR) nos dois germoplasmas de milho estudados.

Para a detecção do gene *ZmMATE1* nos respectivos germoplasmas foi utilizado o primer forward 5'CCGGATGTTTGCTGGATTTT3' e o reverse 5'TGGCCAAATCGACCATGATT3'. A amplificação do gene *ZmMATE2* foi realizada a partir do par de primers forward 5'GCAGTTCGTACGTAGTGGTG3' e reverse 5'AGTACGTAGCTAGGCGATGC3'. As PCRs foram preparadas para um volume final de 20 µL contendo 1X tampão Green GoTaq® Flexi; 2,0 mM MgCl₂; 0,1 mM dNTP; 0,2 µM primer (forward e reverse); 0,75 U Taq DNA polimerase (Promega, 5 U µL⁻¹) e 40 ng de DNA molde. Os produtos de PCR foram resolvidos em gel agarose a 2% em cuba de eletroforese horizontal por 2 h a 80 V. Na sequência os produtos de PCR destes genes foram purificados utilizando-se o kit Axy Prep PCR Cleanup Kit (Axygen, Bioscience), seguindo as instruções do fabricante. As amostras purificadas foram enviadas para sequenciamento automático (ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer) armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Para a análise de homologia das sequências nucleotídicas foi utilizado o software *BLAST – Basic Local Alignment Search Tool* (ZHANG et al., 2000) do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Para o alinhamento das sequências nucleotídicas dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* foi utilizado o software ClustalW v1.6 (THONPSON et al., 1994).

2.2 Quantificação da expressão diferencial dos genes de tolerância ao Al

2.2.1 Genótipos e tratamentos

Os híbridos H 22 (sensível) e H 44 (tolerante), além das variedades crioulas V 25 (sensível) e V 18 (tolerante) foram utilizados na quantificação da expressão diferencial dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1*. Os genótipos foram submetidos à solução mínima (40 mg L⁻¹ de Ca²⁺ + 4 mg L⁻¹ de Al³⁺) por períodos de exposição de 0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h. As plântulas pré-germinadas foram acondicionadas em bandejas de poliestireno expandido e depositadas sobre a solução tratamento. As soluções foram mantidas com aeração constante e

pH entre 4,2 a 4,5. Após cada período de exposição, 12 plântulas de cada genótipo, na presença e na ausência do Al, foram retiradas da solução para a extração do RNA total.

2.2.2 Extração do RNA e síntese de cDNA

O RNA total de cada tratamento foi extraído a partir do ápice (1,0 cm) de 12 raízes utilizando o kit RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare UK Limited), seguindo o protocolo do fabricante após a fragmentação do tecido em nitrogênio líquido. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro Nanovue GE Healthcare®. Para visualizar a integridade do RNA total foram alicotados 2,0 µL do RNA extraído em tampão de carregamento acrescido de formamida para eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras de RNA total foram armazenadas em ultrafreezer (- 80°C) até sua utilização.

Para a síntese dos cDNAs (DNA complementar), aproximadamente 1,5 µg de RNA total foi submetido a transcrição reversa utilizando o kit comercial First-Strand cDNA Synthesis Kit (GE Healthcare, UK Limited), seguindo as recomendações técnicas do fabricante. Alíquotas de cDNA foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% para verificar a integridade das amostras e posteriormente estocadas em freezer (- 20°C).

2.2.3 Genes de referência para normalização dos dados de qRT-PCR

A utilização de uma estratégia de normalização adequada é um dos pontos mais críticos para medições precisas da expressão de genes. A seleção de genes de referência adequados é fundamental para que seja obtida uma normalização confiável. A partir dos resultados obtidos por Manoli et al. (2012), foram selecionados 4 genes candidatos (*MEP*, *LUG*, *CUL* e *FPGS*) à genes de referência, os quais foram testados nas mesmas condições experimentais dos genes de interesse. Informações referentes às funções e número do acesso, estão descritas na Tabela 15. A estabilidade de expressão dos genes foi obtida por meio de três algoritmos diferentes: *GeNorm* (VANDESOMPELE et al., 2002), *NormFinder* (ANDERSEN et al., 2004) e *BestKeeper* (PFAFFL et al., 2004). O *GeNorm* define o parâmetro *M* como a variância média entre os pares de genes em um determinado conjunto de amostras. Genes associados ao menor valor de *M* representam a maior estabilidade. O *NormFinder* recomenda o parâmetro *V* (valor de estabilidade), dado pelo desvio padrão dos dados de expressão para determinado gene. De maneira semelhante ao *GeNorm*, a maior estabilidade é dada pelo gene com menor valor. O modelo proposto por Pfaffl et al. (2004) utiliza os dados de expressão gênica para determinar o

BestKeeper Index, utilizado para ranquear os genes de acordo com a correlação de Pearson (r). Altos valores de r indicam que o gene é estável.

Tabela 15– Descrição dos genes de referência utilizados nos experimentos de expressão gênica.

Genes	Identificação do transcrito	Produto Gênico
<i>FPGS</i>	GRMZM2G393334_T01	Síntese de Folilpoliglutamato
<i>LUG</i>	GRMZM2G425377_T01	Co-repressor Transcricional Leunig
<i>CUL</i>	GRMZM2G166694_T04	Suporte para ubiquitinas ligases
<i>MEP</i>	GRMZM2G018103_T01	Proteína de membrana

2.2.4 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

A análise de expressão gênica foi realizada por ensaios de qRT-PCR no equipamento Mx3005P™ Real Time q-PCR System (Stratagene®). Como controle interno dos experimentos de expressão foi utilizado o gene *LUG*, de acordo com os resultados obtidos anteriormente. Para o gene *ZmMATE1* foram utilizados os primers forward 5'TGTGAGTTTGGCGGATGTGT3' e reverse 5'TCACAATCTAGGCCAGTACAACAGA 3'. Para o gene *ZmMATE2* utilizou-se os primers forward 5'CCTGAGCGAGCGAGCT3' e reverse 5'CCATCGTGCGTGTATATATTACGTGTA3'. E, finalmente, para o gene *ZmNrat1* os primers forward 5'CGCGCTTCTGATCCAAACA3' e reverse 5'GCGAGATGCTTGCCTGTCTT3'.

Para as reações de amplificação foram utilizados os seguintes reagentes: SYBR® Green Master Mix 1X (Life Technologies), 10 µM dos primers forward/reverse e água ultrapura estéril para completar 20 µL de reação. Foram utilizados 2 µL de cDNA de cada amostra após a padronização das concentrações para 10 ng µL⁻¹. Em cada experimento de qRT-PCR foi incluído um controle negativo (água), visando a confirmação da ausência de contaminantes na reação. O equipamento foi programado para a seguinte ciclagem: 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de: 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 65°C e 30 segundos a 72°C. A curva de dissociação foi composta pela seguinte programação: 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 55°C e 10 segundos a 94°C. Os níveis de expressão diferencial de cada gene foram calculados através do método ddCT (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) através do programa GenEx Enterprise (versão 6.0.5 Demo).

2.3 Caracterização da tolerância ao Al através da coloração com hematoxilina

Para esta análise foram utilizados apenas dois híbridos e duas variedades crioulas de milho contrastantes para a tolerância ao Al, sendo: H 44 e V 18 tolerantes; H 22 e V 25 sensíveis. As raízes das plântulas foram submetidas à solução mínima contendo 40 mg L⁻¹ de Ca²⁺ (CaCl₂) e 4 mg L⁻¹ de Al³⁺ (AlCl₃.6H₂O) por períodos de 6, 12, 24 e 48 h. Da mesma forma, os genótipos foram submetidos a um tratamento controle (sem Al) com solução contendo apenas 40 mg L⁻¹ de Ca²⁺ pelos mesmos períodos de exposição. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, com 3 repetições. Os tratamentos foram arranjados em esquema fatorial (4 x 2 x 4). O fator A constituído por 4 genótipos, o fator B pela concentração de Al (0 e 4 mg L⁻¹) e o fator C, pelos períodos de exposição do sistema radicular (6, 12, 24 e 48 h). Para cada genótipo foram avaliadas 12 plântulas por tratamento em cada repetição.

Após a seleção das plântulas pré-germinadas foi medido o comprimento inicial da raiz principal (cm) e as mesmas foram transferidas para bandejas de poliestireno expandido que foram depositadas sob a solução tratamento (0 ou 4 mg L⁻¹ de Al). Após cada período de exposição foi avaliado novamente o comprimento radicular para o cálculo da diferença de crescimento (DIF), seguido da coloração das raízes com hematoxilina. As raízes das plântulas foram lavadas duas vezes em água deionizada e após, imersas em solução contendo 2 g L⁻¹ de hematoxilina + 0,02 g L⁻¹ de iodeto de potássio (KIO₃) por 15 minutos. Após a coloração, as raízes foram lavadas por três vezes para retirar o excesso do corante. A avaliação da coloração das raízes foi baseada na escala visual de notas variando de 1 (tolerante) a 6 (sensível), de acordo com Braccini et al. (2000). Os dados de DIF foram submetidos à análise de variância, através do software R (R CORE TEAM, 2013).

3 Resultados

3.1 Screening dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2*

Com o objetivo de estabelecer uma correlação dos dados de genotipagem do gene *ZmMATE1* com a caracterização prévia dos genótipos (ITR) foi realizada a análise de agrupamento tanto para o germoplasma de híbridos, como para o de variedades crioulas, utilizando um ponto de corte de 1,0 na dissimilaridade. A análise de agrupamento dos híbridos evidenciou a formação de oito grupos (Figura 5-A). O G1

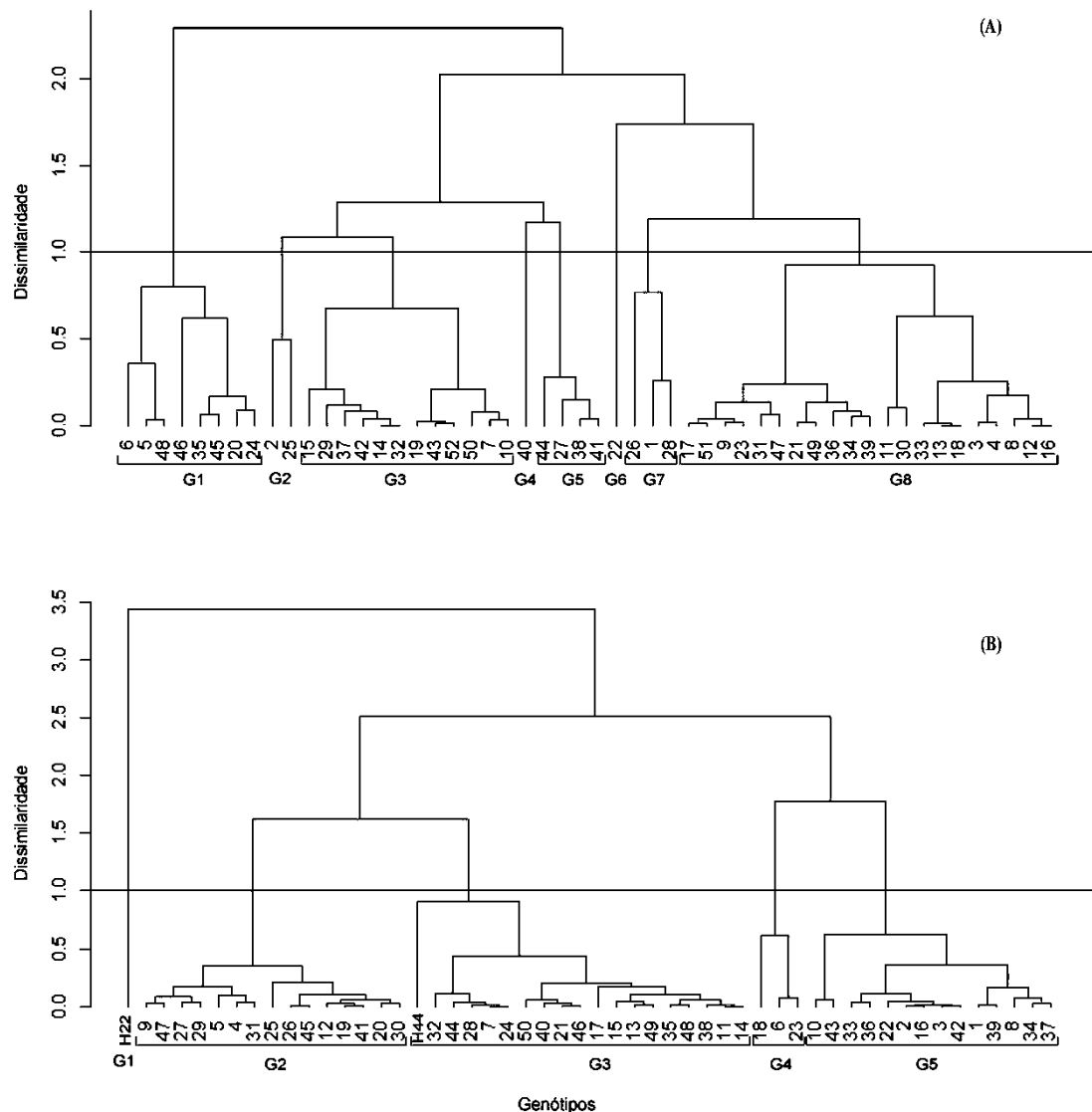


Figura 5– Agrupamento em função dos valores de ITR (Índice de Tolerância Relativa) e dos fragmentos amplificados para o *primer ZmMATE1*. (A) germoplasma de milho híbrido e (B) germoplasma de variedades crioulas de milho mais os tratamentos controle tolerante e sensível (H 44 e H 22, respectivamente)

agrupou oito híbridos, os quais apresentaram ITR médio de 2,56 e padrão de amplificação de um fragmento de aproximadamente 1000 pb (Tabela 16). Apenas dois híbridos foram alocados no G2 com ITR de 2,84 e amplificação de um fragmento de 1166 pb. No G3, 12 híbridos foram agrupados. Estes genótipos apresentaram ITR médio de 3,46 e dois fragmentos (1166 e 1000 pb) amplificados. No G4, apenas o H 40 foi agrupado com ITR de 3,62 e amplificação do fragmento de 1000 pb. Quatro híbridos com maior tolerância foram alocados no G5, H 44, H 27, H 38 e H 41, com ITR médio de 4,79 e todos amplificaram o fragmento de 1000 pb. Por

outro lado, o G6 foi formado apenas pelo H 22, o qual apresenta a maior sensibilidade ao Al com ITR de apenas 1,00 e amplificação dos dois fragmentos (1166 e 1000 pb). No G7, três híbridos agrupados com ITR médio de 2,49 e fragmento de 1166 pb. O G8 agrupou o maior número de genótipos (21), os quais demonstraram ITR médio de 2,69 e amplificação dos dois fragmentos (Tabela 16).

Para o conjunto de variedades crioulas, a análise de agrupamento demonstrou a formação de cinco grupos (Figura 5-B). O híbrido H 22, com ITR de 1,00 (maior sensibilidade) e amplificação dos dois fragmentos (1166 e 1000 pb) ficou isolado no G1, apresentando a maior dissimilaridade genética com o restante dos genótipos. No G2 foram agrupadas 15 variedades crioulas, as quais obtiveram ITR médio de 3,41 e amplificaram os fragmentos de 1166 e 1000 pb (Tabela 16). O G3 alocou 18 variedades e o híbrido tolerante (H 44) que apresentaram ITR de 4,14 e o fragmento amplificado de 1000 pb. As variedades V 18, V 6 e V 23, consideradas as mais tolerantes ao Al, foram agrupadas no G4, com o maior ITR médio de 6,56 e o fragmento de 1166 pb. E finalmente, no G5 14 variedades crioulas foram agrupadas com ITR de 4,78 e fragmento de 1166 pb (Tabela 16).

Tabela 16– Valores médios do índice de tolerância relativa (ITR) ao Al e tamanho de fragmento amplificado (FA) para os respectivos grupos formados da análise de agrupamento, para o germoplasma híbrido e de variedades crioulas de milho. Ponta Grossa, 2015

ZmMATE1							
Híbridos		FA (pb)		Variedades		FA (pb)	
Grupos	ITR	1166	1000	Grupos	ITR	1166	1000
G1	2,56	-	+	G1	1,00	+	+
G2	2,84	+	-	G2	3,41	+	+
G3	3,46	+	+	G3	4,14	-	+
G4	3,62	-	+	G4	6,56	+	-
G5	4,79	-	+	G5	4,78	+	-
G6	1,00	+	+				
G7	2,49	+	-				
G8	2,69	+	+				
ZmMATE2							
Híbridos		FA		Variedades		FA	
Grupos	ITR	280	175	Grupos	ITR	280	175
G1	4,54	+	-	G1	1,00	+	-
G2	4,55	+	+	G2	5,74	+	-
G3	3,31	+	-	G3	4,25	+	-
G4	3,41	+	+	G4	3,75	+	+
G5	1,00	+	-				
G6	2,26	+	+				
G7	2,24	+	-				

A análise de agrupamento com os dados de genotipagem para o *ZmMATE2* em relação ao germoplasma híbrido evidenciou a formação de sete grupos (Figura 6-A). No G1 foram agrupados oito híbridos, os quais obtiveram ITR médio de 4,54 e amplificação de um fragmento

de 280 pb (Tabela 16). O G2 agrupou três híbridos com ITR de 4,55 e dois fragmentos (280 e 175 pb) amplificados. Quinze híbridos foram alocados no G3 com ITR de 3,31 e fragmento de 280 pb. O G4 agrupou oito híbridos com dois fragmentos amplificados e ITR médio de 3,41. Apenas o híbrido sensível, H 22, foi alocado no G5, com o menor ITR e fragmento de 280 pb. Outros 5 híbridos com dois fragmentos amplificados, foram agrupados no G6, com ITR de 2,26. Os demais 12 híbridos, amplificaram um fragmento de 280 pb e ITR de 2,24, sendo alocados no G7 (Tabela 16).

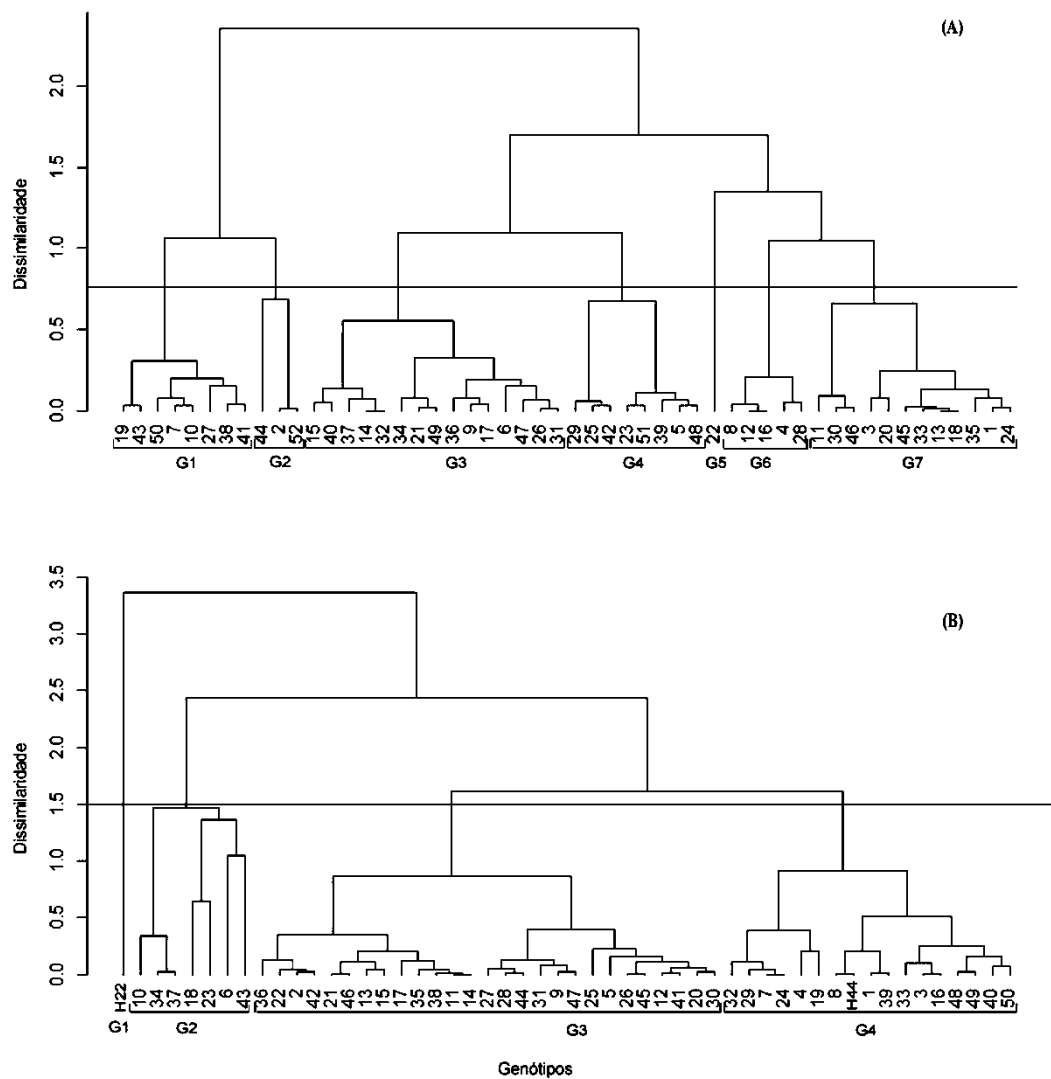


Figura 6– Agrupamento em função dos valores de ITR (Índice de Tolerância Relativa) e dos fragmentos amplificados para o *primer ZmMATE2*. (A) germoplasma de híbridos de milho e (B) germoplasma de variedades crioulas milho mais os tratamentos controle tolerante e sensível (H 44 e H 22, respectivamente).

A análise de agrupamento para o germoplasma crioulo possibilitou a formação de quatro grupos, a partir de um corte no dendrograma à 1,5 de dissimilaridade (Figura 6-B). Novamente, o híbrido H 22 (G1) foi o mais dissimilar dentre os genótipos avaliados (maior sensibilidade) (Tabela 16). O G2 foi composto de sete variedades crioulas as quais apresentaram ITR médio de 5,74 e um fragmento amplificado de 280 pb. A maioria das variedades foi agrupada no G3 (27), com ITR médio de 4,25 e fragmento amplificado de 280 pb. O híbrido tolerante H 44 foi alocado no G4, juntamente com 10 variedades. Este conjunto de genótipos apresentou ITR médio de 3,75 e dois fragmentos de 175 e 280 pb (Tabela 16).

A análise de homologia das sequências nucleotídicas para os genótipos controle tolerante (H 44 e V 18) e sensível (H 22 e V 25) de ambos os germoplasmas indicou que os fragmentos amplificados pelo primer *ZmMATE1* apresentaram maior homologia com a sequência de uma variante transcrita da família MATE1 em milho depositada no GeneBank. Para todas as sequências analisadas dos quatro genótipos, os dados de e-value foram igual a zero e apresentaram cobertura superior a 61% da sequência homóloga e no mínimo 92% de identidade (Tabela 17).

Tabela 17– Resultados da análise de homologia de sequências estudadas em quatro genótipos de milho com as sequências nucleotídicas depositadas no *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*. Ponta Grossa, 2015.

Gene	Genótipos	Cobertura %	E-value	Identidade %	Sequência Homóloga
<i>ZmMATE1</i>	H 22	62	0,0	99	Predicted: <i>Zea mays</i> MATE family protein (MATE1) transcript variant X1 mRNA
	H 44	61	0,0	99	
	V 18	70	0,0	92	
	V 25	61	0,0	99	
<i>ZmMATE2</i>	H 22	85	0,0	92	<i>Zea mays</i> BAC clone CH201-325C16 from chromosome 5, complete sequence
	H 44	84	0,0	92	
	V 18	87	0,0	90	
	V 25	87	0,0	90	

O sequenciamento dos fragmentos amplificados pelo *primer* do *ZmMATE2* indicou maior homologia com as sequências do cromossomo 5 com e-value de 0,0 para os quatro genótipos, com cobertura superior a 84% da sequência homóloga e no mínimo de 90% de identidade (Tabela 17).

Outro método de análise de homologia foi realizado utilizando o banco de dados do *Maize GDB*. Esta análise resultou na imagem gráfica dos cromossomos 5 e 6, indicando as possíveis regiões em que as sequências estudadas estariam mais fortemente agrupadas (Figura 7). As regiões mais fortemente agrupadas estão indicadas nos respectivos cromossomos pela coloração vermelha e as mais fracamente na cor verde, sendo no cromossomo 5 a localização

das sequências relativas ao gene *ZmMATE2* e no cromossomo 6 às aquelas relativas ao gene *ZmMATE1* (Figura 7).

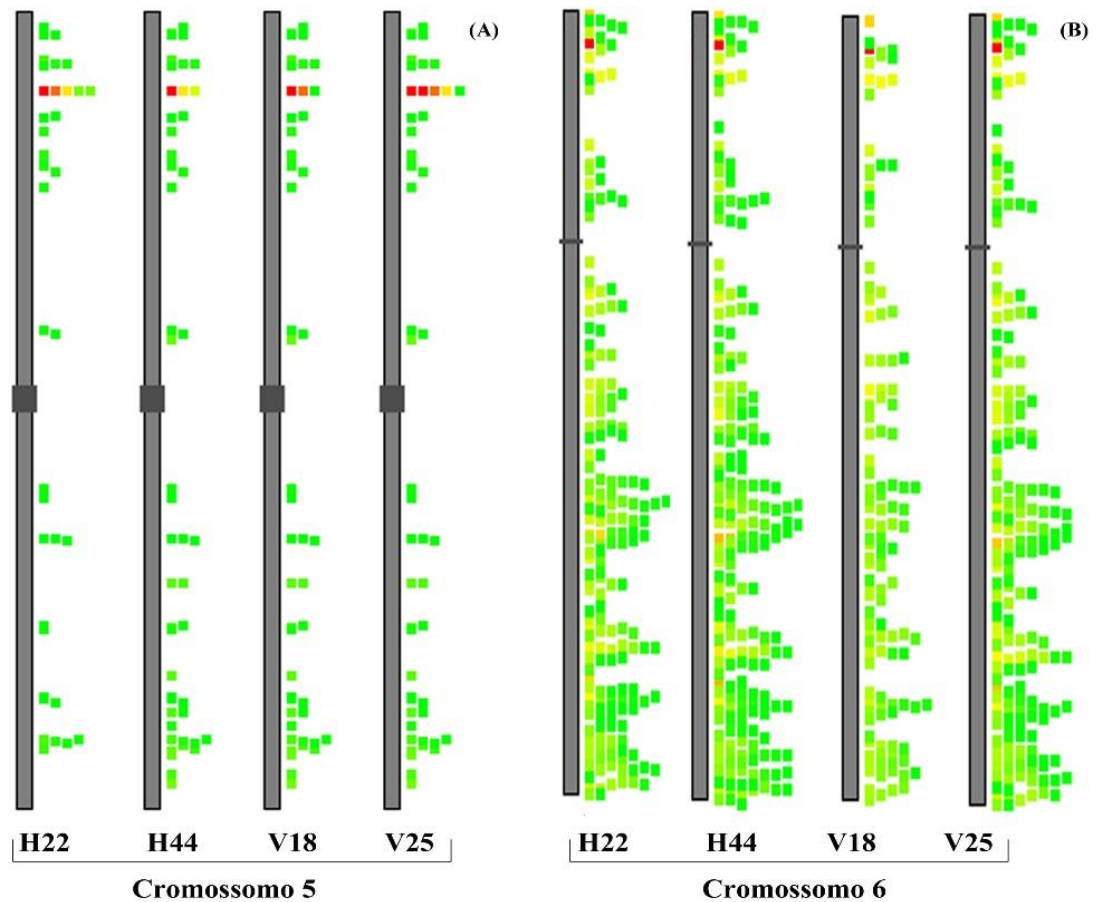


Figura 7 – Ideograma dos cromossomos 5 e 6, indicando as regiões onde as sequências obtidas para cada genótipo de milho (H 22, H 44, V 18 e V 25) estão mais fortemente ligadas. (A) Sequência obtida com o *primer ZmMATE2*. (B) Sequência obtida para o *primer ZmMATE1*.

3.2 Estabilidade de genes de referência

Para a estabilidade dos genes de referência os algoritmos *NormFinder*, *GeNorm* e *BestKeeper* foram empregados (Tabela 18). Os resultados obtidos pela análise com o *NormFinder* e *GeNorm* atribuíram a maior estabilidade de expressão ao gene *LUG* ($V = 0,18$ e $M = 0,35$, respectivamente), seguido pelo *FPGS*, *CUL* e *MEP* (Tabela 18). Os resultados obtidos pelo *BestKeeper* evidenciaram os maiores coeficientes de correlação (r) para as combinações *LUG* x *MEP* ($0,74^{***}$) e *FPGS* x *CUL* ($0,78^{***}$) (Tabela 18).

Tabela 18– Estabilidade de expressão dos genes de referência calculado pelo *NormFinder*, *GeNorm* e *BestKeeper*.

Gene	<i>NormFinder</i>	<i>GeNorm</i>	
	Valor de estabilidade (V)	Estabilidade	Média (M)
<i>LUG</i>	0,18		0,35
<i>FPGS</i>	0,28		0,36
<i>CUL</i>	0,45		0,38
<i>MEP</i>	0,50		0,52
<i>BestKeeper</i>			
Coeficiente de Correlação (r)			
	<i>MEP</i>	<i>LUG</i>	<i>CUL</i>
<i>LUG</i>	0,74 ***		
<i>CUL</i>	0,480 ***	0,674 ***	
<i>FPGS</i>	0,477 ***	0,660 ***	0,78 ***

***, significativo a 0,1% de probabilidade

3.3 Quantificação da expressão diferencial dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1*

Os padrões de expressão dos genes *ZmMATE1*, *ZmMATE2* e *ZmNrat1* foram verificados através da utilização da PCR quantitativa em tempo real (Figura 8). Ao longo dos períodos de exposição das raízes ao Al, a expressão do *ZmMATE1* foi constante no tempo 0 (ausência do elemento), mas foi fortemente regulada pela presença do Al, havendo aumento da expressão após 1 h de exposição em todos os genótipos avaliados, destacando-se a variedade crioula tolerante V 18, a qual atingiu expressão superior e diferencial a partir de 3 h. De maneira geral, houve incremento da expressão do gene com o aumento dos períodos de exposição. Entretanto, é possível evidenciar a superioridade da variedade V 18 que atingiu o maior pico de expressão de 8,1 após 12 h de exposição, enquanto os demais genótipos apresentaram expressão máxima de 2,3 (Figura 8-A).

Através da análise de expressão do gene *ZmMATE2* foi possível observar um padrão de expressão muito diferente em relação ao gene *ZmMATE1* (Figura 8-B). De maneira geral, não houve variação da expressão com o aumento dos períodos de exposição ao Al, não sendo observada expressão diferencial entre os genótipos estudados. Por outro lado, para o gene *ZmNrat1*, foi possível visualizar aumento da expressão deste gene ao longo dos períodos de exposição ao Al. Com 3 h de exposição, a maior expressão foi observada para o híbrido tolerante H 44. A partir de 24 h de exposição, houve um incremento na expressão das variedades crioulas V 18 e V 25, seguidas pelo híbrido H 44. Em 48 h de exposição ao Al, houve uma inversão na expressão gênica dos genótipos, pois aqueles com elevada expressão no tempo 24 h demonstraram redução da expressão, ao passo que o híbrido sensível H 22 apresentou incremento diferencial na expressão do gene *ZmNrat1* em relação aos demais genótipos estudados (Figura 8-C).

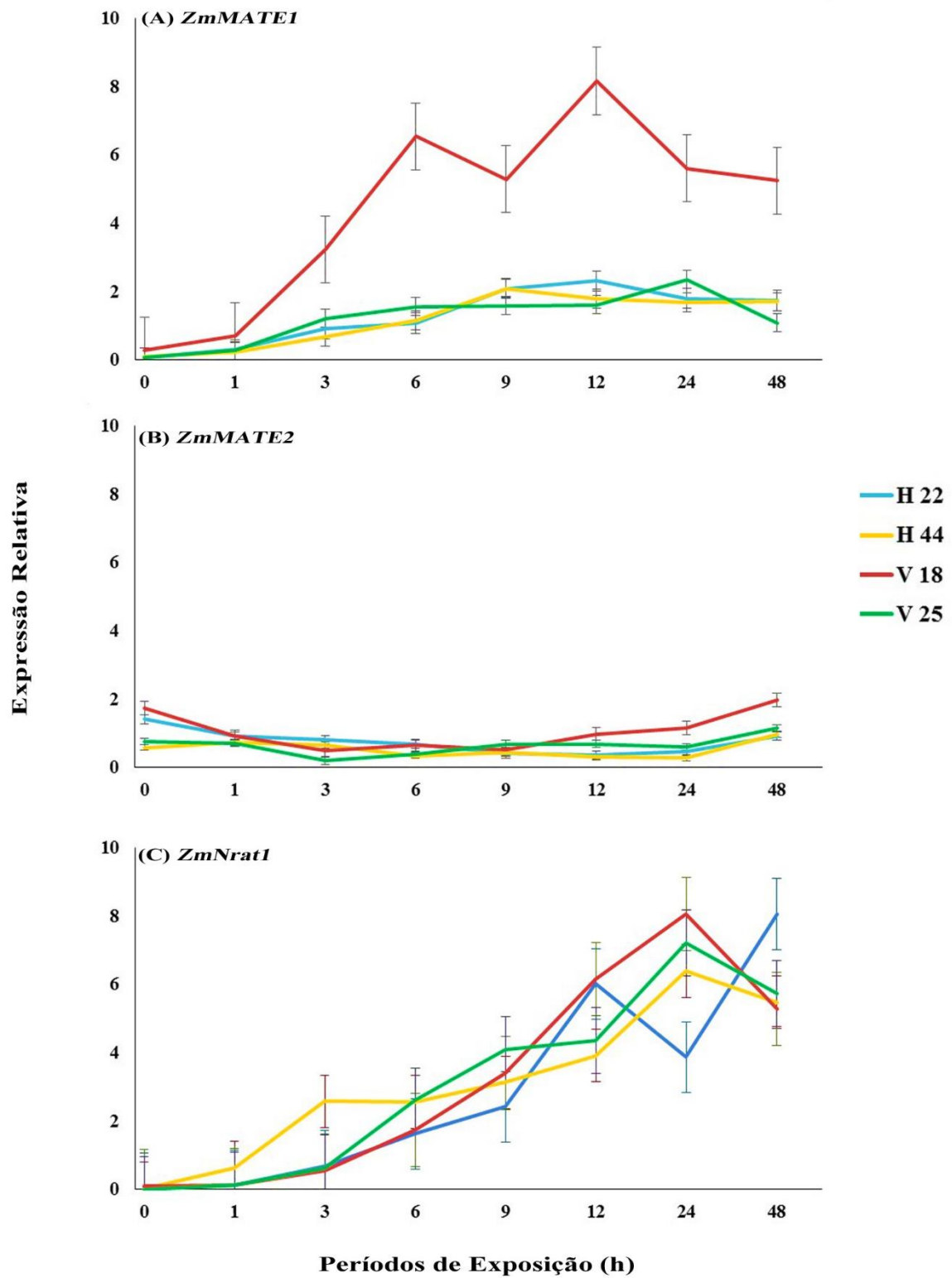


Figura 8— Expressão relativa dos genes *ZmMATE1* (A), *ZmMATE2* (B) e *ZmNrat1* (C), nos híbridos (H 22 e H 44) e nas variedades crioulas de milho (V 18 e V 25), em função dos períodos de exposição ao Al (0, 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h). Ponta Grossa, 2015.

3.4 Caracterização da tolerância ao Al através da coloração com hematoxilina

A análise de variância da variável DIF, demonstrou diferenças significativas entre os genótipos a partir de 12 h de exposição (dados não apresentados). A avaliação da diferença de crescimento radicular evidenciou a superioridade da variedade crioula tolerante V 18 em relação aos demais genótipos (Figura 9). Este genótipo apresentou DIF de 3,24 cm após 48 h de exposição ao Al, enquanto o híbrido tolerante (H 44) obteve DIF de apenas 1,91 cm no mesmo período. Os genótipos sensíveis também apresentaram grande contraste em relação ao DIF. Enquanto a variedade crioula sensível V 25 demonstrou crescimento radicular de 1,41 cm, no híbrido sensível H 22 o DIF foi de apenas 0,85 cm (Figura 9).

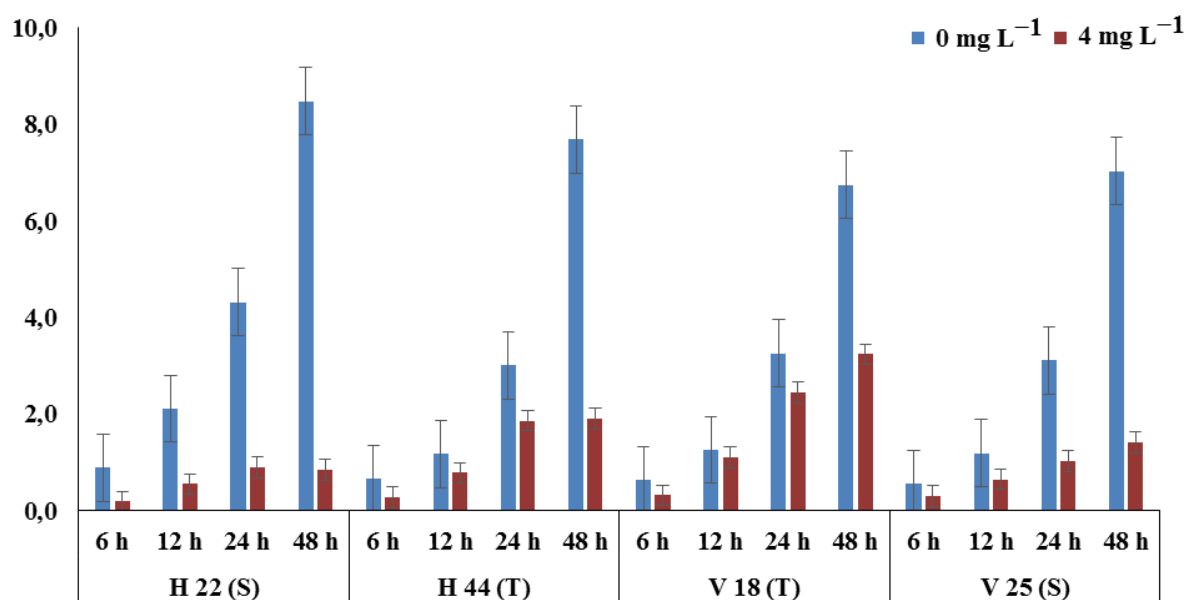


Figura 9– Valores médios de DIF (diferença de crescimento radicular) para os genótipos de milho H 22, H 44, V 18 e V 25, em função dos períodos de exposição ao Al (6, 12, 24 e 48 h). Ponta Grossa, 2015.

As análises de coloração de raízes com hematoxilina não evidenciaram coloração diferencial entre os genótipos tolerantes e sensíveis ao Al (Figura 10). A maior intensidade de coloração das raízes foi observada para o híbrido tolerante H 44 a partir de 6 h de exposição ao Al, quando comparado com o híbrido sensível H 22. A intensa coloração manteve-se em ambos os híbridos com o aumento dos períodos de exposição. Da mesma forma, as variedades crioulas (V 18 e V 25) apresentaram coloração intensa da raiz independente do período de exposição ao Al (Figura 10).

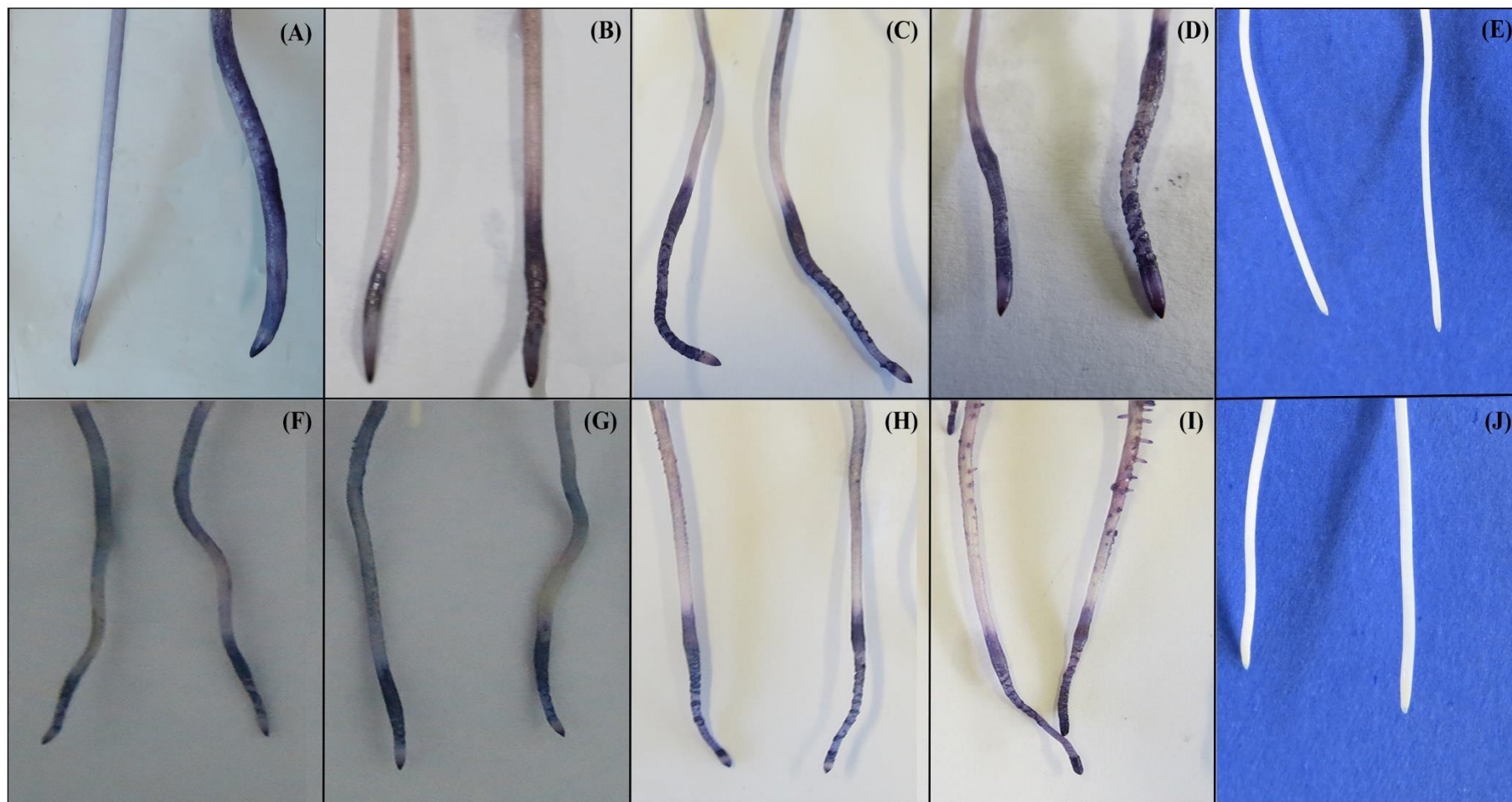


Figura 10– Visualização da coloração com hematoxilina para os híbridos de milho (H 22 e H 44) após 6, 12, 24 e 48 h de exposição a 4 mg L⁻¹ de Al (A, B, C, D, respectivamente) e na ausência de Al (E); e para as variedades crioulas (V 18 e V 25) após 6, 12, 24 e 48 h de exposição a 4 mg L⁻¹ de Al (F, G, H, I, respectivamente) e na ausência de Al (J).

4 Discussão

Membros da família MATE (*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*) têm sido associados a diversos processos celulares, incluindo a tolerância ao Al em várias espécies agrícolas. Maron et al. (2010) identificaram dois membros da família MATE, o *ZmMATE1* e o *ZmMATE2* como genes de efeito maior na tolerância ao Al em milho, os quais explicaram 16,2 e 16,0 % da variação fenotípica, respectivamente.

O *screening* molecular dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* nos germoplasmas de milho híbrido e de variedades crioulas não evidenciou associação dos fragmentos amplificados com os índices de tolerância ao Al. Ou seja, genótipos com padrão de amplificação similar aos genótipos tolerantes apresentaram baixos valores de ITR. Da mesma forma, alguns genótipos com padrão de amplificação semelhante aos sensíveis apresentaram elevados índices de tolerância (> ITR). Por outro lado, o padrão de amplificação dos controles tolerantes e sensíveis para o *ZmMATE1* (H 44 e V 18, H 22 e V 25, respectivamente) permite inferir sobre possíveis diferenças de tolerância (ITR) associadas ao polimorfismo existente entre estes. Os genótipos sensíveis H 22 e V 25 amplificaram dois fragmentos (1166 e 1000 pb), enquanto o híbrido tolerante H 44 amplificou o fragmento de 1000 pb e a variedade tolerante V 18 o fragmento de 1166 pb. O polimorfismo existente entre os genótipos tolerantes (H 44 e V 18) poderia explicar a superioridade em tolerância da variedade crioula em relação ao híbrido. Enquanto o H 44, utilizado aqui como controle apresentou um ITR de 5,00, a variedade crioula V 18 demonstrou um ITR de 6,96. A superioridade em tolerância da V 18 reflete possivelmente a presença de genes de tolerância mais efetivos, uma vez que este genótipo provém de regiões agrícolas de baixo nível tecnológico, caracterizados por ambientes com baixa fertilidade natural e alta saturação por Al (COELHO et al., 2016).

Os estudos desenvolvidos por Maron et al. (2010) e Guimarães et al. (2014) revelaram que esta região genômica (*ZmMATE1*) explica a maior parte da variação fenotípica da tolerância ao Al em milho Cateto. A maior tolerância observada no germoplasma de milho crioulo do presente trabalho poderia estar diretamente relacionada também à presença dos mesmos genes oriundos da raça Cateto de milho, germoplasma muito frequente na região de coleta destas variedades crioulas de milho.

O estudo do gene *ZmMATE2* neste trabalho evidenciou que o polimorfismo molecular não está associado à tolerância ou sensibilidade ao Al. Estes resultados estão parcialmente de acordo com os dados obtidos por Guimarães et al. (2014), os quais demonstraram não haver polimorfismo para o gene *ZmMATE2* entre uma linhagem sensível e uma variedade tolerante de milho Cateto.

Os resultados alcançados com o sequenciamento dos produtos de PCR dos genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* nos quatros genótipos contrastantes para tolerância ao Al (H 44, H 22, V 18 e V 25) confirmaram pelos dois métodos de análise de homologia (NCBI e Maize GDB), que as sequências possuem elevada identidade com os respectivos genes de tolerância ao Al estudados, bem como localização nas regiões genômicas descritas na literatura, sendo, portanto, validados pelas análises.

Atualmente, é reconhecida a necessidade da validação de genes para a normalização de dados de expressão gênica (EXPÓSITO-RODRÍGUEZ et al., 2008; MIGOCKA; PAPERNAIAK, 2010; MANOLI et al., 2012). A adoção de uma sistemática de validação de genes de referência como prática rotineira permite melhorar a acurácia das análises de qPCR. Neste sentido, algoritmos estatísticos como o *GeNorm*, *NormFinder* e *BestKeeper* foram idealizados para auxiliar os pesquisadores na validação dos genes de referência. Segundo Manoli et al. (2012), a utilização de subunidades ribossômicas é ainda sujeita a controvérsias. Em seu estudo de análise de candidatos a genes de referência para a cultura do milho, demonstrou que o gene 18S rRNA é um dos genes com maior instabilidade de expressão, e mesmo assim tem sido utilizado como gene normalizador em diversos estudos (MARON et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2014). Neste trabalho, os resultados obtidos para os genes de referência estão em acordo com os relatados por Manoli et al. (2012). O gene *LUG* apresentou a maior estabilidade dentre os candidatos testados e a sua utilização como normalizador possibilitou a maior precisão das análises de expressão gênica por qPCR.

A análise de expressão diferencial dos genes de tolerância ao Al evidenciou padrão de expressão similar ao encontrado na literatura. Os níveis de expressão do gene *ZmMATE1* na presença do Al foram muito superiores na variedade crioula V 18 quando comparado aos demais genótipos estudados. Este resultado confirma que este gene pode estar contribuindo mais significativamente para a expressão da tolerância ao Al nesta variedade crioula de milho em relação às outras regiões genômicas envolvidas na expressão desta característica. Maron et al. (2010) observaram níveis elevados de expressão deste gene no ápice radicular de duas variedades de milho Cateto, sendo a sua expressão regulada pela presença do Al. Adicionalmente, os autores verificaram elevada exsudação de citrato no ápice radicular destes mesmos genótipos, correlacionando a expressão do gene *ZmMATE1* com o mecanismo de tolerância de exclusão do Al via exsudação de ácidos orgânicos. Por outro lado, o híbrido tolerante H 44, apresentou o mesmo nível de expressão dos genótipos sensíveis (H 22 e V 25), indicando que possivelmente o mecanismo de tolerância neste híbrido poderia estar relacionado a outro gene, como por exemplo o *ZmNrat1*. Verificou-se que, para este gene, o H 44 apresentou

o maior valor de expressão diferencial, entre os genótipos de milho apenas na fase inicial de exposição ao Al (1 a 3 horas). Este resultado de expressão inicial do gene *ZmNrat1* para genótipos tolerantes estão de acordo com Guimarães et al. (2014).

Para o gene *ZmMATE2* verificou-se um padrão de expressão notavelmente diferente em relação ao gene *ZmMATE1*. A expressão deste gene permaneceu quase constante nos quatro genótipos de milho e, adicionalmente, observou-se que o mesmo parece não responder à presença do Al. Este padrão de expressão está de acordo com os resultados relatados por Maron et al. (2010), os quais verificaram ausência de expressão diferencial entre genótipos tolerantes e sensíveis, sendo os níveis de expressão do gene *ZmMATE2* semelhantes tanto nas raízes quanto nos tecidos da parte aérea do milho.

A caracterização do gene *ZmMATE2*, mapeado na região telomérica do cromossomo 5, demonstrou que este gene difere do *ZmMATE1* e de outros MATEs em diversos aspectos. Maron et al. (2010) verificaram que o *ZmMATE2* não compartilha da mesma identidade de aminoácidos que outros MATEs, sugerindo que este gene não media o fluxo de citrato. A natureza da exsudação transportada pelo *ZmMATE2* ainda é desconhecida. Piñeros et al. (2005) demonstraram que embora o Al ative a exsudação de citrato pelas raízes, a tolerância ao Al em milho não poderia ser explicada unicamente por este mecanismo. Piñeros et al. (2002) demonstraram que as raízes de milho podem exsudar quantidades significativas de fosfato e malato, os quais poderiam atuar na complexação do Al. Entretanto, os autores verificaram que as taxas de exsudação de fosfato e malato não respondem diferencialmente à exposição ao Al.

Recentemente, resultados de análises genéticas de QTLs de tolerância ao Al em milho obtidos por Guimarães et al. (2014) demonstraram que o *ZmMATE2* foi constitutivamente expresso em genótipos tolerantes e sensíveis. Adicionalmente, os autores observaram que as sequências de aminoácidos destes genótipos são idênticas, indicando que provavelmente o *ZmMATE2* não é o gene candidato que controla a tolerância no QTL do cromossomo 5. Estes mesmos autores associaram esta região com o gene *ZmNrat1* que é um homólogo do gene *Nrat1* (*Nramp aluminum transporter 1*) em arroz. O *Nrat1* é um transportador localizado na membrana plasmática das células apicais das raízes, demonstrando atividade de transporte para o Al^{3+} , mas não para metais bivalentes ou para o complexo Al-citrato. A expressão deste gene é induzida pelo Al e ocorre especificamente nas raízes, em todas as células radiculares, exceto nas células da epiderme.

A expressão relativa do *ZmNrat1* demonstrou um padrão um pouco diferenciado do descrito em outros trabalhos (GUIMARÃES et al., 2014). Os níveis de expressão foram crescentes com o aumento dos períodos de exposição, sendo a expressão regulada pela presença

do Al. Entretanto, após 3 h de exposição, apenas o híbrido tolerante (H 44) apresentou maior expressão em relação aos demais genótipos. A partir de 24 h de exposição, evidenciou-se incremento de expressão da variedade crioula tolerante V 18, seguida da V 25 e do híbrido H 44. O híbrido sensível H 22 demonstrou expressão diferencial tardia (48 h), sendo que os demais genótipos (V 18, V 25 e H 44) apresentaram queda na expressão deste gene. Estes resultados corroboram com os dados de Guimarães et al. (2014), em que o genótipo de milho mais tolerante ao Al apresentou maior expressão do gene nas primeiras horas de exposição, sendo posteriormente mantida e superada pelo genótipo mais sensível. Segundo Xia et al. (2010), a estratégia de absorção do Al mediada pelo *Nrat1*, seguida da complexação e sequestro do elemento, é mais eficaz no processo de desintoxicação em relação ao mecanismo que permite o acúmulo de Al no apoplasto (principalmente na parede celular), pois este acúmulo pode interferir na extensibilidade da parede celular e, conseqüentemente, reduzir o crescimento radicular.

A complexidade dos mecanismos de tolerância ao Al, as respostas de exsudação de citrato ativada pela presença do Al e a provável ocorrência de mecanismos adicionais de tolerância ao Al em milho estão de acordo com evidências genéticas que demonstram o envolvimento de vários genes de tolerância ao Al em diferentes regiões genômicas no controle genético desta característica.

Os efeitos tóxicos do Al no crescimento das plantas são atribuídos à sua influência sobre vários processos bioquímicos e fisiológicos, sendo o crescimento radicular o principal indicador da sensibilidade das plantas à toxidez (CAMBRAIA et al., 1991). De maneira geral, verificou-se a ação tóxica do Al nos quatro genótipos avaliados, independente do período de exposição. Adicionalmente, foi possível confirmar o padrão de tolerância do híbrido H 44 e a superioridade da variedade crioula V 18 em relação aos demais genótipos. Por outro lado, não foi possível correlacionar positivamente os dados de DIF com a coloração diferencial das raízes com a hematoxilina. Para os quatro genótipos tratados com Al, observou-se coloração radicular intensa e ausência de coloração nas raízes das plântulas controle (sem Al). Nos períodos iniciais de exposição ao Al (6 h), a coloração das raízes do híbrido tolerante foi, inclusive, mais intensa do que a coloração do híbrido sensível. Estes resultados discordam da maioria dos trabalhos que utilizaram a coloração das raízes de milho com hematoxilina (CANÇADO et al., 1999; GIAVENO; MIRANDA FILHO, 2000; DONCHEVA et al., 2005; CONCEIÇÃO et al., 2009). Por outro lado, corroboram àqueles obtidos por Ryan et al. (1993) os quais relataram ausência de coloração diferencial com hematoxilina entre genótipos de milho tolerantes e sensíveis ao Al. Estes autores recomendam a utilização deste tipo de metodologia com cautela, uma vez que

resultados de coloração diferencial isoladamente podem levar a conclusões errôneas sobre a real tolerância ao Al em milho.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que a coloração diferencial das raízes após o tratamento com Al depende dos mecanismos de tolerância envolvidos. Por exemplo, um genótipo tolerante que acumule Al e apresente um mecanismo de tolerância relacionado com a detoxificação do Al após sua absorção pelas raízes poderá ser considerado sensível pelo teste, uma vez que a hematoxilina reage com o Al acumulado (coloração radicular). Da mesma forma, Braccini et al. (2000) demonstraram em estudos de tolerância em genótipos de café que a coloração diferencial com hematoxilina depende do mecanismo de tolerância atuante nos genótipos tolerantes.

A metodologia de coloração com hematoxilina foi proposta inicialmente para a seleção de genótipos de trigo tolerantes ao Al por Polle et al. (1978). Esses pesquisadores concluíram que a metodologia foi um teste simples e rápido para o *screening* de um número grande de indivíduos de uma população segregante pela alta correlação com os dados do crescimento radicular. Contudo, estes mesmos autores observaram que cultivares de trigo tolerantes ao Al possuem menor capacidade de troca de cátions radicular e tendem a acumular menos Al. Desta forma, o teste de coloração com hematoxilina poderia indicar maior ou menor tolerância ao Al para esta espécie vegetal.

Estudos de coloração de hematoxilina em genótipos de feijão submetidos à solução com Al (MASSOT et al., 1991) demonstraram coloração intensa em genótipos tolerantes ao Al, assim como pouca coloração nos genótipos sensíveis. Os pesquisadores correlacionaram este fato ao acúmulo do Al no ápice radicular dos genótipos de feijão, associado à alta (tolerantes) ou baixa (sensíveis) capacidade de complexação do elemento.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que a exsudação de citrato deve ser o principal mecanismo de tolerância ao Al encontrado na variedade de milho crioulo V 18 (altamente tolerante), confirmado, principalmente, pelo maior nível de expressão do gene *ZmMATE1* e pelo maior valor de ITR quando comparados com o híbrido tolerante H 44. Os resultados também evidenciam a possibilidade de outro mecanismo envolvido na tolerância do híbrido H 44, pois este apresentou expressão diferencial apenas para o gene *ZmNrat1* na fase inicial da exposição. A metodologia de coloração das raízes com hematoxilina, utilizada como índice fenotípico em diversos estudos, deve ser empregada com cautela, uma vez que seus resultados dependem do genótipo avaliado e do mecanismo de tolerância presente.

6 CONCLUSÕES

A ação gênica aditiva foi predominante no controle genético da tolerância ao Al no germoplasma de milho tropical.

Os coeficientes de herdabilidade no sentido restrito confirmam a maior contribuição dos efeitos genéticos para a tolerância ao Al em milho.

A herança da tolerância ao Al no conjunto de famílias segregantes avaliadas é prioritariamente oligogênica, com estimativa média de 8,7 genes.

Os genótipos H 44, H 18, V 06 e V 03 apresentaram estimativas positivas da capacidade geral de combinação para o DIF, mostrando-se promissores para geração de populações segregantes com elevado potencial para extração de linhagens tolerantes ao Al.

Os cruzamentos dialélicos que envolveram a variedade crioula V 06 destacaram-se pela alta capacidade específica e geral de combinação para a tolerância ao Al.

Foram mapeados nove QTLs de tolerância ao Al em diferentes regiões genômicas de oito grupos de ligação do mapa consenso de milho, os quais explicaram 70,3% da variação fenotípica em tolerância na população de mapeamento L_T 99-4 x L_S 04-2.

O grande número de QTLs mapeados neste trabalho confirma a herança quantitativa da tolerância ao Al neste germoplasma de milho tropical.

Os dados do sequenciamento validaram a homologia das sequências dos genótipos avaliados com as sequências depositadas nos bancos de dados do *NCBI* e do *Maize GDB*. As sequências nucleotídicas apresentaram elevada identidade com os genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* de tolerância ao Al, bem como confirmaram a localização nas regiões genômicas descritas na literatura.

A expressão diferencial dos genes de tolerância ao Al em milho revelou maior expressão do gene *ZmMATE1* para a variedade crioula tolerante V 18, permitindo associar a elevada tolerância deste genótipo com o mecanismo de exclusão do Al por meio da exsudação de citrato.

A maior expressão diferencial do gene *ZmNrat1* para o híbrido tolerante H 44 nos períodos iniciais de exposição ao Al evidenciam a possibilidade do mecanismo de exclusão do Al das células radiculares, via transportador específico do elemento, estar envolvido na tolerância deste genótipo híbrido.

Os resultados da coloração de raízes com hematoxilina não possibilitaram identificar coloração diferencial entre genótipos contrastantes para tolerância ao Al, tanto em genótipos híbridos quanto em variedades crioulas de milho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C. G. et al. Análise dialélica de linhagens de milho na safrinha. **Ciência Rural**, v.34, p.1731-1737, 2004.
- AJMONE-MARSAN, P. et al. Identification of QTLs for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using AFLP map, different testers, and cofactor analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.230-243, 2001.
- ANDERSEN, C. L., et al. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v.64, p.5245-5250, 2004.
- BALESTRE, M. et al. Potential of maize single-cross hybrids for extraction of inbred lines using the mean components and mixed models with microsatellite marker information. **Genetics and Molecular Research**, v.7, p.1106-1118, 2008.
- BASTEN, C. J.; WEIR, B. S.; ZENG, B. Z. **QTL cartographer**, version 1.21. (software). Raleigh: North Carolina State University, Department of Statistics, 2000.
- BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. 2. ed. Minnesota: University of Minnesota, Woodbury, 2010. 390p.
- BONI, T. A. et al. Inheritance of aluminum tolerance in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.9, p.147-153, 2009.
- BOSCOLO, P. R. et al. Aluminum-induced oxidative stress in maize. **Phytochemistry**, v.62, p.181-189, 2003.
- BRACCINI, M. C. L. et al. Crescimento da planta e coloração das raízes com hematoxilina como critérios de avaliação de genótipos de café quanto à tolerância à toxidez de alumínio. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, v.24, p.59-68, 2000.
- BRONDANI, C.; PAIVA, E. "RFLP" analysis of aluminum tolerance in chromosome 2 in maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.575-579, 1996.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinic Chemical**, v.55, p.611-622, 2009.
- BUSTIN, S. A.; NOLAN, T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. **Journal of Biomolecular Technology**, v.15, p.155-166, 2004.
- CAMARGO, C. E. O.; FELÍCIO, J. C.; FERREIRA FILHO, A. W. P. Triticale: tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, v.50, p.323-330, 1991.
- CAMBRAIA, J. et al. Método simples para a avaliação de cultivares de sorgo quanto à tolerância ao alumínio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.3, p.87-95, 1991.
- CANÇADO, G. M. A., et al. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.747-754, 1999.

CASTIGLIONI, P. et al. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution. **Theoretical and Applied Genetics**, v.99, p.425-431, 1999.

CHIN, E. C. L.; SENIOR, M. L.; SMITH, J. S. C. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. **Genome**, v.39, p.866-873, 1996.

COELHO, C. J. et al. Selection of maize hybrids for tolerance to aluminum in minimal solution. **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.134-144, 2015.

COELHO, C. J. et al. Brazilian maize landraces: source of aluminum tolerance. **Australian Journal of Crop Science**, v.1, p. xx-xx, 2016.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. **Herança da tolerância à toxicidade ao alumínio (Al^{3+}) em milho e identificação de regiões cromossômicas associadas ao caráter**. 2006. 87f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; TESSELE, C.; BARBOSA NETO, J. F. Diallel analysis and mapping of aluminum tolerance in corn inbred lines. **Maydica**, v.54, p.55-61, 2009.

COURVILLE, P.; CHALOUPKA, R.; CELLIER, M. F. M. Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters. **Cell**, v.978, p.960-978, 2006.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: Aplicativo computacional em genética e estatística experimental. Versão 7.0**. Viçosa: UFV, 2009.

CRUZ, C.D. **Programa genes: Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 1997. 442p.

CRUZ, D.C.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3 ed. Viçosa: UFV, 2004. 390p.

CZECHOWSKI, T. et al. Genome wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.139, p.5-17, 2005.

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

DONCHEVA, S. et al. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany**, v.56, p.1213-1220, 2005.

ECHART, C. L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, v.31, p.531-541, 2001.

EDWARDS, M. D.; STUBER, C. W.; WENDEL, J. F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. Numbers, genomic distribution and types of genes action. **Genetics**, v.116, p.113-125, 1987.

ETICHA, D.; STASS, A.; HORST, W. J. Cell-wall pectin and its degree of methylation in the maize root-apex: significance for genotypic differences in aluminium resistance Plant. **Cell & Environment**, v.28, p.1410-1420, 2005.

EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M., et al. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biology**, v.8, p.131, 2008.

EZAKI, B. et al. A combination of five mechanisms confers a high tolerance for aluminum to a wild species of Poaceae, *Andropogon virginicus* L. **Environmental and Experimental Botany**, v.93, p.35-44, 2013.

FERREIRA, M. E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1995. 220p.

FOO, S.; NOLAN, T. NF-kappaB to the rescue – RELs, apoptosis and celular transformation. **Trends in Genetics**, v.15, p.229-235, 1999.

FURUKAWA, J. et al. An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant Cell Physiology**, v.48, p.1081-1091, 2007.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1445-1454, 2004.

GARCIA, O.; SILVA, W. J. Análise genética da tolerância ao alumínio em milho. **Ciência e Cultura**, v.8, p.31-58, 1979.

GIAVENO, C. D; MIRANDA FILHO, J. B. Rapid screening for aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, p.847-850, 2000

GOMES, M. S. et al. Estimativas da capacidade de combinação de linhagens de milho tropical para qualidade fisiológica de sementes. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, p.41-49, 2000.

GRIFFING, B. A generalized treatment of the use of diallel crosses in quantitative inheritance. **Heredity**, v.10, p.31-50, 1956.

GUÉNIN, S. et al. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. **Journal of Experimental Botany**, v.60, p.487-493, 2009.

GUIMARÃES, C. T. et al. Genetic dissection of Al tolerance QTLs in the maize genome by high density SNP scan. **BMC Genomics**, v.15, p.1-14, 2014.

HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values, and calculation of distance between the loci of linked factors. **Journal of Genetics**, v.8, p.299-309, 1919.

HOFFER, G. N.; CARR, R. H. Accumulation of aluminum and iron compounds in corn plants and its probable relation to root rots. **Journal of Agricultural Research**, v.23, p.801-824, 1923.

HOISINGTON, D.; KHAIRALLAH, M.; GONZÁLEZ DE LEON, D. **Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. 2. ed. México: CIMMYT, 1994. 51p.

HOLLAND, J. B. Epistasis and Plant Breeding. **Plant Breeding Reviews**, v.21, p.27-92, 2001.

HORST, W. J.; WANG, Y.; ÉTICHA, D. The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. **Annals of Botany**, v.106, p.185-197, 2010.

HUANG, C. F. et al. A tonoplast-localized half-size ABC transporter is required for internal detoxification of Al in rice. **Plant Journal**, v.69, p.857-867, 2012.

HYNE, V.; KEARSEY, M. J. QTL analysis: further uses of 'marker regression'. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.471-476, 1995.

JANSEN, R. C. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. **Genetics**, v.135, p.205-211, 1993.

JANSEN, R. C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, v.136, p.1447-1455, 1994.

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

JORGE, R. A.; ARRUDA, P. Aluminium-induced organic acid exudation by roots of na aluminium-tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, v.45, p.675-681, 1997.

KEARSEY, M. J.; HYNE, V. QTL analysis: a multiple 'marker regression' approach. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.698-702, 1994.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p.459-493, 2004.

KRILL, A. M. et al. Association and Linkage Analysis of Aluminum Tolerance Genes in Maize. **PLoS ONE**, v.5, p.1-11, 2010.

LAGOS, M. B. et al. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.1011-1020, 1991.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.1, p.174-181, 1989.

LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.1, p.174-181, 1987.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**, v.44, p.398-401, 1989.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOPES, M.T.G. **Mapeamento de genes de resistência a mancha de *Phaeosphaeria* em milho**. 2003. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LÜBBERSTEDT, T. et al. QTL mapping in testcrosses of flint lines of maize: III Comparison across populations for forage traits. **Crop Science**, v.38, p.1278-1289, 1998.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **Trends in Plant Science**, v.6, p.273-278, 2001.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature and Genetics**, v.39, p.1156-1161, 2007.

MANGOLIN, C. A. et al. Mapping QTLs for kernel oil content in a tropical maize population. **Euphytica**, v.137, p.251-259, 2004.

MANOLI, A. et al. Evaluation of reference genes for qPCR in maize. **Journal of Plant Physiology**, v.169, p.807-815, 2012.

MARON, L. G. et al. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, v.61, p.728-740, 2010.

MASSOT, N.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Aluminum tolerance assessment in bush bean cultivars by root growth analysis and hematoxylin staining. **Suelo Planta**, v.1, p.25-32, 1991.

MATHER, K.; JINKS, J. L. **Biometrical Genetics**. The study of continuous Variation. Chapman and Hall. London, 1971.

MATIELLO, R. R. **Patossistema milho x *Colletotrichum graminicola*: estudo de herança, mapeamento de genes de resistência e estimativas de danos na produção**. 2004. 116 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

MATIELLO, L.; SILVA, F. R.; MENOSSE, M. Linking microarray data to QTLs highlights new genes related to Al tolerance in maize. **Plant Science**, v.191, p.8-15, 2012.

MAZZOCATO, A. C. et al. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural**, v.32, p.19-24, 2002.

McLEAN, F. T.; GILBERT, B. E. The relative aluminum tolerance of crop plants. **Soil Science**, v.24, p.163-174, 1927.

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 using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.88, p.9828-9832, 1991.

MIGOCKA, M.; PAPERNAIAK, A. Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. **Molecular Breeding**, v.28, p.343-357, 2010.

MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 187p.

MIRANDA FILHO, J. B. Quantitative analysis of a cross between populations and their derived generations. **Revista Brasileira de Genética**, v.14, p.547-561. 1991.

MIRANDA, L. T.; MIRANDA, L. E. C.; SAWAZAKI, E. **Genética ecológica e melhoramento de milho**. Campinas: Fundação Cargill, 1984. 30p.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993.

MORIYAMA, Y. et.al. Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transport for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. **Xenobiotica**, v.38, p.1107-1118, 2008.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E. et al. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, v.130, p.223-232, 2003.

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**, v.17, p.269-280, 1982.

OGLIARI, J. B.; BOSCARIOL, R. L.; CAMARGO, L. E. A. Optimization of PCR amplification maize microsatellites loci. **Genetic and Molecular Biology**, v.23, p.395-398, 2000.

OLIVEIRA, M. S. **Tolerância de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) à toxidez por alumínio em solução**. 2012. 109f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

OLMOS, I. L. J.; CAMARGO, M. N. Aluminum toxicity in Brazilian soils: characterization and distribution. **Ciência e Cultura**, v.28, p.171-180, 1976.

OMOTE, H. et al. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. **Trends Pharmacology Science**, v.27, p.587-593, 2006.

ORZAEZ, D.; DE JONG, A. J.; WOLTERING, E. J. A tomato homologue of the human protein PIRIN is induced during programmed cell death. **Plant Molecular Biology**, v.46, p.459-468, 2001.

PANDEY, S. et al. Breeding maize for tolerance to soil acidity. **Plant Breeding**, v.28, p.59-100, 2007.

PARENTONI, S. N. et al. Melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos. **Recursos genéticos e melhoramento – Plantas**, v.1, p.783-851, 2001.

PATERNIANI, M.; FURLANI, P. R. Tolerância à toxicidade de alumínio de linhagens e híbridos de milho em solução nutritiva. **Bragantia**, v.61, p.11-16, 2002.

PELLET, D. M.; PAPERNIK, L.; KOCHIAN, L. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat. Roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, v.112, p.591-597, 1995.

PFAFFL, M. W., et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: *BestKeeper*--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v.26, p.509-515, 2004.

PIÑEROS, M. A.; KOCHIAN, L. V. A patch clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize, identification and characterization of Al^{3+} -induced anion channels. **Plant Physiology**, v.125, p.292-305, 2001.

PIÑEROS, M. A. et al. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, v.129, p.1194-1206, 2002.

PIÑEROS, M. A. et al. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. **Plant Physiology**, v.137, p.231-241, 2005.

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

PRIOLI, A. J.; SILVA, W. J. Tolerância à toxidez do alumínio em híbridos simples de milho. **Ciência e Cultura**, v.7, p.834-835, 1984.

PRIOLI, A.J. **Genetic analysis of tolerance to aluminum toxicity in maize (*Zea mays* L.)**. 1987. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1987.

PRIOLI, A. J. et al. Genetic analysis of means and variances of aluminum tolerance in maize. **Acta Scientiarum**, v.22, p.869-875, 2000.

PRIOLI, A. J. et al. Genetics analysis of aluminum tolerance in maize. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.2, p.30-33, 2002.

QUEIROZ, R. J. B. **Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica**. 2010, 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

R CORE TEAM (2013). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

REMANS, T. et al. Normalisation of real-time RT-PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentrations. **Planta**, v.227, p.1343-1349, 2008.

RHUE, R. D. et al. Genetic control of aluminum tolerance in corn. **Crop Science**, v.18, p.1063-1067, 1978.

RIBEIRO, C. **Crescimento, morfologia e mudanças no sistema antioxidativo em raízes de arroz, submetidas ao alumínio**. 2011. 73f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

ROMANEK, C. **Mapeamento de locos de resistência quantitativa à antracnose foliar em milho tropical**. 2014. 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

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**, v.52, p.527-560, 2001.

RYAN, P. R. et al. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, v.149, p.340-351, 2009.

SAWAZAKI, E.; FURLANI, P. R. Genética da tolerância ao alumínio em linhagens de milho Cateto. **Bragantia**, v.46, p.269-278, 1987.

SENIOR, M. L. et al. Mapping simple sequence repeats in maize. **Maize Newsletter**, v.70, p.50-54, 1996.

SIBOV, S. T. et al. Two genes control aluminum tolerance in maize: genetic and molecular mapping analyses. **Genome**, v.42, p.475-482, 1999.

SIBOV S. T. et al. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. **Hereditas**, v.139, p.96-106, 2003.

SIMÕES, C. C. **Abordagens genético-genômicas para identificação e validação de QTL's de tolerância ao alumínio em milho**. 2012. 46f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. L. **Principles and procedures of statistics**. New York: McGraw-Hill, 1980. 418p.

STUBER, C. W.; EDWARDS, M. D.; WENDELL, J. F. Molecular marker-facilitated investigations quantitative trait loci in maize: II Factors influencing yield and its component traits. **Crop Science**, v.27, p.639-648, 1987.

STUBER, C. W. et al. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. **Genetics**, v.132, p.823-839, 1992.

TASIOR, D. **Estimativas de parâmetros genéticos e mapeamento molecular de QRLs à antracnose do colmo em milho tropical**. 2014. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v.75, p.291-295, 1999.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994.

TORRES, G. A. et al. A search for RFLP markers to identify genes for aluminum tolerance in maize. **Brazilian Journal of Genetics**, v.20, p.459-465, 1997.

UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. R. Eleven golden rules of quantitative RTPCR. **Plant Cell**, v.20, p.1736-1737, 2008.

VAN DER VOORT, J. N. A. M. et al. Linkage analysis by genotyping of sibling populations: A genetic map for the potato cyst nematode constructed using a “pseudo-F₂” mapping strategy. **Molecular and General Genetics**, v.261, p.1021-1031, 1999.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, 2002.

VELDBOOM, L. R.; LEE, M. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: I grain yield and yield components. **Crop Science**, v.36, p.1310-1319, 1996.

VENCOVSKY, R. **Alguns aspectos teóricos e aplicados relativos a cruzamentos dialélicos de variedades**. 1970. 59f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1970.

VENCOVSKY, R. **Herança quantitativa**. In: PATERNIANI, E; VIÉGAS, G.P. (ed). Melhoramento e produção do milho. 2. ed. Campinas: Fundação Cargill. 1987. p.137-214.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1992.

VON, U. H. R. E.; MUTERT, E. **Global extent, development and economic impact of acid soils**. In: Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management. RA Date, NJ Grundon, GE Raymet, and ME Probert (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 5-19. 1995.

- VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.
- VUYLSTEKE, M. et al. AFLP: two high-density AFLP linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.6, p.921-935, 1999.
- WU, W. R.; LI, W. M. A new approach for mapping quantitative trait loci using complete genetic marker linkage maps. **Theoretical and Applied Genetics**, v.89, p.535-539, 1994.
- WU, W. R.; LI, W. M. Model fitting and model testing in the method of joint mapping of quantitative trait loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v.92, p.477-482, 1996.
- XIA, J. et al. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p.18381-18385, 2010.
- XU, M. L. et al. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR and AFLP markers. **Molecular and General Genetics**, v.261, p.574-581, 1999.
- YANG, J. L. et al. Cell Wall Polysaccharides Are Specifically Involved in the Exclusion of Aluminum from the Rice Root Apex. **Plant Physiology**, v.146, p.602-611, 2008.
- YAO, Q. et al. Genetic Diversity of Maize (*Zea mays* L.) Landraces from Southwest China Based on SSR Data. **Journal Genetics and Genomics**, v.34, p.851-860, 2007.
- ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, v.136, p.1457-1468, 1994.
- ZENG, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effect in mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p.10972-10976, 1993.
- ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for ligging DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v.7, p.203-514, 2000.
- ZHANG, W.; RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D. Malate-permeable Channels and cation channels activated by aluminum in the apical cell of wheat roots. **Plant Physiology**, v.125, p.1459-1472, 2001.

APÊNDICE

Tabela 1A – Locos SSR polimórficos genotipados na população de mapeamento de milho L 99-4 x L 04-2. Ponta Grossa, 2015.

SSR	Grupo/Bin	SSR	Grupo/Bin
Phi001	1,03	Umc1799	7,06
Bnlg125	2,02	Bnlg2046*	8,04
Bnlg1325	3,02	Bnlg1176*	8,05
Bnlg2291*	4,06	Bnlg240*	8,06
Bnlg1337*	4,11	Umc2014	8,07
ZmMATE2	5,02	Phi015	8,08
Bnlg557*	5,03	Umc2084*	9,01
ZmMATE1*	6,00	Umc1319	10,01
p-nc013	6,05	Umc2021	10,07
Phi034	7,02		

* Locos SSR com segregação mendeliana esperada (1:2:1).