

SÍLVIA NETO JARDIM

**MAPEAMENTO COMPARATIVO DE REGIÕES
GENÔMICAS DE MILHO (*Zea mays* L.) ASSOCIADAS
COM A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO**

BELO HORIZONTE – MG

2007

SÍLVIA NETO JARDIM

**MAPEAMENTO COMPARATIVO DE REGIÕES
GENÔMICAS DE MILHO (*Zea mays* L.) ASSOCIADAS
COM A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Genética para obtenção do título de Doutora em Genética.

Orientadora: Dra. Claudia T. Guimarães
Co-orientador: Dr. Jurandir V. Magalhães

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE – MG**

2007

Aos meus pais, João e Marcília.

As minhas irmãs, Núbia e Cláudia.

Ao meu querido Pedro.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais, pela minha formação acadêmica.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade.

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

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

À Fundação McKnight, pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus orientadores, Claudia Guimarães e Jurandir Magalhães, pela grande confiança em mim depositada, por incentivarem e orientarem este trabalho, pelos ensinamentos e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao professor Fabrício, pela oportunidade e confiança.

Ao Dr. Sidney Parentoni por fornecer as linhagens utilizadas neste trabalho.

À Dra. Vera Carvalho, pelo auxílio no delineamento dos experimentos de fenotipagem.

À Gislene, Júlio e Francine pela ajuda imprescindível nos experimentos de fenotipagem.

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

Aos amigos do NBA, André, Andréa, Anderson, Anne Cybelle, Antônio Álvaro, Beth, Carol, Charles, Dani, Denise, Diógenes, Edílson, Edmilson, Faustinho, Felipe, Fernanda, Fernando, Gracielle, Guilherme, Isabel, Ivana, Sr. Joaquim, Kátia, Lílian, Maria Cristina, Maria José, Martinelli, Miguel, Nate, Newton, Rosângela, Rose,

Raymundo, Ricardo, e Wanderson, pela carinhosa recepção, pela convivência maravilhosa e pelo auxílio nos experimentos.

Aos meus colegas do Curso de Pós-Graduação.

Ao Célio e Edna, pela amizade, apoio e otimismo.

Aos meus grandes amigos Lili e Bira, pelo estímulo e amizade incondicional.

As minhas amigas Allane, Camila, Flávia e Roberta, pela nossa sincera amizade de longa data.

À minha nova família, Miguel, Maria, Fabiana, Auro, Andréia, Maurício, Giulia, Caio e Pedrinho, por todo o carinho e torcida.

Aos meus queridos pais e irmãs, pelo constante apoio e incentivo, imenso carinho e compreensão e por serem meus exemplos de vida.

Ao meu querido noivo, Pedro, que em tudo contribuiu para o sucesso deste trabalho. Pelo seu imenso e fundamental amor, pela paciência e incentivo, por estar sempre ao meu lado com uma palavra para me acalmar, aconselhar e alegrar.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta importante etapa da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. Solos Ácidos e a Toxicidade do Alumínio.....	04
2.2. Efeitos do Alumínio nas Plantas.....	04
2.3. Mecanismos de Tolerância das Plantas ao Alumínio.....	06
2.4. Tolerância ao Alumínio em Milho.....	09
2.5. Avaliação da Tolerância ao Alumínio nas Plantas.....	10
2.6. Mapeamento Genético em Milho.....	11
2.7. Recursos Genômicos em Milho.....	13
2.8. Mapeamento de QTL em Milho.....	15
2.9. Mapeamento Comparativo entre as Gramíneas.....	17
2.10. Genética Comparativa da Tolerância ao Alumínio em Gramíneas....	19
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Material Genético.....	25
4.2. Fenotipagem para a Tolerância ao Alumínio.....	25
4.3. Análise Estatística dos Dados Fenotípicos.....	27

4.4. Análises Genotípicas.....	28
4.4.1. Extração e quantificação de DNA genômico.....	28
4.4.2. Marcadores microsatélites.....	29
4.4.3. Marcadores RFLP.....	30
4.4.4. STS - <i>Sequence Tagged Sites</i>	32
4.5. Construção do Mapa de Ligação.....	33
4.6. Mapeamento de QTL.....	33
5. RESULTADOS.....	35
5.1. Avaliação da Tolerância ao Alumínio na População de RILs.....	35
5.2. Mapa de Ligação.....	38
5.3. Mapeamento de QTL para Tolerância ao Alumínio.....	41
6. DISCUSSÃO.....	45
6.1. Avaliação da Tolerância ao Alumínio na População de RILs.....	45
6.2. Mapa de Ligação.....	47
6.3. Mapeamento de QTL para Tolerância ao Alumínio.....	48
6.4. Análises Comparativas da Tolerância ao Alumínio em Gramíneas...	50
7. CONCLUSÕES.....	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

RESUMO

A toxicidade ao alumínio (Al) é um dos maiores problemas para a agricultura em solos ácidos, que ocupam grandes áreas da região agricultável no mundo. Em condições de baixo pH associado a estes solos, o Al^{3+} é solubilizado e se torna tóxico para as plantas, inibindo o crescimento de suas raízes e reduzindo a produtividade da cultura. Genótipos adaptados aos solos ácidos podem oferecer uma solução adequada a este problema. O milho possui importância no contexto econômico mundial e nacional, e exibe variabilidade genética para a tolerância ao Al, entretanto pouco se sabe sobre as regiões do genoma do milho relacionadas com a tolerância ao Al. O objetivo deste trabalho foi identificar regiões genômicas em milho associadas com a tolerância ao Al, e correlacioná-las com locos de outras espécies de gramíneas. Uma população de 118 RIL (*Recombinant Inbred Lines*) derivada pelo cruzamento entre duas linhagens contrastantes para a característica foi avaliada por meio do crescimento radicular em solução nutritiva contendo níveis tóxicos de Al. Um mapa de ligação foi construído e seis QTL foram mapeados nos cromossomos 3, 5, 6 e 8, explicando 55.10% da variação fenotípica. Todos os seis QTL foram detectados em regiões ortólogas associadas com a tolerância ao Al em outras espécies de gramíneas.

ABSTRACT

Aluminum (Al) toxicity is one of the major constraints for agriculture on acid soils, which occupy large regions of the world's agricultural area. At the low pH values associated with these soils, Al^{3+} is solubilized into the soil solution and is toxic to plants, inhibiting root growth and crop yield. Cultivars genetically adapted to acid soils may offer an environmental compatible solution. Maize is the most economically important cereal crop species in the world and exhibits high genetic variability to Al tolerance, however, little is known about maize genomic regions that confers Al tolerance. The aim of this work was to identify genomic regions associated with Al tolerance in maize, and correlate it to loci in other grass species. A population of 118 RIL (Recombinant Inbred Lines) derived from a cross between two contrasting maize inbred lines for Al tolerance was evaluated using a root growth parameter in nutrient solution containing toxic level of aluminum. A linkage map was constructed and six QTL were mapped on chromosomes 3, 5, 6 and 8, explaining 55.10% of the phenotypic variation. All six QTL mapped to orthologous regions associated to Al tolerance in other grasses.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição de frequências de CLR, CLsAl e CLcAl na população de RIL gerada pelo cruzamento entre L1327 e L5337.
- Figura 2:** Genotipagem de parte da população de RILs gerada pelo cruzamento entre L53 e L1327 com marcadores SSR (A), STS (B) e RFLP (C) 40.
- Figura 3:** Mapa genético com 140 marcadores distribuídos no genoma do milho (*Zea mays* L.) na população de RIL gerada pelo cruzamento entre L1327 e L5341.
- Figura 4:** Relações sintênicas entre o cromossomo 1 de arroz, cromossomos 3 e 8 de milho (Wilson et al., 1999) e cromossomo 3 de sorgo (Magalhães et al., 2004)53.
- Figura 5:** Relações sintênicas entre o cromossomo 3 de arroz, cromossomos 1, 5 e 9 de milho (Wilson et al., 1999), cromossomo 4H de cevada, 4DL de trigo e 4R de centeio (Nguyen et al., 2003)54.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Resumo da análise conjunta de variância de quatro experimentos para os índices crescimento líquido relativo (CLR) e seus componentes, crescimento líquido com e sem alumínio (CL_{cAl} e CL_{sAl})38.
- Tabela 2:** Marcadores associados com a tolerância ao alumínio pela análise de regressão múltipla42.
- Tabela 3:** QTL associados à tolerância ao alumínio por meio de mapeamento por intervalo composto, na população de RILs gerada entre L1327xL53 para o índice CLR. Localização genômica, porcentagem de variância fenotípica e genotípica44

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grau centígrado

Adh1: alcóol desidrogenase 1

Adh2: alcóol desidrogenase 2

Al: alumínio

ALMT1: gene do transportador de malato ativado por alumínio (*Aluminum-activated Malate Transporter*) de trigo

Alp : loco de tolerância ao Al em cevada

Alt1: loco de tolerância ao alumínio em centeio

Alt2: loco de tolerância ao alumínio em centeio

Alt3: loco de tolerância ao alumínio em centeio

Alt4: loco de tolerância ao alumínio em centeio

Alt_{BH} : loco de tolerância ao alumínio em trigo

Alt_{SB}: gene de tolerância ao alumínio em sorgo

ANOVA: análise de variância

BAC: cromossomo artificial bacteriano (*Bacterial Artificial Chromosome*)

BSA: análise de *bulks* segregantes (*Bulk Segregant Analysis*)

cDNA: DNA complementar

CF: comprimento final da raiz seminal

CI: comprimento inicial da raiz seminal

CIM: mapeamento por intervalo composto (*Composite Interval Mapping*)

CL_{cAl} : crescimento líquido da raiz seminal em presença de alumínio

CLR: crescimento líquido relativo da raiz seminal

CL_{sAl}: crescimento líquido da raiz seminal em ausência de alumínio

cM: centiMorgan

CV_e: coeficiente de variação experimental

CV_g: coeficiente de variação genética

DNA: ácido desoxirribonucléico

EST: etiquetas de seqüências expressas (*Expressed Sequence Tag*)

g: força gravitacional

h²_m: herdabilidade entre as médias das famílias

IM: mapeamento por intervalo (*Interval Mapping*)

M: concentração molar

MAGI: ilhas genômicas alinhadas de milho (*Maize Assembled Genomic Islands*)

Mb: megabases

MIM: mapeamento por intervalo múltiplo (*Multiple Interval Mapping*)

mL: mililitro

μL: microlitro

mM: milimolar

μM: micromolar

ng: nanograma

NIL: linhagem isogênica (*Near Isogenic Lines*)

PCR: reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pH: potencial hidrogeniônico

QTL: loco de característica quantitativa (*Quantitative Trait Locus*)

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RIL: linhagem endogâmica recombinante (*Recombinant Inbred Lines*)

ScALMT1 : gene de tolerância ao alumínio em centeio

SDS: dodecilsulfato de sódio

SSR: repetição de sequência simples (*Single Sequence Repeats*)

STS: sítios marcados por seqüências (*Sequence Tagged Sites*)

TIGR: Instituto de Pesquisa Genômica (*The Institute for Genomic Research*)

U: unidade

V: volts

Vs: *versus*

µg: micrograma

1. INTRODUÇÃO

A toxicidade do alumínio (Al) é um dos principais fatores que limitam a produtividade das plantas em solos ácidos, sendo que estes representam 63% do território brasileiro (FAO, 2007). Adicionalmente, em torno de 30% das terras agricultáveis do planeta são constituídas por solos ácidos (vonUexküll e Mutert, 1995), reforçando a importância do problema inerente à toxicidade de Al para a agricultura mundial. Esses solos são caracterizados pelo pH abaixo de 5,5, onde formas monoméricas parcialmente protonadas de Al^{+3} são liberadas na solução do solo, atingindo níveis fitotóxicos. O ápice radicular é o sítio primário da ação tóxica desse metal, que causa uma drástica inibição do crescimento do sistema radicular, limitando a capacidade das plantas em absorver água e nutrientes, o que afeta o desenvolvimento e a qualidade dos grãos (Foy, 1992).

O milho (*Zea mays* ssp. *mays*) é atualmente o cereal de maior importância econômica no mundo, sendo cultivado para a alimentação humana e animal. Na safra 2005/2006, aproximadamente 12 milhões de hectares do território brasileiro foram dedicados ao seu cultivo, produzindo 35 milhões de toneladas de grãos (FAO, 2007). A demanda mundial crescente de milho coloca o Brasil em situação estratégica para ampliar o cultivo deste cereal, onde as áreas de cultivo são essencialmente compostas por solos ácidos e com elevada saturação de Al. Apesar de práticas agrícolas de correção da acidez do solo minimizarem os efeitos tóxicos do Al nas plantas, o uso de cultivares tolerantes torna-se fundamental para a sustentabilidade da produção agrícola no país.

A colinearidade (conservação da ordem linear de locos nos cromossomos em diferentes espécies) em gramíneas tem sido amplamente explorada por meio de mapas genéticos entre espécies filogeneticamente próximas utilizando marcadores comuns entre estas (Devos e Gale, 2000). Vários genes que controlam características importantes como deiscência de semente, florescimento e altura de plantas foram mapeados em regiões ortólogas (regiões genômicas em diferentes espécies originadas de um ancestral comum, que divergiram por um evento de especiação) entre milho, sorgo, arroz e cana-de-açúcar (Paterson et al., 1995; Pereira e Lee, 1995; Peng et al., 1999; Guimarães et al., 1999).

Da mesma maneira, a conservação de locos ortólogos controlando a tolerância ao Al tem sido descrita entre membros da tribo Triticeae (Miftahudin et al., 2002; Garvin e Carver, 2003) e entre arroz e sorgo (Magalhães et al., 2004). O milho possui níveis relativamente elevados de tolerância ao Al, apresentando uma herança quantitativa sob controle de um número reduzido de genes (Magnavaca et al., 1987b; Lima et al., 1992). Apesar da grande quantidade de informações acerca da tolerância ao Al em gramíneas (Nguyen et al., 2003; Magalhães et al., 2004; Fontecha et al., 2007), o controle genético desta característica em milho é ainda pouco compreendido, havendo apenas dois estudos que relatam o mapeamento de locos associados com a tolerância ao Al nesta espécie (Sibov et al., 1999; Ninamango-Cárdenas et al., 2003). A existência de pouca informação genética e fisiológica em milho sobre a tolerância ao Al, aliada à complexidade do genoma desta espécie, torna a genômica comparativa uma estratégia válida para avaliar a tolerância ao Al em milho, explorando a colinearidade entre os genomas das gramíneas para agregar informações genéticas em uma espécie pouco estudada.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de gerar um mapa de ligação na população de RIL, mapear os QTL de tolerância ao AI nesta população e por meio de análises comparativas avaliar a conservação de genes e QTL já detectados em outras espécies de gramíneas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Solos Ácidos e a Toxicidade do Alumínio

Os solos ácidos se caracterizam por baixos valores de pH ($\text{pH} < 5$), baixa disponibilidade de nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas e elevada toxicidade mineral, principalmente causada pela presença de Al. Este último é o fator isolado que provoca a maior limitação ao cultivo agrícola nestes solos (Eswaran et al., 1997).

Os solos ácidos ocupam aproximadamente 30% da área terrestre mundial livre de gelo e ocorrem principalmente em dois cinturões globais: o cinturão norte, em área de clima frio e úmido; e o cinturão do sul, em área tropical (vonUexküll e Mutert, 1995). O continente com maior percentual de acidez do solo é o americano, com quase 41% da sua área ocupada por solo ácido (vonUexküll e Mutert, 1995).

O Al está presente nos solos em muitas formas minerais, incluindo óxidos, aluminossilicatos, sulfatos e fosfatos. Em valores de pH neutro, o Al presente no solo está predominantemente na forma não tóxica $\text{Al}(\text{OH})_3$. Entretanto, em condições de acidez o Al ocorre como $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, sendo este último também denominado Al^{3+} (Kinraide, 1991), que é considerada a forma fitotóxica (Kinraide e Parker, 1990).

2.2. Efeitos do Alumínio nas Plantas

O alumínio iônico (Al) é altamente tóxico para as plantas, interferindo em vários processos fisiológicos e bioquímicos (Kochian, 1995). O grau de toxicidade varia

amplamente de acordo com a espécie da planta, condições de crescimento, concentrações de Al e a duração da exposição.

Como o Al pode interagir com um grande número de estruturas extra e intracelulares, há muitos alvos potenciais para o dano, como a parede celular, a membrana plasmática, o citoesqueleto e o núcleo (Kochian, 1995). Em geral, o Al aumenta a rigidez da parede celular pela ligação cruzada de pectinas, reduz a replicação de DNA por aumentar a rigidez da dupla hélice, fixa o fósforo em formas menos disponíveis no solo, diminui a respiração nas raízes, interfere com a atividade enzimática relacionada à fosforilação de açúcares, à deposição de polissacarídeos na parede celular e à captura, transporte e uso de vários nutrientes (Foy, 1992).

O primeiro sintoma da toxicidade ao Al é uma alteração da morfologia das raízes (Ciamporova, 2002), com rápida inibição do seu crescimento, resultando em um sistema radicular reduzido e danificado, o que leva a uma absorção limitada de água e nutrientes minerais (Kochian et al., 2004). Nas raízes, o ápice, e mais especificamente a porção distal da zona de transição do ápice, é o sítio primário da toxicidade por Al (Sivaguru e Horst, 1998), que rompe rapidamente a expansão e o alongamento celular, antes de inibir a divisão celular propriamente dita (Wallace e Anderson, 1984).

Apesar de a maior parte do Al associado à raiz estar na membrana, uma pequena fração entra rapidamente no citosol e interage com alvos locais (Lazof et al., 1996; Sivaguru e Horst, 1998; Silva et al., 2000), rompendo a dinâmica do citoesqueleto e interagindo tanto com microtúbulos quanto com filamentos de actina, o que é um componente importante na inibição da elongação das raízes (Grabski e Schindler, 1995; Blancaflor et al., 1998; Sivaguru et al., 2003).

Além disso, o contato com o Al desencadeia a formação de espécies reativas de oxigênio (Kochian et al., 2004) capazes de interagir com qualquer molécula dentro da célula. A exposição prolongada ao Al provoca interações com o núcleo celular, resultando no rompimento da divisão celular (Silva et al., 2000).

Em milho, foi observado por Ryan et al. (1993) que a inibição do crescimento radicular ocorria apenas quando o Al era aplicado na região apical da raiz (3 mm terminais), não havendo influência significativa no seu crescimento quando o Al era colocado em contato com outras partes da raiz. Com tais resultados, os autores sugeriram que a toxicidade envolve diretamente a interação do Al com o meristema apical ou com a zona de alongamento das raízes. Kollmeier et al. (2000) demonstraram que a aplicação de Al entre 2,5 e 5 mm do ápice radicular não possuía efeito no crescimento das raízes, e que a porção distal, localizada de 1 a 2 mm do ápice radicular, era a parte das raízes do milho mais sensível ao Al. Estes autores sugeriram a existência de um mecanismo de sinalização, mediando o sinal de Al entre a zona distal, sensível ao Al, e a zona de alongamento, responsável pela inibição do crescimento radicular causado pelo Al. A distribuição subcelular do Al no ápice radicular de milho foi descrita por Vásquez et al. (1999), que detectaram a presença de Al tanto na parede celular quanto no simplasma, em vacúolos.

2.3. Mecanismos de Tolerância das Plantas ao Alumínio

As plantas possuem mecanismos distintos de tolerância à presença de Al no solo, que podem ser separados em duas categorias. Uma baseada na detoxificação externa do Al, que protege o ápice radicular contra a penetração do Al e outro baseado na detoxificação interna, que permite o acúmulo do Al nas raízes e nas partes aéreas.

Ainda é controverso o número de mecanismos de tolerância ao Al nas plantas, mas sabe-se que muitas fazem uso de mais de um mecanismo concomitantemente. O trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum* Moench) é um exemplo, pois além de apresentar exsudação do ácido orgânico oxalato pelas raízes em resposta ao Al no solo, também quela o Al interno com o oxalato nas folhas (Ma et al., 1998) e com o citrato no xilema (Ma e Hiradate, 2000).

No mecanismo interno, o Al é associado a um ligante orgânico como as catequinas, ácidos fenólicos ou ácidos orgânicos e estes complexos ficam armazenados em células especializadas como as células da epiderme foliar (Watanabe e Osaki, 2002), prevenindo assim os seus efeitos nos processos metabólicos da planta. Esta estratégia foi descrita em trigo mourisco (*F. esculentum* M.), chá verde (*Camellia sinensis*) e em hortêncica (*Hydrangea macrophylla*) (Takeda et al., 1985; Nagata et al., 1992; Ma et al., 1997a). Vásquez et al. (1999) observaram que em uma variedade tolerante de milho o Al foi acumulado nos vacúolos das células das raízes.

Dentre os mecanismos de exclusão, a exsudação de compostos fenólicos (Ofei-Manu et al., 2001), o efluxo de fosfato (Pellet et al., 1996; Zheng et al., 2005), a secreção de proteínas que se ligam aos íons de Al (Basu et al., 1999), a permeabilidade seletiva da membrana plasmática para reduzir a captura de Al para o citosol (Archambault et al., 1997) e o controle do pH da rizosfera mediado pelas raízes (Degenhardt et al., 1998) têm sido identificados como envolvidos na tolerância ao Al. Apesar de ainda não ser completamente elucidado, o mecanismo de detoxificação externa mais estudado é a exsudação de ácidos orgânicos pela raiz, como citrato, malato e oxalato (Ma et al., 1998; Ma, 2000; Ryan et al., 2001; Kochian et al., 2004). Ácidos di e tri-carboxílicos formam complexos estáveis com o Al^{3+} presente na rizosfera,

reduzindo ou mesmo anulando seus efeitos tóxicos, uma vez que tais complexos são incapazes de atravessar a membrana plasmática (Kochian et al., 2004).

A primeira evidência para esse mecanismo de tolerância foi publicada por Miyasaka et al. (1991) que demonstraram que um cultivar de feijão (*Phaseolus vulgaris*) resistente ao Al excretava oito vezes mais citrato pelas raízes que o genótipo sensível. Delhaize et al. (1993a) também demonstraram que genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) tolerantes ao Al liberavam malato e acumulavam significativamente menos Al no ápice radicular comparado com genótipos sensíveis. Delhaize et al. (1993a) e Ryan et al. (1995) demonstraram em linhagens isogênicas ou NIL (*Near Isogenic Lines*) de trigo que um único loco controlava a tolerância ao Al, induzindo rapidamente a liberação de malato no ápice radicular da linhagem tolerante.

Desde a publicação destes trabalhos, a liberação de ácidos orgânicos induzida pela presença de Al tem sido descrita em várias espécies de plantas. Algumas exudam oxalato, como o inhame (*Colocasia esculenta*) e o trigo mourisco (*F. esculentum*) (Ma et al., 1997b; Zheng et al., 1998) e outras como o trigo (*T. aestivum*) (Delhaize et al., 1993b) e *Arabidopsis thaliana* (Hoekenga et al., 2003) exudam malato. A soja (*Glycine max*) (Yang et al., 2000), o tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Delhaize et al., 2001), o arroz (*Oryza sativa*) (Ishikawa et al., 2000), o sorgo (*Sorghum bicolor*) (Magalhães et al., 2002) são exemplos de espécies que secretam citrato como mecanismo de tolerância ao Al. Para algumas espécies já foi descrita a exsudação de mais de um tipo de ácido orgânico, como o milho (*Zea mays*) que exuda citrato (Pellet et al., 1995; Jorge e Arruda, 1997; Ishikawa et al., 2000; Kollmeier et al., 2001; Piñeros et al., 2002) e oxalato (Kidd et al., 2001) e a aveia que exuda citrato e malato (Zheng et al., 1998).

Pouco se sabe sobre o mecanismo que desencadeia a secreção dos ácidos orgânicos, mas a alteração do seu metabolismo e a ativação de canais iônicos têm sido consideradas. De acordo com Ryan et al. (1995), os ácidos orgânicos são liberados na rizosfera através de canais aniônicos. Em milho (Piñeros e Kochian, 2001; Piñeros et al., 2002) e em trigo (Ryan e al., 1997; Zhang et al., 2001) a ativação de canal aniônico por Al já foi identificada em protoplastos de pontas de raízes por experimentos eletrofisiologia.

Após a exposição ao Al, os ácidos orgânicos podem ser exudados seguindo dois padrões diferentes. No padrão tipo I, nenhum intervalo é verificado entre a adição do Al e o início da exsudação, o que sugere que não ocorre a ativação da expressão gênica, mas a ativação de um canal iônico já presente na membrana e a liberação de ácido orgânico armazenado no citosol. É o que ocorre em espécies como o trigo, no qual o Al ativa a liberação de malato quase que instantaneamente (Delhaize et al., 1993b).

No padrão tipo II há um marcante intervalo de tempo entre a exposição ao Al e a liberação do ácido orgânico (Ma, 2000). Esse intervalo de tempo sugere a necessidade de indução de genes relacionados com a biossíntese e/ou transporte de ácidos orgânicos por meio da ativação de canais iônicos. Este padrão foi descrito em centeio (*Secale cereale*) onde um intervalo de seis e dez horas foi observado entre a exposição ao Al e a exsudação de malato e citrato, respectivamente (Li et al., 2000).

2.4. Tolerância ao Alumínio em Milho

O principal mecanismo de tolerância ao Al em milho tem sido apontado como sendo a exsudação de citrato pelas raízes (Pellet et al., 1995; Jorge e Arruda, 1997; Kollmeier et al., 2001; Piñeros et al., 2002), apesar de a liberação de oxalato já ter sido

descrita também (Kidd et al., 2001). Pellet et al. (1995) foram os primeiros a demonstrar que a exsudação de citrato era muito maior em genótipos tolerantes quando comparados com genótipos sensíveis. Entretanto, Piñeros et al. (2005) ao examinarem um painel de seis genótipos de milho tolerantes e sensíveis ao Al observaram uma correlação significativa entre a exclusão de Al pelos ápices das raízes e a tolerância ao Al. Entretanto, estes autores reportaram uma baixa correlação entre a tolerância ao Al e a exsudação de citrato pelas raízes, sugerindo que embora a liberação de citrato pelas raízes desempenhe uma função importante na tolerância ao Al, provavelmente não é o único mecanismo atuando em milho.

Os trabalhos pioneiros de Magnavaca et al. (1987b), Lima et al. (1992) indicaram que a tolerância ao Al em milho é uma característica de herança quantitativa, sendo controlada por um número reduzido de genes. Esses resultados são concordantes com os dados de fisiologia já descritos e em conjunto sugerem que além da exsudação de citrato outros mecanismos podem estar envolvidos com a tolerância ao Al em milho.

2.5. Avaliação da Tolerância ao Alumínio nas Plantas

Existem vários métodos para avaliar a tolerância ao Al em plantas. Os ensaios de campo são realizados sob condições naturais de clima e solo, onde são avaliadas características com produção de grãos e acúmulo de biomassa. Assim, os dados finais não refletem apenas os efeitos do Al, mas uma interação entre as demais condições edafo-climáticas onde o experimento foi conduzido. Apesar de requerer longos períodos de tempo e grandes áreas, esse tipo de avaliação é de grande importância para a seleção de genótipos em programas de melhoramento.

Os métodos de avaliação em solução nutritiva sob condições controladas, além de permitirem uma maior padronização das condições experimentais, os efeitos avaliados são exclusivamente associados com a toxicidade do Al. Nestes ensaios, a tolerância é quantificada pela inibição do crescimento radicular na presença de níveis tóxicos de Al em comparação com o crescimento na ausência de Al, sendo possível discriminar fenotipicamente os genótipos tolerantes ou sensíveis (Aniol, 1990; Minella e Sorrells, 1992). A quantificação da inibição do crescimento radicular tem sido amplamente utilizada para avaliar a tolerância ao Al em milho (Lopes et al., 1987; Sibov et al., 1999; Ninamango-Cárdenas et al., 2003), sorgo (Magalhães et al., 2004) e arroz (Nguyen et al., 2001; 2002; 2003).

2.6. Mapeamento Genético em Milho

Marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) foram os pioneiros no mapeamento genético em humanos (Botstein et al., 1980), sendo também utilizados na construção do primeiro mapa de ligação de milho, publicado por Helentjaris et al. (1986) com 116 marcadores. O RFLP baseia-se na clivagem sítio específica do DNA com endonucleases de restrição, cujos fragmentos são separados por eletroforese e transferidos para membranas, onde são hibridizados com sondas. Mapas baseados em sondas genômicas e de cDNA foram também construídos por Coe et al. (1987) e por Burr et al. (1988) usando populações F₂ e de RILs, respectivamente.

Gardiner et al. (1993) publicaram uma versão atualizada do mapa de Coe et al. (1987) contendo 214 locos e propuseram o primeiro grupo de marcadores *core*, composto por 97 marcadores RFLP selecionados com base na consistência do mapeamento e no espaçamento entre eles. Baseados nos marcadores *core*, Gardiner et

al. (1993) criaram o conceito de *bin*, que representa a distância entre dois destes marcadores *core*. Assim, o genoma do milho foi subdividido em uma série de *bins*, numerados de acordo com o cromossomo em que se encontram, com subdivisões subseqüentes a partir do marcador RFLP *core* mais distal no braço curto do cromossomo. A distância aproximada entre dois *bins* é de 20 centiMorgans. O sistema de *bin* apresenta a vantagem de que qualquer característica pode ser localizada em uma região reduzida do genoma (Gardiner et al., 1993), tendo sido usado universalmente.

Com o advento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), os marcadores microssatélites, também denominados repetições de seqüência simples ou SSR (*Single Sequence Repeats*) têm sido bastante utilizados na construção de mapas genéticos. Microssatélites são seqüências curtas, de um a seis nucleotídeos, repetidas em tandem ao longo do genoma, onde a variação no número de repetições é detectada por meio de amplificações com iniciadores que se anelam em regiões conservadas que flanqueiam os microssatélites (Rafalski e Tingey, 1993). Os primeiros mapas de milho que fizeram uso dos marcadores microssatélites foram publicados por Senior e Heun (1993) e por Taramino e Tingey (1996). Sharopova et al. (2002) publicaram o mapa genético de milho usando a população IBM (Intermated B73 x Mo17) derivada do cruzamento entre as linhagens temperadas B73 e Mo17, sendo um dos mais saturados, com um total de 748 marcadores microssatélites. Este e vários outros mapas encontram disponíveis para consulta pública no endereço eletrônico: <http://www.maizegdb.org/>. Mapas genéticos de milho contendo etiquetas de seqüências expressas ou ESTs (Expressed Sequence Tag) também estão publicados (Davis et al., 1999).

2.7. Recursos Genômicos em Milho

O milho é tanto uma espécie modelo para estudos genéticos quanto uma espécie de importância econômica mundial. Seu grande genoma (2500 Mb) é quase seis vezes maior que o do arroz (450 Mb) (Rayburn et al., 1993; Messing et al., 2004) e consiste de 60 a 80% de seqüências repetitivas (Flavell et al., 1974; Hake e Walbot, 1980; Messing et al., 2004), além de possuir duplicações gênicas estimadas em 1.5 genomas de arroz (Helentjaris et al., 1988; Ahn e Tanksley, 1993). As regiões intergênicas repetitivas estão organizadas como uma série de inserções aninhadas de retrotransposons (SanMiguel et al., 1996), e se acumulam rapidamente devido as numerosas inserções sítio-específicas que expandem a porção de DNA repetitivo entre genes conservados (Chen et al., 1997).

Juntas, estas características tornam o seqüenciamento do genoma do milho muito difícil. No entanto, várias estratégias têm sido usadas para gerar informações sobre a organização genômica do milho como mapas genéticos de alta densidade (Davis et al., 1999; Cone et al., 2002; Sharopova et al., 2002), seqüenciamento de fragmentos genômicos selecionados pela alta metilação e pela alta temperatura de anelamento (C_0t) (Palmer et al., 2003; Whitelaw et al., 2003; Yuan et al., 2003), seqüenciamento de ESTs de tecidos e condições fisiológicas diferentes (<http://pgir.rutgers.edu/>; <http://www.maizecdna.org/>) e mapas físicos obtidos por meio do seqüenciamento e alinhamento de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) (Coe et al., 2002; Cone et al., 2002). Muitos destes contíguos de BAC têm sido ancorados ao mapa genético público da população IBM2 Neighbors (<http://www.maizegdb.org>) por meio da estratégia de *fingerprinting contigs* (<http://www.genome.arizona.edu/fpc/maize/>), integrando as

informações entre os mapas físico e genético do milho (Coe et al., 2002; Cone et al., 2002).

Existem em andamento dois projetos de seqüenciamento do genoma do milho, ambos iniciados no final de 2005. O primeiro, visa executar o seqüenciamento completo do cromossomo 10 da linhagem Mo17 por meio da técnica de *shotgun* e o segundo visa o seqüenciamento de alta qualidade de regiões gênicas dentro de BAC gerados a partir do DNA genômico da linhagem B73 (http://www.maizegdb.org/sequencing_project.php). Essas duas linhagens representam os dois maiores grupos heteróticos de milho adaptado ao clima temperado, sendo também os parentais da população de mapeamento genético IBM, um dos mapas mais saturados de milho (Sharopova et al., 2002).

Três grupos de pesquisa têm trabalhado em montagens parciais do genoma do milho: *The Institute for Genomic Research* ou TIGR (<http://www.tigr.org/>), *Plant Genome Database* (<http://www.plantgdb.org/>) e *Iowa State University* (<http://www.iastate.edu/>). O grupo de Iowa, fazendo uso de ferramentas computacionais gerou várias ilhas genômicas ou MAGI (*Maize Assembled Genomic Islands*) (<http://magi.plantgenomics.iastate.edu/>) a partir de seqüências da linhagem B73. A versão 3.1 dos MAGI possui 114.173 seqüências, que comparadas com seqüências de BAC sugerem mais de 95% de acerto na montagem, o que sugere que os MAGI refletem corretamente a estrutura do genoma do milho (Fu et al., 2005) e podem ser úteis no seu estudo. Atualmente os MAGI estão na sua versão 4.0.

2.8. Mapeamento de QTL em Milho

Além de estudos de seqüência de DNA e de todos os recursos genômicos disponíveis, muitos mapas genéticos têm sido desenvolvidos para várias populações de milho, graças à existência de populações com características fenotípicas específicas e interessantes. Uma das aplicações mais importantes dos mapas genéticos é a localização de genes que controlam características de importância econômica, como produção de grãos e resistência a doenças, que por se tratarem de características complexas são denominadas como caracteres quantitativos (Stuber et al., 1987). Os genes ou locos cromossômicos que controlam uma determinada característica quantitativa são denominados QTL (*Quantitative Trait Loci*). Segundo Falconer e Mackay (1996) um QTL é um segmento de cromossomo que afeta uma determinada característica, não sendo necessariamente um único gene.

O estudo de QTL possibilita mensurar o número de locos quantitativos envolvidos na herança complexa, bem como suas localizações cromossômicas, modo de ação gênica (aditividade, dominância e epistasia), além de possibilitar a decomposição da interação de genótipos por ambientes em nível de cada QTL (Ferreira e Grattapaglia, 1996). A capacidade de detecção de um QTL é função da magnitude do seu efeito sobre a característica, do tamanho da população segregante avaliada, da freqüência de recombinação entre o marcador e o QTL, bem como da herdabilidade da característica (Tanksley, 1993).

O procedimento de procura, localização e estimação dos efeitos de QTL é denominado de mapeamento de QTL e seus princípios básicos envolvem a análise de associações entre marcadores moleculares e os valores das características fenotípicas. Quanto mais próximo um marcador estiver de um QTL, maior será o grau de

associação. Portanto, o mapeamento se fundamenta na recombinação entre o QTL e marcadores (Christians, 2002).

Populações que maximizem o desequilíbrio de ligação são desejáveis para o mapeamento de QTL, uma vez que o desequilíbrio é definido como sendo qualquer desvio da segregação em relação ao esperados sob independência, indicando a existência de uma ligação entre os dois locos avaliados. Em geral são usadas populações segregantes, obtidas pelo cruzamento entre parentais que sejam contrastantes para a característica de interesse e divergentes para maximizar a obtenção de polimorfismos, gerando uma população F_2 , de retrocruzamento, ou de linhagens endogâmicas recombinantes (RIL ou *Recombinant Inbred Lines*).

Dentre os métodos propostos para a localização de QTL encontram-se os modelos lineares (ANOVA e regressão linear), mapeamento por intervalo ou IM (*Interval Mapping*), mapeamento por intervalo composto ou CIM (*Composite Interval Mapping*) (Zeng, 1993, 1994; Jansen, 1993; Jansen e Stam, 1994) e mapeamento por intervalo múltiplo ou MIM (*Multiple Interval Mapping*) (Kao et al., 1999).

O mapeamento por intervalo composto, proposto simultaneamente por Jansen (1993; 1994) e Zeng (1993; 1994) segue o princípio do controle dos efeitos de QTL situados fora do intervalo que está sendo mapeado para evitar a interferência destes no QTL que está sendo avaliado. Além de proporcionar maior resolução no mapeamento, permite o uso de dados obtidos em vários ambientes, para avaliar os efeitos da interação QTL *vs.* Ambientes. O modelo se baseia na regressão múltipla entre a observação fenotípica e o conjunto de marcadores, garantindo que o efeito eventualmente detectado no mapeamento em um dado intervalo depende tão somente dos efeitos dos QTL nele presentes. Como vários marcadores são incluídos como cofatores no modelo, além dos

que flanqueiam o intervalo em análise, há um maior controle da variância genética residual, o que aumenta o poder do teste estatístico e a precisão do mapeamento (Zeng, 1994).

Em milho existe um grande número de trabalhos desenvolvidos visando o mapeamento de QTL. Já foram descritos QTL associados à produção de grãos (Lu et al., 2006) ou a características de interesse específico, tais como resposta ao estresse à seca (Xiao et al., 2005), altura de planta e de espiga (Zhang et al., 2006), resistência a patógenos (Sabry et al., 2006), entre outros. Ninamango-Cárdenas et al. (2003) desenvolveram o único estudo disponível que mapeou QTL para a tolerância ao Al em milho.

2.9. Mapeamento Comparativo entre as Gramíneas

Uma das aplicações interessantes dos mapas de genéticos é a comparação entre genomas de espécies filogeneticamente próximas. O mapeamento comparativo se baseia na detecção de locos ortólogos (Berhan et al., 1993). A ortologia é inferida pela localização de locos em regiões sintênicas, que são regiões colineares e derivadas do mesmo cromossomo ancestral (Bennetzen, 2000; Keller e Feuillet, 2000). Os cromossomos em espécies diferentes derivados do mesmo cromossomo ancestral são designados homeólogos (Keller e Feuillet, 2000). A colinearidade observada entre os marcadores moleculares entre diferentes espécies levanta a possibilidade de que a localização de genes que controlam características de interesse agrônômico também possa ser predita uma vez que relações homeólogas entre cromossomos sejam estabelecidas.

Os genomas das gramíneas são bastante diferentes em termos de tamanho (430 Mb em arroz a 15.996 Mb em trigo), ploidia e número cromossômico (arroz: 12; milho e sorgo: 10; cevada, centeio e trigo diplóide: 7; trigo hexaplóide e aveia: 21) (Arumuganathan e Earle, 1991). Apesar destas diferenças já foi demonstrado haver conservação da ordem linear de marcadores genéticos e de genes entre diferentes espécies dentro deste grupo. Pereira e Lee (1995), por exemplo, descreveram QTL associados com a altura de plantas nos grupos de ligação A, E e H de sorgo, ortólogos aos QTL para altura de plantas descritos nos cromossomos 1, 6 (Beavis et al., 1991) e 9 (Veldboom et al., 1994) de milho. Peng et al. (1999), descreveram que o gene que controla o nanismo em milho, arroz e em trigo possui a função similar de controlar a sensibilidade ao hormônio giberelina e se localiza em posição ortóloga entre estas espécies, nos cromossomos 1, 3 e 4, respectivamente. Deste modo, as espécies de gramíneas têm sido consideradas como um sistema genético único (Bennetzen e Freeling, 1993).

O primeiro mapa consenso das gramíneas publicado alinhou os genomas de seis espécies diferentes (Moore et al., 1995) e desde então foi atualizado (Gale e Devos 1998, Devos e Gale 2000, Devos et al., 2005) compreendendo em sua última versão arroz, milheto *foxtail*, cana-de-açúcar, sorgo, milheto *pearl*, milho e membros da tribo Triticeae (trigo, centeio e cevada).

Entretanto, a colinearidade dos genomas parece ser algumas vezes interrompida. Por exemplo, a comparação de seqüências no loco *Adh1* de milho, sorgo e arroz demonstrou que deleções/inserções ou translocações de genes ocorreram durante a evolução (Tarchini et al., 2000). Em milho, nove genes foram encontrados neste loco distribuídos ao longo de 225 kb. Em uma região de 78 kb no genoma de sorgo, os nove

homólogos de milho foram identificados em ordem colinear, além de outros cinco genes adicionais. Em arroz o locus *Adh1* está ligado ao locus *Adh2*, no cromossomo 11; em milho estes locos encontram-se em cromossomos diferentes: *Adh1* no cromossomo 1 e *Adh2* no cromossomo 4 (Paterson et al., 1995, Tarchini et al., 2000). Uma perda de colinearidade também foi descrita entre o gene de resistência à ferrugem, *rgp1*, em cevada e arroz. Em cevada este loco se encontra no cromossomo 1, sintênico ao cromossomo 6 de arroz. Entretanto a inserção de um fragmento de 10-15kb foi o responsável pelo rompimento da colinearidade entre estes cromossomos no loco do gene *rgp1* (Killian et al., 1997).

De acordo com Paterson et al. (2004), uma duplicação ancestral e uma subsequente diploidização moldaram os genomas de todas as espécies dentro da família das gramíneas. A extensão com a qual perdas gênicas diferenciais contribuiu para incongruências nos mapas comparativos está relacionada à duração do período entre o evento de duplicação e a divergência das respectivas linhagens.

Apesar de rupturas na colinearidade entre os genomas das gramíneas ocorrerem, a estratégia de mapeamento comparativo tem se mostrado bastante útil na integração de informações genômicas de diferentes espécies dentro da família.

2.10. Genética Comparativa da Tolerância ao Alumínio em Gramíneas

Diferentes espécies variam enormemente em sua habilidade para tolerar os efeitos danosos do Al e contrastes significativos têm sido descritos dentro até mesmo de uma mesma espécie. O controle genético da tolerância ao Al tem sido bastante estudado em gramíneas, especialmente em membros da tribo Triticeae, representada pelo trigo (*Triticum aestivum* L.), centeio (*S. cereale*) e cevada (*Hordeum vulgare* L.). Em alguns

cultivares de trigo muitos genes com efeitos aditivos parecem estar envolvidos (Aniol e Gustafson, 1984; Aniol, 1991) sendo controlada por um único gene em outros cultivares (Aniol e Gustafson, 1984; Fisher e Scott, 1987; Larkin, 1987). Delhaize et al. (1993a) demonstraram que o loco *Alt1* explicou a maior parte das diferenças na tolerância entre linhagens isogênicas de trigo contrastantes para essa característica. O *Alt1* parece ser o mesmo loco identificado como *Alt2* no cromossomo 4D de trigo por Luo e Dvorak (1996) usando mapeamento físico. Neste mesmo cromossomo 4D foi mapeado o gene de tolerância *Alt_{BH}* a 1,1 cM do marcador RFLP bcd1230, explicando 85% da variação fenotípica para a tolerância ao Al em uma população de RILs derivada do cruzamento de BH1146 e Anahuac (Riede e Anderson, 1996). Recentemente, o primeiro gene de tolerância ao Al foi clonado em trigo, o *ALMT1* (*Aluminum-activated Malate Transporter*), que codifica o transportador de malato ativado por Al (Sasaki et al. 2004). Segundo estes autores, o gene *ALMT1* provavelmente corresponde ao loco *Alt1* descrito anteriormente por Luo e Dvorak (1996).

Os mesmos marcadores ligados ao gene *Alt_{BH}* foram associados ao gene *Alp* de tolerância ao Al em cevada (*H. vulgare* L.). Nesta espécie, a herança da tolerância ao Al é monogênica conforme descrito por Minella e Sorrells (1992; 2002). O gene *Alp* se localiza no cromossomo 4H flanqueado a 2,1 cM pelos marcadores bcd1117, wg464 e cdo1395, sendo esse último também ligado ao gene de tolerância de trigo *Alt_{BH}*. O marcador bcd1230, fortemente ligado ao *Alt_{BH}* de trigo foi mapeado a 33 cM do gene *Alp*, sugerindo que pode ter ocorrido uma quebra de colinearidade por um rearranjo estrutural entre os cromossomos 4H de cevada e 4D de trigo (Tang et al., 2000).

Em centeio (*Secale cereale* L.) foram descritos quatro locos relacionados com a tolerância ao Al: *Alt1*, localizado no cromossomo 6RS; *Alt2*, localizado no

cromossomo 3RS; *Alt3*, no cromossomo 4RL e *Alt4* no cromossomo 7RS (Aniol e Gustafson, 1984; Gallego et al., 1998a; 1998b; Miftahudin et al., 2002; 2005; Matos et al., 2005). Fontecha et al. (2007) clonaram o gene *ScALMT1* associado ao fenótipo de tolerância ao Al em centeio, homeólogo ao *TaALMT1* de trigo e o mapearam no cromossomo 7RS, na mesma posição do loco *Alt4* identificado anteriormente. Evidências da conservação na posição de genes de tolerância ao Al entre os cromossomos homeólogos 4D de trigo, 4H de cevada e 4RL de centeio levaram Garvin e Carver (2003) a sugerirem a existência locos ortólogos controlando essa característica entre membros da tribo Triticeae.

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

A tolerância ao Al em arroz apresenta herança complexa e QTL associados a essa característica foram mapeados em todos os 12 cromossomos de arroz (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2001, 2002, 2003). Ao todo foram identificados 40 QTL em quatro populações diferentes, ocorrendo epistasia entre alguns deles. Apesar do grande número de QTL, alguns foram consistentemente identificados nas quatro populações, um deles de efeito maior e localizado no cromossomo 1 (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2002, 2001), e outro no cromossomo 3 (Nguyen et al., 2003). Considerando que o cromossomo 3 de arroz é homeólogo aos cromossomos 4 da tribo Triticeae, a

conservação na posição de genes de tolerância ao AI pode ser estendida para a tribo *Oryzea*.

Em sorgo (*Sorghum bicolor* L.) a tolerância ao AI também é controlada por um gene maior localizado no cromossomo 3, o *Alt_{SB}*, explicando em torno de 80% da variação fenotípica da tolerância (Magalhães et al., 2004). Essa região não é ortóloga àquela onde foram localizados locos de tolerância ao AI em vários membros da tribo Triticeae como trigo, cevada e centeio, no grupo cromossômico 4. Entretanto, essa porção do cromossomo 3 de sorgo é homeólogo (cromossomo em espécies diferentes derivados do mesmo cromossomo ancestral; Keller e Feuillet, 2000) ao cromossomo 1 de arroz, região onde foram detectados QTL para tolerância ao AI em diferentes populações (Magalhães et al., 2004).

De maneira semelhante ao arroz, a tolerância ao AI em milho tem sido descrita como uma característica quantitativa, baseada na distribuição normal de frequências em progênies geradas pelo cruzamento entre linhagens tolerantes e sensíveis ao AI (Sawasaki e Furlani, 1987; Magnavaca et al., 1987a). Em contraste a estes estudos, Rhue et al. (1978) ao estudarem populações F₂ e de retrocruzamento de milho sugerem que a tolerância ao AI em milho é uma característica controlada por um único loco com uma série alélica múltipla. Entretanto esta aparente discrepância sobre o tipo de herança para a tolerância ao AI em milho pode ser explicada pela diferença nos germoplasmas usados nos estudos. Os estudos moleculares iniciais da tolerância ao AI em milho empregaram a análise de *bulks* segregantes ou BSA (*Bulk Segregant Analysis*) (Michelmore et al., 1991) (Brondani e Paiva, 1996; Torres et al., 1997) e confirmaram a natureza quantitativa da característica. Sibov et al. (1999) identificaram dois locos associados com a característica nos cromossomos 6 e 10 de milho na linhagem Cat-100-

6; e de acordo com os autores, uma epistasia recessiva poderia explicar a ocorrência de uma classe fenotípica intermediária para a tolerância ao AI. Ninamango-Cárdenas et al. (2003) mapearam cinco QTL nos cromossomos 2, 6, 8 de milho. Ambos os trabalhos utilizaram populações de milho tropical e apenas um QTL, localizado no bin 6.00 foi coincidente entre os estudos. Como esses mapas foram construídos sem marcadores comuns a outras espécies de gramíneas, inferências sobre a conservação dessas regiões genômicas associadas com a tolerância ao AI não podem ser ampliadas para o milho. Considerando a complexidade genética da tolerância ao AI em milho, o pouco conhecimento a respeito dessa característica nessa espécie e a importância econômica deste cereal, torna-se estratégico trazer o grande acervo de informações disponíveis em outras espécies de gramíneas para o milho, por meio da genômica comparativa.

3. OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o fenótipo da tolerância ao Al em uma população de RIL gerada pelo cruzamento de duas linhagens contrastantes para a característica; gerar um mapa de ligação para esta população; investigar as regiões do genoma do milho relacionadas à tolerância ao Al nesta população por meio de mapeamento de QTL; analisar as regiões genômicas já associadas com a tolerância ao Al em outras espécies de gramíneas com os dados encontrados neste trabalho. Com este mapa espera-se uma maior compreensão da genética da tolerância ao Al em milho bem como em outras espécies da família Poaceae.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Genético

Uma população com 118 linhagens endogâmicas recombinantes ou RILs (*Recombinant Inbred Lines*) segregando para o caráter tolerância ao Al foi obtida pelo cruzamento entre as linhagens L53 e L1327 (Cateto Al 237/67), sensível e tolerante ao Al, respectivamente.

A linhagem L53 foi originada a partir da população CMS11 (Pool 21 do CIMMYT - *Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz Y Trigo*, México) e a linhagem L1327, a partir da variedade Cateto Água Limpa. Ambas foram desenvolvidas pela EMBRAPA Milho e Sorgo, sendo resultantes de mais de 10 ciclos de autofecundação. Pelo cruzamento entre estas linhagens foi gerado o híbrido F₁ que foi autofecundado gerando a população F₂, cujos indivíduos foram autofecundados sucessivamente até chegar em F₉, estágio também chamado de S₇ em milho (*self pollination*), constituindo a população de linhagens endogâmicas recombinantes ou RILs.

4.2. Fenotipagem para a Tolerância ao Alumínio

A avaliação da tolerância ao Al foi realizada em solução nutritiva sob condições controladas em câmara de crescimento com temperatura diurna média de 27 ± 3°C, noturna de 20 ± 3°C e fotoperíodo de 12 horas, sob aeração contínua.

Sementes das linhagens parentais L53 e L1327 e das 118 famílias de RILs foram germinadas em rolos de papel umedecidos com água deionizada. Após quatro dias de germinação, as plântulas com desenvolvimento uniforme dentro de cada família

foram transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC escuras dentro de bandejas plásticas opacas com capacidade para oito litros e meio de solução nutritiva completa contendo Ca (3527 μM), K (2354 μM), Mg (855 μM), N- NO_3 (10857 μM), NNH_4 (1300 μM), P (45 μM), S (587 μM), B (25 μM), Fe (77 μM), Mn (9,1 μM), Cu (0,63 μM), Mo (0,83 μM), Zn (2,29 μM), Na (1,74 μM), Fe-HEDTA (75 μM), Cl (596 μM) segundo Magnavaca et al. (1987b). O pH inicial das soluções foi ajustado para 4,0, não sendo realizados ajustes no decorrer da avaliação.

Após um dia de incubação em solução nutritiva o Comprimento Inicial da raiz seminal (CI) de cada plântula foi medido e estas foram transferidas para bandejas solução nutritiva contendo 222 μM de Al^{3+} na forma de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$, que correspondem a uma atividade de {39 μM } de Al. Plântulas de cada uma das linhagens foram mantidas em solução completa sem adição de Al, como controle. Após cinco dias de tratamento, o Comprimento Final da raiz seminal (CF) das plântulas foi medido. O Crescimento Líquido da raiz seminal (CL) foi obtido pela diferença entre o comprimento final (CF) e o comprimento inicial (CI) avaliados sob estresse de Al (CL_{cAl}) ou na condição controle (CL_{sAl}).

O índice fenotípico para a avaliação da tolerância ao Al foi o Crescimento Líquido Relativo da raiz seminal (CLR), obtido pela divisão do Crescimento Líquido em condição de estresse (CL_{cAl}) pelo Crescimento Líquido em condição controle (CL_{sAl}).

4.3. Análise Estatística dos Dados Fenotípicos

O experimento para quantificação da tolerância ao Al em solução nutritiva foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com duas repetições, sendo cada parcela experimental constituída de sete indivíduos de cada progênie. O teste de normalidade das características avaliadas: Crescimento Líquido em ambiente sem estresse (CL_{sAl}), Crescimento Líquido em ambiente com estresse (CL_{cAl}) e Crescimento Líquido Relativo da raiz seminal (CLR) foi realizado com o programa Statistica versão 4.5 (Stat Soft, Inc 1993). A análise de variância foi realizada para cada um dos índices em cada um dos experimentos de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + p_i + e_{ij}; \text{ onde:}$$

Y_{ij} = observação da i -ésima progênie na repetição j ;

μ = média geral;

p_i = efeito da i -ésima progênie ($i = 1, 2, \dots, 118$);

e_{ij} = erro associado à observação Y_{ij} .

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento PROC GLM do programa SAS (*Statistical Analysis System*, SAS, 1999). As variâncias genéticas entre as linhagens endogâmicas recombinantes foram obtidas pelas médias de cada repetição. Também foram estimadas a herdabilidade entre as médias das famílias (h^2_m), o coeficiente de variação experimental (CV_e) e de variação genética (CV_g).

4.4. Análises Genotípicas

4.4.1. Extração e quantificação de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de folhas jovens de dez plantas de cada uma das 118 linhagens endogâmicas recombinantes e dos parentais L53 e L1327. As folhas coletadas foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração, de acordo com método descrito por Saghai-Marroof et al. (1984).

Cerca de três gramas das folhas ainda congeladas foram macerados com nitrogênio líquido. Neste momento tomou-se o cuidado de se usar folhas de todas as plantas que representavam cada linhagem. O pó resultante foi transferido para frasco plástico de 50 mL, foram adicionados 10 mL de tampão CTAB (CTAB 2%; Tris-HCl 0,2 M; NaCl 1,4 M; EDTA 0,02 M; β -Mercaptoetanol 2%). Após leve agitação manual, a mistura foi mantida a 65°C em banho-maria por uma hora, com agitação a cada 15 minutos. Em seguida foi realizada lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1), com homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 5000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para novo frasco plástico de 50 mL para nova lavagem com clorofórmio-octanol (24:1). O sobrenadante obtido nesta segunda lavagem foi transferido para tubo de vidro de 25 mL, onde foi adicionado igual volume de isopropanol a -20°C. Após a agitação manual do tubo o DNA precipitado foi transferido com auxílio de uma alça de vidro para microtubo de 1,5 mL e ressuspenso em 1 mL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) contendo RNase (0,1 mg/mL).

O DNA genômico obtido foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0) com um padrão de

concentração conhecida para sua quantificação e avaliação de integridade. Após uma hora de eletroforese a 100 V, o gel foi incubado por 15 minutos em solução de brometo de etídio (1 µg/mL), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene®).

4.4.2. Marcadores microssatélites

Um total de 526 marcadores microssatélites foram avaliados entre as linhagens parentais para a identificação de polimorfismos, sendo posteriormente aplicados na população de mapeamento. As seqüências dos iniciadores estão disponíveis no *Maize Genetics and Genomics Database* (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>).

As reações de amplificação utilizando iniciadores não marcados consistiram de 30 ng de DNA genômico; Tris-HCl 10 µM pH 8,0; KCl 50 µM; MgCl₂ 2 µM, 125 µM de cada um dos deoxinucleotídeos; 0,6 µM de cada um dos iniciadores e uma unidade (1 U) da enzima Taq DNA polimerase em volume final de 10 µL. Os ciclos de amplificação foram de uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos; nove ciclos de 94°C por 20 segundos, 68°C por 20 segundos com a redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 20 segundos; seguidos de 25 ciclos de amplificação a 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 20 segundos. Finalmente, a reação foi submetida a um período de extensão a 72°C por cinco minutos.

Os fragmentos amplificados foram resolvidos em géis de acrilamida 10% (29:1 acrilamida:bisacrilamida) em tampão TBE (Tris-HCl 0,89 M; ácido bórico 0,02 M; EDTA 0,02 M; pH 8). Após duas horas de eletroforese a 200 V, os géis foram incubados sob agitação constante por 15 minutos em solução fixadora (etanol 10%; ácido acético 0,5%), 15 minutos em solução de nitrato de prata 0,2% e em solução

reveladora (NaOH 3%; formaldeído 0,5%) até que as bandas aparecessem. A imagem do gel foi fotografada sob luz branca no equipamento Eagle Eye II (Stratagene®).

As reações de amplificação com iniciadores fluorescentes consistiram de 30 ng de DNA genômico; Tris-HCl 20 μ M pH 8,0; KCl 50 μ M; MgCl₂ 1,5 μ M, 125 μ M de cada um dos deoxinucleotídeos, 0,2 μ M de cada um dos iniciadores e uma unidade (1 U) da enzima Taq DNA polimerase em volume final de 10 μ L. Os ciclos de amplificação foram os mesmos realizados para os iniciadores não marcados. Os fragmentos amplificados foram diluídos de acordo com suas fluorescências nas proporções de 1:40, 1:16 e 1:13 para 6-FAM (azul), HEX (verde) e NED (amarelo), respectivamente. Dessa diluição, 3 μ L foram misturados a 6,7 μ L de formamida Hi-Di (Applied Biosystems®) e 0,3 μ L do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems®). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo até o momento da eletroforese no equipamento ABI3100, com capilares de 36 cm e polímero POP4 (Applied Biosystems®). Após a eletroforese os fragmentos foram analisados com o programa GeneMapper versão 3.5 (Applied Biosystems®) para a determinação do genótipo dos indivíduos.

4.4.3. Marcadores RFLP

Para avaliar a combinação sonda-enzima adequada para o mapeamento, aproximadamente 50 μ g de DNA genômico das linhagens parentais foram incubados separadamente com 100 U de cada uma das enzimas de restrição *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *PvuI*, *BamHI*, *HindIII*, *XbaI*, *XhoI*, *PstI* e *DraI* por 18 horas, em temperatura adequada. Nem todas as enzimas foram utilizadas para todas as sondas, e aquelas combinações polimórficas foram avaliadas na população. Os fragmentos resultantes

foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0). Após 16 horas de eletroforese a 30 V, o gel foi incubado por 15 minutos em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta. A transferência do DNA do gel para membrana de Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences[®]) foi realizada por capilaridade em presença de NaOH 0,4 M por 24 horas em temperatura ambiente de acordo com Sambrook et al. (1989). Posteriormente, a membrana foi incubada por 10 minutos em solução SSC 2X (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M) sob com agitação e armazenada a 4°C até sua utilização.

As sondas bcd1230, isu68, isu52, cdo795, rz14, bcd1117, rz630, cdo1387, cdo1395, zm1 e mALMT1, associadas com a tolerância ao Al em outras espécies de gramíneas, clonadas em pUC19, foram amplificadas com os iniciadores M13 F (5'GTAAAACGACGGCCAGTG3') e R (5'TCACACAGGAAACAGCTA3') seguindo as mesmas condições da reação para os marcadores SSR não marcados. Os ciclos da reação de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos; 30 ciclos de 94°C por um minuto, 60°C por um minuto e 72°C por um minuto, finalizada a 72°C por cinco minutos. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% em tampão TAE tratado com brometo de etídio, cortados do gel sob luz ultravioleta e armazenados em microtubos a -20°C até o momento do uso. As sondas foram marcadas com [α^{32} P]CTP utilizando o kit *Ready to Go DNA Labelling Beads* (Amersham Biosciences[®]) de acordo com as recomendações do fabricante. As sondas de RFLP foram fornecidas pela Universidade de Missouri-Columbia (EUA) e os fragmentos mALMT1 e zm1 foram gentilmente cedidos pelo Dr. Leon Kochian da Universidade de Cornell (EUA).

A hibridização foi realizada conforme descrito por Bernatzky e Tanksley (1986). As membranas foram pré-hibridizadas com 15 mL de solução de pré-hibridização (NaCl 0,75 M; ácido cítrico trisódico di-hidratado 125 mM; SDS 0,6%; Na₃PO₄ 0,05 M; solução de Denhard's 5X; EDTA 2,5 mM; sulfato dextran 0,05%; DNA de esperma de salmão 100 µg/mL) por 3 horas a 65°C. Em seguida, a sonda desnaturada a 100°C foi adicionada à solução de hibridização, ficando em contato com as membranas por 16 horas a 65°C. As membranas foram lavadas duas vezes por 30 minutos com 100 mL de solução SSC 1X, SDS 0,1%; e uma vez com solução SSC 0,5X, SDS 0,1%, todas a 65°C. As membranas foram expostas a filme de raio-X hipersensível (Kodak®) em cassete com tela intensificadora a -80°C por 24 horas e após este período o filme foi revelado em câmara escura com soluções fixadora e de revelação (Kodak®).

4.4.4. STS - Sequence Tagged Sites

Por meio de estratégias de bioinformática utilizando seqüências dos genes de tolerância ao alumínio *ALMT1* de trigo (Sasaki et al., 2004) e *Alt_{SB}* de sorgo (Magalhães et al., 2007, submetido), o Dr. Owen Hoekenga (Universidade de Cornell, EUA) identificou seqüências genômicas de milho (MAGI ou *Maize Assemble Genomic Islands*) contendo similaridades com esses genes (comunicação pessoal).

Um total de nove destes MAGI foram avaliados para identificação de polimorfismos entre as linhagens parentais L53 e L1327. Dentre eles, MAGI4_49968, MAGI4_154934 e MAGI4_30642 apresentaram similaridade de seqüência com o gene *Alt_{SB}* de sorgo, enquanto MAGI4_48924, MAGI3_90876, MAGI3_92049, MAGI4_1318, MAGI4_41238, MAGI4_160591 foram similares ao gene de tolerância

ao Al em trigo, *ALMT1*. As seqüências dos MAGI estão disponíveis no endereço <http://magi.plantgenomics.iastate.edu/>.

As reações de amplificação e a eletroforese dos fragmentos obtidos foram desenvolvidas de acordo com a metodologia descrita no item 4.4.2. para microssatélites não fluorescentes. Iniciadores específicos para cada um deles foram desenhados, os que apresentaram polimorfismo foram seqüenciados e após a confirmação da seqüência correta os MAGI foram mapeados na população.

4.5. Construção do Mapa de Ligação

Os polimorfismos obtidos com os marcadores RFLP, SSR e de MAGI foram codificados como 0 (alelo proveniente do parental sensível ao Al) ou 2 (alelo proveniente do parental tolerante ao Al), sendo os indivíduos heterozigotos desconsiderados das análises. A segregação de cada loco foi avaliada quanto aos desvios da segregação esperada para a população de RIL (1:1) por meio do teste Qui-quadrado ($p < 0,05$). As análises de ligação foram realizadas com $LOD > 2,0$ e frequência de recombinação menor que 0,4; utilizando o programa MapMaker/EXP versão 3.0 (Lander et al., 1987). As distâncias em centiMorgans (cM) foram estimadas pela função de Kosambi (Kosambi, 1944).

4.6. Mapeamento de QTL

O índice fenotípico utilizado para a avaliação da tolerância ao Al foi a média do crescimento líquido relativo (CLR). Inicialmente, todos os marcadores mapeados foram associados com dados fenotípicos por meio da análise de regressão múltipla a 2% de probabilidade utilizando o método *stepwise* por meio do programa Jump 3.1.6.2

(SAS Institute). O coeficiente de determinação (R^2) foi utilizado para estimar a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo marcador e o coeficiente de regressão indicou o efeito de cada marcador na tolerância ao Al.

O mapeamento de QTL para tolerância ao Al foi realizado pela metodologia de intervalo composto ou CIM (Jansen e Stam, 1994; Zeng, 1994) implementada pelo programa QTL Cartographer versão 2.5 para Windows (Wang et al., 2006). Para controlar a interferência de múltiplos QTL foi utilizado o modelo 6 e a regressão *forward* utilizando 20 cofatores e uma janela de 30 cM. A localização mais provável dos QTL dentro do intervalo bem como as estimativas de seus efeitos genéticos foram determinadas pelo método da Máxima Verossimilhança (Fisher, 1921) com testes realizados a cada 1 cM. O QTL foi declarado presente na posição em que o valor de LOD foi superior ao limite de significância determinado por 1000 permutações segundo Churchill e Doerge (1994).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da Tolerância ao Alumínio na População de RILs

O Crescimento Líquido Relativo (CLR) foi o índice fenotípico utilizado para avaliar da tolerância ao Al na população de RILs e apresentou distribuição normal (Figura 1), confirmando a natureza quantitativa da herança da característica em milho. Como os índices CL_{sAl} e CL_{cAl} foram os componentes do Crescimento Líquido Relativo, eles também foram avaliados quanto a distribuição na população, apresentando distribuição normal (Figura 1).

Pela análise de variância, tanto o índice CLR quanto seus componentes CL_{sAl} e CL_{cAl} possuem variabilidade genética nesta população (Tabela 1). Esses resultados, juntamente com os componentes de variância, viabilizam as análises de mapeamento de QTL para a tolerância ao Al em milho. Mesmo não sendo diretamente associado com a tolerância ao Al, a distribuição normal e a existência de variabilidade significativa para o crescimento radicular na ausência de Al (CL_{sAl}) ressalta a necessidade do uso desse índice como controle, em relação ao crescimento líquido na presença do Al.

As estimativas de herdabilidade mostraram valores elevados em nível de médias das famílias para CL_{sAl} , CL_{cAl} e CLR (0,888; 0,901; 0,809; respectivamente). A herdabilidade reflete a proporção da variância fenotípica explicada pela variância genética que pode ser herdada. Estimativas elevadas de herdabilidade reafirmam a superioridade do uso de médias na avaliação de progênies quanto à tolerância ao Al, semelhante aos resultados obtidos por Martins et al. (1999) e Ninamango-Cárdenas et al. (2003) em solução nutritiva.

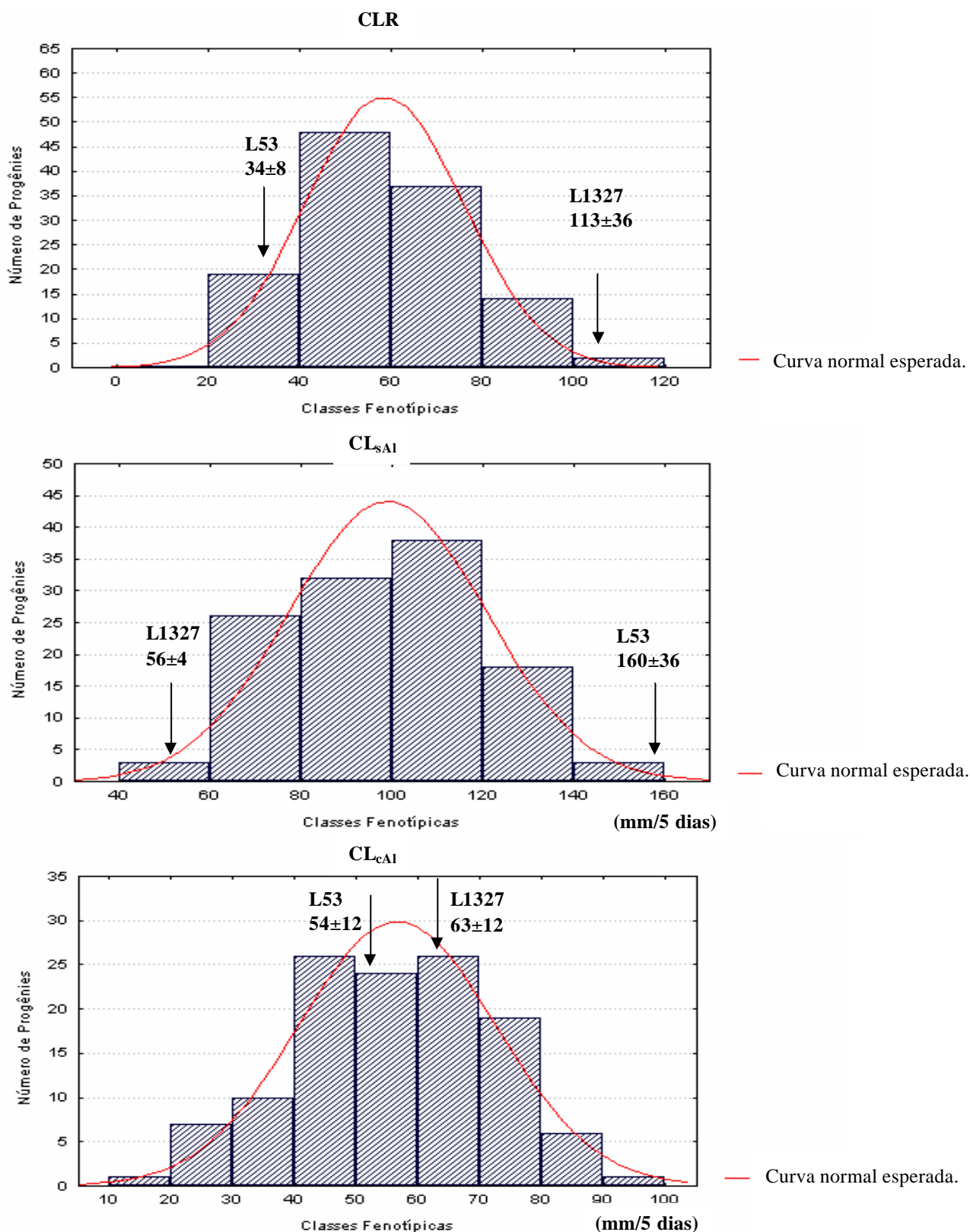


Figura 1: Distribuição de freqüências para CLR, CL_{sAl} e CL_{cAl} na população de RILs gerada pelo cruzamento entre L1327 e L53. A linha indica a curva normal esperada. As setas indicam a posição das linhagens parentais L53 e L1327, sensível e tolerante ao alumínio, respectivamente.

Tabela 1: Resumo da análise conjunta de variância de quatro experimentos para os índices crescimento líquido relativo (CLR) e seus componentes, crescimento líquido com e sem alumínio (CL_{sAl}, e CL_{cAl}). ** corresponde a 1% significância pelo Teste F.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>G.L.</i>	<i>QM</i>		
		CLR	CL_{sAl}	CL_{cAl}
Linhagens	117	0.05646**	868.12**	518.38**
Erro	118	0.01077	97.43	51.54
Estimativas	-	CLR	CL_{sAl}	CL_{cAl}
Variância Genética	-	0.0228	385.35	233.42
Variância Fenotípica entre médias	-	0.0282	434.06	259.19
Herdabilidade entre médias	-	0.809	0.888	0.901
Coefficiente de Variação Experimental (CV _e)	-	0.177	0.100	0.127
Coefficiente de Variação Genética (CV _g)	-	0.258	0.198	0.271
Média Geral	-	0.5860	98.92	56.48
CV.gen/CV.exp		1.46	1.99	2.13

O coeficiente de variação genética (CV_g) foi superior ao coeficiente de variação experimental (CV_e), para o CLR, confirmando a precisão na avaliação da característica (Tabela 1).

5.2. Mapa de Ligação

Foram avaliados um total de 526 pares de iniciadores microssatélites, 11 sondas RFLP de milho, arroz, aveia e cevada localizadas próximas a QTL de tolerância ao Al nestas espécies e nove MAGI com similaridade de seqüência aos genes de tolerância ao Al em trigo (*ALMT1*) e sorgo (*Al_{SB}*) entre as linhagens L53 e L1327. Dentre eles, 156 microssatélites, cinco RFLPs (zm01, mALMT1, bcd1230, isu68 e cdo795) e os nove MAGI apresentaram polimorfismo entre as linhagens parentais e foram avaliados na população de mapeamento. Um exemplo da segregação de cada tipo de marcador molecular em uma parte da população de RILs está mostrado na Figura 2.

Um total de 140 marcadores moleculares polimórficos foram alocados no mapa de ligação ao longo de 12 grupos de ligação (Figura 3), sendo 128 microssatélites, três RFLPs e nove MAGI. O mapa de ligação cobriu 1.657 cM do genoma do milho, com uma média de um marcador a cada 11,75 cM, o que pode ser considerada uma saturação adequada para o mapeamento de QTL. Uma descontinuidade no cromossomo 2, entre os marcadores bnlg1017 e dupssr27 (bins 2.02 e 2.03) e outra no cromossomo 6, entre os marcadores phi15981 e umc1413 (bins 6.01 e 6.05) resultaram na formação dos 12 grupos de ligação representando os 10 cromossomos do milho.

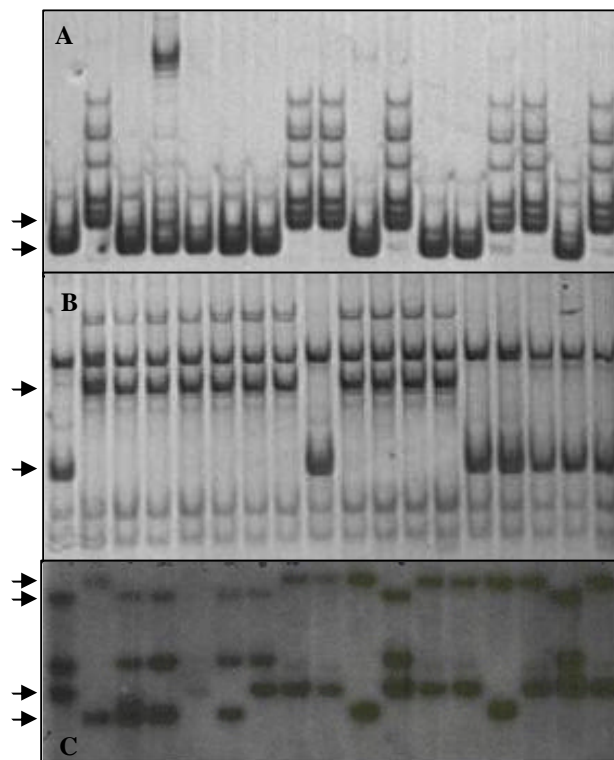


Figura 2: Genotipagem de parte da população de RILs gerada pelo cruzamento entre L53 e L1327 com marcadores SSR (A), STS (B) e RFLP (C). As setas à esquerda indicam os polimorfismos. A: Perfil de amplificação do loco SSR umc2224 visualizado em gel de poliacrilamida corado com prata. B: Padrão de amplificação do MAGI4_41238 visualizado em gel de poliacrilamida corado com prata. C: Padrão de hibridização com a sonda RFLP bcd1230 marcada com isótopo radioativo, revelando dois locos com segregação independente.

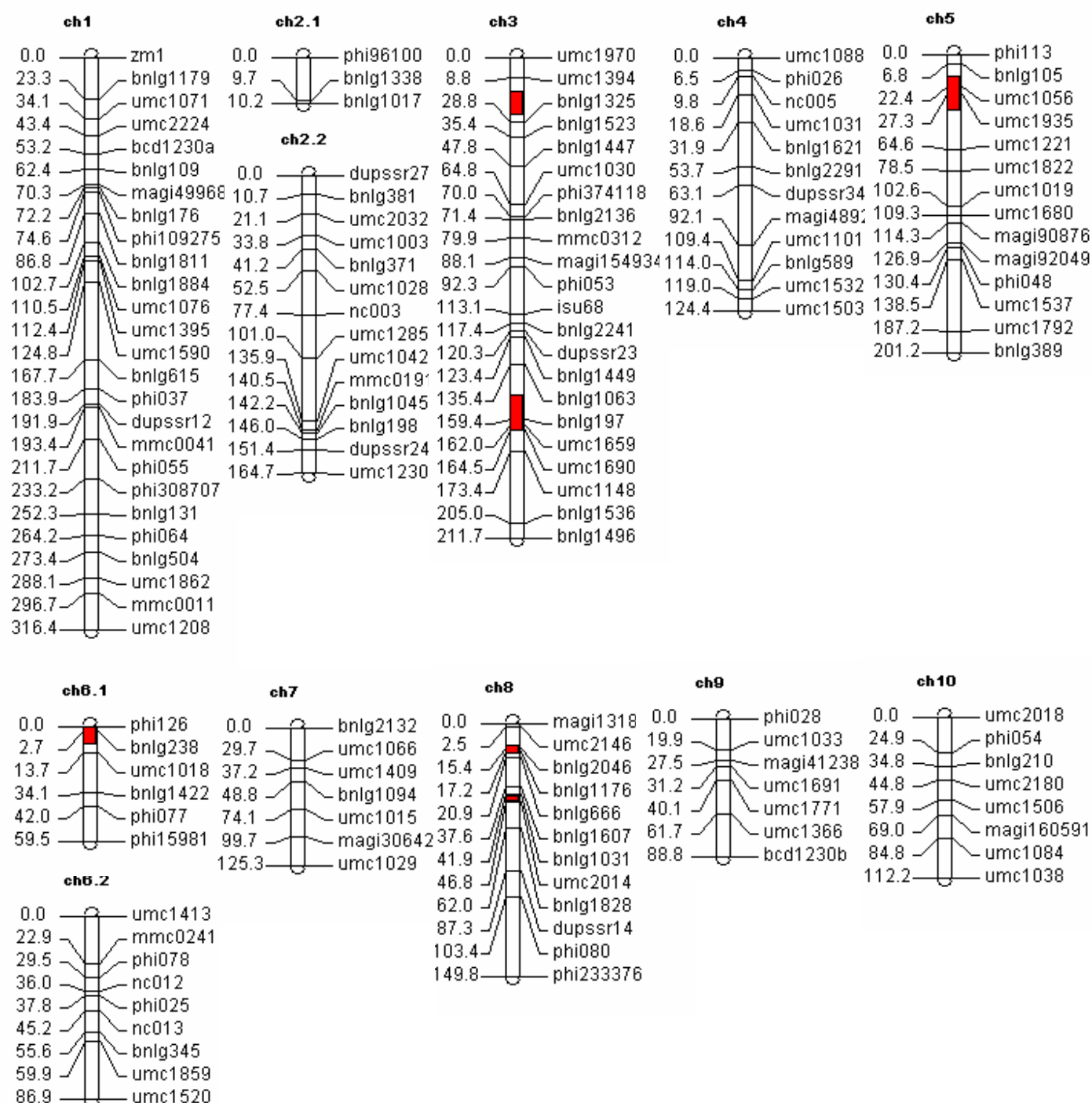


Figura 3: Mapa genético com 140 marcadores distribuídos no genoma do milho (*Zea mays* L.) na população de RILs gerada pelo cruzamento entre L1327 e L53. Os números à esquerda dos cromossomos representam as distâncias em cM entre os marcadores, contadas a partir do telômero; à direita está apresentado o nome do marcador. As barras nos cromossomos indicam as posições dos QTL de tolerância ao Al.

Dentre os 140 marcadores mapeados apenas três SSR e um MAGI apresentaram distorção na segregação mendeliana e mesmo assim foram mapeados nas posições esperadas no cromossomo 10. A ordem dos marcadores no mapa de ligação foi concordante com a dos mapas genéticos públicos de milho disponíveis no *Maize Genetics and Genomics Database* (<http://www.maizegdb.org/>).

5.3. Mapeamento de QTL para Tolerância ao Alumínio

Os dados de segregação de todos os marcadores e as médias do índice fenotípico CLR de cada linhagem foram inicialmente avaliados por meio de uma regressão múltipla, que detectou cinco marcadores associados com o CLR, a uma probabilidade inferior a 2%, explicando entre 5,29% (mmc0241) e 17,70% (umc1056) da variação fenotípica para a tolerância ao Al, totalizando 37,17% (Tabela 2).

Pelo método de mapeamento por intervalo composto (Zeng, 1994; Jansen e Stam, 1994) foram mapeados seis QTL para tolerância ao Al na população de RILs com base no índice fenotípico CLR (Figura 3), distribuídos nos cromossomos 3 (QTL_{3.1} e QTL_{3.2}), 5 (QTL_{5.1}), 6 (QTL_{6.1}) e 8 (QTL_{8.1} e QTL_{8.2}). As contribuições dos seis QTL na variância fenotípica e genotípica e seus efeitos aditivos na característica CLR foram estimados e estão apresentados na Tabela 3. Os efeitos aditivos para CLR variaram de 4.48 para o QTL_{8.2}, localizado entre os bins 8.06-8.07 entre os marcadores bnlg1031-umc2014 a 6.22 para o QTL_{5.1}, que se encontra no cromossomo 5 (bin 5.03) flanqueado pelos marcadores umc1056-umc1935. A proporção da variância fenotípica explicada pelos QTL variou de 7.11 a 13.72% para os mesmos QTL. Juntos, os seis QTL explicam 55.10% da variância fenotípica e 68.11% da variância genotípica para a tolerância ao Al nessa população. Quanto à origem dos alelos favoráveis para a

tolerância ao AI observou-se que os alelos dos seis QTL mapeados foram provenientes do parental tolerante L1327.

Tabela 2: Marcadores associados com a tolerância ao alumínio pela análise de regressão múltipla. O efeito de cada marcador é dado pelo coeficiente de regressão e o coeficiente de determinação (R^2) representa a proporção da variância fenotípica explicada pelo marcador. O sinal negativo do efeito indica que o alelo favorável é derivado da linhagem parental sensível

Marcador	Posição (Bin)	Efeito	R^2(%)	Probabilidade (F)
bnlg1179	1.01	4,60	7,30	0,0045
nc003	2.07	3,85	5,40	0,0113
mmc0312	3.04	-4,03	5,85	0,0138
umc1056	5.03	7,16	17,70	0,0001
mmc0241	6.05	3,85	5,29	0,0172
Total			37,17	

Tabela 3: QTL associados à tolerância ao alumínio por meio de mapeamento por intervalo composto, na população de RILs gerada entre L1327xL53 para o índice CLR. Localização genômica, porcentagem de variância fenotípica e genotípica.

QTL	Cromossomo	Bin	Posição (cM)	Intervalo entre Marcadores	LOD	Efeito Aditivo	R² Fenotípico (%)	R² Genotípico (%)
3.1	3	3.01 - 3.02	22.83	umc1394 - bnlg1325	3.39	5.04	9.00	11.12
3.2	3	3.06 - 3.07	159.37	bnlg197 - umc1659	5.20	5.02	8.92	11.03
5.1	5	5.03	23.39	umc1056 - umc1935	7.32	6.22	13.72	16.96
6.1	6.1	6.00	0.01	phi126 - bnlg238	4.08	4.55	7.35	9.09
8.1	8	8.04 - 8.05	15.4	bnlg2046-bnlg1176	4.28	5.04	9.00	11.12
8.2	8	8.06 - 8.07	45.86	bnlg1031-umc2014	3.55	4.48	7.11	8.79
Total	-	-	-	-	-	30.34	55.10	68.11

LOD: escala logarítmica que indica a probabilidade da existência de um QTL sobre a possibilidade da sua ausência; R² Fenotípico: proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL; R² Genotípico: porcentagem da variância genotípica explicada pelo QTL.

6. DISCUSSÃO

6.1. Avaliação da Tolerância ao Alumínio na População de RIL

A quantificação da tolerância Al foi realizada sob condições controladas em solução nutritiva, garantindo que a inibição do crescimento radicular fosse consequência apenas da presença do Al. Este é o método de avaliação da tolerância ao Al mais empregado em gramíneas, uma vez que possibilita uma análise quantitativa do comprimento radicular de forma não destrutiva, além de ser de fácil execução, permitindo um controle rigoroso das condições experimentais (Ninamango-Cárdenas et al., 2003; Nguyen et al., 2003; Magalhães et al., 2004; Wight et al., 2006).

O índice fenotípico utilizado para avaliar a tolerância ao Al foi Crescimento Líquido Relativo da raiz seminal (CLR), que apresentou distribuição normal (Figura 1), variabilidade genética significativa na população e elevados valores de herdabilidade baseado em médias de famílias (h^2_m) (Tabela 1). Tais resultados confirmam que a tolerância ao Al em milho possui herança quantitativa controlada por um pequeno número de genes, conforme inicialmente proposto por Magnavaca et al. (1987b), Lima et al. (1992) e Ninamango-Cárdenas et al. (2003), utilizando a geração $F_{3:4}$ da mesma população (0,97).

É interessante notar que as linhagens parentais foram alocadas em lados opostos da curva normal do CLR (Figura 1), confirmando o contraste existente entre elas para a tolerância ao Al.

Conforme sugerido por Ma et al. (2002), ao avaliarem a tolerância ao Al em milho e arroz, é importante a utilização da medida do crescimento líquido em condição controle, sem Al (CL_{sAl}) para minimizar o efeito das diferenças intrínsecas do

crescimento radicular entre as linhagens; como de fato ocorreu e pode ser verificado pela variabilidade significativa do CL_{sAl} na população (Tabela 1). O índice fenotípico utilizado por Ninamango-Cárdenas et al. (2003) para o mapeamento de QTL foi o Crescimento Líquido da Raiz Seminal em presença de Al (CL_{cAl}), não sendo avaliado o crescimento radicular em condição controle, o que possibilita que o efeito das diferenças intrínsecas do crescimento radicular entre as linhagens do crescimento da raiz em ausência de Al interfiram na avaliação da tolerância.

Os valores superiores a 100% para o CLR encontrados tanto em RIL e na linhagem parental L1327 (Figura 1) indicam um aumento do crescimento radicular em presença do Al nestas linhagens. Este estímulo não necessariamente resulta de um efeito direto do Al sobre as plantas de milho. As possíveis explicações incluem o bloqueio de cargas negativas em sítios da parede celular favorecendo a absorção de fósforo, e a prevenção da toxicidade causada por outros metais tóxicos (Foy et al., 1978).

A grande amplitude dos valores de CLR, entre 20 e 120%, nos genótipos avaliados em solução nutritiva indica a existência de extensa variabilidade fenotípica para tolerância ao Al na população avaliada. Esta variabilidade pode estar associada ao fato de que em milho mais de um mecanismo para a tolerância ao Al parece ocorrer, conforme descrito por Piñeros et al. (2005), que descrevem que além da exsudação de citrato pelas raízes outros mecanismos fisiológicos parecem estar envolvidos.

A razão entre os coeficientes de variação genético e experimental (CV_g/CV_e) foi maior que 1.0 (Tabela 1), indicando que os efeitos ambientais foram controlados apropriadamente nos experimentos, o que aumenta a confiabilidade da avaliação fenotípica.

Como grande parte da variância fenotípica do CLR é explicada pela variância genética e a sua herdabilidade é alta ($h^2_{\text{médias}} = 0,809$) (Tabela 1), pode-se dizer que a seleção assistida para a tolerância ao AI em milho é possível e bastante adequada em programas de melhoramento.

6.2. Mapa de Ligação

O mapa de ligação construído com 128 marcadores microssatélites, três RFLPs e nove STSs (MAGI), possui cobertura de 1.657 cM do genoma do milho, com uma média de um marcador a cada 11,75 cM. Groh et al. (1998) encontraram uma distância média de 11,5 cM e 14,4 cM entre os marcadores avaliados ao trabalharem com duas populações de RILs de milho. Ming et al. (1997) descreveram um mapa de 1624.7 cM com distância média entre os marcadores de 15,8 cM, também em RILs de milho. Em geral, para a construção de mapas de ligação, a distância média entre marcadores se situa em torno de 20 cM (Fang et al., 2003). Assim, a saturação média obtida no presente mapa de ligação (11, 75 cM) o torna bastante adequado para o mapeamento de QTL, além de ser um valor bastante próximo aos encontrados em outras populações de RILs de milho.

A ordem dos marcadores no mapa de ligação foi concordante com mapas genéticos públicos de milho disponíveis no *Maize Genetics and Genomics Database* (<http://www.maizegdb.org/>). Adicionalmente, nove fragmentos genômicos de milho (MAGI) foram também inseridos nos cromossomos 1, 3, 4, 5, 7, 8, 9 e 10, fornecendo suporte adicional para a ordem correta dos marcadores ao longo dos grupos de ligação.

Os cromossomos 2 e 6 foram segmentados em dois grupos de ligação (Figura 3), entretanto, vários marcadores microssatélites foram avaliados nestas regiões sem

obtenção de polimorfismos na população. Sibov et al. (2003), construindo um mapa de ligação com linhagens de milho adaptadas ao clima tropical também encontraram mais de um grupo de ligação representando um mesmo cromossomo, indicando a presença de um *gap*. Entretanto não houve coincidência entre estas regiões e as encontradas neste trabalho. Outros marcadores poderão ser mapeados nestes intervalos para tentar solucionar a questão.

6.3. Mapeamento de QTL para Tolerância ao Alumínio

Tratando-se a tolerância ao Al como uma característica métrica, procedeu-se à análise de mapeamento por intervalo composto visando verificar a presença de QTL para a tolerância ao Al na população de RILs. Ao todo foram encontrados seis QTL distribuídos nos cromossomos 3, 5, 6 e 8 do milho (Tabela 3, Figura 3). O número de QTL mapeados neste trabalho, para a tolerância ao Al (seis) foi o maior dentre os trabalhos já publicados em milho. Sibov et al. (1999) descreveram dois locos, *Alm1* e *Alm2* nos cromossomos 10 e 6, respectivamente. Ninamango-Cárdenas et al. (2003) utilizando a geração $F_{3:4}$ dessa mesma população mapearam cinco QTL nos bins 2.07, 6.00, 6.05, 8.05 e 8.07. O único QTL conservado entre os três trabalhos foi o localizado no bin 6.00, coincidindo com o QTL₂ publicado por Ninamango-Cárdenas et al. (2003) e com o *Alm2* mapeado por Sibov et al. (1999). O QTL_{8.1} e o QTL_{8.2}, localizados nos bins 8.04 e 8.07 podem ser considerados coincidentes com os QTL 4 e 5 descritos por Ninamango-Cárdenas et al. (2003), respectivamente. Os restantes três QTL detectados nos bins 3.01-3.02, 3.06-3.07, 5.03 são inéditos e não haviam sido descritos anteriormente.

Apesar de Ninamango-Cárdenas et al. (2003) ter utilizado ciclos anteriores dessa mesma população de mapeamento, o mapa atual possui uma cobertura de marcadores cinco vezes superior, o que contribuiu para o aumento na precisão do mapeamento de QTL. Mesmo não tendo sido detectado pelo mapeamento por intervalos compostos, marcadores localizados nos bins 2.07 (nc003) e 6.05 (mmc0241) foram significativamente associados com a tolerância ao Al por meio da regressão múltipla, posições essas coincidentes com os QTL 1 e 3 mapeados por Ninamango-Cárdenas et al. (2003). Outra causa da não coincidência de QTL pode ter sido em função do índice fenotípico utilizado para avaliar a tolerância ao Al, que no trabalho anterior não incluiu a medição do crescimento radicular na ausência do Al tóxico como controle.

A proporção da variância fenotípica explicada pelos seis QTL juntos foi de 55.10%, valor que apesar de ser considerado alto, foi inferior ao encontrado por Ninamango-Cárdenas et al. (2003), que foi de 60%. Os QTL detectados não foram igualmente distribuídos ao longo do genoma do milho, e algumas regiões nos cromossomos 3 e 8 apresentaram uma maior concentração de QTL para a tolerância ao Al. O QTL₅, localizado no bin 5.03, explicou 13,72% da variância fenotípica, podendo ser considerado o QTL de maior efeito para a tolerância ao Al nesta população.

Quanto à origem dos alelos favoráveis para a tolerância ao Al observou-se que os seis QTL mapeados foram derivados do parental tolerante, L1327. Portanto, conforme o esperado, o parental L1327 foi predominante na contribuição de alelos favoráveis para a tolerância ao Al.

6.4. Análises Comparativas da Tolerância ao Alumínio em Gramíneas

Mapas genéticos comparativos têm revelado que os genomas das gramíneas são bastante semelhantes em relação à ordem e ao conteúdo genético e que é possível com eles avaliar, entre diferentes espécies, a ortologia entre locos que atuam em características fenotípicas de interesse (Ahn e Tanksley, 1993; Devos et al., 2005).

O mapa de ligação utilizando marcadores associados com a tolerância ao Al em outras espécies de gramíneas possibilitou a comparação da posição dos QTL com locos de tolerância ao Al em outras espécies de gramíneas. O mapeamento comparativo revelou que todos os seis QTL de tolerância ao Al mapeados se localizam em regiões previamente associadas com essa característica em outras espécies de gramíneas.

Dois QTL foram mapeados no cromossomo 3 em regiões ortólogas ao cromossomo 8 de milho, onde também outros dois QTL foram detectados (Figura 4). O QTL_{8.2}, localizado no braço longo do cromossomo 8 de milho, está em posição homeóloga ao braço longo do cromossomo 1 de arroz (Wilson et al., 1999), onde foi mapeado um QTL que explica grande porcentagem da tolerância ao Al em arroz e encontra-se conservado em pelo menos três populações diferentes (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2001, 2002, 2003). Este QTL está localizado em uma região homeóloga à porção do cromossomo 3 de sorgo que contém o gene *Alt_{SB}*, que explica 80% da tolerância ao Al dessa espécie na população estudada (Magalhães et al., 2004). O braço longo do cromossomo 1 de arroz e do cromossomo 8 de milho também possuem homeologia com o braço longo do cromossomo 3 de milho (Wilson et al., 1999), onde o QTL_{3.2} foi mapeado (Figura 4). Os braços curtos dos cromossomos 3 e 8 de milho, onde

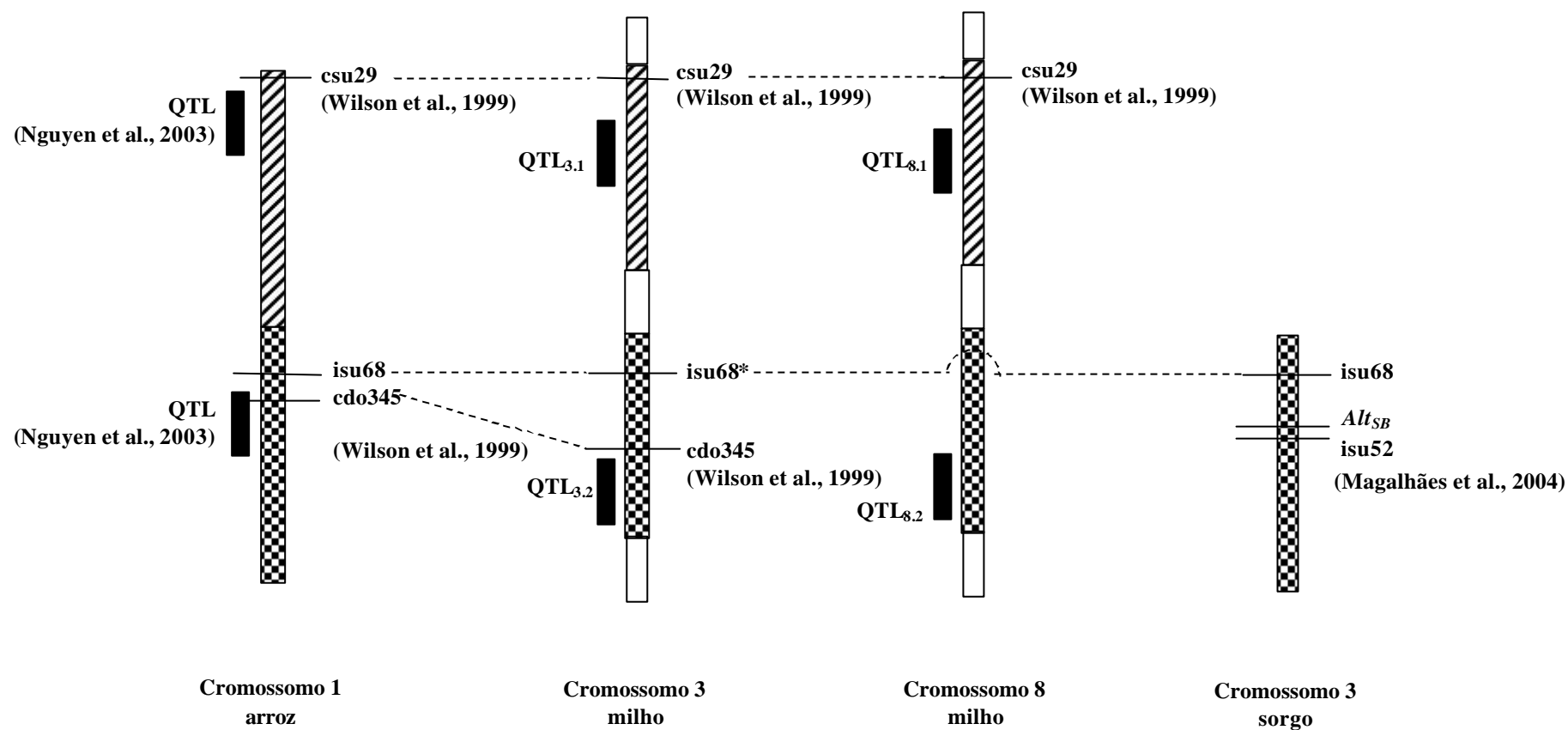


Figura 4: Relações sintênicas entre o cromossomo 1 de arroz, cromossomos 3 e 8 de milho (Wilson et al., 1999), cromossomo 3 de sorgo (Magalhães et al., 2004). Regiões homeólogas estão representadas com barras de mesmo padrão. QTL representados por barras escuras.
* representa marcador mapeado neste trabalho.

foram mapeados os QTL 3.1 e 8.1, respectivamente, são homeólogas entre si e com regiões do braço curto do cromossomo 1 de arroz, onde também foi mapeado um QTL de tolerância ao Al segundo Nguyen et al. (2003). As relações de homeologia entre regiões dos cromossomos 1 de arroz, 3 e 8 de milho e 3 de sorgo estão apresentadas graficamente na Figura 4.

O milho possui origem tetraplóide e contemporaneamente é uma espécie diplóide, o que justifica grande parte do seu genoma ser duplicado. Anh e Tanksley (1993), demonstraram que quase sempre os locos de cópia única em arroz encontram-se duplicados no genoma do milho. Anh et al. (1993) descreveram homeologias entre vários cromossomos de milho, resultantes da duplicação do seu genoma, incluindo regiões dos cromossomos 3 e 8, e entre os cromossomos 1, 5 e 9.

O QTL_{5.1}, de efeito maior nesta população, foi mapeado em uma região do cromossomo 5 de milho ortóloga ao braço longo do cromossomo 3 de arroz (Wilson et al., 1999) e aos cromossomos 4D de trigo (Riede e Anderson, 1996), 4H de cevada (Tang et al., 2000) e 4RL de centeio (Miftahudin et al., 2002), onde foram detectados locos para a tolerância ao Al (Figura 5). Nestas espécies da tribo Triticeae, a tolerância ao Al parece ser relativamente simples e um gene maior parece explicar grande parte da tolerância observada. A herança da tolerância ao Al em trigo tem sido estudada em vários cruzamentos entre linhagens contrastantes a tolerância ao Al parece ser conferida por um único loco dominante, mapeado no braço longo do cromossomo 4D, denominado *Alt_{BH}* ou *Alt₂* (Milla e Gustafson, 2001). Em centeio, também no braço longo do cromossomo 4RL foi mapeado um loco de efeito maior para tolerância ao Al,

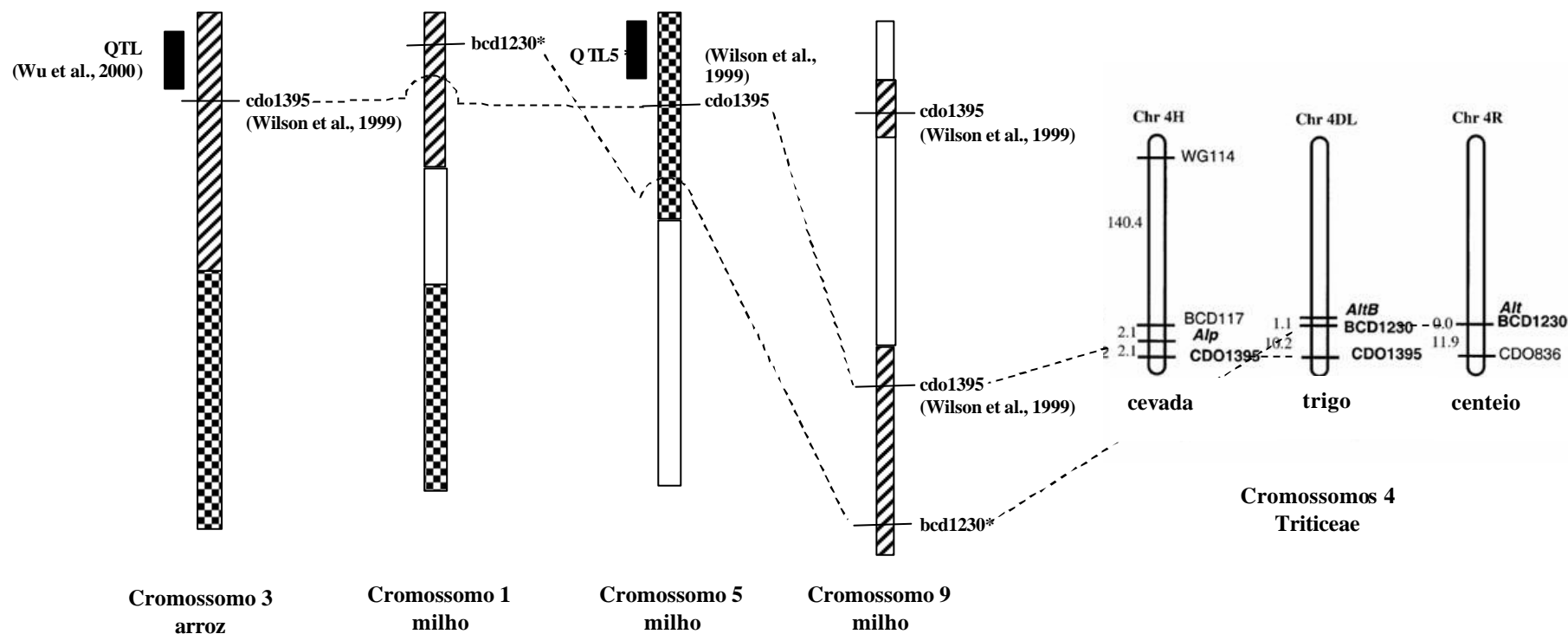


Figura 5: Relações sintênicas entre o cromossomo 3 de arroz, cromossomos 1, 5 e 9 de milho (Wilson et al., 1999), cromossomo 4H de cevada, 4DL de trigo e 4R de centeio (Nguyen et al., 2003). Regiões homeólogas estão representadas com barras de mesmo padrão. QTL representados por barras escuras. * representa marcador mapeado neste trabalho.

denominado *Alt₃* (Gallego e Benito, 1997). O loco *Alt₃* encontra-se fortemente ligado a marcadores mapeados próximo ao loco *Alt_{BH}* de trigo, o que sugere que locos ortólogos controlam a tolerância ao Al nestas duas espécies (Miftahudin et al., 2002). Em cevada, um loco de efeito maior denominado *Alp*, foi mapeado no braço longo do cromossomo 4 por Minella e Sorrells (1992), sendo também ortólogo aos locos *Alt₃* de centeio e *Alt_{BH}* de trigo (Tang et al., 2000). Entretanto, nos cromossomos 1 e 9, homeólogos ao cromossomo 5 não foram detectados QTL de tolerância ao Al. Nessas regiões pode ter ocorrido uma perda de função do loco responsável pela tolerância ao Al, ou nesta população o alelo favorável não está presente, ou ainda o loco não está presente.

A região do cromossomo 6 de milho, onde foi detectado um QTL conservado nos dois estudos mapeamento para tolerância ao Al em milho de origem tropical, é ortóloga ao cromossomo 6 de arroz, onde também foi detectado QTL associado com essa característica (Ma et al., 2002).

Nenhum QTL foi associado com os clones de MAGI identificados *in silico* como possuindo seqüências homólogas aos genes de tolerância ao Al de trigo (*ALMT1*) (Sasaki et al, 2004) e de sorgo (*Alt_{SB}*) (Magalhães et al., 2007, submetido) e mapeados na população. Esses genes são membros de famílias multigênicas em milho e, os clones MAGI mapeados podem não conter as cópias funcionais desses genes.

Tendo em vista a complexidade do genoma do milho e as possíveis quebras na sintenia, estudos mais aprofundados nas regiões de QTL deverão ser realizados para validar os QTL e para identificar genes candidatos.

7. CONCLUSÕES

A tolerância ao AI avaliada por meio do crescimento líquido relativo da raiz seminal apresentou variabilidade significativa para na população de mapeamento, além de distribuição normal e alta herdabilidade, confirmando que essa característica em milho possui herança complexa sob controle de um número reduzido de genes .

Foi gerado um mapa de ligação com 140 marcadores moleculares, cobrindo 1.657 cM do genoma do milho, com um marcador em média a cada 11,75 cM.

Foram mapeados seis QTL de tolerância ao AI nesta população, explicando 55.10% da variância fenotípica da característica. Todos os QTL foram localizados em regiões ortólogas a outros locos associados com essa características em diferentes espécies de gramíneas.

Clones genômicos identificados com base na similaridade de seqüência com os genes de tolerância ao AI (*ALMT1* e *Alt_{SB}*) não foram co-localizados com os QTL.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, S. N.; TANKSLEY, S. D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 7980–7984, 1993.
- ANIOL, A. Genetics of acid tolerant plants. *In*: WRIGHT, R. J. **Plant Soil Interactions at Low pH**. Kluwer, Dordrecht, 1991. pp. 1007-17.
- ANIOL, A.; GUSTAFSON, J. P. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, Ottawa, v. 26, p. 701-05, 1984.
- ARCHAMBAULT, D. J.; ZHANG, G. C.; TAYLOR, G. J. Spatial variation in the kinetics of aluminium (Al) uptake in roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) exhibiting differential resistance to Al- Evidence for metabolism-dependent exclusion of Al. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 151 p. 668–674, 1997.
- ARUMUGANATHAN, K; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 9 p. 208–218, 1991.
- BASU, U.; GOOD, A. G.; AUNG, T.; SLASKI, J. J.; BASU, A.; BRIGGS, K. G.; TAYLOR, G. J. A 23 kDa protein root exudates polypeptide co-segregates with aluminium resistance in *Triticum aestivum*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 106, p. 53–61, 1999.
- BEAVIS, W. D.; GRANT, D. A linkage map based on information from four F2 populations of maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 82, p. 636–644, 1991.
- BENNETZEN, J. L. Comparative sequences analysis of plant nuclear genomes: microcolinearity and its many exceptions. **The Plant cell**, Rockville, v. 12, p. 1021-1029, 2000.
- BENNETZEN, J. L.; FREELING, M. Grasses as a single genetic system: genome composition, collinearity and compatibility. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 9, p. 259-261, 1993.
- BERHAN, A. M.; HULBERT, S. H.; BUTLER, L. C.; BENNETZEN, J. L. Structure and evolution of the genome of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 598-604, 1993.
- BERNATZKY, R.; TANKSLEY, S. D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. **Genetics**, Austin, v.112, p.887-898, 1986.

BLANCAFLOR, E.B.; JONES, D. L.; GILROY, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 118, p. 159–72, 1998.

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

BURR, B.; BURR, F. A.; THOMPSON, K. H.; ALBERTSEN, M. C.; STUBER, C. W. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. **Genetics**, Austin, v. 118, p. 519–526, 1988.

CAUSSE, M., S.; SANTONI, C.; DAMERVAL, A.; MAURICE, A.; CHARCOSSET, A.; DEATRICK, J.; DE VIENNE, D. A composite map of expressed sequences in maize. **Genome**, Ottawa, v. 39 p. 418–432, 1996.

CHEN, M.; SAN MIGUEL, P.; DE OLIVEIRA, A. C.; WOO, S. S.; ZHANG, H.; WING, R. A.; BENNETZEN, J. L. Microcolinearity in *sh2*-homologous regions of the maize, rice, and sorghum genomes. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3431–3435, 1997.

CHRISTIANS, J. K.; KEIGHTLEY, P. D. Genetic Architecture: Dissecting the Genetic Basis of Phenotypic Variation. **Current Biology**, London, v. 12, p. R415–R416, 2002.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, Austin, v. 138 p. 963-971, 1994

CIAMPROVA, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 45 p. 161-171, 2002.

COE, E. H.; HOISINGTON, D. A.; NEUFFER, M. G. Linkage map of corn(maize) (*Zea mays* L.). Maize Genetics Cooperation Newsletter, Missouri, v. 61, p. 116–147, 1987.

COE, E.; CONE, K.; MCMULLEN, M.; CHEN, S.-S.; DAVIS, G.; GARDINER, J.; LISCUM, E.; POLACCO, M.; PATERSON, A. H.; SANCHEZ-VILLEDA, H.; SODERLUND, C.; WING, R. Access to the maize genome: An integrated physical and genetic map. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, p. 9–12, 2002.

CONE, K. C.; MCMULLEN, M.D.; BI, I. V.; DAVIS, G. L.; YIM, Y.-S.; GARDINER, J. M.; POLACCO, M.; SANCHEZ-VILLEDA, H.; FANG, Z.; SCHROEDER, S.G.; HAVERMANN, S. A.; BOWERS, J. E.; PATERSON, A. H.; SODERLUND, C. A.; ENGLER, F. W.; WING, R. A.; COE JR, E. H. Genetic, physical, and informatic resources for maize: On the road to an integrated map. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, p. 1598–1605, 2002.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. GQMOL: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Desenvolvido pelo setor de Genética da Universidade Federal de Viçosa.

2001.

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

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

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C. D.; BENNET, R. J.; JAGADISH, V. C.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, Minneapolis, v.103, p.685-693, 1993a.

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

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

DEVOS, K. M.; BEALES, J.; OGIHARA, Y.; DOUST, A. N. Comparative sequence analysis of the Phytochrome C gene and its upstream region in allohexaploid wheat reveals new data on the evolution of its three constituent genomes. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 58, p. 625–641, 2005.

DEVOS, K.; GALE, M. D. Genome relationships: The grass model in current research. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 637–646, 2000.

ESWARAN, H.; REICH, P.; BEINROTH, F. Global distribution of soils with acidity. In: **Plant-Soil Interactions at Low pH**. Moniz, A.C. et al. (eds.). Brazilian Soil Science Society. p. 159-164, 1997.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. New York: Longman, 1996. 464p.

FANG, X. J.; WU, W. R. Molecular selection. **Molecular Plant Breeding**, China, v. 1, p. 1–5, 2003.

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

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1996. 220p.

FISHER, J. A.; SCOTT, B. J. Response to selection for aluminum tolerance. *In: Searle, P. G. E.; DAVEY, B. G. **Priorities in soil/plant relations research for plant production***. School of Crop Sciences, University of Sydney, Australia, 1987, pp 135-7.

FISHER, R. A. A. On the mathematical foundations of statistics. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 222 p. 309-368, 1921.

FLAVELL, R. B.; BENNETT, M. D.; SMITH, J. B.; SMITH, D. B. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. **Biochemical genetics**, New York, v. 12, p. 257-269, 1974.

FONTECHA G.; SILVA-NAVAS J.; BENITO C.; MESTRES M. A.; ESPINO, F. J.; HERNÁNDEZ-RIQUER, M. V.; GALLEGO, F. J. Candidate gene identification of an aluminum-activated organic acid transporter gene at the *Alt4* locus for aluminum tolerance in rye (*Secale cereale L.*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, p. 249-60, 2007.

FOY, C. D. Soil chemical factors limiting plant root growth *In: **Limitations to plant root growth*** (Hatfield JL and Stewart BA, eds.). New York: Springer-Verlag, 1992, pp. 97-149.

FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 29, p. 511-566, 1978.

FU, Y.; EMRICH, S. J.; GUO, L.; WEN, T. J.; ASHLOCK, D. A.; ALURU, S.; SCHNABLE, P. S. Quality assessment of maize assembled genomic islands (MAGIs) and large-scale experimental verification of predicted genes. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, Washington, v. 102, p. 12282-12287, 2005

GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, Washington, v.95, p.1971-1974, 1998.

GALLEGO, F. J.; BENITO, C. Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale L.*). **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 393-399, 1997.

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

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

GARDINER, J. M.; COE, E. H.; MELIA-HANCOCK, S.; HOISINGTON, D. A.; CHAO, S. Development of a core RFLP map in maize using an Immortalized-F2 population. **Genetics**, Austin, v. 134 p. 917–930, 1993.

GARVIN, D. F.; CARVER, B. F. 2003. Role of the genotype in tolerance to acidity and aluminum toxicity, pp. 387-406 *In Handbook of Soil Acidity*, editado por Z. Rengel. Dekker, New York.

GRABSKI, S.; SCHINDLER, M. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 108 p. 897– 901, 1995.

GROH, S.; GONZÁLEZ-DE-LEÓN, D.; KHAIRALLAH, M.M.; JIANG, C.; BERGVINSON, D.; BOHN, M.; HOISINGTON, D.A.; MELCHINGER, A.E. QTL Mapping in Tropical Maize: III. Genomic Regions for Resistance to *Diatraea* spp. and Associated Traits in Two RIL Populations. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1062–1072, 1998;

GUIMARÃES, C. T.; HONEYCUTT, R. J.; GAVIN, R. S.; SOBRAL, B. W. S. Genetic maps of *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum robustum* Brandes & Jew. ex grassl. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 22, p., 1999.

HAKE, S.; WALBOT, V. The genome of *Zea mays*, its organization and homology to related grasses. **Chromosoma**, Wien, v. 79, p. 251–270, 1980.

HELENTJARIS, T.; WEBER, D.; WRIGHT, S. Identification of chrothe genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. **Genetics**, Austin, v. 118 p. 353–363, 1988.

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIEN HUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 72 p. 761–769, 1986.

HOEKENGA, O.A.; VISION, T.J.; SHAFF, J. E; MONFORTE, A.J ; LEE, G. P.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* × *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology**, Lancaster, v.132, p.936-948, 2003.

ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T.; SASAKI, R.; OFEI-MANU, P. Comparison of the amount of citric and malic acids in Al media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. **Soil science and plant nutrition**, Nishigara, v. 46, p. 751–758, 2000.

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

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

JORGE R.; ARRUDA, P. Aluminum-induced organic acid exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, Oxford, v.45, p.675-81, 1997.

KAO, C. H.; ZENG, Z. B.; TEASDALE, R. D. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 152, p. 1203-1216, 1999.

KELLER, B.; FEUILLET, C. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 5, p.246-251, 2000.

KIDD, P.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; BARCELO, J. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 1339–1352, 2001.

KILLIAN, A.; CHEN, J.; HAN, F.; STEFFENSON, B.; KLEINHOF, A. Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance gene *Rgp1* and *rpg4* using rice as a intergenomic cloning vehicle. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 35, p.187-195, 1997.

KINRAIDE, T. B. Identity of the rhizotoxic aluminium species. **Plant and Soil**, The Hague, v. 134, p. 167–178, 1991.

KINRAIDE, T. B.; PARKER, D. R. Apparent phytotoxicity of mononuclear hydroxyl-aluminum do four dicotyledenous species. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 79, p. 283-288, 1990.

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

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

KOLLMEIR, M.; FELLE, H. H.; HORST, W. J. Genotypical differences in aluminum resistance of maize are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by aluminum? **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, p. 945-956, 2000.

KOLLMEIER, M.; DIETRICH, P.; BAUER, C.; HORST, W.; HEDRICH, R. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone

of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 126, p. 397–410, 2001.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, London, v.12, p.172-75, 1944.

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBURG, L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v.1, p. 174-181, 1987.

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

LAZOF, D. B.; GOLDSMITH, J. G.; RUFTY, T. W.; LINTON, R. W. The early entry of Al into cells of intact soybean roots. A comparison of three developmental root regions using secondary ion mass spectrometry imaging. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, p. 1289–300, 1996.

LI, X. F.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H.. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiology**, Lancaster, v.123, p.1537-1544, 2000.

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

LU, G.; TANG, J.; YAN, J.; MA, X.; LI, J.; CHEN, S.; MA, J.; LIU, Z.; E, L.; ZHANG, Y. and DAI, J. Quantitative Trait loci mapping of maize yield and its components under different water treatments at flowering time. **Journal of Integrative Plant Biology**, Carlton South, Victoria, v. 48, n. 10, p. 1233-1243, 2006.

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

MA, J. F.; HIRADATE, S.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 117, p. 753–759, 1998.

MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of Al in higher plants. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v.44, p.482-488, 2000.

MA, J. F.; HIRADATE, S. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). **Planta**, Berlin, v. 211, p. 355-360, 2000.

MA, J. F.; HIRADATE, S.; NOMOTO, K.; IWASHITA, T.; MATSUMOTO, H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. Identification of Al form in the leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v.113, p.1033-1039, 1997a.

MA, J.F.; ZHENG, S.J.; MATSUMOTO, H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v.38, p.1019-1025, 1997b.

MAGALHÃES, J. V. **Molecular genetic and physiological investigations of aluminum tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench)**. (PhD thesis. Cornell University. 192 pp. 2002.

MAGALHAES, J. V.; HOEKENGA, O. A., GARVIN, D. F. Mechanisms of Metal Resistance in Plants: Aluminum and Heavy Metals. **Plant and Soil Journal**, v. 247, p.109-119, 2002.

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

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

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O. E.; CLARK, R. B. **Inheritance of aluminum tolerance in maize**, In: Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition, edited by Gabelman, H. W. and B. C. Loughman. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, p.201-212,1987a.

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

MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. Efficiency of root length phenotypic index in the evaluation of individual maize plants for aluminum tolerance. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasilia, v. 34, p.1897-1904, 1999.

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

MESSING, J.; BHARTI, A. K.; KARLOWSKI, W. M.; GUNDLACH, H.; KIM, H. R.; YU, Y.; WEI, F.; FUKS, G.; SODERLUND, C. A.; MAYER, K. F. X.; WING, R. A. Sequence composition and genome organization of maize. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 14349-14354, 2004.

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

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

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

MILLA, M. A. R.; GUSTAFSON, J. P. Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat1. **Genome**, Ottawa, v. 44, p. 883-892, 2001.

MINELLA, E.; SORRELLS, M. E. Genetic analysis of aluminum tolerance in Brazilian barleys. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasilia, v. 37, p.1099-1103, 2002.

MINELLA, E.; SORRELLS, M. E. Aluminum tolerance in barley: genetic relationships among genotypes of diverse origin. **Crop Science**, Madison, v.32, p.593-598, 1992.

MING, R.; BREWBAKER, J. L.; PRATT, R. C.; MUSKET, T. A.; MCMULLEN, M. D. Molecular mapping of a major gene conferring resistance to maize mosaic virus. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 271-275, 1997.

MIYASAKA, S. C.; BUTA, J. G.; HOWELL, R. K.; FOY, C. D. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 96, p. 737-743, 1991.

MOORE, G.; DEVOS, K. M.; WANG, Z.; GALE, M. D. Cereal genome evolution: grasses, line up and form a circle. **Curent Biology**, London, v. 5, p. 737-739, 1995.

NAGATA, T.; HAYATSU, M.; KOSUGE, N. Identification of aluminium forms in tea leaves by ²⁷Al NMR. **Phytochemistry**, Oxford, v.31, p.1215-1218, 1992.

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

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

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

NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; GUIMARÃES, C. T.; MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; CARNEIRO, N. P.; LOPES, M. A.; MORO, J. R.; PAIVA, E. Mapping QTL for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, Dordrecht, n.130, v. 2, p. 223-232, 2003;

OFEI-MANU, P.; WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; TAWARAYA, K. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. **Soil Science Plant Nutrition**, Nishigara, v. 47, p. 359-375, 2001.

PALMER, L. E.; RABINOWICZ, P. D.; O'SHAUGHNESSY, A. L.; BALIJA, V. S.; NASCIMENTO, L. U.; DIKE, S.; DE LA BASTIDE, M.; MARTIENSSEN, R. A.; MCCOMBIE, W. R. Maize genome sequencing by methylation filtration. **Science**, Washington, v. 302, p. 2115–2117, 2003.

PATERSON, A. H.; BOWERS, J. E.; CHAPMAN, B. A. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative genomics **Proceedings of National Academy of Science USA**, Washington, v. 101, p. 9903–9908, 2004.

PATERSON, A. H.; LIN, Y. R.; LI, Z. K.; SCHERTZ, K. F.; DOEBLEY, J. F.; PINSON, S. R. M.; LIU, S. C.; STANSEL, J. W.; IRVINE, J. E. Convergent domestication of cereal crops by independent mutations at corresponding genetic loci **Science**, Washington, v. 269, p. 1714–1718, 1995.

PELLET, D. M ; GRUNES, D. L KOCHIAN, L. V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Berlin, v. 196, p. 788-95, 1995.

PELLET, D.M.; PAPERNIK, L.A.; KOCHIAN, L. V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, p. 591-597, 1996.

PENG, J.; RICHARDS, D. E.; HARTLEY, N. M.; MURPHY, G. P.; DEVOS, K. M.; FLINTHAM, J. E.; BEALES, J.; FISH, L. J.; WORLAND, A. J.; PELICA, F.; SUDHAKAR, D.; CHRISTOU, P.; SNAPE, J. W.; GALE, M. D.'HARBERD, N. P. "Green revolution"genes encode mutant gibberellin response modulators. **Nature**, New York, v. 400, p. 256-261, 1999.

PEREIRA, M. G.; LEE, M. Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, p. 380-388, 1995.

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**, Lancaster, v. 125, p. 292–305, 2001.

PIÑEROS, M. A.; MAGALHÃES, J.V.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L. V.. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 29, p. 1194-1206, 2002.

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

RAYBURN, A. L.; BIRADAR, D. P.; BULLOCK, D. G.; MCMURPHY, L. M. Nuclear DNA content in F1 hybrids of maize. **Heredity**, London, v. 70, p. 294–300, 1993.

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

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

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

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P. J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, Berlin, v.196, p.103-110, 1995.

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

RYAN, P. R.; SKERRETT, M.; FINDLAY, G.P.; DELHAIZE, E.; TYERMAN, S. D. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, Washington, v.94, p.6547-6552, 1997.

SABRY, A.; JEFFERS, D.; VASAL, S. K.; FREDERIKSEN, R.; MAGILL, C. A region of maize chromosome 2 affects response to downy mildew pathogens. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 113, n. 2, p. 321-330, 2006.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance,

chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of National Academy of Science (USA)**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984;

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v.3;

SAN MIGUEL, P.; TIKHONOV, A.; JIN, Y. K.; MOTCHOULSKAIA, N.; ZAKHAROV, D.; MELAKE-BERHAN, A.; SPRINGER, P. S.; EDWARDS, K. J.; LEE, M.; AVRAMOVA, Z.; BENNETZEN, J. L. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. **Science**, Washington, v. 274, p. 765-768, 1996.

SAS INSTITUTE INC. **Statistical Analyses System**. Release 6.12, (software). Cary, 1992.

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

SAWASAKI, E.; FURLANI, P. R. Genética da tolerância ao alumínio em milho cateto. **Bragantia**, Campinas, v. 46, p.269-278, 1987.

SENIOR, M. L.; HEUN, M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. **Genome**, Ottawa, v. 36 n. 5, p. 884-889, 1993.

SHAROPOVA, N.; MCMULLEN, M. D.; SCHULTZ, L.; SCHROEDER, S.; SANCHEZ-VILLEDA, H.; GARDINER, J.; BERGSTROM, D.; HOUCHINS, K.; MELIA-HANCOCK, S.; MUSKET, T.; DURU, N.; POLACCO, M.; EDWARDS, K.; RUFF, T.; REGISTER, J. C.; BROUWER, C.; THOMPSON, R.; VELASCO, R.; CHIN, E.; LEE, M.; WOODMAN-CLIKEMAN, W.; LONG, M. J.; LISCUM, E.; CONE, K.; DAVIS, G.; COE JR, E. H. Development and mapping of SSR markers for maize. **Plant molecular biology**, The Hague, v. 48, p. 463-481, 2002.

SIBOV, S.T.; DE SOUZA JR, C.T.; CARCIA, A.A.F.; GARCIA, A.F.; SILVA, A.R.; MANGOLIN, C.A. Molecular mapping in tropical maize (*Zea mays* L.) using microsatellite markers. 1.Map construction and localization of loci showing distorted segregation. **Hereditas**, Lund, v. 139, p. 96-106, 2003.

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

SILVA, I. R.; SMYTH, T. J.; MOXLEY, D. F.; CARTER, T. E.; ALLEN, N. S.; RUFTY, T. W. Aluminum accumulation at nuclei of cells in the root tip. Fluorescence

detection using lumogallion and confocal laser scanning microscopy. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, p. 543–52, 2000.

SIVAGURU, M.; HORST, W. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 116, p.155–63, 1998.

SIVAGURU, M.; PIKE, S.; GASSMANN, BASKIN, T. I. Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. **Plant & cell physiology**, Kyoto, v. 44, p. 667–75, 2003.

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

TAKEDA, K.; KARIUDA, M.; ITOI, H. Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. **Phytochemistry**, Oxford, v.24, p.2251-2254, 1985.

TANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KOCHIAN, L. V.; GARVIN, D. F. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 778-782, 2000.

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

TANKSLEY, S. D.; GANAL, M. W.; PRINCE, J. P.; VICENTE, M. C.; BONIERBALE, M. W.; BROUN, P.; FULTON, T. M.; GIOVANNONI, J. J.; GRANDILLO, S.; MARTIN, G. B.; MESSEGUER, R.; MILLER, J. C.; MILLER, L.; PATERSON, A. H.; PINEDA, O.; RÖDER, M. S.; WING, R. A.; WU, W.; YOUNG, N. D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. **Genetics**, Austin, v. 132, p. 1141-1160, 1992.

TARAMINO, G.; TINGEY, S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. **Genome**, Ottawa, v. 39 n. 2, p. 277–287, 1996.

TARCHINI, R.; BIDDLE, P.; WINELAND, R.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The complete sequence of 340 kb of DNA around the rice *Adh1-Adh2* region reveals interrupted colinearity with maize chromosome 4. **Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 381-391, 2000.

TORRES, G. A.; PARENTONI, S. N.; LOPES, M. A.; PAIVA, E. A search for RFLP markers to identify genes for aluminum tolerance in maize. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, p. 459-465, 1997.

VÁSQUEZ, M. D.; POSCHENRIEDER, C.; CORRALES, I.; BARCELO, J. Change in apoplastic aluminum during the initial growth response to aluminum by roots of a tolerant maize variety. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 119, p. 435-444, 1999.

VELDBOOM, L. R.; LEE, M.; WOODMAN, W. L. Molecular marker-facilitated studies in an elite maize population. I. Linkage analysis and determination of QTL for morphological traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 88, p. 7-16, 1994.

von UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 71, p. 1-15, 1995.

WALLACE, S. U.; ANDERSON, I. C. Aluminum toxicity and DNA synthesis in wheat roots. **Agronomy Journal**, Madison, v. 76, p. 5-8, 1984.

WANG S., C. J. BASTEN, AND Z.-B. ZENG (2006). **Windows QTL Cartographer 2.5**. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)

WATANABE, T.; OSAKI, M. Mechanisms of adaptation to high aluminum condition in native plant species growing in acid soils: a review. **Communications in soil science and plant analysis**, New York, v. 33, p. 1247-1260, 2002.

WHITELAW, C. A.; BARBAZUK, W. B.; PERTEA, G.; CHAN, A. P.; CHEUNG, F.; LEE, Y.; ZHENG, L.; VAN HEERINGEN, S.; KARAMYCHEVA, S.; BENNETZEN, J.L.; SANMIGUEL, P.; LAKEY, N.; BEDELL, J.; YUAN, Y.; BUDIMAN, M. A.; RESNICK, A.; VAN AKEN, S.; UTTERBACK, T.; RIEDMULLER, S.; WILLIAMS, M.; FELDBLYUM, T.; SCHUBERT, K.; BEACHY, R.; FRASER, C. M.; QUACKENBUSH, J.. Enrichment of gene-coding sequences in maize by genome filtration. **Science**, Washington, v. 302, p. 2118–2120, 2003.

WIGHT, C. P.; KIBITE, S.; TINKER, N. A.; MOLNAR, S. J. Identification of molecular markers for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 112, n. 2, p. 222-31, 2006.

WILSON, W. A.; HARRINGTON, S. E.; WOODMAN, W. L.; LEE, M.; SORRELLS, M. E.; MCCOUCH, S. R. Inferences on the genome Structure of progenitor maize through comparative analysis of rice, maize and the domesticated panicoids. **Genetics**, Austin, v. 153, p. 453-473, 1999.

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

XIAO, Y. N.; LI, X. H.; GEORGE, M. L.; LI, M. S.; ZHANG, S. H. and ZHENG, Y. L. Quantitative trait locus analysis of drought tolerance and yield in maize in China. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, 23: 155-165, 2005.

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

YUAN, Y.; SANMIGUEL, P. J.; BENNETZEN, J. L. High-cot sequence analysis of the maize genome. **Plant Journal**, Oxford, v. 34, p. 249–255, 2003.

ZENG, Z. B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Austin, v. 136, p. 1457-68, 1994.

ZENG, Z. B. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping of quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, Washington, v.90, n.23, p.10972-10976, 1993.

ZHANG, Z. M.; ZHAO, M. J.; DING, H. P.; RONG, T. Z.; PAN, G. T. QTL mapping analysis of plant height and ear height of maize (*Zea mays* L.). **Genetika**, Moskva, v. 42 n. 3, p. 391-396, 2006.

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

ZHENG, S.; MA, J.; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. **Physiologia plantarum**, Lund, 103, 209–214, 1998.

ZHENG, S. J.; YANG, J. L.; HE, Y. F.; YU, X. H.; ZHANG, L.; YOU, J. F.; SHEN, R. F.; MATSUMOTO, H. Immobilization of Aluminum with Phosphorus in Roots Is Associated with High Aluminum Resistance in Buckwheat. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 138, p. 297-303, 2005.