

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO

MAPEAMENTO DO CARÁTER TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM
MILHO (*Zea mays* L.) ATRAVÉS DE MARCADORES
MOLECULARES

BC/30878
IB/80057

Sérgio Tadeu Sibov

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Anete Pereira de Souza

exemplar corresponde à redação final
tese defendida pelo (a) candidato (a)
Sérgio Tadeu Sibov
vada pela Comissão Julgadora.

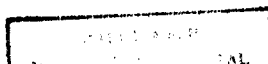
28/04/97
Anete

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
mestre em Ciências Biológicas. Área
de Concentração: Genética.

Campinas
1997

T/UNICAMP

Sil?
m



UNIDADE	IB
N.º CHAMADA:	
T	Unicamp
Si	12m
V	Ex
T. NBO BC/	30878
PROC.	28197
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	31/06/97
N.º CPDC	400098392-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
DO INSTITTO DE BIOLOGIA -UNICAMP**

Si12m Sibov, Sérgio Tadeu
Mapeamento do caráter tolerância ao alumínio em milho (*Zea mays* L.)
através de marcadores moleculares / Sérgio Tadeu Sibov. – Campinas,
SP:[s.n.], 1997.
147f:ilus.

Orientadora: Anete Pereira de Souza
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. Milho. 2. Alumínio. 3. Polimorfismo (genética). I. Souza, Anete Pereira
de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III.
Título.

Campinas, 28 de abril de 1997.

Banca Examinadora:

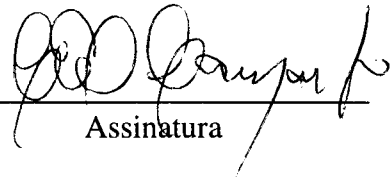
Titulares:

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza (Orientadora)



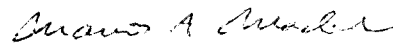
Assinatura

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Oliveira Camargo



Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antônio Machado



Assinatura

Suplente

Profa. Dra. Laudénir Maria Prioli

Assinatura

Dedico,

À Lucilia Kato,
por alegrar cada momento
de minha vida.

Ofereço,

Aos meus pais,
Basílio Sibov e Maria Terezinha Bedani Sibov,
pelo amor, dedicação e apoio
que nunca me faltaram.

e

Ao Celso Sibov, à Tânia Fetcher e à Beatriz Fetcher Sibov,
por tornar minha vida mais leve
e divertida.

Meus sinceros agradecimentos...

À Profa. Dra. Anete Pereira de Souza, pela orientação segura, paciência e preocupação constante com nossa formação profissional;

À Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho, por estar sempre disponível para a solução de alguma dúvida, uma conversa, um conselho amigo;

Ao Prof. Dr. Paulo Arruda pelo material biológico, estímulo, e auxílio técnico-administrativo fundamental para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Dr. Carlos Eduardo de Oliveira Camargo, ao Dr. Marcos Antônio Machado e a Dra. Laudénir Maria Prioli pela disponibilidade em participar da pré-banca, pelas discussões e críticas sempre construtivas e pelas contribuições significativas para este trabalho;

À Marília Gaspar, pela grande ajuda no início deste trabalho, e pela amizade que perdura apesar da distância;

À Luciana Lasry Benchimol Lanza, pela amizade, cumplicidade, prestatividade e pela paciência em aturar um cara chato como eu por tanto tempo;

Ao Dr. Eberson Sanches Calvo, pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho, pelas dicas, e por tornar o dia-a-dia do laboratório mais alegre;

Ao Dr. David Moon, meu grande amigo, pelo bom humor permanente, incentivo, por estar sempre preocupado com meu futuro, e por ter gentilmente cedido algumas fotos ilustrativas;

A todo o pessoal do CIMMYT, em especial ao Dr. Dave Hoisington, à Dra. Mireille Khairallah e ao Dr. Diego González-de-León pela simpatia, orientação e pelo treinamento em técnicas que foram essenciais para a conclusão desta Tese;

À Dra. Theresa A. MusKet da Universidade de Missouri-Columbia, pela presteza no envio dos clones contendo os marcadores imprescindíveis a este trabalho;

À Berenice Rosa, pela alegria que contagiava todo o laboratório;

Às colegas Patrícia, Susy, Sandra e Milena por terem tanta ou mais paciência que a Luciana para aguentar minhas brincadeiras;

À Zilda, pelo cafezinho gostoso e por estar sempre pronta a ajudar;

A todo o pessoal do CBMEG pela convivência agradável, pela amizade e por suportarem meu costumeiro mal humor matinal;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do Curso de Pós-Graduação no nível de Mestrado;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

Abreviaturas	5
Lista de Figuras	7
Lista de Tabelas	11
Resumo	12
Summary	14
1. Introdução.....	16
2. Objetivo	20
3. Revisão Bibliográfica	21
3.1. Solos ácidos	21
3.2. O problema da toxidez do Al.....	23
3.2.1. Tolerância ao Al.....	27
3.2.2. Avaliação fenotípica da tolerância ao Al	29
3.2.3. Genética da tolerância ao Al	30
3.3. Marcadores Moleculares.....	33
3.3.1. RFLP: aspectos gerais.....	36
3.3.2. Mapeamento genético	39
3.3.3. Utilização de “bulks” contrastantes	41
3.4. Apresentação do Trabalho	44
4. Materiais.....	50
5. Métodos.....	53
5.1. Análise da tolerância ao Al.....	53

5.1.1. Avaliação das Gerações: Parentais, F1, F2 e F3	53
5.1.2. Montagem do Experimento	54
5.1.3. Análise fenotípica das raízes.....	54
5.1.4. Transferência para o campo	56
5.2. Coleta e preparo do material vegetal	57
5.3. Preparo das sondas.....	58
5.3.1. Transformação de bactérias	58
5.3.1.1. Preparo das células competentes	58
5.3.1.2. Transformação por choque térmico	59
5.3.1.3. Preparo do estoque de bactérias em glicerol	59
5.3.2. Extração de DNA plasmidial	60
5.3.3. Digestão do DNA plasmidial	61
5.3.4. Extração do inserto	61
5.4. Preparo do DNA Genômico	62
5.4.1. Extração de DNA.....	62
5.4.2. Digestão	63
5.4.3. Preparo do Gel	64
5.5. Hibridizações	64
5.5.1. Hibridização Radioativa	65
5.5.1.1. Transferência do DNA	65
5.5.1.2. Marcação de sondas	66
5.5.1.3. Separação dos nucleotídeos não incorporados	67

5.5.1.4. Medida da incorporação da radioatividade	67
5.5.1.5. Hibridização	68
5.5.1.6. Auto-radiografia.....	69
5.5.1.7. Remoção da sonda	70
5.5.2. Hibridização não radioativa.....	70
5.5.2.1. Transferência do DNA	70
5.5.2.2. Marcação de sondas com digoxigenina-dUTP.....	70
5.5.2.3. Incorporação de dig-dUTP e quantificação das sondas.....	71
5.5.2.4. Hibridização	72
5.5.2.5. Auto-radiografia.....	74
5.5.2.6. Remoção da sonda	75
5.6. Análise de polimorfismo	76
5.6.1. Seleção de indivíduos para confecção das membranas-F2	76
5.6.2. Seleção de sondas para hibridização com as membranas-F2.....	77
5.6.3. Análise de segregação.....	77
6. Resultados	79
7. Discussão.....	92
8. Conclusões	99
9. Perspectivas.....	101
10. Bibliografia.....	102
Anexo I - Resultados do teste de progênes F3	122
Anexo II - Resultados das hibridizações efetuadas com as membranas-teste.....	125

Anexo III - Cálculos do teste de χ^2 para a verificação da segregação dos alelos.....	130
Anexo IV - Listagens dos arquivos de entrada para o programa MAPMAKER.....	132
Anexo V - Listagem da análise do arquivo MMDATA1	134
Anexo VI - Listagem da análise do arquivo MMDATA2.....	138

ABREVIATURAS

μl	Microlitro
μg	Micrograma
Al	Alumínio
Anti-dig	Anticorpo anti-digoxigenina
BET	Brometo de Etídio
BSA	“Bulked Segregant Analysis”
cDNA	DNA complementar
cM	Centimorgan
cpm/ml	Cintilações por minuto/ mililitro
CSPD	“Disodium 3-(4-methoxyspiro{ 1,2-dioxetane-3,2’ -(5’-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenyl phosphate”
CTAB	“Mixed alkyltrimethyl-ammonium bromide”
Dig-dUTP	Digoxigenina-11-dUTP
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatos
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
h	Hora
ha	Hectare
kDa	KiloDaltons
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LOD	“Logarithm of the odds” - Logaritmo da probabilidade

M	Molaridade
min.	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
p/v	Peso/volume
pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
ppm	Partes por milhão
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	NaCl/Citrato Trissódico
STE	Tris/EDTA/NaCl
T.A.	Temperatura ambiente
TAE	Tris/EDTA/Ácido acético
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris-(hidroximetila)-aminometano
UV	Luz ultravioleta
V/cm	Volts/centímetro
v/v	Volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de solos ácidos ao redor do mundo (adaptado de Rao *et al.*, 1993).

Os solos ácidos cobrem a maior parte de 48 países em desenvolvimento e envolvem 1700 milhões de ha. Em relação à região tropical, aproximadamente 65% dos solos da América do Sul, 45% dos solos na África, 32% dos solos da Ásia e 10% dos solos da América Central, Caribe e México são solos ácidos..... 22

Figura 2. Uso da técnica de “bulks” contrastantes no mapeamento genético com marcadores moleculares. **A** - Indivíduos selecionados por apresentarem determinada característica (indicada em vermelho) formam o primeiro “bulk”, enquanto o outro “bulk” é formado por indivíduos que não a apresentam (em verde). **B** - resultados das hibridizações de duas sondas de RFLP com membranas contendo o DNA da linhagem tolerante (**PT**), sensível (**PS**), do **F1** e dos bulks tolerante (**BT**) e sensível (**BS**). 43

Figura 3. Efeitos do Al nas raízes de plantas tolerantes da linhagem Cat-100-6 e sensíveis da linhagem S1587-17. As plantas cresceram em uma solução de Al na presença e na ausência de 6 mg/l de Al por 7 dias, sendo então analisadas quanto aos sintomas de toxidez ao Al. **A**, Sistema radicular de plantas tolerantes (1,2) e sensíveis (3,4) que cresceram em solução nutritiva sem Al (1,3) e com 6 mg/l de Al (2,4). **B** e **D**; detalhes das raízes laterais e da ponta da raiz, de plantas tolerantes crescidas na presença de 6 mg/l de Al. **C** e **E**; detalhes das raízes laterais e da ponta da raiz, de plantas sensíveis crescidas na presença de 6 mg/l de Al (Moon *et al.*, 1997) 45

Figura 4. Cortes histológicos mostrando a zona de elongação de raízes principais coradas com Azul de Toluidina da linhagem tolerante Cat-100-6 (A-E) e da linhagem sensível S1587-17 (F-J). A e F; controles sem Al. As fotos restantes referem-se ao tratamento com 6 mg/l de Al por 1 dia (B e G), 2 dias (C e H), 4 dias (D e I) e 6 dias (E e J). A seta em E indica o desligamento das células da coifa, um sinal de crescimento da raiz; em I indica a completa destruição da coifa, e em J, a aparência dos meristemas das raízes laterais após as células da coifa terem sido destruídas (Moon *et al.*, 1995)..... 47

Figura 5. Efeito do aumento da concentração de Al no comprimento relativo da raiz principal (CRRP) das raízes de plantas da linhagem tolerante Cat-100-6 (círculo cheio), da linhagem sensível S1587-17 (círculo aberto) e do F1 (quadrado aberto). Dez plantas de cada genótipo cresceram em solução nutritiva contendo um gradiente de atividade do íon Al^{3+} de 0 a 93.10^{-6} . Após sete dias o CRRP foi calculado para cada planta (Moon *et al.*, 1997)..... 48

Figura 6. Esquema de obtenção da linhagem S1587-17, sensível ao Al. O somaclone S1587 foi obtido a partir de calos gerados através da passagem da linhagem Cat-100-6 pela cultura de tecidos. Este somaclone foi autofecundado até a obtenção da geração R5. Nesta geração a progênie S1587-17 apresentou elevada sensibilidade ao Al, sendo selecionada para estudos genéticos da tolerância ao Al 51

Figura 7. Auto-radiografias indicando o polimorfismo entre os “bulks” que possibilitou a seleção de sondas para a análise da população segregante. Três das combinações

sonda/enzima representadas acima (CSU86/*Bam*HI, UMC39/*Hind*III, UMC85/*Hind*III) foram utilizadas nas hibridizações com as membranas F2. **A** - Cat-100-6, **B** - S1587-17, **F** - F1, **T** - “bulk” tolerante, **S** - “bulk” sensível..... 82

Figura 8. Auto-radiografias indicando polimorfismo apenas em “bulks” sensíveis (UMC90/*Hind*III), ou em “bulks” tolerantes (UMC90/*Eco*RV, CSU81/*Eco*RI). **A** - Cat-100-6, **B** - S1587-17, **F** - F1, **T** - “bulk” tolerante, **S** - “bulk” sensível.. 83

Figura 9. Padrão de segregação dos alelos (bandas) obtido pela hibridização da sonda UMC39, com o DNA de indivíduos da população F2, digerido com a enzima *Hind*III. **A** - Cat-100-6, **B** - S1587-17, **F** - F1, **S** - Sensível, **T** - Tolerante..... 85

Figura 10. Exemplo da leitura de uma parte dos resultados obtidos com a sonda UMC39, utilizando uma membrana contendo DNA da população F2, digerido com a enzima *Hind*III. Para os dados genotípicos, os códigos padrão utilizados com populações F2 são: a letra “A” para indicar um indivíduo homozigoto para o alelo a neste loco (**P1**/Cat-100-6); a letra “B” para indicar um indivíduo homozigoto para o alelo b (**P2**/S1587-17), e a letra “H” indicando um indivíduo heterozigoto contendo ambos os alelos a e b (**F1**). ... 87

Figura 11. Mapas de ligação construídos a partir da segregação dos alelos dos marcadores em uma população constituída por 56 indivíduos F2. Os grupos de ligação foram determinados usando o programa MAPMAKER versão 2.0 em um computador Apple Macintosh. Os marcadores foram inicialmente agrupados pela análise de dois

pontos e mapeados com a análise de três pontos e multipontos. Um “LOD score” mínimo de 3,0 e uma frequência de recombinação de 40% foram usados nas análises de ligação. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da solução nutritiva salina usada para o desenvolvimento de plântulas de milho (Prioli AJ, 1987). Antes da adição de Al o pH da solução nutritiva estabiliza-se em torno de 4,3. Com a adição de $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (PM = 474,38) para uma concentração final de 4,5 mg/l de Al, o pH tende a 4,0, dispensando ajuste posterior..... 55

Tabela 2. Resumo dos resultados das 269 combinações sonda/enzima polimórficas envolvendo 92 sondas e 4 enzimas de restrição. **P/-** - polimorfismo não testado com “bulks”; **P/?** - sem resultados nos “bulks” por problemas na leitura das membranas; **P/NP** - sondas polimórficas nas linhagens parentais mas não polimórficas entre os “bulks”; **P/P** - polimorfismo encontrado entre as linhagens parentais, repetiu-se nos “bulks”; **P/P(BT)** - polimorfismo encontrado nas linhagens parentais, repetiu-se apenas no “bulk” tolerante; **P/P(BS)** - polimorfismo encontrado nas linhagens parentais, repetiu-se apenas no “bulk” sensível. 91

RESUMO

Visando o mapeamento do caráter responsável pela tolerância ao Al em milho (*Zea mays* L.) através de marcadores moleculares do tipo RFLP, foram utilizadas a linhagem tolerante Cat-100-6 e a linhagem sensível S1587-17, derivada de um variante somaclonal obtido através da cultura de tecidos da linhagem Cat-100-6. Estudos genéticos preliminares da tolerância/sensibilidade ao Al na linhagem original Cat-100-6 e na linhagem S1587-17, indicaram que o caráter tolerância ao Al seria provavelmente condicionado por um gene dominante. A partir da população F2 obtida pela autofecundação do F1 entre Cat-100-6 e S1587-17, foram selecionados indivíduos para a formação de “bulks” contrastantes quanto ao fenótipo tolerância ao Al. Cinco indivíduos foram utilizados para cada “bulk”, e seu fenótipo tolerante/sensível foi confirmado pela análise de suas progênes F3 através de testes em solução nutritiva com Al. Membranas contendo o DNA das linhagens parentais, do F1 e dos “bulks”, digeridos com as enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* e *EcoRV*, foram hibridizadas com sondas marcadas com digoxigenina (Dig-dUTP). Das 158 sondas utilizadas, cobrindo o genoma do milho a intervalos de 20 cM, 27 foram utilizadas em hibridizações com membranas contendo o DNA de 56 indivíduos F2. Após análise de ligação empregando-se o programa MAPMAKER, os resultados obtidos nestas hibridizações indicaram a cossegregação de 10 marcadores com o caráter de tolerância ao Al. Estes marcadores estavam divididos em dois grupos de ligação, indicando a ocorrência de dois locos envolvidos com a tolerância ao Al. O primeiro grupo de ligação, formado por 6 sondas foi mapeado no braço curto do

cromossomo 6. O outro grupo de ligação, formado por 4 sondas, foi mapeado no braço curto do cromossomo 10.

SUMMARY

A high percentage of Brazilian soil displays an acid character with a high Al concentration, hindering seriously its agricultural exploitation. A possible solution is the development of Al tolerant genotypes, and this approach is particularly interesting for maize, where Al tolerance genetic variability exists. In consequence, the identification of molecular markers related to the Al tolerance genes will represent a very important progress in order to perform the tolerant plant selection process.

Previous genetic analysis of Al tolerance in Cat-100-6, a tolerant inbred line, indicated that this trait is probably controlled by a single dominant gene. The aim of this work was to map the gene involved in aluminum tolerance in Cat-100-6 by means of RFLP markers. A segregating population (F₂) was developed by selfing of F₁ generation, obtained by crossing of Cat-100-6 (tolerant) X S1587-17 (sensitive) parents. The last one is an inbred line originated by somaclonal variation from calli type I of Cat-100-6 line. We have used bulked segregant analysis (BSA) to identify loci linked to Al tolerance in the inbred line Cat-100-6. Two bulks of individuals displaying a contrasting Al tolerance trait were generated from the segregating population: DNA from five F₂ plants were selected from each bulk (sensitive or tolerant). The F₂ genotypes were checked by analysis of the corresponding F₃ progeny grown in nutrient solution in the presence of 4.5 mg/l of Al. Genomic DNA of Cat-100-6, S1587-17, F₁ and the two contrasting bulks were individually digested with *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, and *EcoRV*, and subsequently southern blot analysis was performed using digoxigenin labeled probes. A total of 158 probes were used to identify 18 RFLP markers showing polymorphism

between parents and bulks. These 18 markers were hybridized with 56 individuals from the F2 population and the segregation results were analyzed by MAPMAKER software. Ten (10) markers co-segregating with the Al tolerance trait were found and they were located in two linkage groups indicating that two loci are involved in this trait in Cat-100-6 line. The linkage groups were composed of 6 and 4 markers, and they were mapped on the short arm of chromosomes 6 and 10, respectively.

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial despertará um esforço proporcional para satisfazer as necessidades de água, moradia, emprego, educação e, sobretudo, alimentação. Esta necessidade por alimento é muito mais acentuada nos países em desenvolvimento, onde a taxa de crescimento populacional é mais elevada. Há dois caminhos para se aumentar a produção agrícola: elevar a produção por unidade de área, usando o solo de modo mais eficiente, ou expandir as áreas de terras cultivadas. A escassez de recursos e de conhecimento adequado nos países em desenvolvimento, limita a adoção de novas tecnologias agrícolas ou o uso de melhores sementes. Para um grande contingente de pessoas, a procura por novas fronteiras agrícolas torna-se a única opção.

No entanto, a maioria destas terras potencialmente viáveis localizam-se na região tropical e são constituídas principalmente por oxissolos e ultissolos. Estes tipos de solos geralmente apresentam boas propriedades físicas, mas possuem limitações de fertilidade decorrentes de sua elevada acidez. Nestas condições, um grande número de fatores interferem na produção agrícola, sendo o mais importante deles a presença de elevados níveis de Al trocável. Os solos sob vegetação de cerrado no Brasil representam um bom exemplo deste caso (Foy *et al.*, 1978; Rao *et al.*, 1993; Borlaug & Dowsell, 1996).

A toxicidade do Al é particularmente severa em condições de solo com pH abaixo de 5,0, onde ele torna-se solúvel e assimilável pelas plantas. O sintoma mais característico da toxicidade do Al é a inibição do crescimento radicular deixando as

plantas mais suscetíveis à seca e incapazes de utilizarem adequadamente os nutrientes disponíveis no solo.

A correção da toxidez de Al pode ser efetuada através da aplicação de calcário no solo, elevando o pH deste. Entretanto, este processo não é economicamente viável para muitos produtores, além de corrigir somente as camadas superficiais do solo. Uma alternativa para contornar o problema, seria o desenvolvimento de genótipos mais tolerantes à toxidez de Al. No caso do milho (*Zea mays* L.), isto é perfeitamente viável, uma vez que existe variabilidade genética para a tolerância ao Al tóxico (Rhue *et al.*, 1978; Lefèbvre & Nyamangombe, 1985; Pandey & Granados, 1985; Lopes *et al.*, 1987).

Utilizando-se a variabilidade genética existente, variedades e/ou híbridos de milho tolerantes ao Al poderiam ser obtidos através de programas de melhoramento empregando-se duas estratégias: seleção recorrente para a obtenção de linhagens tolerantes ao Al; utilização de retrocruzamentos para a introdução da característica desejada em linhagens elites. Contudo, em muitos casos, os efeitos ambientais mascaram o genótipo, de modo que a discriminação entre plantas tolerantes e sensíveis torna-se difícil.

Uma alternativa para a identificação e manipulação de genes de interesse em programas de melhoramento, surgiu com o desenvolvimento e utilização de marcadores moleculares (Beckmann & Soller, 1983; Tanksley *et al.*, 1989; Lee, 1995). Desta forma, a detecção de marcadores moleculares ligados à tolerância ao Al permitiria a seleção monitorada por marcas moleculares das plantas tolerantes ao Al, sem influência de efeitos ambientais. As plantas desejáveis seriam então identificadas, contribuindo para uma maior eficiência e rapidez em programas de melhoramento.

Os marcadores moleculares mais utilizados em milho são aqueles que detectam polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição do DNA, denominados de marcadores do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Tanksley *et al.*, 1989; Zehr *et al.*, 1992). Um marcador molecular do tipo RFLP é representado por uma sonda molecular (fragmento de DNA) correspondendo, na maior parte dos casos, à uma sequência única. Esta sonda é utilizada em hibridizações com DNA genômico digerido por uma enzima de restrição e impresso em membranas. Assim, a associação sonda/enzima define um marcador molecular e, ao mesmo tempo, um loco cromossômico (Botstein *et al.*, 1980).

Atualmente existem mapas genéticos do milho totalmente construídos com marcadores moleculares do tipo RFLP. Associações entre a segregação de uma característica e dos marcadores RFLP que possuem posições conhecidas nos cromossomos do milho, permitem que locos importantes possam ser localizados no genoma. Desta forma, existe potencial para efetuar-se a seleção baseada em marcadores moleculares (Helentjaris *et al.*, 1986a; Hoisington, 1986; Burr *et al.*, 1988).

O mapeamento da tolerância ao AI tem interesse tanto para estudos básicos quanto aplicados. A identificação de um marcador molecular ligado ao gene que confere tolerância ao AI pode facilitar o processo de seleção das plantas tolerantes, em programas de melhoramento. Além disso, através de sua localização genética pode-se definir estratégias para a clonagem do gene.

Neste âmbito, o presente trabalho se propôs a mapear, através de marcadores moleculares, o caráter tolerância ao AI em milho. A identificação de marcadores moleculares ligados ao caráter tolerância ao AI foi realizada através de

estudos de ligação genética. Estes estudos foram efetuados na geração segregante F₂, obtida do cruzamento entre dois genótipos contrastantes para a tolerância ao Al: as linhagens Cat-100-6 (tolerante) e S1587-17 (sensível), disponíveis no Departamento de Genética e Evolução da UNICAMP.

2. OBJETIVO

Mapeamento do caráter tolerância ao Al em milho, utilizando-se marcadores moleculares do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Solos ácidos

Os trópicos são regiões com solos muito antigos, expostos por longo tempo a ação de um clima quente e úmido. Desta forma, os tipos de solos mais característicos pela sua alta concentração de Al, os chamados ultissolos e oxissolos, são os mais frequentemente encontrados nos trópicos (**Figura 1**), cobrindo extensas áreas da América do Sul (850 milhões de ha), da África Central e do Sul (600 milhões de ha) e da Ásia Tropical (250 milhões de ha) (Richter & Markewitz, 1995). Este fato agrava muito a produção de alimentos nestas regiões pois, a fertilidade em solos ácidos é baixa e os fatores que contribuem para esta baixa fertilidade são muito complexos.

No Brasil, cerca de 70% das áreas agriculturáveis apresentam solos ácidos e alta saturação de Al. Estas áreas encontram-se principalmente na região amazônica e nos cerrados. Para sua utilização na produção agrícola, a região amazônica tem sido preterida pela dificuldade no manejo, no escoamento da produção, e pela baixa fertilidade do solo. Assim, os cerrados tornaram-se importante foco de pesquisas desde a década de 40, mas somente durante os últimos 20 anos as informações das pesquisas desenvolvidas foram agregadas sob a forma de tecnologias prontas, para serem aplicadas pelos agricultores.

Estas pesquisas proporcionaram ganhos significativos de produtividade em várias culturas, principalmente na produção de soja, milho e trigo. Muitas das tecnologias desenvolvidas para o cerrado brasileiro são de grande valia quando da abertura de novas

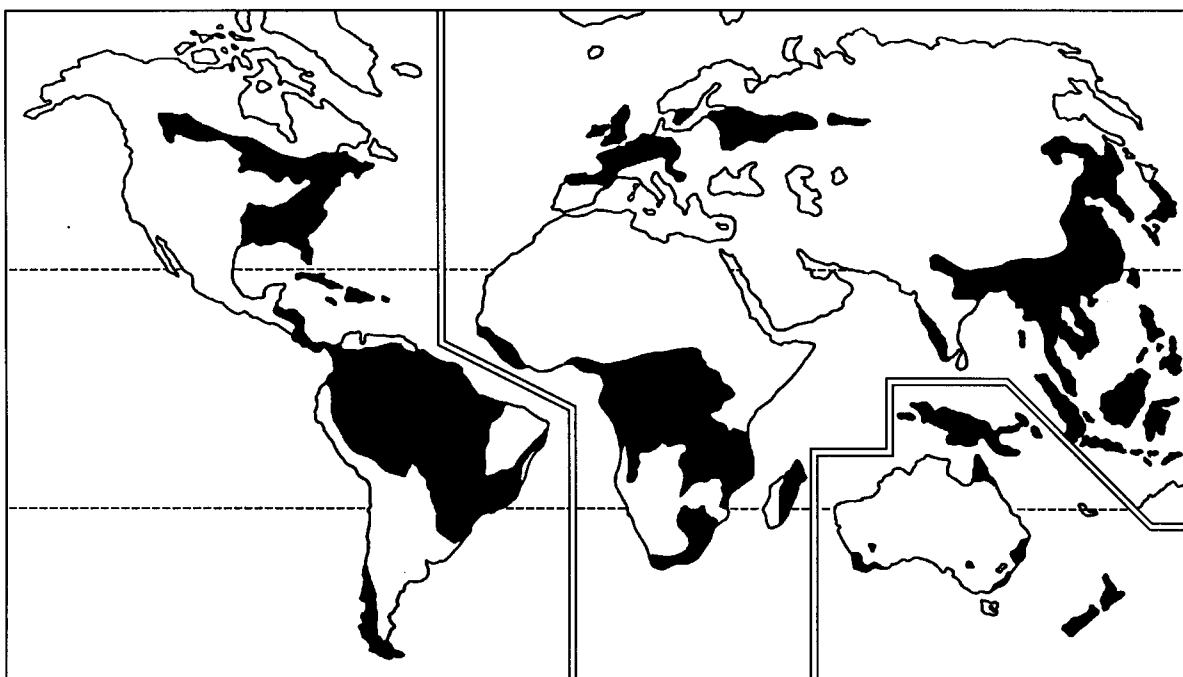


Figura 1. Distribuição de solos ácidos ao redor do mundo (adaptado de Rao *et al.*, 1993).

Os solos ácidos cobrem a maior parte de 48 países em desenvolvimento e envolvem 1700 milhões de ha. Em relação à região tropical, aproximadamente 65% dos solos da América do Sul, 45% dos solos na África, 32% dos solos da Ásia e 10% dos solos da América Central, Caribe e México são solos ácidos.

áreas de fronteira agrícola em solos com problemas similares, como, por exemplo, as vastas planícies do rio Orinoco, na Colômbia e na Venezuela, e em grandes extensões de terra na África Central e do Sul (Lopes, 1996; Borloug & Dowswell, 1996).

3.2. O problema da toxidez do Al

Em um solo com baixo pH, os fatores mais limitantes para o crescimento da planta não se restringem à atividade do íon hidrogênio. Também são importantes: a toxicidade do alumínio e do manganês; a deficiência de fósforo, nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, zinco, e molibdênio lixiviados pela ação do clima; o estresse à seca devido a um precário desenvolvimento das raízes, e uma maior suscetibilidade à pragas e doenças. As deficiências e toxicidades podem atuar independentemente ou conjuntamente para reduzir o crescimento da planta e, a relativa importância destes fatores vai depender da espécie de planta, seu genótipo, do tipo de solo, do valor do pH do solo, de sua estrutura e aeração e das condições climáticas locais (Marschner, 1991; Rao *et al.*, 1993).

A maior parte do Al no solo está unida a outros elementos ou ocorre em formas não fitotóxicas, como aluminossilicatos e precipitados. Entretanto, à medida que o pH diminui, o Al em suas formas mais fitotóxicas é liberado, tornando-se solúvel em um pH ao redor de 5,0. No solo, a quantidade de Al varia de 1 a 33 ppm, mas raramente excede 4 ppm. Entretanto, em muitas espécies o crescimento radicular é inibido quando o solo apresenta uma concentração de 1 a 2 ppm de Al em solução (Marschner, 1991; Wersuhn *et al.*, 1994).



A complexa química do Al foi uma das primeiras dificuldades no estudo dos processos relacionando Al e plantas. Ainda é controverso afirmar qual espécie química apresenta maior ou menor toxicidade. Assim, há dúvidas se as espécies mononucleares Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ são mais ou menos tóxicas que a espécie polinuclear Al_{13} . As condições de equilíbrio entre as várias espécies são extremamente dependentes do pH, da concentração e da composição de nutrientes em uma solução nutritiva ou no solo (Kinraide, 1991; Marschner, 1991). No entanto, como muitos cátions trivalentes são tóxicos às plantas, e como o Al hidroliza em solução como uma espécie trivalente Al^{3+} , dominante em condições ácidas ($\text{pH} < 5$), vários autores sugerem que Al^{3+} seja a espécie tóxica predominante (Kinraide, 1991; Kinraide *et al.*, 1992).

O principal sintoma da toxidez ao Al, é a drástica redução na taxa de crescimento das raízes devido à destruição do meristema apical. O ápice caulinar e as raízes laterais têm seu crescimento inibido, resultando em um sistema radicular com desenvolvimento superficial e ramificação inadequada. Raízes danificadas pelo Al podem explorar apenas um limitado volume de solo e tornam-se ineficazes na absorção de nutrientes e água, provocando uma redução no crescimento da planta (Foy, 1976; Foy *et al.*, 1978).

Ao nível celular, as células da coifa e do meristema tornam-se vacuoladas, e mostram sequencialmente: uma perda da função do complexo de Golgi, ausência de desenvolvimento dos plastídeos, alterações na estrutura nuclear, perda de citoplasma, e finalmente desintegração (Taylor, 1988b). Células da epiderme, endoderme e do córtex afetadas pelo Al, sofrem um processo de inchamento e rapidamente autolisam. As regiões meristemáticas da raiz primária e das raízes laterais tornam-se desorganizadas a ponto de

não haver distinção entre as células da coifa, do meristema e dos tecidos vasculares. Sítios de erupção de raízes laterais não conseguem se desenvolver normalmente (Taylor, 1988a; Marschner, 1991; Rao *et al.*, 1993).

O maior acúmulo de Al ocorre no ápice caulinar (coifa, meristema e zona de alongação), sendo também esta a região que sofre os maiores danos físicos quando comparada aos tecidos maduros da raiz. Na verdade, somente 2 a 3 mm das raízes (coifa e meristema), precisam ser expostos ao Al para que o crescimento radicular seja inibido. Quando o Al é seletivamente aplicado apenas na zona de alongação ou em toda a extensão da raiz, excetuando-se o ápice, o crescimento não é afetado (Ryan *et al.*, 1993a).

Os efeitos fisiológicos do estresse ao Al parecem ser o resultado de uma complexa interação de fatores, havendo grande dificuldade na distinção entre efeitos primários e sintomas secundários (Taylor, 1988a; Kochian, 1995; Delhaize & Ryan, 1995). Ainda é incerto afirmar se o Al necessita penetrar no citoplasma das células do ápice radicular para diretamente danificar o metabolismo, ou se sua ação poderia estar relacionada à interações no apoplasto.

Interações com a parede celular e com as membranas celulares necessariamente precederiam qualquer transporte para o simplasto. Nestas interações, o Al poderia atuar de diferentes maneiras: ligando-se a resíduos de pectina ou proteínas na parede celular; diminuindo sua extensibilidade ou sua condutividade hídrica; removendo outros íons de sítios críticos na parede celular ou das membranas; ligando-se a camada bilipídica ou a proteínas intermembranas para inibir o transporte de nutrientes, ou alterar o metabolismo intracelular a partir do apoplasto, ativando vias metabólicas através de

mensageiros secundários (Taylor, 1988a; Bennet & Breen, 1991; Rengel 1992a; Kochian, 1995).

A medição do influxo de Al tem sido dificultada pela incapacidade de separar-se as frações de Al do simplasto e do apoplasto. Entretanto, Lazof *et al.* (1994) utilizando íons secundários detectou Al no simplasto das raízes de soja (*Glycine max*), apenas 30 min após a exposição ao íon. Isto demonstra que a entrada de Al nas células ocorre antes que o crescimento das raízes seja inibido, e sugere a possibilidade da existência de um sítio simplástico ao Al. Presume-se que o Al presente no simplasto seria mantido a uma concentração muito baixa, considerando-se que o pH deste meio varia de 6,5 a 7,5 e aí existe abundância de elementos que poderiam se ligar ao Al. No entanto, mesmo em pequenas concentrações, o Al poderia causar consideráveis danos no simplasto, devido a sua alta afinidade de ligação a muitos metabólitos importantes. O Al poderia inibir funções vitais do metabólito ao qual se ligasse (enzimas, calmodulinas, tubulinas, ATP, GTP, DNA), ou o próprio complexo Al-metabólito seria prejudicial a outros processos metabólicos (Taylor, 1988a; Tice *et al.*, 1992; Kochian, 1995).

Atualmente, tem sido muito investigada a interação do Al com o cálcio. Tal interação tem sido considerada como um processo primário na toxicidade do íon. A concentração de Ca^{2+} livre no citoplasma é geralmente mantida abaixo de 200 nM. Entretanto, aumentos transitórios na concentração de Ca^{2+} são vitais para o crescimento celular, uma vez que, este elemento atua como um mensageiro secundário na indução e regulação de diversos processos metabólicos. Desta forma, o Al poderia interromper o metabolismo dependente de Ca mantendo sua concentração mais elevada que o normal,

ou impedindo as mudanças súbitas em sua concentração, como ocorre nos aumentos transitórios (Kauss, 1987; Rengel, 1992a,b; Coté & Crain, 1993).

Uma das maneiras pela qual o Al poderia interromper a homeostase do Ca^{2+} simplástico, seria alterando o padrão de fluxo Ca^{2+} através da membrana plasmática. Huang *et al.* (1992a,b) demonstraram que o Al^{3+} inibe o transporte de Ca^{2+} no ápice radicular em um cultivar de trigo sensível ao Al. Esta inibição foi significativamente maior no cultivar sensível que no tolerante. Um padrão de resposta similar foi encontrado em linhagens quase isogênicas de trigo sensível e tolerante ao Al (Ryan & Kochian, 1993b).

3.2.1. Tolerância ao Al

O estresse ao Al é uma força seletiva muito importante na natureza, portanto, diferentes mecanismos de tolerância podem ter evoluído em diferentes espécies de plantas (Rao *et al.*, 1993). Várias hipóteses foram levantadas para explicar as diferenças quanto à tolerância ao Al. Os mecanismos de tolerância, assim como os mecanismos de toxidez, não são completamente entendidos ou claramente definidos. Da mesma forma que para os mecanismos de toxidez as hipóteses existentes para os mecanismos de tolerância, podem ser divididas em dois grupos: mecanismos de exclusão, os quais ocorreriam no exterior da célula, e mecanismos internos, que ocorreriam no citoplasma da célula (Kochian, 1995).

Há pelo menos seis diferentes hipóteses que poderiam explicar a tolerância por mecanismos de exclusão. Estas incluem: imobilização do Al^{3+} na parede celular,

permeabilidade seletiva da membrana plasmática, formação de uma barreira de pH na rizosfera ou no apoplasto radicular, exudação de quelantes e/ou fosfato e efluxo de Al. Nestes mecanismos de exclusão impede-se a entrada do Al no simplasto, evitando sua passagem através da membrana plasmática. Desse modo os sítios intracelulares sensíveis ao ataque do Al^{3+} ficariam protegidos (Rao *et al.*, 1993; Taylor, 1988a; Kochian, 1995).

Se estes mecanismos estiverem ausentes ou forem ineficientes, outras quatro hipóteses poderiam explicar os mecanismos internos de tolerância. Tais hipóteses são: quelação no citosol, compartimentalização no vacúolo, expressão de proteínas que se ligam ao Al e evolução de enzimas Al-tolerantes. Desta forma, nos mecanismos internos de tolerância, o Al entraria no simplasto e a tolerância seria alcançada pela sua imobilização, compartimentalização ou detoxificação (Taylor, 1988a; Delhaize & Ryan 1995; Kochian, 1995).

De todos os mecanismos propostos, a tolerância ao Al mediada pela exudação de ácidos orgânicos é a hipótese atualmente mais aceita (Basu, 1994; Kochian, 1995; Ryan *et al.*, 1995). Miyasaka *et al.* (1991) forneceram as primeiras evidências de que o mecanismo da tolerância em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) envolve efluxo de ácido cítrico. Mais recentemente, Delhaize *et al.* (1993b) mostraram que a tolerância ao Al, codificada pelo gene dominante *Alt1* em trigo, está correlacionada com o efluxo de malato do ápice radicular. Isto sugere que a excreção de malato protege a planta por quelação e detoxificação do Al ao redor da região crítica da raiz. Além disso, as altas taxas de efluxo do malato das raízes cossegregam com o loco *Alt1* em populações segregantes para a tolerância ao Al. Pellet *et al.* (1995) demonstraram que um genótipo de milho tolerante ao Al excretava várias vezes mais ácido cítrico de suas raízes, em resposta

ao Al, do que um genótipo Al-sensível. O ácido cítrico forma um complexo forte com Al^{3+} sendo mais eficiente que o succinato ou malato na reversão da toxidez ao Al (Ownby & Popham, 1989).

3.2.2. Avaliação fenotípica da tolerância ao Al

Vários métodos de avaliação de plantas quanto a tolerância ao Al já foram desenvolvidos, tanto a nível de campo quanto em casa de vegetação. Estes últimos podem ser realizados em experimentos de vasos com solo, ou em solução nutritiva (Reid *et al.*, 1971; Howeler & Cadavid, 1976; Lefever *et al.*, 1977; Foy *et al.*, 1978; Garcia & Silva, 1979; Garcia *et al.*, 1979; Lopes *et al.*, 1987; Spehar, 1994).

Como o desenvolvimento radicular da planta é a característica mais afetada pela toxidez ao Al, este caráter é utilizado com frequência na avaliação da tolerância/sensibilidade ao Al em várias espécies. No entanto, na literatura constata-se que diferentes parâmetros fenotípicos foram avaliados na busca daquele que melhor refletisse o genótipo sensível ou tolerante do material. Desta forma, avaliou-se o número de raízes laterais, o peso seco ou peso fresco das raízes e o aspecto visual do desenvolvimento radicular.

Também foram empregados diferentes critérios de medição do comprimento radicular, tais como: o comprimento líquido (comprimento da raiz principal no final do experimento menos o comprimento inicial) ou o comprimento relativo (o comprimento da raiz principal da planta submetida ao estresse de Al em relação ao comprimento da raiz principal de uma planta controle) (Reid *et al.*, 1971; Garcia & Silva,

1979; Prioli AJ, 1987; Magnavaca, 1982; Cambraia & Cambraia, 1994; Urrea-Gómez *et al.*, 1996).

Uma alternativa à medição do comprimento da raiz seria sua avaliação visual. As raízes de plantas sensíveis de diferentes espécies que crescem em solução nutritiva contendo Al, apresentam-se curtas, engrossadas, desprovidas de raízes laterais, têm o meristema apical destruído e muitas vezes estão enegrecidas, enquanto que as raízes de plantas tolerantes apresentam um desenvolvimento radicular normal. A classificação das plantas em tolerante/sensível ao Al pela avaliação visual poderia ser ainda confirmada através de métodos de coloração da radícula utilizando-se hematoxilina, um corante específico para a detecção do Al (Ownby, 1993). Assim, a avaliação visual permitiria resultados seguros a despeito da variabilidade do material (Reid *et al.*, 1971; Garcia *et al.*, 1979) além de possuir alta correlação com os resultados conseguidos em experimentação de campo (Urrea-Gómez *et al.*, 1996).

3.2.3. Genética da tolerância ao Al

A calagem é a principal metodologia utilizada para a correção da acidez do solo. A aplicação de grandes quantidades de Ca no solo, principalmente na forma de gesso (CaSO_4) ou calcário (CaCO_3), eleva o pH do solo, resultando na precipitação do Al, e consequentemente, fazendo com que os níveis de Al tóxico declinem. Em geral, aplicações de calcário suficientes para a correção do pH do solo são bastante caras. Além disso, esta correção atinge apenas as camadas superficiais do solo, sendo que o subsolo permanece ácido. A aplicação de calcário em maiores profundidades no solo é

tecnicamente difícil e economicamente inviável. Como consequência, plantas cultivadas em solos que sofreram calagem desenvolvem raízes apenas na camada superficial do solo, onde houve correção do pH, sendo bastante suscetíveis ao estresse hídrico. Por estas razões, a melhor alternativa para contornar-se o problema de toxicidade do Al em solos ácidos, é a utilização de genótipos tolerantes ao Al, aliada à correção do pH do solo (Foy *et al.*, 1978; Rao *et al.*, 1993).

A herança da tolerância ao Al tem sido estudada em diversas espécies. Em cevada e sorgo, a herança é monogênica e condicionada por um alelo dominante (Minella & Sorrells, 1992; Boye-Goni & Marcarian, 1985). Em arroz a tolerância é controlada por poucos locos (Howeler & Cadavid, 1976), enquanto que, em trigo, a expressão da tolerância ao Al parece ser uma característica multigênica em alguns cultivares (Berzonsky, 1992), mas em outros, uma grande proporção da tolerância pode ser atribuída a um único gene dominante (Camargo, 1981, 1984a; Larkin, 1987, Delhaize *et al.*, 1993a, b). Tal hipótese foi confirmada recentemente pelo mapeamento no cromossomo 4DL do gene denominado *Alt_{BH}* no cultivar de trigo BH 1146 (Riede & Anderson, 1996). Em milho, vários autores estudaram a herança do caráter através de diversas técnicas. Estes trabalhos chegaram a conclusões conflitantes sobre a herança do caráter.

Rhue *et al.* (1978) trabalhando com populações F2 e retrocruzamentos entre quatro linhagens tolerantes e sensíveis ao Al, encontraram evidências de que um único loco com alelos múltiplos controlava a tolerância em milho. As avaliações foram feitas em solução nutritiva, tendo como parâmetro de avaliação o crescimento radicular. Os autores sugeriram que a variação nos níveis de tolerância ao Al em milho poderia ser explicada por diferentes alelos.

Garcia & Silva (1979) utilizaram gerações F1, F2 e retrocruzamentos desenvolvidas a partir de cruzamentos de três linhagens tolerantes e duas sensíveis. O parâmetro adotado para a avaliação da tolerância ao Al foi o comprimento radicular, medido 7 dias após o plantio das sementes em potes de areia irrigados com solução nutritiva contendo Al. Os autores concluíram que a tolerância ao Al era controlada por um gene dominante, com possíveis alterações por modificadores.

Prioli AJ (1987) analisou a herança da tolerância ao Al em milho utilizando linhagens homozigóticas e híbridos obtidos a partir de cruzamentos entre linhagens flints (raça Cateto) e dentadas (raça Tuxpeño). A caracterização fenotípica foi estudada avaliando-se o comprimento líquido da radícula de plantas crescidas em solução nutritiva. O autor concluiu que um 1 a 3 locos dominantes estavam envolvidos na expressão da tolerância, fato corroborado pela alta herdabilidade constatada para o caráter.

Magnavaca (1987) estudou seis gerações (P1, P2, F1, BC1 e BC2) derivadas de cruzamentos entre linhagens tolerantes e sensíveis ao Al. Ele utilizou solução nutritiva e avaliou as plantas através do comprimento relativo da raiz principal (comprimento final dividido pelo comprimento inicial). O autor concluiu que a tolerância é uma característica quantitativa, com uma tendência da sensibilidade ser dominante.

Sawazaki & Furlani (1986) avaliaram gerações F1, F2 e S1 de milho, desenvolvidas a partir de linhagens Cateto (Ip 48-5-3) cruzadas com uma raça flint da Colômbia (Col 2-22), e sugeriram herança quantitativa para a tolerância. O parâmetro de avaliação foi o comprimento líquido da raiz principal (comprimento inicial subtraído do comprimento final).

Miranda Filho *et al.* (1996) empregaram a mesma técnica de Garcia & Silva. (1979) para estudar a herança da tolerância ao Al. Eles utilizaram progênies de autofecundação (S1) e progênies de irmãos germanos ($S_0 \times S_0$) de milho, desenvolvidas a partir de populações Piranão VD-2(A) e Piranão VF-1(B). As plantas foram caracterizadas fenotipicamente como tolerantes e sensíveis através da medida do comprimento da radícula. A frequência de distribuição das diferentes classes e as estimativas da variância dentro de progênies, levaram os autores a concluir que a tolerância ao Al foi devida ao efeito de um gene principal com ação gênica dominante para o caráter avaliado.

As diferentes conclusões apresentadas por estes trabalhos evidenciam portanto, que a genética da tolerância ao Al em milho ainda não foi efetivamente elucidada.

3.3. Marcadores Moleculares

Antes da aplicação das técnicas moleculares, os métodos tradicionais de estudo da variação genética em plantas dependiam da identificação de marcadores morfológicos na espécie em estudo, tais como nanismo, albinismo, morfologia foliar, etc. Embora tenham contribuído muito em programas de melhoramento e em estudos de genética básica, os marcadores morfológicos possuem algumas limitações. Como exemplo, podemos citar o pequeno número existente quando comparado ao polimorfismo ao nível do DNA. Além disso, marcadores morfológicos bem conhecidos são disponíveis

apenas para poucas espécies, as quais foram extensivamente estudadas do ponto de vista genético (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

A introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas no início da década de 60, além de iniciar a era dos marcadores moleculares, ampliou o número de marcadores que poderiam ser utilizados. A técnica baseia-se em mutações no código genético, as quais alteram a carga elétrica de algumas proteínas com função enzimática. Após eletroforese das amostras de proteína, o polimorfismo é detectado através da visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos. Os marcadores isoenzimáticos podem ser obtidos de uma maneira relativamente rápida, barata e são disponíveis para praticamente todas as espécies de plantas. A utilização de isoenzimas permitiu a detecção de polimorfismo entre plantas que não mostravam diferenças morfológicas. Assim foi possível uma melhor avaliação da variação genética (Torggler *et al.*, 1995).

O poder de detecção da variabilidade existente diretamente ao nível do DNA, só foi alcançado com o desenvolvimento de técnicas em biologia molecular. A primeira delas baseia-se na ação de enzimas de restrição, as quais reconhecem uma sequência de DNA, e clivam a molécula nestes sítios específicos. Os efeitos de mutações pontuais, inserções, deleções e rearranjos nos sítios de clivagem, são detectados através de “Southern blots” como polimorfismos no tamanho dos fragmentos de DNA após digestão com uma enzima de restrição. Esta variação encontrada entre indivíduos foi denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Botstein *et al.*, 1980).

Com o aparecimento da reação de polimerização em cadeia (PCR - Mullis & Faloona, 1987) permitindo a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento

específico de DNA, uma nova classe de polimorfismo, de obtenção mais rápida e muita mais sensível que aquela baseada em RFLPs, pôde ser utilizada. A técnica desenvolvida por Williams *et al.* (1990) foi denominada de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Esta técnica, baseia-se na amplificação enzimática diferencial de pequenos fragmentos de DNA, utilizando-se “primers” aleatórios (oligonucleotídeos geralmente com 10 bases). O polimorfismo resulta de mudanças cromossômicas nas regiões amplificadas ou mudanças de bases que alteram o pareamento dos “primers” com a região homóloga no DNA.

Os marcadores de DNA citados acima representam somente dois exemplos entre os vários existentes, tais como: VNTR - “Variable Number of Tandem Repeated” (Wyman & White, 1980), SSR - “Simple Sequence Repeats” (Litt & Luty, 1989), AFLP - “Amplified Fragment Length Polymorphism” (Zabeau, 1993), etc. Certamente o constante desenvolvimento da biologia molecular fará com que surjam outras metodologias de detecção de polimorfismo em nível do DNA, ainda mais poderosas e menos laboriosas. A escolha de um ou outro tipo de marcador depende do material com o qual se está trabalhando, do objetivo a ser alcançado, e da estratégia adotada para alcançar-se este objetivo.

Todos os marcadores possuem propriedades importantes em comum, tais como: estarem dispersos no genoma, existirem em grande número, serem estavelmente herdados, não serem afetados pelo ambiente, nem por efeitos pleiotrópicos e, sobretudo, serem detectáveis em todos os tecidos e em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Beckmann, 1991).

3.3.1. Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP):

aspectos gerais

O princípio envolvido na técnica de RFLP baseia-se nas mudanças de bases do DNA que podem alterar as sequências reconhecidas por enzimas de restrição. Estas mudanças podem abolir ou criar novos sítios de restrição para uma enzima em particular. Deleções ou transposições de grandes porções da molécula de DNA podem trazer mudanças simultâneas nos padrões de restrição de um grande número de enzimas. Como resultado, um mesmo loco (representado por um segmento de DNA) em dois cromossomos homólogos, pode ou não apresentar os mesmos sítios de clivagem para uma dada enzima. Consequentemente, para um mesmo loco, fragmentos de DNA de tamanhos diferentes poderão ser observados quando o DNA de um indivíduo heterozigoto, ou de dois indivíduos homozigotos para alelos diferentes, forem digeridos (Beckmann & Soller, 1986).

As diferenças no tamanho dos fragmentos se refletem em suas velocidades de migração através de um gel, por eletroforese. Estas são visualizadas quando o gel é transferido para uma membrana, e a mesma é hibridizada com uma sequência de DNA homóloga àquela que corresponde ao loco em estudo. Tal sequência de DNA, denominada “sonda”, é marcada radioativamente ou com compostos que desencadeiam uma reação de quimioluminescência. Após hibridização e auto-radiografia, as diferenças no tamanho dos fragmentos são visualizadas pelas bandas impressas em diferentes posições do filme, sendo que, cada tipo de perfil de restrição corresponde a um alelo diferente, do mesmo loco (Tanksley *et al.*, 1989).

O uso de marcadores moleculares do tipo RFLP foi inicialmente proposto como uma fonte de marcadores genéticos em humanos pois o pequeno número de marcadores fenotípicos na espécie humana, complicava e, muitas vezes, impossibilitava as análises genéticas (Botstein *et al.*, 1980). Com o passar do tempo, a utilização de RFLP na genética humana tornou-se generalizada, sendo eles aplicados atualmente na diagnose de doenças hereditárias (Little *et al.*, 1980; Philips *et al.*, 1980; Gusella *et al.*, 1983; Watson, 1992).

Em plantas os marcadores moleculares representam uma ferramenta para a resolução de problemas específicos. Em estudos básicos de genética de plantas tais marcadores podem ser usados: na análise estrutural do genoma, na comparação da organização genômica de espécies diferentes através do estudo da ordem dos genes e, conseqüentemente, no estudo de processos evolutivos (Tanksley, 1983; Beckmann & Soller, 1983, 1986; Paterson, 1991; Goffreda *et al.*, 1992). Em programas de melhoramento, o uso de RFLPs pode auxiliar o processo de seleção, na formação de grupos heteróticos, na identificação de indivíduos e variedades ("fingerprint"), no acompanhamento e otimização de introgressões e no mapeamento de genes de interesse (Beckmann & Soller, 1983; Bonierbale *et al.*, 1988; Tanksley *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1990; Dudley, 1993; Bernardo, 1994; Moser & Lee, 1994; Lanza, 1996).

Existe grande variabilidade detectável por marcadores do tipo RFLP em plantas. Esta variabilidade foi observada em várias espécies economicamente importantes, tais como: arroz (McCouch *et al.*, 1988), soja (Apuya *et al.*, 1988), cevada (Saghai-Marooft *et al.*, 1984), ervilha (Polans *et al.*, 1985), alface (Landry *et al.*, 1987b) e batata (Bonierbale *et al.*, 1988) entre outras. Em milho, Rivin *et al.* (1983), Burr *et al.*

(1983) e Helentjaris *et al.* (1985) encontraram grande variabilidade entre diferentes linhagens, quando sequências de DNA repetitivo ou de cópia única eram utilizadas como sondas. A disponibilidade de um grande número de marcadores do tipo RFLP, dispersos ao acaso no genoma de muitas espécies de plantas, tornou possível a confecção de mapas de ligação saturados, com inúmeros locos informativos (Hoisington & Coe, 1990).

Em um mapa de ligação cada loco é definido por uma sonda. A escolha de uma coleção de sondas apropriadas como marcadores RFLP é um passo muito importante. Os principais critérios para esta seleção, incluem: 1) a capacidade da sonda revelar claramente o polimorfismo no genoma em estudo; 2) a detecção de um ou poucos locos por sonda, evitando-se assim qualquer ambiguidade na análise de diferentes alelos. As sondas podem ser obtidas tanto a partir de bancos de cDNA quanto de bancos genômicos. A maioria é anônima ou seja, não se conhece a sua sequência de bases (Hoisington & Coe, 1990).

Mapas de RFLPs são um conjunto de frequências de recombinação entre um grande número de locos, cujos alelos segregam em progênie segregantes, obtidas a partir de parentais contrastantes para tais locos. Espera-se que os marcadores sejam codominantes e possuam herança mendeliana simples. Em plantas, a maioria dos mapas feitos com marcadores do tipo RFLP foram baseados na segregação de progênie F₂, mas populações resultantes de retrocruzamentos, de linhagens recombinantes ("Recombinant Inbred Lines" - Burr *et al.*, 1988) e de duplo-haplóides (Snape, 1988) também foram utilizadas. Verificado o padrão de segregação, a distância entre os locos é determinada através da medida de recombinação, e os marcadores ligados são combinados em grupos de ligação (Gebhardt & Salamini, 1992).

A designação de um grupo de ligação para determinado cromossomo é feita através de uma série de técnicas, dependendo da espécie em questão e da existência de mapas genéticos, elaborados a partir de outros tipos de marcadores, tais como isoenzimas e marcadores morfológicos. Em milho, utilizaram-se linhas monossômicas ($2n-1$) (Helentjaris *et al.*, 1986b) e translocações A-B (Weber & Helentjaris, 1989), marcadores morfológicos em *Arabidopsis* (Chang *et al.*, 1988), trissômicos ($2n+1$) e locos isoenzimáticos em arroz (Young *et al.*, 1987) e tomate (Bernatzky & Tanksley, 1986).

3.3.2. Mapeamento genético com marcadores moleculares

O mapeamento genético de um dado gene utiliza-se da porcentagem de recombinação entre dois locos para determinar a distância relativa entre eles. Se esta porcentagem for menor que 50%, há uma indicação de que estes dois locos estão ligados. Este método se baseia na teoria da probabilidade e foi desenvolvido por Sturtevant em 1911. Usando *Drosophila melanogaster* como organismo experimental, ele estabeleceu que a frequência de quiasmas entre dois genes ligados é de certa forma proporcional à distância entre eles. Sturtevant também sugeriu um padrão para a unidade de distância genética, sendo 1% de recombinação definido como um centimorgan (Sturtevant & Beadle, 1939).

Se uma ligação estreita entre um marcador RFLP e a característica fenotípica for detectada, outros marcadores mapeados na mesma região, podem ser utilizados. Quanto maior for o nível de saturação do mapa genético molecular, maior será

a probabilidade de identificação de um marcador estreitamente ligado à característica em estudo. A frequência de recombinação e a ordem dos marcadores são estimadas usando equações de máxima verossimilhança (Haldane, 1919; Kosambi, 1944), que constituem a base de programas de computador desenvolvidos especialmente para analisar uma grande quantidade de dados, como os programas LINKAGE (Lathrop & Lalouel, 1984) e MAPMAKER (Lander *et al.*, 1987).

Exemplos da identificação de marcadores RFLP ligados à características monogênicas são encontrados para resistência a diferentes espécies de patógenos, tais como: vírus (McMullen & Louie, 1989; Ritter *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1994), fungos (Sarfatti *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1992; Hartl *et al.*, 1993; Kilian *et al.*, 1994), e nematóides (Kleinlankhorst *et al.*, 1991; Weisemann *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1994), além de inúmeros outros exemplos para características mais específicas tais como: controle da androgênese em milho (Cowen *et al.*, 1992), desenvolvimento embrionário em *Arabidopsis* (Patton *et al.*, 1995), formação de nódulos em raízes de soja (Landauellis *et al.*, 1994), regulação da expressão de zeínas em milho (Chaudhuri & Messing, 1995), entre outros.

No entanto, o uso de marcadores RFLP não se restringe ao mapeamento de características qualitativas. Inúmeros trabalhos demonstram a possibilidade do uso desta ferramenta para a localização e análise de locos envolvidos com características poligênicas. Estudos avaliando período de florescimento em cevada (Laurie *et al.*, 1995); acúmulo de óleo e proteína em soja (Diers *et al.*, 1992); heterose em milho (Stuber *et al.*, 1992) e em arroz (Xiao *et al.*, 1995); altura da planta, peso do grão e conteúdo protéico da

semente em milho (Schon *et al.*, 1994) e tolerância à salinidade em tomate (Foolad & Jones, 1993), são apenas alguns exemplos.

3.3.3. Utilização de “bulks” contrastantes no mapeamento genético com marcadores moleculares

No mapeamento de genes com marcadores moleculares, a busca de um marcador estreitamente ligado à característica de interesse requer a avaliação de muitos genótipos com uma série de marcadores. Para simplificar e reduzir o trabalho envolvido nesta etapa, foi desenvolvida uma estratégia onde efetua-se a análise da segregação dos alelos utilizando-se dois conjuntos de indivíduos contrastantes, ao invés de toda a população segregante. Esta estratégia desenvolvida por Milcheltmore *et al.* (1991) foi denominada de BSA (Bulked Segregant Analysis).

A estratégia está baseada na comparação de dois conjuntos de DNA, denominados “bulks”, formados a partir de indivíduos selecionados da população segregante para uma determinada característica. Em cada “bulk” os indivíduos são selecionados, de forma que, todos apresentem uma dada característica em comum. Isto significa que pelo menos um loco será idêntico em todos os indivíduos de um “bulk”. No entanto, todos os outros locos segregarão aleatoriamente, uma vez que não sofreram seleção. A característica selecionada será aquela que se quer mapear. Desta forma, sempre há dois “bulks”, um constituído por indivíduos que apresentam a característica, e outro formado por aqueles que não a apresentam. Como nos dois “bulks” não houve seleção para outras características, considera-se que estas irão segregar aleatoriamente em ambos

os casos. Assim, pode-se dizer que a única diferença entre os “bulks” estará na região cromossômica onde encontra-se o gene responsável pela característica em estudo (**Figura 2**).

Os “bulks” devem ser homozigotos para a característica. Assim, no caso do fenótipo dominante, antes de formar-se o “bulk” correspondente, é necessário avaliar-se as progênies F3. Apenas indivíduos com fenótipo dominante e homozigotos, farão parte do “bulk”.

“Bulks” segregantes podem ser feitos para qualquer loco ou região genômica, desde que uma população segregante para o caráter tenha sido desenvolvida. Os dois “bulks” são formados a partir de quantidades equivalentes de DNA isolado de, no mínimo, 5 indivíduos selecionados da população segregante. Embora poucos indivíduos por “bulk” sejam requeridos, é importante ressaltar que quanto menor for a amostra utilizada, maior será a frequência de sondas que, após hibridização, indicarão ligação com o caráter, por simples coincidência.

A técnica de análise de “bulks” segregantes fornece informações simultâneas a respeito do polimorfismo entre as linhagens parentais para um dado marcador, e da possível ligação entre este marcador e o gene de interesse. Entretanto estas informações devem ser confirmadas através da análise individual de todos os componentes da população segregante. Porém, a análise empregando-se todos os indivíduos da população segregante, somente é feita com aquelas sondas que foram polimórficas entre os “bulks”.

A utilização de “bulks” contrastantes facilitou a detecção de marcadores ligados a várias características. Entre os exemplos existentes, podemos destacar os

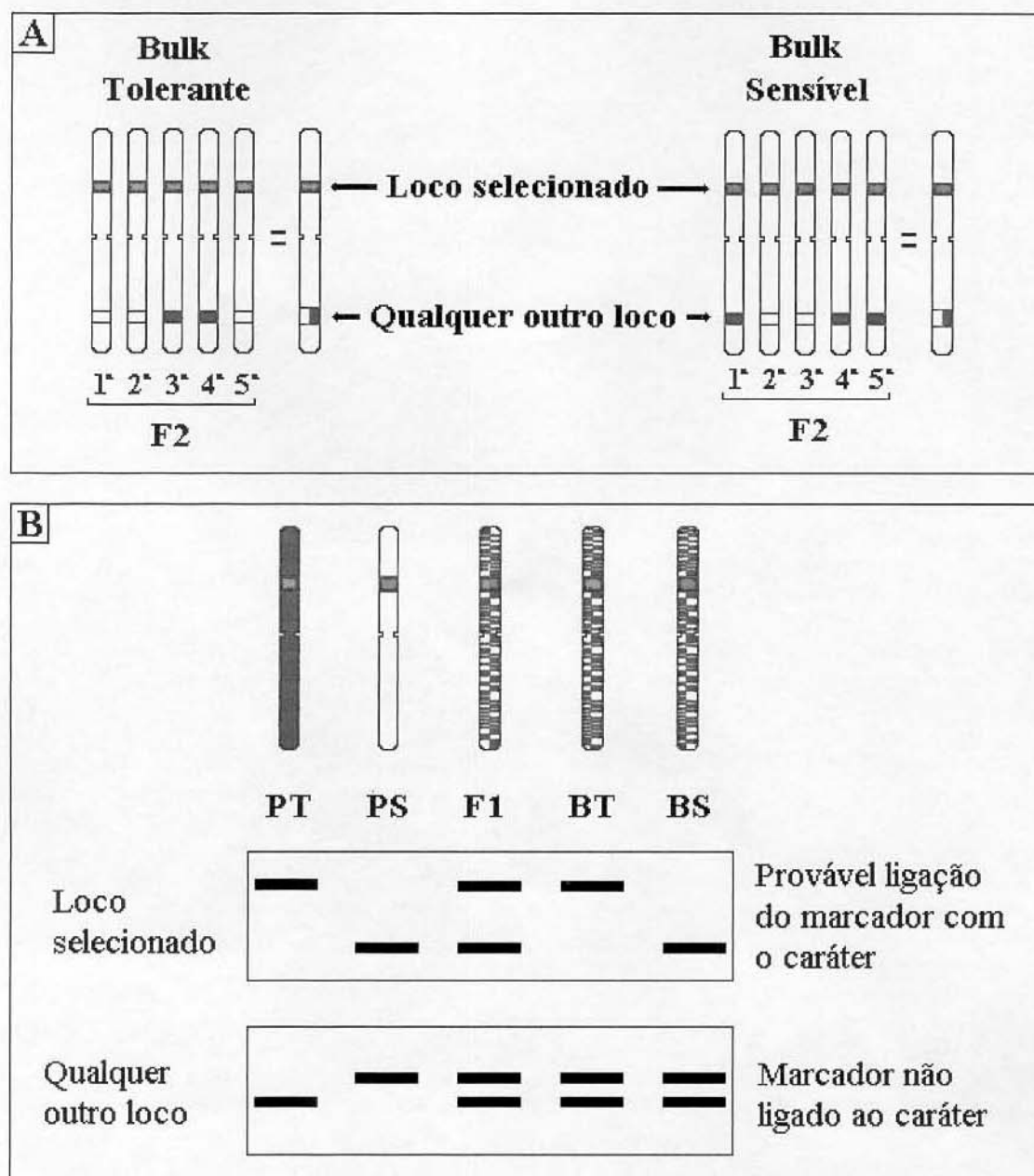


Figura 2. Uso da técnica de “bulks” contrastantes no mapeamento genético com marcadores moleculares. **A** - Indivíduos selecionados por apresentarem determinada característica (indicada em vermelho) formam o primeiro “bulk”, enquanto o outro “bulk” é formado por indivíduos que não a apresentam (em verde). **B** - resultados das hibridizações de duas sondas de RFLP com membranas contendo o DNA da linhagem tolerante (PT), sensível (PS), do F1 e dos bulks tolerante (BT) e sensível (BS).

trabalhos com resistência a fungos (Penner *et al.*, 1993; Barua *et al.*, 1993; Poulsen *et al.*, 1995), diplosporia em *Tripsacum dactyloides* (Leblanc *et al.*, 1995), a identificação de um fragmento de cromatina de centeio no genoma de trigo (Francis *et al.*, 1995), sensibilidade ao fotoperíodo em aveia (Wight & Penner, 1994) e restauração da fertilidade em cevada (Delourme *et al.*, 1994).

3.4. Apresentação do Trabalho

Há vários anos o Departamento de Genética e Evolução desenvolve trabalhos relacionados à tolerância ao Al em milho, abordando os aspectos genético, molecular e bioquímico desta característica.

O presente trabalho foi realizado utilizando duas linhagens de milho desenvolvidas anteriormente, sendo elas Cat-100-6 e S1587-17. No experimento realizado por Moon *et al.* (1997) com plântulas destas duas linhagens, crescidas em solução com e sem Al, observou-se que o Al apresentou efeito tóxico pronunciado às raízes das plantas da linhagem S1587-17 (**Figura 3**). Este efeito foi evidenciado pela diminuição do crescimento da raiz principal (**Fig. 3A-4**), e entumescimento da ponta da raiz (**Fig. 3E**), resultantes da desorganização estrutural do tecido. Tal efeito provavelmente leva à perda da dominância apical, induzindo o aparecimento de raízes laterais, as quais também tiveram seu crescimento inibido pelo Al (**Fig. 3C**). Plantas da linhagem Cat-100-6 mostraram-se tolerantes, apresentando crescimento radicular normal (**Fig. 3A-1 e 2, 3B e 3D**).

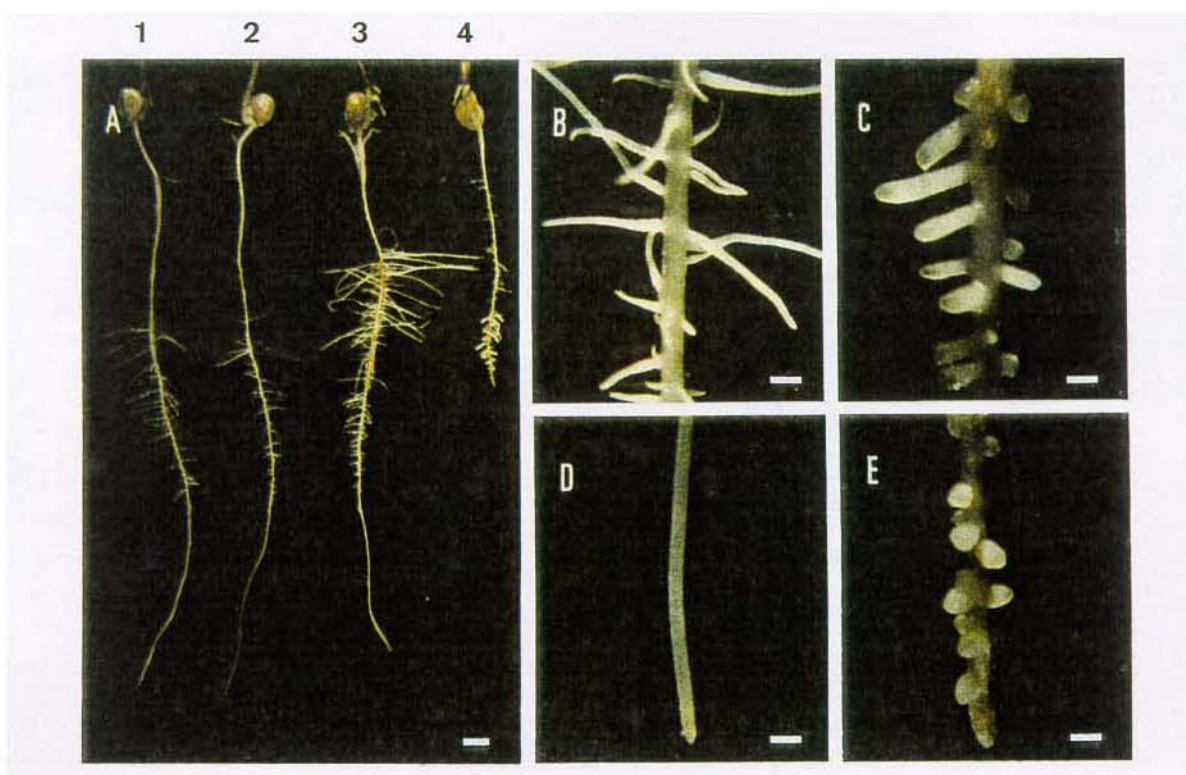


Figura 3. Efeitos do Al nas raízes de plantas tolerantes da linhagem Cat-100-6 e sensíveis da linhagem S1587-17. As plantas cresceram em uma solução de Al na presença e na ausência de 6 mg/l de Al por 7 dias, sendo então analisadas quanto aos sintomas de toxidez ao Al. **A**, Sistema radicular de plantas tolerantes (1,2) e sensíveis (3,4) que cresceram em solução nutritiva sem Al (1,3) e com 6 mg/l de Al (2,4). **B** e **D**; detalhes das raízes laterais e da ponta da raiz, de plantas tolerantes crescidas na presença de 6 mg/l de Al. **C** e **E**; detalhes das raízes laterais e da ponta da raiz, de plantas sensíveis crescidas na presença de 6 mg/l de Al (Moon *et al.*, 1997).

No caso das linhagens Cat-100-6 e S1587-17, a desorganização estrutural dos tecidos pela ação fitotóxica do Al, tornou-se evidente através do estudo de cortes histológicos da ponta da raiz principal de plântulas tolerantes (**Fig. 4A-E**) e sensíveis (**Fig. 4F - J**) (Moon *et al.*, 1995). Na **Figura 4**, de **G** a **J** é possível visualizar o dano progressivo induzido pela continua exposição de raízes de plântulas sensíveis à solução nutritiva contendo 6 mg/l de Al. O ápice radicular das plântulas tolerantes, da linhagem Cat-100-6, não mostrou nenhum sintoma de toxidez ao Al, mesmo após o sexto dia de exposição ao íon (**Fig. 4-E**).

A concentração de 4,5 mg/l de Al utilizada nos testes de tolerância/sensibilidade em solução nutritiva, foi determinada por Moon *et al.* (1997) de acordo com Prioli AJ (1987) que analisou com várias linhagens, entre elas, a linhagem Cat-100-6. Moon *et al.* (1997) estabeleceram esta concentração analisando a resposta das plantas tolerantes e sensíveis a um gradiente de concentração de Al em solução nutritiva. A concentração de 4,5 mg/l mostrou-se eficiente na discriminação da tolerância/sensibilidade entre as linhagens parentais e o F1. Além disso, na concentração de 4,5 mg/l, o nível de injúria causado pelo Al às raízes das plântulas utilizadas no teste, ainda permitia seu desenvolvimento após transferência para o campo. Os autores optaram por expressar a concentração de Al na solução através da atividade livre do íon Al^{3+} , estimada pelo programa GEOCHEM-PC (Parker *et al.*, 1995). A concentração de 4,5 mg/l de Al na solução e pH indicados na **Tabela 1** equivale a uma atividade de 30.10^{-6} (**Figura 5**).

Os efeitos causados pela toxidez ao Al na linhagem sensível S1587-17, como a redução na taxa de crescimento das raízes (**Figura 3**), a autólise das células da

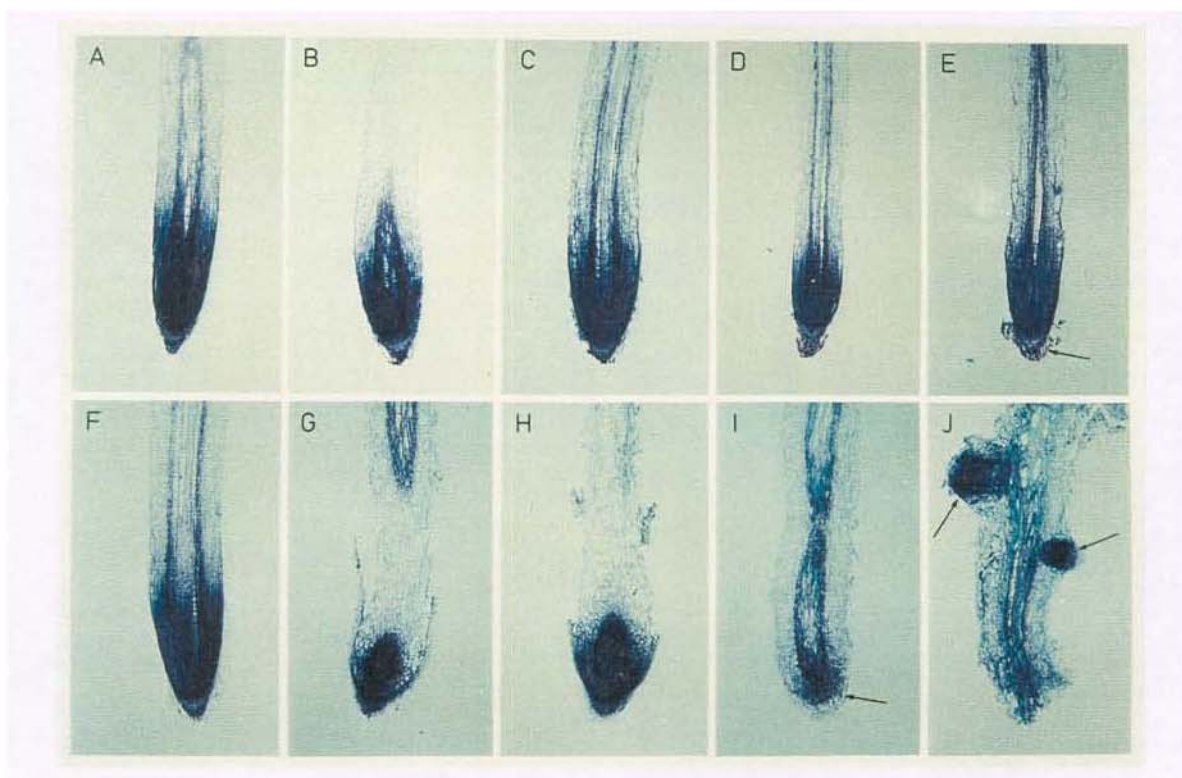


Figura 4. Cortes histológicos mostrando a zona de elongação de raízes principais coradas com Azul de Toluidina da linhagem tolerante Cat-100-6 (**A-E**) e da linhagem sensível S1587-17 (**F-J**). **A** e **F**; controles sem Al. As fotos restantes referem-se ao tratamento com 6 mg/l de Al por 1 dia (**B** e **G**), 2 dias (**C** e **H**), 4 dias (**D** e **I**) e 6 dias (**E** e **J**). A seta em **E** indica o desligamento das células da coifa, um sinal de crescimento da raiz; em **I** indica a completa destruição da coifa, e em **J**, a aparência dos meristemas das raízes laterais após as células da coifa terem sido destruídas (Moon *et al.*, 1995).

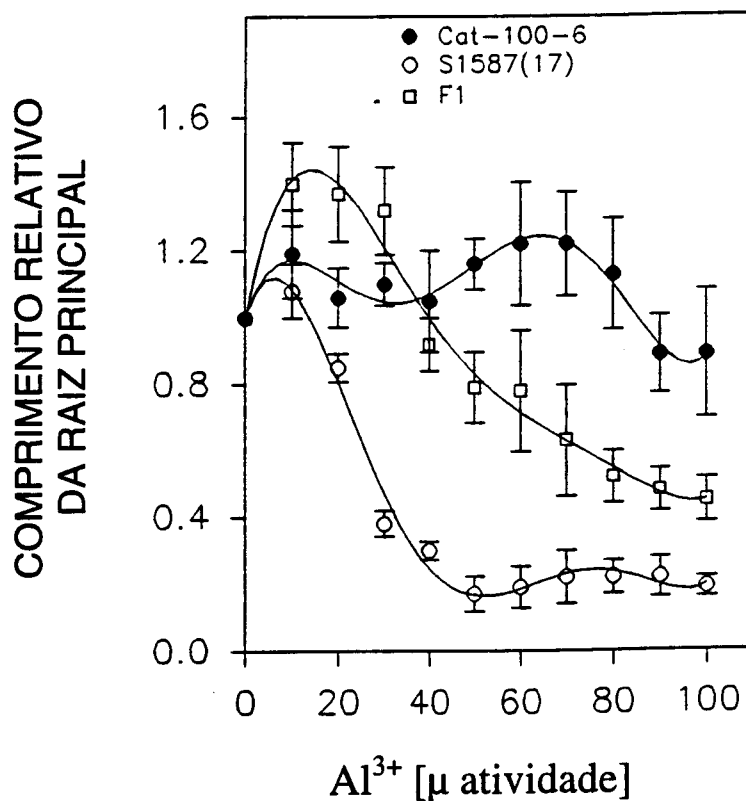


Figura 5. Efeito do aumento da concentração de Al no comprimento relativo da raiz principal (CRRP) das raízes de plantas da linhagem tolerante Cat-100-6 (círculo cheio), da linhagem sensível S1587-17 (círculo aberto) e do F1 (quadrado aberto). Dez plantas de cada genótipo cresceram em solução nutritiva contendo um gradiente de atividade do íon Al^{3+} de 0 a $93 \cdot 10^{-6}$. Após sete dias o CRRP foi calculado para cada planta (Moon *et al.*, 1997).

epiderme, endoderme e do córtex, além da desorganização das regiões meristemáticas da raiz primária e das raízes laterais (**Figura 4 de G a J**), apresentam um processo de destruição do meristema apical pela toxidez ao Al, amplamente documentado não só em milho, como em outras espécies (Foy, 1976; Foy *et al.*, 1978; Taylor, 1988a ; Marschner, 1991; Rao *et al.*, 1993).

Estes efeitos demonstram claramente que estas linhagens são extremamente contrastantes para a característica tolerância ao Al, representando um excelente material para o mapeamento do caráter responsável por esta característica. Além disso, estudos genéticos e moleculares desenvolvidos anteriormente no laboratório sugeriram que a tolerância da linhagem Cat-100-6 ao Al seria controlada por um gene dominante (Sibov *et al.*, 1995; Moon *et al.*, 1995, 1997) e que, provavelmente, tal gene estaria ligado àqueles que codificam zeínas de 22kD (Gaspar *et al.*, 1995; Moon *et al.*, 1997; A. P. Souza, comunicação pessoal). Como a maioria dos genes que codificam esta classe de zeínas está localizada nos cromossomos 4 e 7, havia a hipótese de que a tolerância ao Al pudesse estar localizada em um destes 2 cromossomos.

Neste contexto foi iniciado este trabalho, onde, através do mapeamento com marcadores moleculares, seria possível localizar-se precisamente no genoma, o gene que controla a tolerância ao Al. Para tanto, empregou-se a estratégia de BSA (Bulked Segregant Analysis) e marcadores moleculares do tipo RFLP.

4. MATERIAIS

4.1. Material Vegetal

a) Parentais: linhagens Cat-100-6 e S1587-17

A linhagem endogâmica de milho Cat-100-6, previamente denominada L922 (W. J. da Silva), foi obtida do banco de germoplasma do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas. Esta linhagem foi derivada da raça de milho duro (flint) Cateto sendo tolerante ao Al (Prioli AJ, 1987).

Culturas de calos da linhagem Cat-100-6 foram estabelecidas a partir de embriões imaturos (Prioli & Silva, 1989) e algumas plantas foram regeneradas a partir destes calos. Uma destas plantas, designada S1587, apresentou várias mutações e foi selecionada para estudos posteriores (Targon *et al.*, 1991). Este somaclone foi autofecundado até a obtenção da geração R5. Uma das progênie obtidas, designada S1587-17 apresentou elevada sensibilidade ao Al tóxico quando comparada à linhagem original Cat-100-6 (Moon *et al.*, 1997). Por esta razão, a linhagem S1587-17 foi selecionada para estudos genéticos da tolerância ao Al (**Figura 6**).

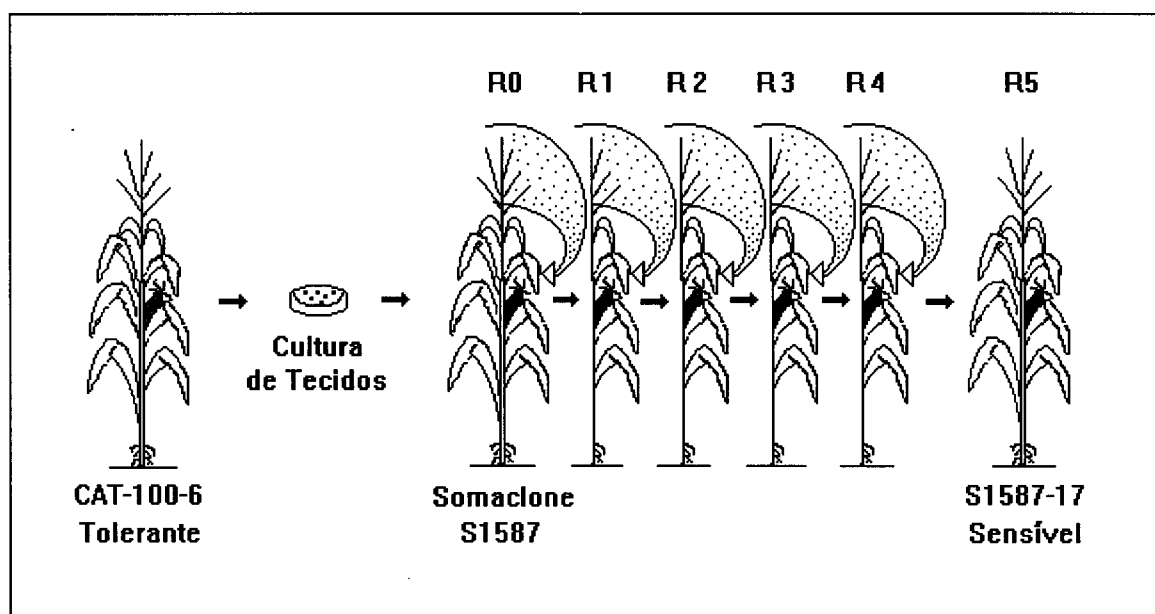


Figura 6. Esquema de obtenção da linhagem S1587-17, sensível ao Al. O somaclone S1587 foi obtido a partir de calos gerados através da passagem da linhagem Cat-100-6 pela cultura de tecidos. Este somaclone foi autofecundado até a obtenção da geração R5. Nesta geração a progênie S1587-17 apresentou elevada sensibilidade ao Al, sendo selecionada para estudos genéticos da tolerância ao Al.

b) F1 e população segregante F2

Para este estudo, o F1 foi obtido através do cruzamento Cat-100-6 (tolerante) x S1587-17 (sensível). A população F2 foi obtida a partir da autofecundação do F1.

4.2. Sondas

Utilizou-se um total de 158 marcadores de RFLP, desenvolvidos por diversas instituições: Brookhaven National Laboratory (sondas BNL); University of Missouri, Columbia (sondas UMC); Asgrow (sondas ASG); Pioneer Hi-Bred International (sondas PHP e NPI); Mycogen Plant Genetics (sondas AGR) e California State University (sondas CSU). As sondas utilizadas foram escolhidas de forma que fossem distribuídas a intervalos de 10 a 30 cM, cobrindo todo o genoma do milho (Coe, 1994, 1995, 1996).

Várias das sondas foram gentilmente cedidas pelo CIMMYT - Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (sondas BNL, UMC e CSU), e as demais pela Dra. Theresa A. Musket, da University of Missouri, Columbia.

4.3. Enzimas de Restrição

O DNA isolado das plantas foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* e *BamHI*.

5. MÉTODOS

5.1. Análise da tolerância ao Al

5.1.1. Avaliação das linhagens parentais e das gerações F1, F2 e F3

a) Em uma etapa anterior a este trabalho, plantas das linhagens parentais, Cat-100-6 (tolerante) e S1587-17 (sensível), além do cruzamento F1 (Cat-100-6 X S1587-17), foram plantadas no campo para a manutenção do material de pesquisa e autofecundação do F1. As sementes da geração F2 utilizadas para o teste de tolerância ao Al, foram retiradas de uma mesma espiga. Após o teste, 300 plântulas F2 foram numeradas, transferidas para vasos com terra e após duas semanas, as plantas sobreviventes foram transplantadas para o campo.

b) Todas as plantas F2 transferidas para o campo foram autofecundadas para a obtenção das progênies F3. De cada planta F2 avaliou-se um mínimo de doze sementes F3, no teste de tolerância ao Al. Foi utilizada uma amostra de doze sementes para permitir que pelo menos dez delas pudessem gerar plântulas em condições de serem avaliadas ao final do experimento, pois sempre havia perdas devido à não germinação, quebra de raízes no momento da montagem/desmontagem do experimento, etc.

c) Sementes das linhagens parentais (Cat-100-6 e S1587-17) e da geração F1, também foram submetidas às mesmas condições do teste para servirem como padrão no momento da avaliação.

5.1.2. Montagem do Experimento

a) **Pré-germinação:** as sementes foram dispostas horizontalmente sobre papel de germinação umedecido em água destilada autoclavada. Em seguida, o papel foi enrolado e posicionado verticalmente dentro de um recipiente plástico contendo no interior de 2 a 3 cm de água destilada autoclavada. Os rolos (dentro dos recipientes) foram colocados na estufa à 30°C por 60 h. Devido ao menor vigor das sementes das linhagens parentais em relação às sementes das gerações F1 e F2, a germinação delas foi mais lenta, tendo sido necessário permanecerem na estufa por 72 h.

b) **Montagem:** após o período de germinação, as plântulas apresentando 2 a 3 cm de comprimento radicular, foram colocadas ordenadamente sobre placas de isopor perfuradas para que as raízes entrassem em contato com a solução nutritiva. A solução foi preparada segundo Prioli AJ (1987) (**Tabela 1**), contendo 4,5 mg/l de Al. O pH da solução foi aproximadamente 4,0 (valor necessário para manter o Al solúvel), não necessitando de correções posteriores. As plântulas permaneceram na solução nutritiva contendo Al tóxico por sete dias. O experimento foi realizado em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 16/8 claro/escuro, à 26°C +/- 1°C, sob aeração constante.

5.1.3. Análise fenotípica das raízes

O aspecto morfológico da ponta da raiz principal, foi a principal característica utilizada para a classificação das plantas como tolerante ou sensível. A sensibilidade ao Al foi indicada principalmente pelo entumescimento da ponta da raiz. No

Solução Estoque			Solução Nutritiva Final		
Nome	Sal	g/l	ml/ Estoque	mg Elemento/l	
Ca	$\text{Ca}(\text{N O}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	270,00	3,00	Ca = 137,5	$\text{NO}_3\text{-N} = 96,1$
	NH_4NO_3	33,80		$\text{NH}_4\text{-N} = 17,8$	$\text{NO}_3\text{-N} = 17,8$
K	KCl	18,60	2,20	K = 21,5	Cl = 19,5
	K_2SO_4	44,00		K = 43,5	$\text{SO}_4\text{-S} = 17,8$
	KNO_3	24,60		K = 21,0	$\text{NO}_3\text{-N} = 7,5$
Mg	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	142,40	1,50	Mg = 20,3	$\text{NO}_3\text{-N} = 23,4$
P	KH_2PO_4	17,60	0,25	K = 1,25	$\text{H}_2\text{PO}_4 = 1,0$
Fe	FeSO_4	12,05	1,40	Fe = 6,2	$\text{SO}_4\text{-S} = 3,6$
	EDTA	12,55			EDTA = 17,6
Micro	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,34	0,70	Mn = 0,455	Cl = 0,588
	H_3BO_3	2,04			$\text{BO}_3\text{-B} = 0,250$
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,88		Zn = 0,140	$\text{SO}_4\text{-S} = 0,069$
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,20		Cu = 0,036	$\text{SO}_4\text{-S} = 0,018$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,26		Na = 0,035	$\text{MoO}_4\text{-Mo} = 0,072$

Solução Nutritiva Final		
Composição Total		
Elemento	mg/l	mM
Ca^{2+}	137,500	3431,0
K^+	87,200	2230,0
Mg^{2+}	20,300	835,0
NO_3^-	144,800	10343,0
NH_4^+	17,800	1271,0
HPO_4^{2-}	1,000	31,0
SO_4^{2-}	21,500	672,0
BO_3^{3-}	0,250	23,0
Cl^-	20,100	566,0
Fe^{2+}	6,200	111,0
Mn^{2+}	0,455	8,3
Cu^{2+}	0,036	0,6
MoO_4^{2-}	0,072	0,8
Zn^{2+}	0,140	2,2
Na^+	0,350	1,5
EDTA	17,600	52,0

Tabela 1. Composição da solução nutritiva salina usada para o desenvolvimento de plântulas de milho (Prioli AJ, 1987). Antes da adição de Al o pH da solução nutritiva estabiliza-se em torno de 4,3. Com a adição de $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (PM = 474,38) para uma concentração final de 4,5 mg/l de Al, o pH tende a 4,0, dispensando ajuste posterior.

entanto, outras características também foram observadas, tais como o aparecimento de raízes laterais na região de elongação e o desenvolvimento reduzido do sistema radicular. Os padrões fenotípicos utilizados nas avaliações foram as linhagens parentais Cat-100-6 (tolerante) e S1587-17 (sensível), as quais foram submetidas às mesmas condições do teste de Al. As avaliações foram efetuadas separadamente, por três pessoas, sendo os resultados comparados. Nos casos onde as avaliações foram discordantes, efetuou-se a coloração das raízes com hematoxilina, para classificar a planta como tolerante ou sensível.

Coloração com hematoxilina: as raízes foram lavadas por 10 min em água destilada sob aeração. Em seguida, foram colocadas por 15 min em uma solução contendo hematoxilina 0,2%, KIO_3 0,02% e NaOH 0,1M. Após a coloração, as raízes foram lavadas duas vezes, por 10 min com água destilada. A hematoxilina forma um complexo com o Al precipitando-o. Desta forma, a raiz da planta sensível torna-se negra, enquanto que a tolerante permanece não corada (Ownby, 1993).

5.1.4. Transferência para o campo

Todas as plântulas F2 avaliadas foram transferidas para potes plásticos com terra, sendo diariamente umedecidas e protegidas da exposição direta ao sol. Este período, de aproximadamente duas semanas, foi necessário para que as plântulas se adaptassem às condições ambientais antes de serem transferidas para o campo.

5.2. Coleta e preparo do material vegetal

Pouco antes do florescimento, foram coletadas 2 ou 3 folhas jovens e saudáveis, com aproximadamente 30 a 60 cm de comprimento, de cada planta F2. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas à -70°C. Posteriormente elas foram liofilizadas (72 h, -60°C, 05 a 10 microns de Hg), moídas em moinho (Ciclotec-1093 Sample Mill, Tecator), acondicionadas em frascos plásticos hermeticamente fechados e armazenadas em freezer à -20°C.

Foram coletadas individualmente folhas de 16 a 20 plantas das linhagens parentais e da geração F1. Após a moagem, foram feitos 3 “pools” de material vegetal, sendo cada um constituído pela mistura, em quantidades iguais, de folhas moídas das plantas das linhagens Cat-100-6, S1587-17 e geração F1. Assim, havia uma mistura de material liofilizado e moído representando o conjunto de plantas referentes à linhagem tolerante, uma mistura para a linhagem sensível e outra para o cruzamento F1. Estas misturas foram utilizadas posteriormente para a extração de DNA e confecção das membranas para hibridização. Tal procedimento foi adotado para evitar que possível polimorfismo dentro das linhagens pudesse afetar o mapeamento.

Para a formação dos “bulks” foram selecionadas plantas da geração F2 com base nos resultados dos testes das progênes F3, efetuados em solução com A1. Cinco plantas F2 tolerantes homozigotas e outras cinco plantas F2 altamente sensíveis, de acordo com os resultados dos testes de progênie, formaram respectivamente os “bulks” tolerante e sensível. Os “bulks” foram preparados através da mistura de igual quantidade de folhas moídas de cada uma das cinco plantas.

5.3. Preparo de sondas para hibridização

Todas as sondas utilizadas fazem parte do banco genômico mantido pelo Laboratório de Análise Genética e Molecular do CBMEG - UNICAMP. Cada sonda corresponde a um clone, o qual é mantido sob a forma de cultura bacteriana (*E. coli*) em glicerol, à -70 °C.

5.3.1. Transformação de bactérias

Vários clones foram recebidos sob a forma de plasmídeos liofilizados. Para sua multiplicação e conservação foi necessário transformar bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α .

5.3.1.1. Preparo das células competentes

Um pré-inóculo de bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α foi crescido em 10 ml de meio LB (Bacto-triptona 1%, Extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) sob agitação vigorosa, durante a noite. Um ml do pré-inóculo foi inoculado em 100 ml de meio LB e incubado à 37°C, sob agitação moderada (250 rpm), até atingir a densidade de 5×10^7 células/ml ($DO_{550} = 0,45-0,55$). Ao atingir este valor a cultura foi mantida por 10 min no gelo. Após este tempo a cultura foi dividida em tubos de 50 ml e centrifugada por 15 min a 4000 rpm (2200 g), à 4°C. Após a centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em 25 ml de CaCl₂ 50 mM gelado e incubado por 30 min no gelo. As células foram novamente

centrifugadas por 15 min a 4000 rpm (2200 g), à 4°C, e o precipitado ressuspendido em 1 ml de CaCl₂ 50 mM + Glicerol 15%, este volume foi aliqotado em tubos, contendo 100 µl cada um, e armazenados à -70°C.

5.3.1.2. Transformação por choque térmico

Cinco a dez ng do plasmídeo foram adicionados a 100 µl de suspensão de células competentes. A mistura foi incubada por 30 min no gelo e posteriormente efetuou-se o choque térmico, mantendo-se o tubo por 90 s à 42°C. Imediatamente após o choque, o tubo foi colocado no gelo. Foram adicionados 700 µl de meio SOC (Bacto Triptona 2%; Extrato de levedura 0,5%; NaCl 0,5%; KCl 2,5 mM; Glucose 20 mM) e a cultura mantida à 37°C por 1 h. Em seguida, 100-150 µl das bactérias transformadas foram espalhadas em placas de petri contendo LB-agar e ampicilina (100 µg/ml) e inoculadas por 16-18 h à 37°C.

5.3.1.3. Preparo do estoque de bactérias em glicerol

Após a inoculação das placas foi selecionada uma colônia, que foi inoculada em 2 ml de meio líquido LB + o antibiótico ampicilina (100 µg/ml). Após incubação à 37°C durante a noite com agitação vigorosa, uma alíquota de 750 µl da cultura foi misturada a 250 µl de glicerol em tubo apropriado. As culturas em glicerol foram armazenadas à -70°C.

5.3.2. Extração de DNA plasmidial

A extração baseou-se no protocolo de Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações. Um ml e meio de cultura de células transformadas foram centrifugados por 1 min a 10.000 rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 100 µl de Solução I (Glucose 50 mM; Tris-HCl pH 8,0 25 mM; EDTA pH 8,0 10 mM). Em seguida, foram adicionados 200 µl da Solução II (NaOH 0,2 N; SDS 1%), e misturou-se por inversão. Estando o material com a consistência viscosa, foram adicionados 150 µl da Solução III (acetato de potássio 5 M; ácido acético 2 M). A mistura foi centrifugada por 3 min a 10.000 rpm, à temperatura ambiente. Transferiu-se 400 µl do sobrenadante para um tubo contendo 720 µl de etanol absoluto, a solução foi centrifugada por 1 min a 10.000 rpm, o álcool foi descartado e o precipitado lavado com 600 µl de etanol 70%. Nova centrifugação por 1 min a 10.000 rpm foi efetuada e o precipitado liofilizado e ressuscitado em 40 µl de TE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; EDTA 1 mM) mais 1 µl de RNase (10 µg/µl). A concentração do plasmídeo isolado foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparado em tampão TAE 1X (Tris 40 mM; EDTA 2 mM; ácido acético 20 mM), tendo como parâmetros de concentrações, 100 ng de fragmentos de ϕ X174 e λ digeridos respectivamente por *Hae*III e *Hind*III, corridos no mesmo gel.

5.3.3. Digestão do DNA plasmidial para recuperação do inserto

No caso do plasmídeo pUC19, os fragmentos utilizados como sondas foram nele inseridos através da clonagem no sítio da enzima *Pst*I. Assim, para a liberação do inserto, o plasmídeo foi digerido com *Pst*I. Para cada sonda, foi feita uma reação de digestão contendo de 0,5 a 1 µg de DNA do plasmídeo, tampão apropriado, 2 unidades da enzima e água esterilizada. Incubou-se à 37°C por 1 h.

5.3.4. Extração do inserto

O fragmento de interesse foi separado do vetor, submetendo-se o volume total da reação à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), utilizando-se o tampão TAE 1X. O gel possuía BET (0,5 µg/ml). Após a corrida o gel foi retirado da cuba de eletroforese, e a banda a ser eluída, localizada sob UV. Com um bisturi foi feita uma incisão no gel, cerca de 3 mm à frente e atrás das bandas referentes ao fragmento isolado. Com a ajuda de pinças inseriu-se nas incisões pedaços de papel DE81 (Whatman) de tamanho adequado, até que o mesmo tocasse o suporte onde estava o gel. O gel de agarose foi recolocado na cuba e continuou-se a eletroforese até que todo o DNA do inserto migrasse para o papel DE81 localizado à sua frente. O papel posicionado atrás da banda serviu como uma barreira, para que nada além do fragmento isolado migrasse para o papel onde está o inserto. O papel foi cuidadosamente removido, com ajuda de uma pinça, e transferido para um microtubo com 800 µl de tampão de eluição (Tris-HCl pH 8,0 20 mM; EDTA 2 mM; NaCl 1,5 M), por 1 h à 45°C. O papel foi retirado do tampão e

este foi centrifugado por 30 s a 10.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo tendo sido tomado o cuidado de não transferir qualquer impureza. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol gelado e incubado à -20°C durante a noite. Após este período, a solução foi centrifugada por 20 min a 10.000 rpm, o precipitado lavado com 500 µl de etanol 70%, sendo novamente centrifugado por 20 min a 10.000 rpm. O precipitado foi liofilizado por 5 min e ressuspendido em 20 µl de TE. A concentração do inserto isolado foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), tendo como parâmetros de concentrações, 100 ng de fragmentos de ϕ X174 e λ digeridos respectivamente por *Hae*III e *Hind*III, corridos no mesmo gel.

5.4. Preparo do DNA Genômico

As metodologias utilizadas na extração do DNA, digestão e análise do polimorfismo de restrição foram aquelas descritas no manual do Laboratório de Genética Molecular Aplicada do CIMMYT, (Hoisington, D., Khairallah, M., González-de-León, D. 1994. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT), com pequenas modificações.

5.4.1. Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de 300 mg de tecido foliar liofilizado e moído. O pó foi pesado em tubos plásticos de 15 ml onde foram adicionados 9 ml do tampão de extração CTAB (Tris-HCl pH 7,5 100 mM; NaCl 700 mM; EDTA pH 8,0 50 mM;

βMercaptoetanol 140 mM; CTAB 1%). A mistura permaneceu por 1 h em banho-maria à 65°C sob agitação lenta. Após este período, 4,5 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foram adicionados e misturados cuidadosamente. O material foi centrifugado por 10 min a 2500 rpm, sendo a parte aquosa removida para outro tubo contendo 4,5 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após a mistura, nova centrifugação foi realizada por 10 min a 2500 rpm. A parte aquosa foi removida para novo tubo. Neste, foram adicionados 25 µl de RNase (10 µg/µl) e o material foi mantido à temperatura ambiente por 2 h. Em seguida, foram adicionados 6 ml de isopropanol, e a solução foi invertida cuidadosamente várias vezes até o surgimento de um "novelo" de DNA. Este "novelo" foi recuperado com um gancho de vidro e lavado em 2 ml da solução Wash1 (etanol 76%; acetato de sódio 0,2M) por 20 min. Após este período, o "novelo" de DNA foi retirado desta primeira solução, banhado rapidamente em 2 ml da solução Wash2 (etanol 76%; acetato de amônia 10 mM), ressuspensionado em 1 ml de TE e quantificado em espectrofotômetro. A concentração estimada em espectrofotômetro foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), preparado em TAE 1X, tendo como parâmetros de concentrações, amostras de DNA de fago λ, em concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200 ng corridas no mesmo gel.

5.4.2. Digestão

O DNA extraído foi digerido com quatro enzimas de restrição: *EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII* e *BamHI*. As reações foram preparadas com 15 µg de DNA, 30 µl do tampão da enzima (10x); 7,5 µl de espermidina (0,1 M); 6 U de enzima de restrição (10

U/μl), e água esterilizada para completar o volume para 300 μl. A reação foi incubada à temperatura de 37°C durante a noite. Precipitou-se o DNA adicionando-se 30 μl de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 900 μl de etanol absoluto, por 2 h à -70°C. Centrifugou-se por 15 min a 10.000 rpm. O precipitado foi lavado com etanol 70%, novamente centrifugado por 10 min a 10.000 rpm, liofilizado por 5 min e ressuspendido em 30 μl de TE.

5.4.3. Preparo do Gel

Foram utilizados géis de agarose 0.8% (p/v), preparados em tampão TAE 1X. As amostras de DNA (15 μg) digeridas e os marcadores de pesos moleculares ϕ x/*Hae*III- λ /*Hind*III foram aplicados. A eletroforese foi efetuada a 20V por aproximadamente 18 h. Em seguida o gel foi corado em banho com BET (0,5 μg/ml) por 20 min, descorado em água destilada e fotografado com câmera Polaroid sob UV. Colocou-se uma régua fluorescente no momento de efetuar-se a fotografia para que, posteriormente, fosse possível calcular o tamanho dos fragmentos reconhecidos pela sonda (quando necessário).

5.5. Hibridizações

Foram utilizadas duas metodologias para hibridização: hibridização radioativa e hibridização “a frio”, ou seja, não radioativa. A escolha de um ou outro

método baseou-se na disponibilidade de reagentes e no tamanho do fragmento a ser marcado. Sempre que possível foi dada preferência à hibridização não radioativa.

5.5.1. Hibridização Radioativa

5.5.1.1. Transferência do DNA

O DNA contido no gel foi transferido para membrana de Nylon (Hybond-N⁺ da Amershan). Inicialmente o gel foi tratado com uma solução de depuração (HCl 0,25 M) por 15 min, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Em seguida ele foi lavado em água destilada e transferido para uma solução de desnaturação (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) por 30 min. A transferência utilizada foi do tipo neutra. Após a desnaturação, o gel foi lavado em água destilada, sendo posteriormente neutralizado por 30 min, em uma solução de neutralização (NaCl 1,5 M; Tris-HCl pH 7,5 1 M). O volume das soluções de depuração, desnaturação e neutralização foi sempre três vezes superior ao volume do gel a ser transferido.

Para a transferência colocou-se uma plataforma sobre um reservatório preenchido com aproximadamente 1 litro de solução de transferência (SSC 10X). Sobre a plataforma foram depositadas 3 folhas de papel Whatman 3MM, um pouco mais largas que o gel, e de comprimento suficiente para que as extremidades do papel ficassem em contato com a solução de transferência, formando uma ponte. O gel foi invertido e posicionado sobre esta ponte. A membrana de nylon, pouco maior que o gel foi depositada sobre ele. Sobre a membrana foram colocadas outras três folhas de papel

Whatman 3MM, do mesmo tamanho da membrana e, sobre estas, colocou-se uma pilha de papel de germinação, com aproximadamente 7 cm de altura, contendo as mesmas dimensões do gel. Sobre a pilha de papel foi colocada uma placa de acrílico e sobre esta, um peso de aproximadamente 800 g. A transferência procedeu-se por 18 a 20 h. Após este período, o sistema foi desmontado, a membrana retirada e lavada em SSC 2X para eliminação de vestígios de agarose, seca à temperatura ambiente, fixada à 80°C por 2 h e guardada à 4°C em um envelope feito com papel de germinação.

5.5.1.2. Marcação das sondas

O método empregado na marcação das sondas foi o de "Random-Primer" (Feinberg e Volgstein, 1983), empregando-se a incorporação, no fragmento de DNA, de nucleotídeos marcados radioativamente. Foi utilizado o "kit" de marcação Megaprime da Amersham. A reação de marcação consiste na polimerização do DNA por ação do fragmento Klenow da DNA polimerase I a partir de "primers" aleatórios. A reação foi efetuada em um volume final de 50 µl: adicionou-se a um microtubo 25-50 ng de DNA, água suficiente para completar 21 µl e 5 µl da solução de "primers". Esta mistura foi aquecida à 100°C por 10 min para a desnaturação do DNA. Após a desnaturação, foram adicionados 4 µl de cada um dos 3 dNTPs não marcados, 5 µl do tampão da reação, 2 µl da enzima e 5 µl do dNTP marcado radioativamente (α -³²P[dNTP] - 10 mCi/ml). A reação foi incubada por 1 h à 37°C. Ao final deste tempo foram adicionados 5 µl de EDTA pH 8,0 0,2 M.

5.5.1.3. Separação dos nucleotídeos não incorporados

As moléculas de DNA marcadas com α - ^{32}P foram separadas dos nucleotídeos radioativos não incorporados, pela passagem da reação através de uma coluna de Sephadex G-50, equilibrada em tampão STE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 1 mM; NaCl 0,1 M).

Esta coluna foi construída da seguinte forma: em uma seringa de 1 ml (sem êmbolo e agulha), compactou-se uma pequena quantidade de lã de vidro siliconizada, de forma que fosse obstruído o orifício de conexão com a agulha. Em seguida, a seringa foi preenchida com a resina Sephadex G50 (preparada em tampão STE), sendo esta compactada através de sucessivas centrifugações. Quando o volume da resina compactada atingiu a marca de 0,7 ml, a minicoluna foi colocada em um tubo de polipropileno de 15 ml contendo, no fundo, um microtubo sem tampa. Aplicou-se, sobre a coluna, o volume da reação de marcação acrescido de 50 μl de tampão STE e centrifugou-se o conjunto por 2 min a 5.000 rpm. Após a centrifugação, os nucleotídeos não incorporados ficaram retidos na coluna e a sonda foi recuperada no microtubo.

5.5.1.4. Medida da incorporação da radioatividade

Em dois pedaços de papel DE81 (1 cm^2) colocou-se 1 μl da reação de marcação antes e depois de passar na coluna. Após secarem, os papéis foram colocados separadamente em frascos de vidro no suporte apropriado do cintilador. Efetuou-se a leitura em Cherenkov (leitura de P^{32} no canal de tritium). A amostra que não passou pela

coluna indicou a radiotividade total na reação e a amostra que passou pela coluna, indicou a radioatividade incorporada na sonda. A sonda marcada foi utilizada quando apresentou um mínimo de 50% de incorporação de radioatividade.

5.5.1.5. Hibridização

1º) **Pré-hibridização:** as membranas foram enroladas, com auxílio de um bastão de vidro, e acondicionadas em tubos de hibridização contendo a solução de pré-hibridização (Formamida 50%; SSC 5X; Tris-HCl pH 7,5 20 mM; Denhardt's solution 10X; SDS 1%; DNA de esperma de salmão 100 µg/ml). Para membranas de 5 x 20 cm utilizou-se 10 ml de solução e para aquelas de 20 x 25 cm, utilizou-se 30 ml. Incubou-se por 18 h à 42°C em forno de hibridização

2º) **Hibridização:** substituiu-se a solução de pré-hibridização pela de hibridização (Formamida 50%; SSC 5X; Tris-HCl pH 7,5 20 mM; Denhardt's 2X; SDS 1%; sulfato de dextran 5%; DNA de esperma de salmão 100 µg/ml). Utilizou-se 5 ml de meio para membranas de 5 x 20 cm e 15 ml para membranas de 20 x 25 cm. Adicionou-se ao tubo a sonda marcada, previamente desnaturada por 5 min à 100°C. Incubou-se por aproximadamente 18 h, à 42°C em forno de hibridização. Quando o meio de hibridização contendo a sonda foi reutilizado, a desnaturação da sonda foi efetuada aquecendo-se o meio por 30 min à 70°C.

3º) **Lavagens:** após a hibridização, as membranas foram retiradas dos tubos e colocadas em recipientes de plástico, contendo um volume de solução de lavagem suficiente para encobri-las. A solução de hibridização foi transferida para tubos de

polipropileno de 50 ml e armazenada à -20°C. As membranas foram lavadas sob agitação lenta, nas seguintes condições:

- a) Baixa estringência: duas lavagens de 15 min com SSC 2X, SDS 0,1%, à temperatura ambiente.
- b) Alta estringência: duas lavagens de 30 min com SSC 0,1X, SDS 0,1%, à 55-60°C.

5.5.1.6. Auto-radiografia

Após a lavagem, as membranas foram envolvidas em filme plástico e expostas a filmes XAR5X-Kodak, em cassetes com tela intensificadora de sinal. Os cassetes foram armazenados à -70°C por um período que variou de 3 a 14 dias.

Os filmes XAR5X-Kodak foram revelados em sala escura procedendo-se da seguinte maneira: os filmes fixos em suportes de metal foram dispostos por 3 min em revelador GBX, lavados em água corrente por 30 s, fixados em fixador GBX por 5 min e lavados abundantemente em água corrente para retirar o fixador. Após secagem, os filmes foram devidamente identificados.

5.5.1.7. Remoção da sonda

Após a revelação as membranas foram cuidadosamente retiradas dos plásticos, colocadas em uma solução de NaOH 0,4 N à 45°C por 30 min e neutralizadas em solução de SSC 0,1X, SDS 0,1%, Tris-HCl pH 7,5 0,2 M, por 15 min à 45°C. Em seguida, a membrana foi guardada à -20°C envolvida em filme plástico.

5.5.2. Hibridização não radioativa

5.5.2.1. Transferência do DNA

Procedeu-se da maneira como explicado no item 5.5.1.1, tendo sido utilizadas as seguintes soluções: desnaturação (NaOH 0,4 N; NaCl 0,6 N); neutralização (NaCl 1,5 M; Tris-HCl pH 7,5 0,5M); transferência (NaPO₄ pH 6,5 25mM). A transferência foi realizada em membrana de nylon (MSI Magnagraph Cat. Nº NJ4HYAD010). Após a transferência, a membrana foi lavada em SSC 2X e fixada à 95°C por 2 h.

5.5.2.2. Marcação de sondas com digoxigenina-dUTP

O método empregado na marcação de sondas com digoxigenina-dUTP foi a amplificação do inserto por PCR. As reações, cada uma com volume final de 100 µl, foram preparadas em um recipiente de gelo. Para cada reação foram utilizados: 63,6 µl de

água Milli-Q autoclavada; 10 µl de tampão 10X para a enzima *Taq* Polimerase (GIBCO-BRL); 4 µl de $MgCl_2$ 50 mM; 1,5 µl do “mix” de dNTPs (dCTP, dATP, dGTP a 10 mM cada); 0,48 µl de dTTP (10 mM); 0,125 µl de dig-dUTP (1 mM); 0,4 µl de enzima *Taq* Polimerase (5U/µl); 10 µl de “primer” 1 (CV72 - 7,5 ng/µl); 10 µl de “primer” 2 (CV76 - 7,5 ng/µl) e 1 µl do clone glicerolado contendo o inserto a ser amplificado. Os primers 1 e 2 correspondem àqueles indicados por Hoisington *et al.* (1994), para amplificação de insertos a partir de plasmídeos derivados de pUC.

Para facilitar o trabalho, todos os componentes, exceto o DNA, tiveram suas quantidades calculadas e misturadas de acordo com o número de reações requeridas, constituindo assim um “mix”. Posteriormente, este “mix” foi aliquotado em microtubos estéreis de 0,6 µl, previamente identificados. O DNA, correspondente a cada um dos microtubos identificados foi então adicionado. Cada microtubo recebeu 2 gotas de óleo mineral antes de ser colocado no termociclador.

Os tubos foram colocados no termociclador (Perkin Elmer-Cetus), e os insertos foram amplificados através do seguinte programa: 1 ciclo inicial de desnaturação à 94°C por 2 min e 30 s; 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 2 min, 72°C por 3 min; 1 ciclo de 72°C por 4 min para a extensão final da fita de DNA.

5.5.2.3. Verificação da incorporação de dig-dUTP e quantificação das sondas

As reações foram então retiradas do termociclador e receberam, cada uma, 50 µl de TE e 50 µl de clorofórmio para a retirada do óleo. Tudo foi misturado e centrifugado. Após a centrifugação o sobrenadante foi recuperado, colocado em um tubo

limpo e conservado à -20°C. O produto amplificado foi verificado e quantificado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), preparado em TAE 1X, tendo como parâmetro de concentração, 100 ng de fragmentos de ϕ X174 e λ digeridos respectivamente por *Hae*III e *Hind*III, corridos no mesmo gel. O gel migrou por 1 h à 80 V, foi corado em solução de BET (0,5 μ g/ml), descorado em água destilada e fotografado sob UV.

A incorporação de dig-dUTP foi verificada através de desnaturação, neutralização e transferência do gel, seguida de detecção com anti-dig e CSPD.

5.5.2.4. Hibridização

1º) **Pré-hibridização:** as membranas foram incubadas por 4 h à 65°C em forno de hibridização, em uma cuba contendo um volume de solução de pré-hibridização [SSC 5X, Laurylsarcosine 0,01%, SDS 0,02%, reagente bloqueador (Boehringer Mannheim) 0,2%] suficiente para encobrir as membranas.

2º) **Hibridização:** As membranas molhadas com solução de hibridização (mesma composição da solução de pré-hibridização) foram enroladas, com auxílio de um bastão de vidro, e colocadas em tubos de hibridização. Elas foram enroladas no mesmo sentido de rotação dos tubos de hibridização e evitou-se a formação de bolhas de ar entre elas e a parede do tubo. Foram adicionados 5 ml ou 15 ml de solução de hibridização por tubo, dependendo do tamanho da membrana.

A sonda marcada foi previamente desnaturada à 95°C por 10 min, e adicionada ao meio de hibridização. Se a sonda estivesse sendo reutilizada, permaneceria à 95°C por 20 min para sua desnaturação. A quantidade de sonda marcada variou de

acordo com o número de vezes que, tanto a membrana quanto a solução de hibridização foram utilizadas. Para a primeira hibridização, a quantidade de sonda utilizada foi de 100 ng/ml. A cada reutilização da membrana ou da solução de hibridização a concentração de sonda foi acrescida em 50 ng/ml. A hibridização foi efetuada por cerca de 18 h à 65°C.

3º) **Lavagens:** após a hibridização, as membranas foram retiradas dos tubos e colocadas em cubas, contendo um volume de solução suficiente para encobri-las. A solução de hibridização foi transferida para tubos de polipropileno de 15 ml e armazenada à -20°C podendo ser reutilizada mais duas vezes. As membranas foram lavadas sob agitação lenta nas seguintes condições:

SSC 0,15X; SDS 0,1%	05 min	T.A.	2 vezes
SSC 0,15X; SDS 0,1%	15 min	65°C	2 vezes
Tampão 1	01 min	T.A.	1 vez
Tampão 2	30 min	T.A.	1 vez
Tampão 2 + anti-Dig (1 µl/15 ml)	30 min	T.A.	1 vez
Tampão 2	10 min	T.A.	3 vezes
Tampão 1	10 min	T.A.	3 vezes
Tampão 3	05 min	T.A.	1 vez

Após a lavagem no Tampão 3, as membranas foram colocadas sobre uma folha de papel absorvente para a retirada do excesso de solução. Uma a uma elas foram dispostas sobre um plástico fino, esticado sobre a bancada. As membranas foram umedecidas com Tampão 3 contendo CSPD (5 µl CSPD/ml). Outra folha plástica foi

colocada sobre a membrana, a solução foi espalhada homogeneamente por toda a superfície da membrana e o seu excesso foi retirado. O plástico foi selado e acondicionado em um cassete de vinil devidamente numerado.

Composição das soluções utilizadas na revelação.

Tampão 1	Tris-HCl pH 7,5 0,01 M; NaCl 0,15 M
Tampão 2	Tris-HCl pH 7,5 0,01 M; NaCl 0,15 M; Bloqueador (Boehringer Mannheim) 0,1%
Tampão 3	Tris-HCl pH 9,5 0,01 M; NaCl 0,10 M; MgCl ₂ 0,05 M
Tampão 2 + Anti-dig	1 µl de Anti-digoxigenina-AP (Boehringer Mannheim - 150 U/200 µl) em 15 ml de Tampão 2
Tampão 3 + CSPD	5 µl de CSPD (Tropix - 25 mM) por ml de Tampão 3

5.5.2.5. Auto-radiografia.

Sobre as membranas foram colocados filmes XAR5X-Kodak. Os cassetes, de acordo com a sua numeração, foram dispostos em uma pilha que recebeu placas de

acrílico em suas extremidades superior e inferior. Este conjunto foi fixado com grampos laterais, evitando-se assim dobras ou curvaturas. O conjunto foi colocado na estufa à 37°C onde permaneceu por 12 a 18 h.

Os filmes XAR5X-Kodak foram revelados como descrito no item 5.5.1.6. As membranas foram cuidadosamente retiradas dos plásticos e colocadas em uma solução de SSC 2X.

5.5.2.6. Remoção da sonda

As membranas foram colocadas em uma cuba com uma solução de SSC 0,1X e SDS 0,1%. Utilizou-se um volume de solução suficiente para que todas as membranas pudessem flutuar livremente no recipiente. O recipiente foi colocado em estufa à 65°C, permanecendo nela até a solução alcançar 60-65°C. Em seguida as membranas foram transferidas para outra cuba contendo a mesma solução e volume, à 90-95°C. O recipiente foi colocado em estufa à 100°C por 10 min. Após as lavagens, as membranas foram ou colocadas em uma solução de SSC 2X ou secas e acondicionadas em sacos plásticos selados. Em ambos os casos elas foram armazenadas à 4°C. Quando colocadas em solução de SSC 2X, elas aí permaneceram por três dias no máximo, sendo reutilizadas em seguida.

5.6. Análise de polimorfismo

As sondas foram avaliadas quanto a presença ou ausência de polimorfismo entre os parentais e “bulks” tolerante e sensível. Para tanto, foram feitas membranas com o DNA das linhagens parentais (Cat-100-6 e S1587-17), do F1 e dos “bulks” tolerante e sensível. Estas 5 amostras de DNA constituíram um conjunto para análise do polimorfismo. Cada membrana apresentava quatro destes conjuntos, sendo cada um digerido por uma enzima de restrição diferente: *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, e *Hind*III. Foram feitas várias destas membranas, as quais receberam o nome de “membranas-teste”.

As membranas-teste foram hibridizadas com as sondas escolhidas. A cada hibridização foram anotadas as seguintes informações (sempre considerando-se as 4 digestões): 1) presença/ausência de polimorfismo entre os parentais; 2) presença/ausência de polimorfismo entre os “bulks”; 3) no caso de “bulks” polimórficos, foi observado se os “bulks” tolerante e sensível apresentavam os mesmos alelos presentes, respectivamente, nos parentais tolerante e sensível; 4) a melhor combinação sonda/enzima, capaz de revelar o polimorfismo existente entre os parentais e, quando presente, entre os “bulks”.

5.6.1. Seleção de indivíduos para confecção das membranas F2

Cinquenta e seis plantas da população F2, foram utilizadas para a extração de DNA e posterior confecção das membranas-F2. Estas plantas tiveram seus fenótipos tolerante ou sensível ao Al, confirmados através dos resultados de suas progênies F3. Não foram utilizadas plantas cujo fenótipo não era conhecido, que possuíam pequena

quantidade de sementes F3 para testes, ou pouco material vegetal liofilizado para extração de DNA.

5.6.2. Seleção de sondas para hibridização com as membranas F2

As sondas a serem hibridizadas com as membranas-F2, foram escolhidas a partir dos resultados obtidos nas hibridizações com as membranas-teste. Foram escolhidas sondas que revelaram polimorfismo, entre as linhagens parentais e entre os “bulks” tolerante e sensível com pelo menos uma enzima de restrição. Também foram selecionadas sondas que mostraram polimorfismo entre os pais e apenas um dos “bulks”.

5.6.3. Análise de segregação

Foram analisados 56 indivíduos da população F2 quanto à segregação dos alelos dos marcadores selecionados. Os resultados da segregação dos alelos de cada marcador foram inicialmente avaliados pelo teste de χ^2 para verificar se os genótipos segregavam mendelianamente, na proporção 1:2:1, esperada para marcadores codominantes na população F2. Posteriormente, estes resultados foram preparados para serem processados pelo programa MAPMAKER (Lander *et al.*, 1987). Além dos resultados das membranas, a classificação de cada indivíduo F2, baseada nos resultados das análises das sementes F3 nos testes em solução com Al, também foi anexada aos dados de entrada com o nome de “loco-Al”.

A análise de ligação e a construção de mapas foram feitas através do programa MAPMAKER (Lander *et al.*, 1987) versão 2.0. Os locos RFLP foram primeiro agrupados em grupos de ligação através de análises de dois pontos utilizando-se um “LOD score” mínimo de 3,0 e uma frequência máxima de recombinação de 40%. Uma combinação das análises de três pontos e multipontos foi aplicada para encontrar a ordem mais provável dos locos dentro de cada grupo. Finalmente, as frequências de recombinação foram transformadas em centimorgans usando a função de Haldane (1919). Um roteiro passo a passo das análises efetuadas pelo MAPMAKER encontra-se descrito nos **Anexos V e VI**.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação fenotípica das plântulas à tolerância ao Al

A alteração da morfologia da ponta da raiz principal, devido à destruição do meristema apical pelo Al, foi o parâmetro adotado nos testes com as sementes F2. Das 300 sementes F2 germinadas, 181 plântulas foram classificadas como tolerantes, 52 como sensíveis e 48 foram classificadas em uma categoria intermediária. Dezenove indivíduos F2 não foram analisados porque as sementes não germinaram ou as plântulas tiveram a raiz principal danificada.

Cento e setenta e três plântulas foram transferidas para o campo na seguinte proporção: 118 tolerantes, 33 sensíveis e 22 indeterminadas. Este número foi definido em função das plântulas que sobreviveram ao primeiro transplante em vasos. Cada planta no campo foi identificada e autofecundada para a obtenção da geração F3. Destas 173 plantas transplantadas para o campo, foram coletadas folhas de somente 118 pois muitas plantas morreram ou foram descartadas por apresentarem sinais de doenças causadas por fungos ou vírus. O rendimento de material liofilizado e moído foi de aproximadamente 2g de tecido em média.

As sementes F3 obtidas foram utilizadas nos testes de progênie para a confirmação do fenótipo das plantas F2. Das 173 plantas F2 que foram para o campo, 97 produziram sementes suficientes para testes de tolerância ao Al. Deste total, 57 foram confirmadas como tolerantes, 14 como sensíveis e 26 permaneceram não definidas pois as

avaliações entre os testes não coincidiam. Os resultados dos testes de Al com as sementes F3 estão listados no **Anexo I**.

6.2. Seleção de sondas através dos resultados com as membranas-teste

Quando nada se conhece a respeito da localização cromossômica do caráter a ser mapeado, a estratégia de mapeamento por marcadores moleculares possui basicamente, quatro etapas: 1^a) a escolha de um conjunto de marcadores moleculares distanciados um do outro de 20 a 30 cM para permitir a análise de todo o genoma e detectar ligação; 2^a) uma seleção da melhor combinação sonda/enzima que revele polimorfismo entre as linhagens parentais contrastantes; 3^a) selecionadas as melhores combinações sonda/enzima, as sondas são hibridizadas com membranas contendo o DNA da população segregante (RC ou F2 por exemplo) e os resultados analisados quanto ao padrão de segregação, na busca de marcadores que cossegrem com o caráter; 4^a) caso algum marcador ligado ao caráter seja encontrado, outras sondas flanqueando este loco, são selecionadas para a confirmação da ligação (Beckmann & Soller, 1986; Beckmann, 1991).

A grande variabilidade detectável por marcadores do tipo RFLP entre diferentes linhagens de milho tornou possível a confecção de mapas de ligação saturados, com um grande número de marcadores dispersos ao acaso no genoma (Helentjaris *et al.*, 1985; Hoisington & Coe, 1990). Esta saturação no mapa, foi muito importante para o mapeamento do caráter de tolerância ao Al, pois permitiu a escolha de marcadores moleculares ao longo dos dez cromossomos do milho, a uma distância média de 20 cM

entre eles. Foram selecionados de 9 a 13 marcadores por cromossomo, totalizando 112 marcadores moleculares que foram utilizados como sondas, nas hibridizações da segunda etapa.

As sondas foram hibridizadas com membranas-teste contendo o DNA genômico da linhagem tolerante, da linhagem sensível, da geração F1 e dos “bulks” contrastantes digeridos com quatro enzimas diferentes. Estas hibridizações tiveram por objetivo, selecionar a melhor combinação sonda/enzima que fosse polimórfica entre os pais e entre os dois “bulks”.

Entre as combinações sonda/enzima que detectaram polimorfismo entre as linhagens Cat-100-6 e S1587-17, foram escolhidas 12 sondas, cujo polimorfismo repetiu-se ou entre os dois “bulks” contrastantes (**Figura 7**), ou em apenas um dos dois “bulks” (**Figura 8**). Estes resultados nos “bulks” contrastantes indicavam uma possível ligação da sonda com a característica de tolerância ao Al.

A presença do polimorfismo encontrado entre as linhagens parentais em apenas um dos dois “bulks”, em algumas hibridizações (**Figura 8**), deveu-se principalmente ao pequeno número de indivíduos utilizados na formação dos “bulks”. Entretanto, estes resultados foram considerados na escolha das sondas para a próxima etapa, quando seriam utilizadas as membranas-F2. Estas sondas foram também escolhidas pois imaginava-se que o polimorfismo evidenciado por elas poderia indicar ligação com a tolerância ao Al.

Os primeiros marcadores a serem utilizados para a seleção das combinações sonda/enzima polimórficas, foram os marcadores dos cromossomos 4 e 7. Nestes dois cromossomos foram mapeados os “clusters” de genes de zeínas de 22 kD

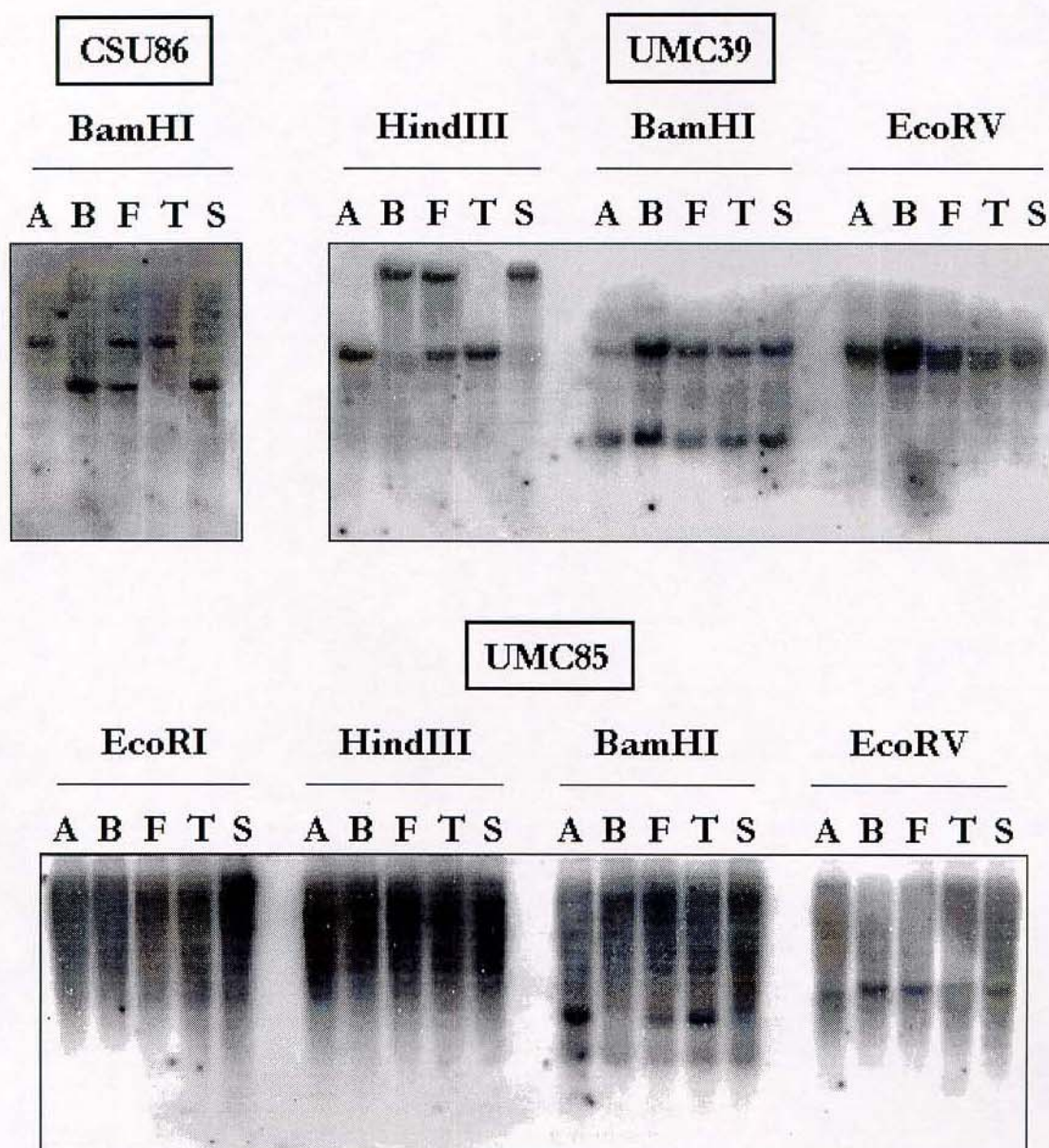


Figura 7. Auto-radiografias indicando o polimorfismo entre os “bulks” que possibilitou a seleção de sondas para a análise da população segregante. Três das combinações sonda/enzima representadas acima (CSU86/*Bam*HI, UMC39/*Hind*III, UMC85/*Hind*III) foram utilizadas nas hibridizações com as membranas F2. **A** - Cat-100-6, **B** - S1587-17, **F** - F1, **T** - “bulk” tolerante, **S** - “bulk” sensível.

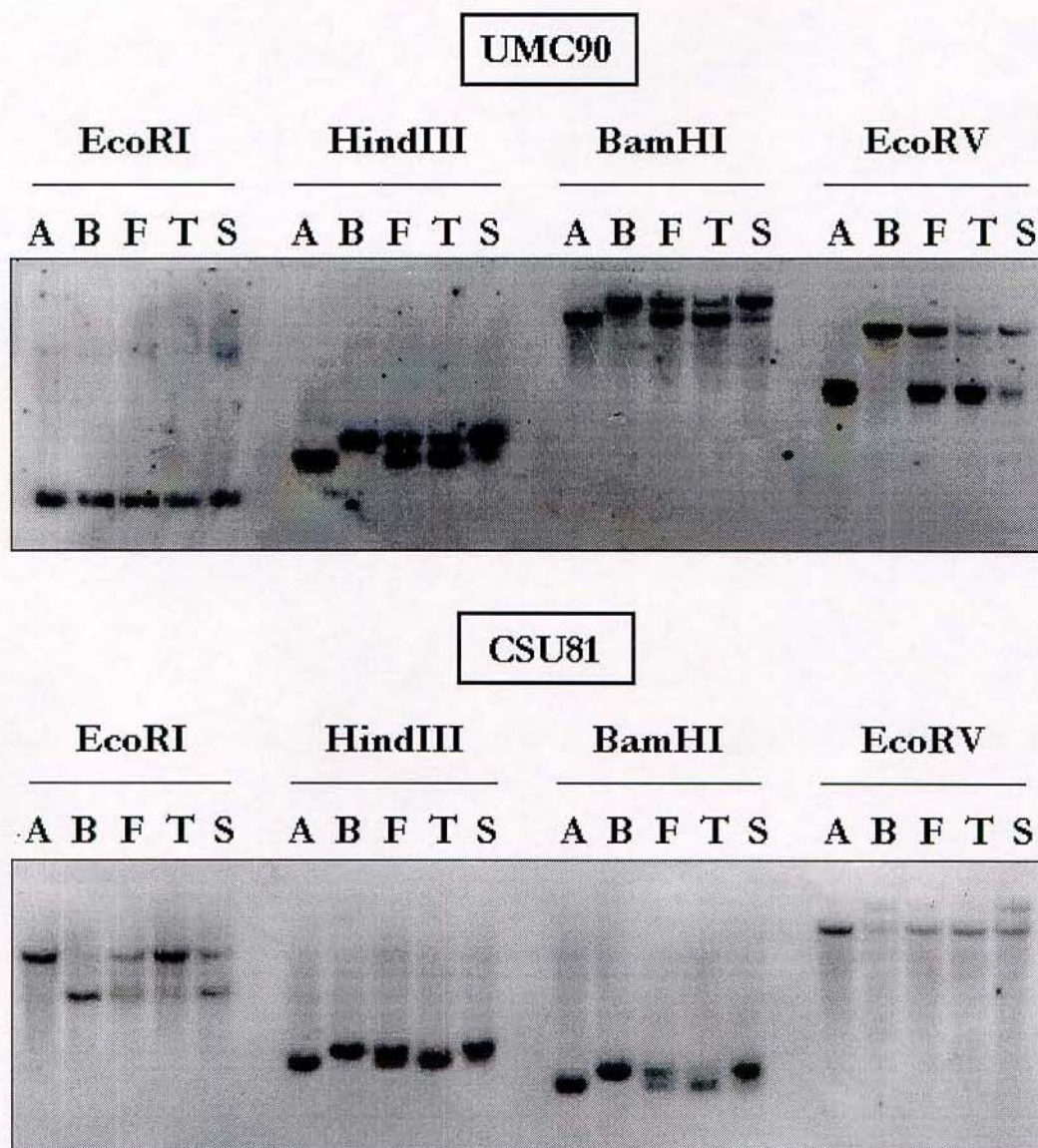


Figura 8. Auto-radiografias indicando polimorfismo apenas em “bulks” sensíveis (UMC90/*HindIII*), ou em “bulks” tolerantes (UMC90/*EcoRV*, CSU81/*EcoRI*). **A** - Cat-100-6, **B** - S1587-17, **F** - F1, **T** - “bulk” tolerante, **S** - “bulk” sensível.

(Soave & Salamini, 1984). Este tipo de proteína de reserva de milho estava alterada na linhagem S1587-17 (Gaspar, 1996), e havia a possibilidade de uma ligação entre a tolerância ao Al e a alteração das zeínas no somaclone que deu origem à linhagem S1587-17.

Seis sondas do cromossomo 4 e uma do cromossomo 7, utilizadas para a verificação da ligação do caráter de tolerância ao Al com as zeínas alteradas, não foram testadas com os “bulks” contrastantes. Constatado o polimorfismo entre as linhagens parentais, a sonda foi hibridizada com as membranas F2 para a análise de ligação. Embora 19 novas sondas tenham sido selecionadas para os cromossomos 4 e outras 16 sondas para o cromossomo 7, poucas revelaram-se polimórficas entre as linhagens parentais e destas novas sondas, somente 2 foram selecionadas para a hibridização com as membranas-F2. Os resultados de todas as hibridizações com as membranas-teste estão listados no **Anexo II**.

6.3. Análise dos resultados das hibridizações com as membranas-F2

No final da terceira etapa do mapeamento, tínhamos o resultado da hibridização de 21 sondas com membranas contendo o DNA da população F2. Somente as sondas UMC5 e UMC23 detectaram a presença de dois locos cada uma. Todas as demais sondas utilizadas apresentaram padrões de segregação simples, correspondendo a apenas um loco (**Figura 9**).

Cada hibridização com as membranas F2, permitia a análise de 56 indivíduos, número menor do que os 100 indivíduos indicados por Beckmam (1991) para

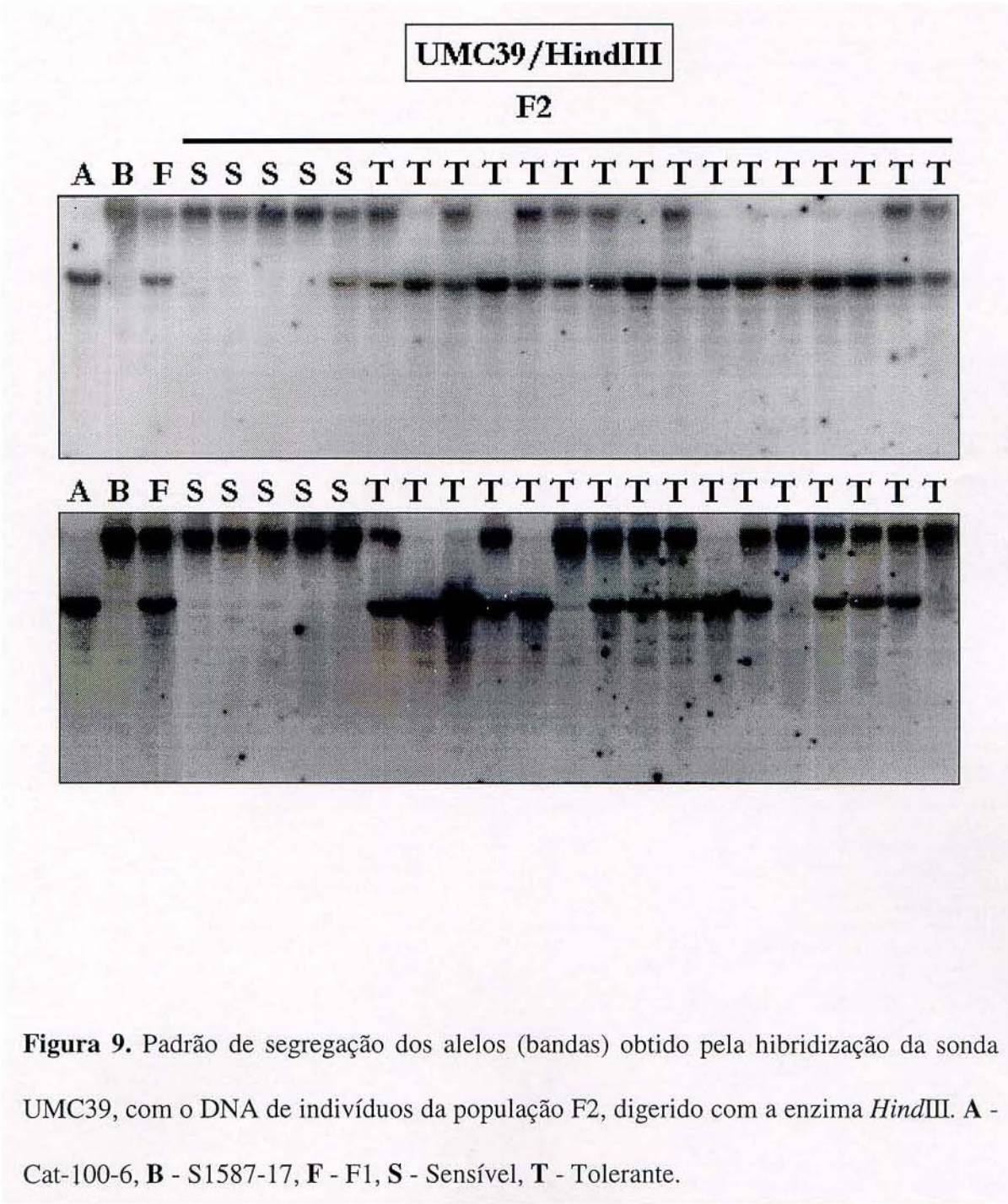


Figura 9. Padrão de segregação dos alelos (bandas) obtido pela hibridização da sonda UMC39, com o DNA de indivíduos da população F2, digerido com a enzima *HindIII*. **A** - Cat-100-6, **B** - S1587-17, **F** - F1, **S** - Sensível, **T** - Tolerante.

o mapeamento de um caráter monogênico, mas dentro da faixa de amostragem, entre 50 e 100 indivíduos, utilizada por vários autores, no mapeamento de características monogênicas em diversas espécies (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991; Mackill *et al.*, 1993; Timmerman *et al.*, 1993; Graner & Bauer, 1993; Hartl *et al.*, 1993; Clarke & Dean, 1994).

Antes que estes resultados pudessem ser analisados pelo programa MAPMAKER, os dados genotípicos dos locos estudados foram lidos (**Figura 10**), e a segregação mendeliana na proporção de 1:2:1, típica de um caráter monogênico codominante, foi verificada entre os alelos de cada loco, por testes χ^2 (**Anexo III**). Entre as 21 sondas testadas, somente três: BNL6.22, CSU81 e NPI220, não apresentaram a segregação esperada, não sendo utilizadas nas análises de ligação. Os mecanismos envolvidos nestes desvios de segregação ainda não estão bem definidos (Kahler & Wehrhahn, 1986; Edwards *et al.*, 1987). Desvios causados por mistura de sementes ou contaminações durante as autopolinizações do F1 são improváveis, pois todas as outras 16 sondas apresentaram a segregação esperada.

Após sua leitura e verificação, os resultados foram formatados de maneira que o MAPMAKER pudesse interpretá-los. Um arquivo tipo texto denominado MMDATA1 foi criado contendo, além dos resultados das hibridizações, informações importantes para o programa (**Anexo IV**).

Os resultados da análise do arquivo MMDATA1 pelo programa MAPMAKER descartaram a possibilidade da ligação do caráter de tolerância ao Al, com marcadores localizados na mesma região onde “clusters” de genes de zeínas de 22 kD foram mapeados, nos cromossomos 4 e 7. Estes resultados também mostraram a

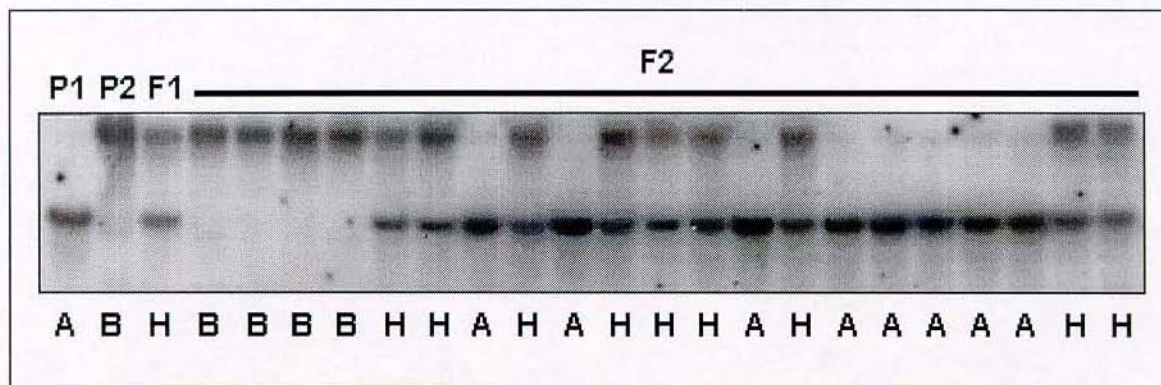


Figura 10. Exemplo da leitura de uma parte dos resultados obtidos com a sonda UMC39, utilizando uma membrana contendo DNA da população F2, digerido com a enzima *HindIII*. Para os dados genotípicos, os códigos padrão utilizados com populações F2 são: a letra “A” para indicar um indivíduo homozigoto para o alelo a neste loco (**P1**/Cat-100-6); a letra “B” para indicar um indivíduo homozigoto para o alelo b (**P2**/S1587-17), e a letra “H” indicando um indivíduo heterozigoto contendo ambos os alelos a e b (**F1**).

formação de vários grupos de ligação entre as sondas utilizadas. Entre eles, duas sondas: a UMC85 e a UMC130, localizadas nos cromossomos 6 e 10 respectivamente, formaram um grupo de ligação com o caráter de tolerância ao Al. Na verdade este grupo de ligação indicava a ligação de cada sonda com o “loco-Al” isoladamente, pois as duas sondas não estavam ligadas entre si.

Tal resultado indicou o mapeamento de dois locos distintos em dois cromossomos diferentes. Para a verificação desta ligação, foram escolhidas novas sondas, desta vez, flanqueando os locos mapeados pelas sondas UMC85 no cromossomo 6 e UMC130 no cromossomo 10. As sondas escolhidas no cromossomo 6 foram: CSU70, NPI223, NPI235, UMC39 e UMC55, e as sondas do cromossomo 10 foram: CSU86, NPI232, PHP20626 e UMC64. Após a leitura e verificação da segregação destas novas sondas, um novo arquivo de entrada de dados foi criado: o MMDATA2 (**Anexo IV**).

A listagem com todos os comandos utilizados durante a análise dos arquivos de entrada MMDATA1 e MMDATA2 pelo MAPMAKER, está descrita e comentada nos **Anexos V e VI**.

Desta segunda análise, dois grupos de ligação surgiram: o primeiro com 6 sondas e o segundo com 4 sondas. Observou-se também que os marcadores moleculares que compunham os dois grupos de ligação mostraram a ordem dos locos e as distâncias em cM entre si, semelhantes às publicadas por outros autores (Hoisington, 1986; Helentjaris, 1987; Coe, 1994, 1995, 1996). Este fato possibilitou localizar o grupo de ligação com 6 sondas no braço curto do cromossomo 6, próximo à região telomérica. O grupo de ligação com 4 sondas foi localizado no braço curto do cromossomo 10. Estas hibridizações confirmaram a ligação de marcadores dos cromossomos 6 e 10 com a

tolerância ao Al, além de indicar que o mapa construído com as linhagens Cat-100-6 e S1587-17 estava correto (**Figura 11**).

Os resultados totalizados na **Tabela 2** mostram a grande economia de tempo e trabalho que a adoção da técnica de BSA proporcionou. Mesmo com os problemas encontrados pelo pequeno número de indivíduos utilizados na formação dos “bulks”, o universo de escolhas entre as melhores combinações sonda/enzima polimórficas, diminuiu de um total de 269 combinações possíveis para 74 combinações nas quais o polimorfismo repetiu-se entre os dois “bulks” em 45 casos, com os “bulks” tolerantes em 14 casos e com os “bulks” sensíveis em 15 casos. As totalizações de resultados polimórficos por enzima, também confirmaram a eficiência das enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* e *EcoRV* na detecção de alto nível de polimorfismo nas análises de RFLP, principalmente com as enzimas *HindIII* e *EcoRV* (Evola *et al.*, 1986; Landry *et al.*, 1987a).

Das 158 sondas utilizadas, 103 apresentaram um padrão de hibridização simples. Onze sondas (10.6%) não revelaram polimorfismo com nenhuma das quatro enzimas utilizadas. Outras 11 sondas (10.6%) apresentaram polimorfismo com apenas uma das enzimas testadas, 23 sondas (22,3%) foram polimórficas com duas enzimas, 25 sondas (24,2%) com três enzimas e 33 sondas (32%) apresentaram polimorfismo com as quatro enzimas testadas. Do total de 103 sondas que produziram bons resultados nas hibridizações, 92 sondas (89,3%) detectaram polimorfismo entre os pais com pelo menos, uma das quatro enzimas testadas.

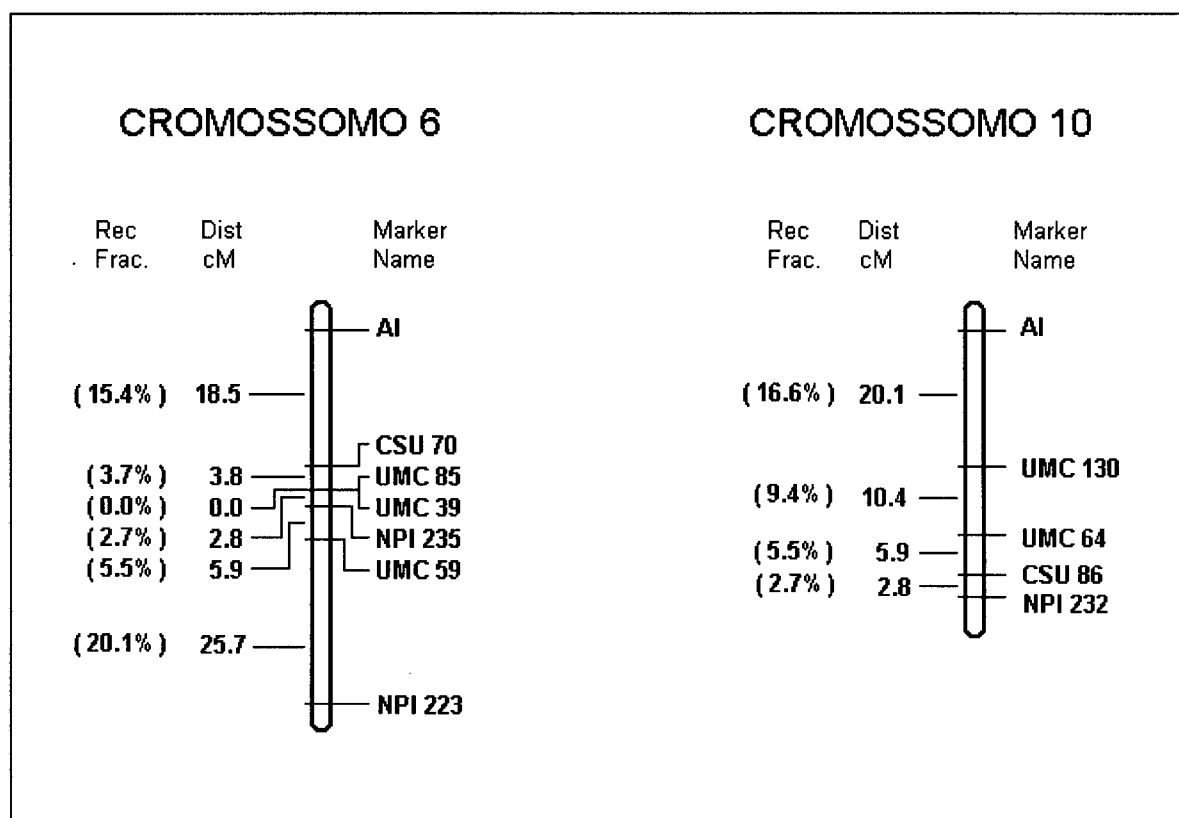


Figura 11. Mapas de ligação construídos a partir da segregação dos alelos dos marcadores em uma população constituída por 56 indivíduos F2. Os grupos de ligação foram determinados usando o programa MAPMAKER versão 2.0 em um computador Apple Macintosh. Os marcadores foram inicialmente agrupados pela análise de dois pontos e mapeados com a análise de três pontos e multipontos. Um “LOD score” mínimo de 3,0 e uma frequência de recombinação de 40% foram usados nas análises de ligação.

Parentais/ “bulks”	EcoRI	HindIII	BamHI	EcoRV	Totais
P/-	6	6	4	4	20
P/?	3	4	2	3	12
P/NP	40	41	34	48	163
P/P	7	17	11	10	45
P/P(BS)	4	4	3	4	15
P/P(BT)	4	1	5	4	14
Totais	64	73	59	73	269

Tabela 2. Resumo dos resultados das 269 combinações sonda/enzima polimórficas envolvendo 92 sondas e 4 enzimas de restrição. **P/-** - polimorfismo não testado com “bulks”; **P/?** - sem resultados nos “bulks” por problemas na leitura das membranas; **P/NP** - sondas polimórficas nas linhagens parentais mas não polimórficas entre os “bulks”; **P/P** - polimorfismo encontrado entre as linhagens parentais, repetiu-se nos “bulks”; **P/P(BT)** - polimorfismo encontrado nas linhagens parentais, repetiu-se apenas no “bulk” tolerante; **P/P(BS)** - polimorfismo encontrado nas linhagens parentais, repetiu-se apenas no “bulk” sensível.

7. DISCUSSÃO

Como a presença de Al é o principal fator limitante para o crescimento de plantas em condições de solos ácidos, uma atenção especial tem sido dada ao estudo genético da sua tolerância. Existe um grande número de espécies que apresentam considerável variabilidade na tolerância ao Al. Esta variabilidade é muito útil para os melhoristas pois é utilizada no desenvolvimento de cultivares tolerantes ao Al. Além disso a existência de genótipos contrastantes constitui-se em um excelente material para estudos da fisiologia e bioquímica da tolerância ao Al (Foy, 1976; Taylor, 1988a; Pandey & Gardner, 1992).

Existe grande variabilidade genética quanto a tolerância ao Al em milho. Isto possibilitaria a ocorrência de diferentes mecanismos de tolerância, em diferentes variedades ou raças. No entanto, as diferentes conclusões sobre o número de genes envolvidos com a tolerância ao Al, encontradas pelos autores que estudaram a herança do caráter (Rhue *et al.*, 1978; Garcia & Silva, 1979; Prioli AJ, 1987; Magnavaca, 1987; Sawazaki & Furlani, 1986; Miranda Filho *et al.*, 1996), devem-se provavelmente a interação de dois fatores: 1^º) diferentes genótipos analisados; 2^º) diferentes métodos e parâmetros fenotípicos adotados para a avaliação dos genótipos.

O primeiro passo para o estudo da herança de determinado caráter, é o desenvolvimento de populações onde ocorra a segregação no loco desejado. Muitas populações são possíveis, e a decisão quanto ao tipo que será utilizado está baseada no nível de resolução a que se quer chegar e na facilidade ou possibilidade de desenvolvê-la. Retrocruzamentos ou populações F2 são adequadas para estudos de herança e

relativamente fáceis de se produzir. No entanto, um cuidado deve ser tomado quanto à escolha das linhagens parentais. Quanto mais divergentes geneticamente forem estas linhagens, mais complexas poderão ser as interações gênicas e alélicas, que poderão influenciar na expressão dos genes.

Estudos genéticos efetuados por Prioli AJ (1987) envolvendo cruzamentos da linhagem tolerante Cat-100-6 (denominada pelo autor de L922) com outras linhagens sensíveis, sugeriram que a tolerância da linhagem Cat-100-6 ao Al seria condicionada por 1 a 3 locos dominantes. Moon *et al.*, (1997) analisando o cruzamentos entre as linhagens Cat-100-6 e S1587-17, as quais possuem um “background” genético semelhante, concluíram que a tolerância seria controlada por apenas um gene dominante.

É interessante notar que quando linhagens com “background” genéticos não muito divergentes entre si são utilizadas no estudo da herança da tolerância ao Al, o caráter parece ser determinado por um ou poucos genes. Assim, a utilização de progênies de autofecundação (S1) e progênies de irmãos germanos ($S_0 \times S_0$), desenvolvidas a partir das populações Piranão VD-2(A) e Piranão VF-1(B), levaram Miranda Filho *et al.* (1996) a concluir que a tolerância era devida ao efeito de um gene principal com ação gênica dominante. Linhagens quase isogênicas em trigo utilizadas por Delhaize *et al.* (1993a e 1993b) para o estudo da tolerância ao Al, indicaram que a tolerância ao íon nesta espécie seria conferida por um único gene de efeito dominante.

Entretanto, na comparação entre trabalhos envolvendo o estudo da herança do caráter tolerância ao Al, não apenas o genótipo utilizado deve ser considerado. Tanto o método de avaliação quanto o parâmetro fenotípico utilizado na classificação das plantas entre tolerantes e sensíveis, podem influenciar nos resultados obtidos.

Ainda que a presença de Al no solo seja considerada o principal fator limitante em solos ácidos, experimentos realizados a nível de campo, ou utilizando vasos com solo em casas de vegetação, indicam a resposta da planta em relação a vários fatores envolvidos com a acidez do solo, não somente com a tolerância ao Al. A herança quantitativa para o caráter que resulta da análise deste tipo de experimento, reflete portanto a resposta da planta a uma série de fatores ambientais relacionados com a acidez do solo como um todo (S. Pandey, comunicação pessoal).

Vários métodos de avaliação foram desenvolvidos para isolar e controlar todas as variáveis envolvidas durante o teste, com o objetivo de analisar a resposta específica da planta para a tolerância ao Al. Dentre estes métodos, o que mais se difundiu pela rapidez e eficiência foi a utilização da solução nutritiva. O estudo da herança de linhagens de milho, submetidas ao teste de Al em solução nutritiva, geralmente indicam a presença de um ou poucos genes envolvidos com a tolerância (Rhue *et al.*, 1978; Prioli AJ, 1987; S. Pandey, comunicação pessoal).

Porém, é importante notar que a utilização da solução nutritiva exige uma atenção especial em relação aos controles necessários durante o experimento. Camargo (1981) verificou que, dentro da mesma variedade de trigo, o número de locos responsáveis pela tolerância parece variar com a concentração de Al na solução nutritiva. Na concentração de 6 mg/l de Al, dois locos estariam atuando, com um alelo dominante para tolerância em cada um deles. No nível de 10 mg/l de Al a tolerância seria controlada pelo alelo dominante de apenas um dos locos.

No caso das linhagens Cat-100-6 e S1587-17, a concentração de 4,5 mg/l além de possibilitar uma clara discriminação entre plantas tolerantes, sensíveis, e do F1,

permitiu a transferência para o campo das plantas utilizadas no teste com Al, com alta porcentagem de sobrevivência. Concentrações de Al maiores do que 4,5 mg/l causavam graves lesões nas raízes de plantas sensíveis, impedindo seu desenvolvimento no campo. Acima de 8 mg/l as plantas apresentavam sintomas intermediários de tolerância/sensibilidade, dificultando sua classificação e produzindo padrões complexos de segregação. Abaixo de 2 mg/l de Al na solução, o efeito do Al se invertia, causando um estímulo ao crescimento das raízes tanto das linhagens parentais quanto do F1 (Moon *et al.*, 1997). Este crescimento estimulado por baixa concentração de Al ocorre em muitas espécies de plantas, mas seu mecanismo de ação ainda não está bem explicado (Foy *et al.*, 1978; Bennet *et al.*, 1987).

Mas não apenas a concentração de Al na solução nutritiva pode afetar a resposta das plântulas durante o teste de avaliação. Mudanças na temperatura, pH, e na concentração de nutrientes, podem levar a resultados completamente diferentes para um mesmo material (Camargo, 1981, 1983, 1984a, 1984b, 1984c, 1985).

A solução nutritiva empregada por Prioli AJ (1987) e utilizada neste estudo, foi a mesma apresentada por Furlani (1981) com pequenas modificações. Esta solução demonstrou ser eficiente na avaliação dos efeitos da toxidez do Al nas plântulas e segura quanto a possíveis variações na sua composição, devido ao seu balanço nitrato/amônia garantir a estabilidade do pH, sem a necessidade de correções diárias.

Ainda em relação ao método de avaliação, o parâmetro de avaliação fenotípica escolhido, também pode interferir nas análises dos resultados de plântulas submetidas ao teste de tolerância ao Al. O grande problema encontrado na utilização de

medidas de crescimento do sistema radicular como parâmetro de avaliação fenotípica, é a grande variabilidade inerente ao próprio parâmetro avaliado (Polle *et al.*, 1978).

Sendo o crescimento radicular um processo dependente de vários genes, e do vigor da semente, este parâmetro torna-se bastante sensível a variações ambientais. O efeito desta variação poderia ser diminuído aumentando-se o número de repetições ou tratamentos. Entretanto, esta necessidade muitas vezes limita a utilização do método. Uma alternativa à medição do comprimento da raiz seria sua avaliação visual.

No caso das linhagens Cat-100-6 e S1587-17, a drástica diferença entre elas, quanto ao efeito do Al na morfologia da ponta da raiz principal (**Figuras 3 e 4**), possibilitava uma distinção simples, rápida e efetiva entre plântulas tolerantes e sensíveis. Além disso, Moon *et al.* (1997) verificou que a avaliação visual da ponta da raiz principal entre as linhagens Cat-100-6 e S1587-17, foi equivalente às medições do comprimento da raiz principal para a distinção dos fenótipos tolerantes e sensíveis ao Al, quando a concentração de Al utilizada na solução era de 4,5 mg/l.

Garcia *et al.* (1979) utilizando vasos com areia, irrigados com solução nutritiva contendo Al, e Urrea-Gómez *et al.* (1996) utilizando vasos com solo, verificaram a mesma equivalência entre a análise visual e a medição do comprimento do sistema radicular, após a comparação entre vários parâmetros de avaliação quanto a tolerância ao Al.

Outra vantagem da avaliação visual da ponta da raiz principal, seria sua alta correlação com os resultados de tolerância ao Al obtidos em experimentação de campo (Urrea-Gómez *et al.*, 1996). Fato corroborado pelos resultados obtidos pelos melhoristas de milho da Empresa AGROCERES de Sementes S/A, que adotaram a

avaliação da ponta da raiz principal após crescimento das plântulas em solução nutritiva contendo Al tóxico, como metodologia para a identificação de plantas tolerantes e sensíveis ao Al (M. A. Guimarães, comunicação pessoal).

Entretanto, o mapeamento de dois locos envolvidos com a tolerância ao Al nas linhagens Cat-100-6 e S1587-17, mostrou que a classificação da tolerância ao Al como uma característica discreta, embora tenha se mostrado rápida e eficaz, não evidenciou a ação de outros genes que pudessem estar envolvidos na expressão do caráter, mas com efeito menor sobre ele.

A proporção de 3:1 tolerantes/sensível, esperada para a segregação de um caráter controlado por um gene dominante, não foi observada entre os 300 indivíduos da população F2 analisados. Houve dificuldade na classificação de 48 plantas que apresentavam um fenótipo intermediário entre tolerante e sensível, mesmo após reavaliação do fenótipo pelo tratamento da raiz com hematoxilina.

Desta forma, assumindo esta categoria intermediária como uma nova classe fenotípica, a frequência dos fenótipos observados entre os indivíduos F2 se aproximava de outra proporção mendeliana de 9:3:4 ($\chi^2 = 8,48$; $P = 0,05-0,01$; 2gl). A interação gênica responsável por este tipo de proporção fenotípica mendeliana é chamada **epistasia recessiva**. Nesta interação dífrida modificada, o alelo recessivo de um dos genes, na condição homozigota, mascara a expressão do outro gene. Assim, ao invés de um único gene dominante responsável pela tolerância ao Al, o caráter, de acordo com os resultados obtidos na população F2 à concentração de 4,5 mg/l de Al, seria controlado pela interação entre 2 genes. O genótipo de uma planta F2 tolerante poderia ser descrito

como **A-B-**, o genótipo intermediário seria representado por **A-bb**, e as plantas sensíveis, pelo efeito da epistasia recessiva, seriam ou **aaB-** ou **aabb**.

Os resultados obtidos nos testes de Al com as sementes F3 poderiam confirmar tal hipótese. Porém, durante os testes as plântulas foram classificadas em apenas duas classes fenotípicas, seguindo a metodologia estabelecida no início do trabalho. Plântulas apresentando um aspecto normal no desenvolvimento do ápice radicular, foram classificadas como tolerantes. Alterações na morfologia da ponta da raiz principal ou na coloração da raiz após tratamento com hematoxilina, foram consideradas como um sintoma de toxidez ao Al, e as plantas classificadas como sensíveis.

Assim, uma análise complementar das linhagens parentais e da geração F3 precisaria ser feita utilizando-se agora a medida de uma característica tipicamente quantitativa, como o comprimento relativo da raiz principal, associado ao aspecto morfológico da ponta da raiz. Deste modo, possíveis interações gênicas envolvidas no fenótipo da tolerância/sensibilidade poderiam ser esclarecidas.

8. CONCLUSÕES

- Dois locos ligados a tolerância ao Al foram mapeados na linhagem Cat-100-6. O primeiro, localizado próximo da região telomérica no cromossomo 6, e o segundo, no braço curto do cromossomo 10.

Além desta conclusão principal, várias conclusões metodológicas podem ser citadas:

- A decisão de se utilizar um grande número de sementes (300 sementes F2) no início do experimento mostrou ser acertada, pois garantiu um número suficiente de indivíduos para a confecção de membranas e análise de ligação, apesar das perdas constantes em cada fase do processo de análise.
- A utilização de material liofilizado e moído mostrou ser uma metodologia mais eficiente na extração do DNA do que o uso de material fresco.
- A melhor quantidade de DNA a ser transferida para as membranas foi de 15 µg. Esta quantidade possibilitou a reutilização das membranas por no mínimo 4 vezes, nas hibridizações com sonda “fria”.
- A técnica de “hibridização a frio”, utilizando sondas marcadas com digoxigenina, demonstrou ser mais rápida, segura e eficiente na obtenção dos

resultados das hibridizações nas nossas condições, do que a utilização de sondas marcadas radioativamente.

- O método de “Random Primer” não foi efetivo na marcação de sondas com digoxigenina. A grande quantidade de inserto isolado necessária para a reação, foi o principal problema na utilização desta técnica de marcação de sondas não radioativas.
- Mesmo sendo um processo mais demorado, o uso do espalhamento da solução constituída pelo Tampão 3 + CSPD sobre as membranas, ao invés do banho em uma cuba com tal solução, possibilitou uma importante economia do reagente.

9. PERSPECTIVAS

A utilização de uma característica discreta, para a classificação das plantas em tolerantes ou sensíveis ao Al, não evidenciou a ação de outros genes de efeito menor, que pudessem estar envolvidos na expressão da tolerância. Um estudo correlacionando os padrões de RFLP encontrados nas membranas-F2, com as medidas de um caráter quantitativo, como o comprimento relativo da raiz principal das progênes F3, poderia indicar o efeito de cada um dos locos mapeados com a tolerância ao Al.

Embora os locos relacionados com o caráter de tolerância ao Al tenham sido mapeados com vários marcadores nos dois cromossomos, a distância em cM entre estes marcadores e os locos mapeados ainda é grande. Outros marcadores localizados na mesma região dos locos responsáveis pela tolerância ao Al devem ser selecionados na busca de um marcador mais estreitamente ligado ao caráter.

Uma vez que estes marcadores RFLP estreitamente ligados aos locos mapeados forem identificados, os genes envolvidos com a tolerância ao Al poderiam ser isolados. Técnicas como “chromosome walking” poderiam ser empregadas para “mover-se” ao longo do cromossomo a partir do marcador RFLP até o gene de interesse. Com o gene clonado, outras plantas poderiam ser transformadas e estudos envolvendo a expressão e a atividade gênica poderiam ser realizados.

10. BIBLIOGRAFIA

Apuya NR, Frazier BL, Keim P, Roth EJ, Lark KG. 1988. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean (*Glycine max L*) merril. Theor Appl Genet 75:889-901.

Barua UM, Chalmers KJ, Hackett CA, Thomas WTB, Powell W, Waugh R. 1993. Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. Heredity 71:177-184.

Basu U, Godbold D, Taylor GJ. 1994. Aluminum Resistance in *Triticum aestivum* Associated with Enhanced Exudation of Malate. J Plant Physiol 144:747-753.

Beckmann JS, Soller M, 1983. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theor Appl Genet; 67:35-43.

Beckmann JS. 1991. Genomic genetics and plant genetic improvement. In Gene-mapping techniques and applications. Schook LB, Lewin HA, McLaren DG. Eds. Marcel Dekker, New York. pp. 201-229.

Beckmann JS, Soller M, 1986. Restriction fragment length polymorphism in plant genetic improvement. Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology 3:196-250.

Bennet RJ, Breen CM, Fey MV, 1987. The effects of Aluminum on root cap function and root development in *Zea mays* L. Env Exp Bot 27:91-104.

Bennet, RJ and Breen, CM, 1991. The aluminium signal: New dimension to mechanism of aluminium tolerance. Plant and Soil 134:153-166.

- Bernardo R. 1994. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids. *Crop Sci* 34:20-25.
- Bernatzky R, Tanksley SD. 1986. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112:887-898.
- Berzonsky WA. 1992. The genomic inheritance of aluminum tolerance in 'Atlas 66' wheat. *Genome* 35:689-693.
- Bonierbale MW, Plaisted RL, Tanksley SD. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120:1095-1103.
- Borlaug NE and Dowsell, CR, 1996. The Acid Lands: One of Agriculture's Last Frontiers. IV International Symposium on Plant-Soil Interactions at Low pH. Resumos/Palestra de abertura. Março 17-24, 1996. Belo Horizonte Minas Gerais - Brasil.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, e Davis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet*, 32:314-331.
- Boye-Goni SR, Marcarian V. 1985. Diallel analysis of aluminum tolerance in selected lines of grain sorghum. *Crop Sci*. 25:749-752.
- Burr B, Evola SV, Burr FA, Beckmann JS. 1983. The application of restriction fragment length polymorphism to plant breeding. In: *Genetic engineering: principles and methods*, Setlow JK, Hollaender A, eds. New York: Plenum Press, Vol 5, pp 45-59.
- Burr B, Burr FA, Thompson KH, Albertsen MC, Stuber CW, 1988. Gene mapping with recombinant inbreds in maize. *Genetics*, 118:519-526.

Camargo CEO. 1981. Melhoramento do trigo. I. Hereditariedade da tolerância ao alumínio tóxico. *Bragantia* 40:33-45.

Camargo CEO. 1983. Efeito da temperatura da solução nutritiva na tolerância ao Alumínio de cultivares de trigo. *Bragantia* 42:51-63.

Camargo CEO. 1984a. Melhoramento do trigo. VI. Hereditariedade da tolerância a três concentrações de alumínio em solução nutritiva. *Bragantia* 43(2):279-291.

Camargo CEO. 1984b. Tolerância de cultivares de arroz a dois níveis de alumínio em soluções nutritivas contendo diferentes concentrações de sais. *Bragantia*, 43(2):381-388.

Camargo CEO. 1984c. O pH das soluções nutritivas no comportamento de cultivares de trigo à toxicidade de alumínio. *Bragantia* 43(2):327-335.

Camargo CEO. 1985. Efeitos de níveis de cálcio combinados com diferentes concentrações de sais na tolerância de trigo à toxicidade de alumínio, em solução nutritiva. *Bragantia* 44(2):659-668.

Cambraia J, Cambraia MC. 1994. Avaliação de híbridos de milho quanto a tolerância ao Alumínio, em solução nutritiva. *Ceres* 42(241):297-307.

Chang C, Bowman JL, De John AW, Lander ES, 1988. Construction of a genetic linkage map in *Arabidopsis thaliana* using RFLP. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 85:6856-6860.

Chaudhuri S, Messing J. 1995. RFLP mapping of the maize *dzr1* locus, which regulates methionine-rich 10-kDa zein accumulation. *Mol Gen Genet* 246(6):707-715

Clarke JH, Dean C. 1994. Mapping *FRI*, a locus controlling flowering time and vernalization response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 242:81-89.

- Coe E. 1994. Mapping the maize genome - maize working maps. Maize Genet Coop Newsl, 68:247.
- Coe E. 1995. Mapping the maize genome - maize working maps. Maize Genet Coop Newsl, 69:258.
- Coe E. 1996. Mapping the maize genome - maize working maps. Maize Genet Coop Newsl, 70:199.
- Coté GG, Crain RC. 1993. Biochemistry of phosphoinositides. Annu Revv Plant Physiol Plant Mol Biol 44:333-356.
- Cowen NM, Johnson CD, Armstrong K, Miller M, Woosley A, Pescitelli S, Skokut M, Belmar S, Petolino JF. 1992. Mapping genes conditioning *in vitro* androgenesis in maize using RFLP analysis. Theor Appl Genet 84(5-6):720-724.
- Delhaize E, Ryan PR, 1995. Aluminum toxicity and tolerance in plants. Plant Physiol. 107:315-321.
- Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC, Randall PJ. 1993a. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Uptake and Distribution of Aluminum in Root Apices. Plant physiol 103:685-693.
- Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ. 1993b. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-Stimulated Excretion of Malic Acid from Root Apices. Plant Physiol 103:695-702.
- Delourme R, Bouchereau A, Hubert N, Renard M, Landry BS. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restores gene for the Ogura radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.) Theor Appl Genet 88:741-748.

Diers BW, Keim P, Fehr WR, Shoemaker RC. 1992. RFLP Analysis of Soybean Seed Protein and Oil Content. *Theor Appl Genet* 83(5):608-612.

Dudley JW. 1993. Molecular markers in plant improvement: Manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci* 33:660-668.

Edwards MD, Stuber CW, Wendel JF. 1987. Molecular-Marker-Facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116:113-125.

Evola SV, Burr FA, Burr B. 1986. The suitability of restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in maize. *Theor Appl Genet* 71:765-771.

Feinberg AP, Vogelstein B. 1983. A technique for radio-labeling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.

Ferreira ME, Grattapaglia D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª Ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. pp 220.

Foolad MR, Jones RA. 1993. Mapping salt-tolerance genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) using trait-based marker analysis. *Theor Appl Genet* 87(1/2):184-192.

Foy CD. 1976. Differential aluminum and manganese tolerance of plant species and varieties in acid soils. *Ciência e Cultura* 28:150-155.

Foy CD, Chaney RL and White MC, 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Rev. Plant Physiol.* 29, 511-566.

- Francis HA, Leitch AR, Koeber RMD. 1995. Conversion of a RAPD-generated PCR product, containing a novel dispersed repetitive element, into a fast and robust assay for the presence of rye chromatin in wheat. *Theor Appl Genet* 90(5):636-642.
- Furlani PR. 1981. Effects of aluminum on growth and mineral nutrition of sorghum genotypes. Lincoln, Ne, University of Nebraska, 136p. (Ph. D. Thesis).
- Garcia Jr O, Silva WJ. 1979. Análise genética da tolerância ao alumínio em milho. *Ciência e Cultura* 31:585 (resumo).
- Garcia Jr O, Silva WJ, Massei MAS. 1979. An efficient method for screening maize inbreds for aluminum tolerance. *Maydica* 24:75-82.
- Gaspar M, Sibov ST, Souza AP, Ottoboni LMM,. 1995. Analysis of Somaclonal Variation-Induced Zein Mutation in Maize. *Maize Genet Coop Newsl* 69:30.
- Gaspar M, 1996. Alterações em Genes de Zeína Induzidas por Variação Somaclonal. Universidade Estadual de Campinas; Campinas SP, Brasil. Tese de Mestrado.
- Gebhardt C, Salamini F. 1992. Restriction fragment length polymorphism analysis of plant genomes and its application to plant breeding. *Intern. Rev. of Cytol* 135:201-237.
- Goffreda JC, Burnquist WB, Beer SC, Tanksley SD, sorrels ME. 1992. Applications of molecular markers to assess genetic relationships among accessions of wild oat, *Avena sterilis*. *Theoret Appl Genet* 85:146-151.
- Graner A, Bauer E. 1993. RFLP mapping of the *ym4* virus resistance gene in barley. *Theor Appl Genet* 86:689-693.

Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E, Martin JB. 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* 306:234-238.

Haldane JBS. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J Genet* 8:299-309.

Hartl L, Weiss H, Zeller FJ, Jahoor A. 1993. Use of RFLP markers for the identification of alleles of the *Pm3* locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 86(8):959-963.

Helentjaris T, Jking G, Slocum M, Siedenstrang C, Wegman S. 1985. Restriction fragment polymorphism as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol Biol* 5:109-118.

Helentjaris T, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Neinhuis J, 1986a. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphism. *Theor Appl Genet* 72:761-769.

Helentjaris T, Weber DF, Wright S. 1986b. Use of monosomics to map cloned DNA fragments in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6035-6039.

Helentjaris T. 1987. A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Tren in Gen* 3(8):217-221.

Hoisington, D., Khairallah, M., González-de-León, D. 1994. *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory*. Second Edition. Mexico, D.F.: CIMMYT.

Hoisington D, 1986. Maize working maps. Maize Genet Coop Newsl, 60:142.

Hoisington DA, Coe Jr EH. 1990. Mapping in maize using RFLPs. Gene Manipulation in Plant Improvement II. Gustafson JP. Eds. Plenum Press, New York. pp. 331-352.

Howeler RH, Cadavid LF. 1976. Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrient solutions as compared with a field screening method. Agron J 68:551-555.

Huang JW, Grunes DL, Kochian LV. 1992a. Aluminum effects on the kinetics of calcium uptake into cells of the wheat root apex. Planta 188:414-421.

Huang JW, Shaff JE, Grunes DL, Kochian LV. 1992b. Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum-tolerant-sensitive wheat cultivars. Plant Physiol 98:230-237.

Kahler AL, Wehrhahn CF. 1986. Associations between quantitative traits and enzyme loci in the F2 population of a maize hybrid. Theor Appl Genet 72:15-26.

Kauss H. 1987. Some aspects of calcium-dependent regulation in plant metabolism. Annu Rev Plant Physiol 38:47-72.

Kilian A, Steffenson BJ, Maroof MAS, Kleinhofs A. 1994. RFLP Markers Linked to the Durable Stem Rust Resistance Gene Rpg1 in Barley. Mol Plant-Micro Int 7(2):298-301.

Klein-Lankhorst R, Rietveld P, Machiels B, Verkerk R, Weide R, Gebhardt C, Koornneef M, Zabel P. 1991. RFLP markers linked to the root knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. Theor Appl Genet 81:661-667.

Kinraide, TB, 1991. Identity of the rhizotoxic aluminium species. Plant Soil, 134:167-178.

- Kinraide, TB, Ryan, PR, Kochian LV, 1992. Interactive effects of Al^{3+} , H^+ , and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiol.* 99:1461-1468.
- Kleinlankhorst R, Rietveld P, Machiels B, Verkerk R, Weide R, Gebhardt C, Koornneef M, Zabel P. 1991. RFLP markers linked to the root-knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theor Appl Genet* 81(5):661-667.
- Kochian LV, 1995. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:237-260.
- Kosambi DD. 1944. The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12:172-175.
- Landauellis D, Gresshoff PM. 1994. The RFLP molecular marker closely linked to the supernodulation locus of soybean contains 3 inserts. *Mol Plant-Micro Int* 7(3):432-433.
- Lander ES, Green P, Abrahanson J, Barlow A, Daly MJ, Lincon SE, Newburg L, 1987. MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- Landry BS, Kesseli R, Leung H, Milcheltmore RW. 1987a. Comparison of restriction endonucleases and sources of probes for their efficiency in detecting restriction fragment length polymorphisms in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Theor Appl Genet* 74:646-653.
- Landry BS, Kesseli RV, Farrara B, Milcheltmore RW. 1987b. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116:331-337.

- Lanza LLB. 1996. Distâncias genéticas entre linhagens endogâmicas de milho (*Zea mays* L.) e predição de híbridos simples através de marcadores do tipo RAPD. Universidade Estadual de Campinas; Campinas SP, Brasil. Tese de Mestrado.
- Larkin, PJ. 1987. Calmodulin levels are not responsible for aluminium tolerance in wheat. *Aust J Plant Physiol* 14:377-385.
- Lathrop GM, Lalouel JM. 1984. Easy calculations of LOD scores and genetic risks on small computer. *Am J Hum Genetic* 36:460-465.
- Laurie DA, Pratchett N, Bezant JH, Snape JW. 1995. RFLP Mapping of 5 Major Genes and 8 Quantitative Trait Loci Controlling Flowering Time in a Winterxspring Barley (*Hordeum-Vulgare* L) Cross. *GENOME* 38(3):575-585.
- Lazof DB, Goldsmith JG, Rufty TW, Linton RW. 1994. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips. A microanalytical study using secondary ion mass spectroscopy. *Plant Physiol* 106:1107-1114.
- Leblanc O, Grimanelli D, Gonzalez-de-Leon D, Savidan Y. 1995. Detection of the apomictic mode of reproduction in maize-Tripsacum hybrids using maize RFLP markers. *Theor Appl Genet* 90(7/8):1198-1203.
- Lee EA, Lee M, Lamkey KR. 1990. RFLP analysis of isogenic lines B14 and B14A. *Maize Genet Coop Newsl*. 64:20.
- Lee M. 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy* 55:265-344.
- Lefebvre C, Nyamangombe L. 1985. Aluminium tolerance in *Zea mays* varieties from Central Africa and Europe. *Cereal Res Comm* 13(4):429-432.

- Lefever AN, Campbell LG, Foy CD. 1977. Differential response of wheat cultivars to Al. *Agron. J.* 69:563-568.
- Litt M, Luty JA. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44:398-401.
- Little P, Annison G, Darling S, Williamson R, Cambar T, Model B. 1980. Model for antenatal diagnosis of b-thalassemia and other monogenic disorders by molecular analysis of linked DNA polymorphisms. *Nature* 285:144-147.
- Lopes MA, Magnavaca R, Bahia Filho AFC & Gama, EEG, 1987. Avaliação de populações de milho e seus cruzamentos para a tolerância à toxidez do Al em solução nutritiva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 22(3):257-63.
- Lopes AS, 1996. Soil fertility management for crop production in the "cerrado" region of Brazil". IFA-PPI Conference for Latin America and Caribbean, June 25 - 28, 1996, Cidade do México, México.
- Mackill DJ, Salam MA, Wang ZY, Tanksley SD. 1993. A major photoperiod-sensitivity gene tagged with RFLP and isozyme markers in rice. *Theor Appl Genet* 85:536-540.
- Magnavaca R. 1982. Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). Lincoln, NE, University of Nebraska, 135p. (Tese de Doutorado).
- Magnavaca R, Gardner Co, Clark RB. 1987. Inheritance of aluminum tolerance in maize. Gabelman HW, Loughman BC, eds. *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. Martinus Nijhoff Publis., Dordrecht, the Netherlands. p 201-212.

- Marschner H, 1991. Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. *Plant and Soil* 134:1-20.
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76:815-829.
- McMullen MD, Louie R. 1989. The linkage of molecular markers to a gene controlling the symptom response in maize to maize dwarf mosaic virus. *Mol-Plant-Microb-Interact.* 2(6):309-314.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. 1991. 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9828-9832.
- Minella E, Sorrells ME, 1992. Aluminium tolerance in barley: Genetic relationships among genotypes of diverse origin. *Crop Sci*, 32:593-598.
- Miranda Filho JB, Ogliari JB, Geraldi IO. 1996. Avaliação de progênies obtidas pelo método dos híbridos crípticos quanto à tolerância ao alumínio. 42º Congresso Nacional de Genética. Caxambu/MG.
- Miyasaka SC, Buta JG, Howell RK, Foy CD. 1991. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans: root exudation of citric acid. *Plant Physiol* 96:737-743.
- Moon HD, Silva MJ, Souza AP, Ottoboni LMM,. 1995. The effect of phytotoxic levels of aluminum on sensitive and tolerant primary roots. *Maize Genet Coop Newsl* 69:30.

- Moon HD, Ottoboni LMM, Souza AP, Sibov ST, Gaspar M, Arruda P. 1997. Somaclonal variation-induced aluminium-sensitive mutant from an aluminium-tolerant maize inbred line. *Plant Cell Rep* (no prelo).
- Moser H, Lee M. 1994. RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis, and genetic variance in oats. *Theor Appl Genet* 87:947-956.
- Mullis K, Fallona F. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55:335-350.
- Ownby JD, Popham HR. 1989. Citrate reverses the inhibition of wheat root growth caused by aluminum. *J Plant Physiol* 135:588-591.
- Ownby JD. 1993. Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium-treated wheat roots. *Physiol Plant* 87:371-380.
- Pandey S, Granados G. 1985. Development of maize cultivars tolerants for aluminum related problems. CIMMYT Publics Collection. Location number 631.53 EDM.
- Pandey S, Gardner CO. 1992. Recurrent selection for population, variety and hybrid improvement in tropical maize. *Adv Agron* 48:1-87.
- Parker DR, Norvell WA, Chaney RJ. 1995. Soil chemical equilibrium and reaction models, Loeppert RH, ed ASA and SSSA, Madison, Sis. SSSA Spec. Publi. 42, 253-270.
- Paterson AH, Tanksley SD, Sorrels ME. 1991. DNA markers in plant improvement. *Adv Agron* 44:39-90.
- Patton DA, Franzmann LH, Meinke DW. 1991. Mapping genes essential for embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *M-G-G-Mol-Gen-Genet* 227(3):337-347.

- Pellet DM, Grunes DL, Kochian LV. 1995. Organic acid exudation as a aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196:788-795.
- Penner GA, Chong J, Wight CP, Molnar SJ, Fedak G. 1993. Identification of an RAPD marker for the crown rust resistance gene Pc68 in oats. *Genome* 36(5):818-820.
- Phillips J, Panny S, Kazazian H, Bochun C, Scott C, Smith R. 1980. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia by restriction endonuclease analysis: *Hind*III polymorphisms in α -globin genes extend applicability. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:2853-2856.
- Polans NO, Weeden NF, Thompson WF. 1985. Inheritance, organization, and mapping of rbcS and cab multigene families in pea. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5083-5087.
- Polle E, Konzak CF, Kittrick JA. 1978. Rapid screening of maize for tolerance to aluminum in breeding varieties better adapted to acid soils. CIMMYT Technical Series Bulletin No. 22.
- Poulsen DME, Henry RJ, Johnston RP, Irwin JAG, Rees RG. 1995. The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor Appl Genet* 91(2):270-273.
- Prioli AJ. 1987. Análise genética da tolerância a toxidez do alumínio em milho (*Zea mays* L.). Universidade Estadual de Campinas; Campinas SP, Brasil. Tese de Doutorado.
- Prioli LM. 1987. Cultura de tecidos e células, controle genético da embriogênese somática e variação somaclonal em milho (*Zea mays* L.). Universidade Estadual de Campinas; Campinas SP, Brasil. Tese de Doutorado.
- Prioli LM, Silva WJ. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration capacity in tropical maize inbreds. *Rev. Brasil. Genet.* 12:553-566.

Rao IM, Zeigler RS, Vera R, Sarkarung S, 1993. Selection and Breeding for Acid-Soil Tolerance in Crops. *BioSci*, 43(7):454-465.

Reid DA, Fleming AL, Foy CD. 1971. A method for determining aluminum response of barley in nutrient solution in comparison to response in Al-toxic soil. *Agron Jour* 63:600-603.

Rengel Z, 1992a. Role of calcium in aluminium toxicity. *New Phytol.* 121:499-513.

Rengel Z. 1992b. Disturbance of cell Ca^{2+} homeostasis as a primary trigger of Al toxicity syndrome. *Plant Cell and Envir* 15:931-938.

Rhue RD, Grogan CO, Stockmeyer EW, Everett HL. 1978. Genetic control of Aluminum tolerance in corn. *Crop Science* 18:1063-1067.

Richter DD, Babbar LI. 1991. Soil diversity in the tropics. *Advances in Ecological Research* 21:316-389.

Richter DD, Markewitz D. 1995. How deep is soil? *BioSci* 45(9):600-609.

Riede CR, Anderson JA. 1996. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci* 36:905-909.

Ritter E, Debener T, Barone A, Salamini F, Gebhardt C. 1991. RFLP mapping on potato chromosomes of 2 genes controlling extreme resistance to potato virus-x (Pvx). *Mol Gen Genet* 227(1):81-85.

Rivin CJ, Zimmer EA, Cullis CA, Walbot V, Huynh T, Davis RW. 1983. Evaluation of genomic variability at the nucleic acid level. *Plant Mol Biol Rep* 1:9-16.

- Ryan PR, Ditomaso JM, Kochian LV, 1993a. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. *J Exp Bot* 44(259):437-446.
- Ryan PR, Kochian LV. 1993b. Interaction between aluminum toxicity and calcium uptake at root apex in near-isogenic line of wheat (*Triticum aestivum* L.) differing in aluminum tolerance. *Plant Physiol.* 102, 975-982.
- Ryan PR, Delhaize E, Randall PJ. 1995. Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196:103-110.
- Saghai-Marouf MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:8014-8018.
- Sambrook J, Fritsch EE, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sarfatti M, Abuabied M, Katan J, Zamir D. 1991. RFLP mapping of I1, a new locus in tomato conferring resistance against *Fusarium-oxysporum* F Sp *Lycopersici* Race-1. *Theor Appl Genet* 82(1):22-26.
- Sawazaki E, Furlani PR. 1986. Genética da tolerância ao alumínio em linhagens de milho cateto. XVI Congresso Nacional de Milho e Sorgo - Resumos. Belo Horizonte, p. 382-392.
- Schon CC, Melchinger AE, Boppenmaier J, Brunklaus JE, Herrmann RG, Seitzer JF. 1994. RFLP mapping in maize: quantitative trait loci affecting testcross performance of elite European flint lines. *Crop Sci* 34(2):378-389.

Sibov ST, Gaspar M, Moon DH, Silva MJ, Ottoboni LMM, Souza AP. 1995. Somaclonal Variation Induced Mutation in an Aluminum Tolerant Maize Inbred Line. *Maize Gen Coop News* 69:29-30.

Snape JW. 1988. The detection and estimation of linkage using doubled haploid or single seed descent populations. *Theor Appl Genet* 76:125-128.

Soave C, Salamini F. 1984. Organization and regulation of zein genes in maize endosperm. *Philos. Trans. R. Soc. London* 204:341-347.

Spehar CR. 1994. Aluminum tolerance of soya bean genotypes in short term experiments. *Euphytica* 76:73-80.

Stuber CW, Lincoln SE, Wolff DW, Helentjaris T, Lander ES. 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132(3):823-839.

Sturtevant AH, Beadle GW. 1939. An introduction to genetics. W. B. Saunders Co., Philadelphia. (Republicado em 1962 por Dover Publications, New York).

Tanksley SD. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol Biol Rep* 1:3-8.

Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW, 1989. RFLP mapping in plant breeding new tools for an old science. *Biotechnology*, 7:257-64.

Targon MLN, Leite A, Ottoboni LMM, Malacrida SA, Silva MJ, Turcinelli SR, Arruda P. 1991. Biotechnology for plant production. Crocomo OJ, Sharp WR, Melo M, eds. CEBTEC/FEALQ. pp 47-58.

- Taylor GJ. 1988a The physiology of aluminum tolerance in higher plants. *Soil Sci Plant Anal* 19(7-12):1179-1194.
- Taylor GJ. 1988b The physiology of aluminum phytotoxicity. In H Sigel, A Sigel, eds, *Metal Ions in Biological Systems*, Vol 24. Marcel dekker, New York, pp 123-163.
- Tice KR, Parker DR, DeMason DA. 1992. Operationally defined apoplastic and symplastic aluminum fractions in root tips of aluminum-intoxicated wheat. *Plant Physiol* 100:309-318.
- Timmerman GM, Frew TJ, Miller AL, Weeden NF, Jermyn WA. 1993. Linkage mapping of *sbm-1*, a gene conferring resistance to pea seed-borne mosaic virus, using molecular markers in *Pisum sativum*. *Theor Appl Genet* 85:609-615
- Torggler MGF, Contel EPB, Torggler SP. 1995. Isoenzimas - Variabilidade genética em plantas (Série Monografias - 1-Sociedade Brasileira de Genética). São Paulo: Editora FCA, pp 175.
- Urrea-Gómez R, Ceballos H, Pandey S, Bahia Filho AFC, León LA. 1996. A greenhouse screening technique for acid soil tolerance in maize. *Agron J* 88:806-812.
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. 1992. *Recombinant DNA - 2nd Ed.* Scientific American Books. Freeman WH and Company, Dist. New York. pp 511-533.
- Weber D, Helentjaris T. 1989. Mapping RFLP loci in maize using B-A translocations. *Genetics* 121:583-590.
- Weisemann JM, Matthews BF, Devine TE. 1992. Molecular markers located proximal to the soybean cyst nematode resistance gene, *Rhg4*. *Theor Appl Genet* 85(2/3):136-138.

- Wersuhn G, Kalettka T, Gienapp R, Reinke G, Schulz D. 1994. Problems posed by in-vitro selection for aluminium-tolerance when using cultivated plant cells. *J Plant Physiol* 143:92-95.
- Wight CP, Penner GA. 1994. The identification of random amplified polymorphic DNA markers for daylength insensitivity in oat. *Genome* 37(6):910-914.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski LA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Williams KJ, Fisher JM, Langridge P. 1994. Identification of RFLP markers linked to the cereal cyst nematode resistance gene (CRE) in wheat. *Theor Appl Genet* 89(7-8):927-930.
- Wyman AR & White R. 1980. A highly polymorphic locus in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6754-6758.
- Xiao JH, Li J, Yuan LP, Tanksley SD. 1995. Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers. *Genetics* 140(2):745-754.
- Young ND, Miller JC, Tanksley SD. 1987. Rapid chromosomal assignment of multiple genomic clones in tomato using primary trisomics. *Nuc Aci Res* 15:9339-9348.
- Young ND, Kumar L, Menanciohautea D, Danesh D, Talekar NS, Shanmugasundarum S, Kim DH. 1992. RFLP Mapping of a Major Bruchid Resistance Gene in Mungbean (*Vigna-Radiata*, L-Wilczek). *Theor Appl Genet* 84(7-8):839-844.
- Yu YG, Maroof MAS, Buss GR, Maughan PJ, Tolin SA. 1994. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic-virus resistance. *Phytopathol* 84(1):60-64.

Zabeau M. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application N° 0534858 A1.

Zehr BE, dudley JW, Chojeci J, Mardoof MAS, Mowers RP, 1992. Use of molecular markers to search for alleles in a maize population for improvement of an elite hybrid. Theor Appl Genet, Berlin, 83:903-11.

ANEXO I

Resumo dos resultados dos testes com Al em sementes F3

Resultados do teste de progênies F3 obtidas a partir dos 97 indivíduos F2 que foram para o campo e produziram sementes suficientes para realização dos testes de tolerância ao Al. Dez sementes F3, no mínimo, foram utilizadas em cada teste. Nas colunas referentes a cada teste (**1º Teste F3, 2º Teste F3, 3º Teste F3, Teste “bulks”**) estão indicados: **P** - sementes não germinadas, **T** - indivíduos tolerantes, **S** - indivíduos sensíveis. Na coluna **Somatórias**, encontram-se as totalizações dos resultados dos três testes de Al efetuados com as progênies F3. No caso dos indivíduos escolhidos para fazer parte dos “bulks” segregantes, efetuou-se um novo teste de progênie, sendo utilizadas, no mínimo, 20 sementes de cada progênie F3, por teste (**Teste “bulks”**). **F2, T1, T2, T3, Tb** e **C** correspondem respectivamente aos resultados da tolerância/sensibilidade observados: nos indivíduos da geração F2; no 1º, 2º e 3º Teste F3; no teste para a formação dos “bulks” e na conclusão final, baseada nos resultados dos testes anteriores. A listagem foi ordenada de acordo com os resultados da conclusão final. As classificações adotadas em cada teste são: **T** - tolerante, **S** - sensível, **?** - indeterminado. As linhas em vermelho indicam os 56 indivíduos utilizados para a confecção das membranas F2. As linhas com moldura em destaque indicam os indivíduos selecionados para a formação dos “bulks”. **Nº** - número de cada indivíduo na listagem.

Nº	1º Teste F3			2º Teste F3			3º Teste F3			Teste "bulks"			Somatórias			F 2	T 1	T 2	T 3	T b	C
	P	T	S	P	T	S	P	T	S	P	T	S	P	T	S						
01				00	04	06	01	08	01				01	12	07	?	-	?	T	-	?
02	00	04	06	01	06	03	00	06	04				01	16	13	?	?	T	T	-	?
03	00	03	07	01	05	04	00	07	03				01	15	14	?	?	?	T		?
04	02	01	07	00	01	09	01	06	03				03	08	19	?	?	?	T	-	?
05				00	05	05	05	03	02				05	08	07	S	-	?	?	-	?
06				01	05	04	01	04	05				02	09	09	S	-	?	?	-	?
07	00	05	05	00	02	08	00	07	03				00	14	16	S	?	?	T	-	?
08	00	02	08	01	06	03	00	04	06				01	12	17	S	?	T	?	-	?
09	04	05	01	10	00	00	10	00	00				24	05	01	T	?	?	?	-	?
10				05	02	03	03	07	00				08	09	03	T	-	?	T	-	?
11				04	04	02	04	04	02				08	08	04	T	-	?	?	-	?
12				04	04	02	03	05	02				07	09	04	T	-	?	?	-	?
13				00	06	04	03	05	02				03	11	06	T	-	T	?	-	?
14				02	03	05	05	04	01				07	07	06	T	-	?	?	-	?
15	00	03	07	10	00	00	03	07	00				13	10	07	T	?	?	T		?
16	02	04	04	03	06	01	00	07	03				05	17	08	T	?	?	T	-	?
17	00	02	08	10	00	00	04	06	00				14	08	08	T	?	?	T	-	?
18				00	03	07	01	06	01				01	09	08	T	-	?	T	-	?
19				00	03	07	01	08	01				01	11	08	T	-	?	T	-	?
20				00	02	08	01	08	01				01	10	09	T	-	?	T	-	?
21	00	01	09	03	05	02	00	10	00				03	16	11	T	?	?	T	-	?
22	00	05	05	00	08	02	00	06	04				00	19	11	T	?	T	T	-	?
23	00	04	06	00	07	03	00	07	03				00	18	12	T	?	T	T	-	?
24	01	02	07	03	04	03	00	05	05				04	11	15	T	?	?	?	-	?
25	00	02	08	00	06	04	01	05	04				01	13	16	T	?	T	?	-	?
26	00	01	09	01	06	03	00	03	07				01	10	19	T	?	T	?	-	?
27	00	00	10							05	00	15	05	00	25	?	S	-	-	S	S
28				01	00	09				04	00	16	05	00	25	?	-	S	-	S	S
29	01	00	09							03	00	17	04	00	26	?	S	-	-	S	S
30				00	04	06	00	01	09				00	05	15	S	-	?	S	-	S
31	02	00	08							04	00	16	06	00	24	S	S	-	-	S	S
32	02	00	08							02	00	18	04	00	26	S	S	-	-	S	S
33	02	00	08							02	00	18	04	00	26	S	S	-	-	S	S
34	00	00	10				00	00	00	02	00	18	02	00	28	S	S	-	-	S	S
35				00	01	09				00	00	20	00	01	29	S	-	?	?	S	S
36				00	00	10				00	00	20	00	00	30	S	-	S	-	S	S
37				00	00	10				00	00	20	00	00	30	S	-	S	-	S	S
38				00	00	10				00	00	20	00	00	30	S	-	S	-	S	S
39				00	00	10				09	06	05	09	06	15	T	-	S	-	?	S
40	00	00	10	00	02	08	00	05	05				00	07	23	T	S	?	?	-	S
41	01	09	00										01	09	00	?	T	-	-	-	T
42				00	07	03	00	10	00				00	17	03	?	-	T	T	-	T
43	01	04	05	02	07	01	00	08	02				03	19	08	?	?	T	T	-	T
44	01	09	00										01	09	00	T	T	-	-	-	T
45	00	10	00							05	15	00	05	25	00	T	T	-	-	T	T
46	02	08	00				04	06	00				06	14	00	T	T	-	T	-	T
47	00	10	00							00	20	00	00	30	00	T	T	-	-	T	T
48	00	10	00										00	10	00	T	T	-	-	-	T

Nº	1º Teste F3			2º Teste F3			3º Teste F3			Teste "bulks"			Somatórias			F 2	T 1	T 2	T 3	T b	C
	P	T	S	P	T	S	P	T	S	P	T	S	P	T	S						
49	00	10	00							03	17	00	03	27	00	T	T	-	-	T	T
50				00	10	00				00	20	00	00	30	00	T	-	T	-	T	T
51				01	09	00							01	09	00	T	-	T	-	-	T
52				01	09	00							01	09	00	T	-	T	-	-	T
53				02	08	00							02	08	00	T	-	T	-	-	T
54				00	10	00				01	19	00	01	29	00	T	-	T	-	T	T
55				00	10	00				05	15	00	05	25	00	T	-	T	-	T	T
56	01	07	01				06	04	00				07	11	01	T	T	-	?	-	T
57	02	07	01				00	10	00				02	17	01	T	T	-	T	-	T
58	00	09	01										00	09	01	T	T	-	-	-	T
59	07	02	01	00	10	00							07	12	01	T	?	T	-	-	T
60	04	06	00	00	09	01							04	15	01	T	?	T	-	-	T
61	00	10	00							00	19	01	00	29	01	T	T	-	-	T	T
62				00	09	01							00	09	01	T	-	T	-	-	T
63				00	09	01							00	09	01	T	-	T	-	-	T
64				00	09	01							00	09	01	T	-	T	-	-	T
65				00	09	01							00	09	01	T	-	T	-	-	T
66	00	10	00							02	16	02	02	26	02	T	T	-	-	T	T
67	01	07	02				04	06	00				05	13	02	T	T	-	T	-	T
68	02	06	02				00	10	00				02	16	02	T	T	-	T	-	T
69	01	07	02				00	10	00				01	17	02	T	T	-	T	-	T
70	00	08	02				00	10	00				00	18	02	T	T	-	T	-	T
71				00	08	02	00	10	00				00	18	02	T	-	T	T	-	T
72				01	08	01	00	09	01				01	17	02	T	-	T	T	-	T
73				00	08	02	00	10	00				00	18	02	T	-	T	T	-	T
74				00	10	00				01	17	02	01	27	02	T	-	T	-	T	T
75				00	10	00				01	17	02	01	27	02	T	-	T	-	T	T
76	00	07	03				00	10	00				00	17	03	T	T	-	T	-	T
77	00	07	03				00	10	00				00	17	03	T	T	-	T	-	T
78	00	07	03				00	10	00				00	17	03	T	T	-	T	-	T
79				00	07	03	00	10	00				00	17	03	T	-	T	T	-	T
80				01	06	03	01	09	00				02	15	03	T	-	T	T	-	T
81	00	06	04	00	10	00							00	16	04	T	?	T	-	-	T
82				00	10	00				01	15	04	01	25	04	T	-	T	-	T	T
83				01	07	02	00	08	02				01	15	04	T	-	T	T	-	T
84	01	06	03				00	08	02				01	14	05	T	T	-	T	-	T
85	00	05	05	00	10	00							00	15	05	T	?	T	T	-	T
86	01	06	03				01	07	02				02	13	05	T	T	-	T	-	T
87	01	06	03				00	08	02				01	14	05	T	T	-	T	-	T
88				00	06	04	02	07	01				02	13	05	T	-	T	T	-	T
89	01	05	04	01	07	02	04	06	00				06	18	06	T	?	T	T	-	T
90	02	05	03	00	07	03	02	08	00				04	20	06	T	?	T	T	-	T
91				00	06	04	00	08	02				00	14	06	T	-	T	T	-	T
92				00	07	03	00	07	03				00	14	06	T	-	T	T	-	T
93	00	04	06	00	09	01							00	13	07	T	?	T	-	-	T
94	00	05	05	00	07	03	00	10	00				00	22	08	T	?	T	T	-	T
95	02	04	04	00	08	02	00	08	02				02	20	08	T	?	T	T	-	T
96	01	04	05	00	07	03	00	09	01				01	20	09	T	?	T	T	-	T
97	06	01	03	00	07	03	00	07	03				06	15	09	T	?	T	T	-	T

ANEXO II

Resultados das hibridizações realizadas nas membranas-teste

Resultados das hibridizações efetuadas com as membranas-teste. **Cr** - número do cromossomo; **Nº** - número de sondas por cromossomo; **cM** - distâncias em Centimorgans; **pb** - pares de bases; **Sonda** - nome da sonda - as sondas indicadas em **negrito** indicam as primeiras 112 sondas utilizadas. As demais sondas que não estão em **negrito** representam outras 47 sondas utilizadas na verificação da ligação de determinada sonda com a tolerância ao Al; *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI* e, *EcoRV* - enzimas utilizadas para digestão dos parentais, “bulks” e F1; **F2** - as sondas que possuem o sinal “✓”, foram utilizadas nas hibridizações com membranas contendo o DNA de indivíduos da população F2. As distâncias em cM referem-se à distância de uma sonda em relação à anterior. Estas distâncias foram baseadas em mapas de ligação em milho já publicados (Coe, 1994, 1995, 1996). Os resultados do polimorfismo observado foram apresentados na ordem **Parentais/“bulks”** utilizando-se a seguinte simbologia: **P** - polimórfica; **NP** - não polimórfica; **?** - resultados não conclusivos; ‘---’ - sonda não hibridizada; “**Smear**” - padrão de bandas muito difuso; **P/P** - polimorfismo encontrado nos dois “bulks”; **P/P(BT)** - polimorfismo encontrado apenas no “bulk” tolerante; **P/P(BS)** - polimorfismo encontrado apenas no “bulk” sensível.

Cr.	Nº	cM	pb	Sonda	<i>EcoRI</i> Parentais/ “bulks”	<i>HindIII</i> Parentais/ “bulks”	<i>BamHI</i> Parentais/ “bulks”	<i>EcoRV</i> Parentais/ “bulks”
1	1	0.0	158	TUB1	---	---	---	---
	2	18.7	1220	UMC157	NP	NP	NP	NP
	3	17.8	760	UMC76	NP	NP	NP	NP
	4	23.3	350	ASG45	---	---	---	---
	5	28.6	2000	NPI214	P/P(BS)	NP	NP	NP
	6	18.5	650	UMC67	?	P/NP	NP	NP
	7	30.5	500	ASG62	?	?	P/NP	P/NP
	8	22.5	740	UMC128	NP	NP	P/P	P/P
	9	19.6	2500	BNL8.10	---	---	---	---
	10	17.8	1090	UMC107	P/P	NP	P/NP	P/NP
	11	23.8	700	UMC161	NP	P/P	P/NP	P/NP
	12	17.6	900	CSU33	P/?	P/?	?	P/P
	13	21.1	2250	BNL6.32	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
2	1	0.0	2100	BNL8.45	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	2	12.2	640	UMC53	NP	NP	NP	NP
	3	<30.0	1200	NPI287	---	---	---	---
	4	<30.0	590	UMC6	P/?	P/?	P/?	P/?
	5	17.0	970	UMC34	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	6	18.2	810	UMC131	---	---	---	---
	7	21.0	1050	UMC255	P/NP	P/NP	NP	P/NP
	8	25.5	850	UMC5	P/P(BT)	P/NP	P/P(BT)	P/NP
	9	25.2	550	ASG20	NP	P/?	P/NP	P/NP
	10	17.3	630	UMC49	P/NP	P/P	P/P(BT)	P/P(BT)
	11	21.1	900	CSU109	---	---	---	---
	12	10.8	1400	PHP20581	---	---	---	---
3	1	0.0	990	UMC32	P/NP	P/NP	NP	P/NP
	2	19.6	500	CSU32	---	---	---	---
	3	26.3	550	ASG24	NP	NP	NP	P/NP
	4	26.9	2200	BNL8.35	NP	NP	NP	NP
	5	29.6	1010	UMC102	P/NP	P/?	P/?	P/?
	6	23.5	2300	BNL5.37	---	---	---	---
	7	27.3	2450	BNL6.16	---	---	---	---
	8	18.9	850	UMC17	---	---	---	---
	9	1.9	730	UMC103	NP	P/NP	NP	P/NP
	10	23.5	620	UMC63	?	?	P/NP	?
	11	17.1	1100	CSU25	NP	P/P	?	P/?

Cr.	Nº	cM	pb	Sonda	<i>EcoRI</i> Parentais/ “bulks”	<i>HindIII</i> Parentais/ “bulks”	<i>BamHI</i> Parentais/ “bulks”	<i>EcoRV</i> Parentais/ “bulks”
4	1	0.0	440	UMC4	NP	NP	P/NP	P/NP
	2	2.2	600	AGRR115	---	---	---	---
	3	21.7	1650	PHP20725	---	---	---	---
	4	14.1	550	UMC31	P	P	P	P
	5	0.0	900	UMC55	---	---	---	---
	6	14.4	2250	BNL5.46	---	---	---	---
	7	6.1	1200	NPI386	NP	P/NP	P/NP	P/NP
	8	12.2	300	AGRR37	---	---	---	---
	9	<10.0	2000	BNL12.06	---	---	---	---
	10	<10.0	1300	BNL15.27	---	---	---	---
	11	<10.0	670	UMC23	P	P	NP	?
	12	<10.0	640	UMC42	P	NP	P	P
	13	<10.0	740	UMC47	NP	NP	NP	NP
	14	<10.0	1030	UMC14	P	P	P	P
	15	0.0	570	UMC156	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	16	<10.0	?	NPI284	---	---	---	---
	17	<20.0	1020	UMC66	P	P	NP	NP
	18	4.0	670	UMC19	P	P	P	P
	19	0.0	740	UMC104	P/NP	P/NP	NP	NP
	20	13.5	1210	UMC127	---	---	---	---
	21	<10.0	640	UMC12	VB	VB	VB	VB
	22	<10.0	720	UMC133	?	P	?	?
	23	4.0	750	UMC15	NP	NP	NP	NP
	24	9.5	780	UMC52	NP	NP	NP	NP
	25	<20.0	?	PHP10025	---	---	---	---
	26	<20.0	1500	PHP20608	---	---	---	---
	27	14.3	2500	BNL8.23	---	---	---	---
	28	0.0	810	UMC111	NP	NP	NP	NP
	29	1.0	670	UMC169	---	---	---	---

5	1	0.0	660	NPI409	P/NP	P/P	NP	P/NP
	2	25.2	1240	UMC90	NP	P/P(BS)	P/P(BS)	P/P(BT)
	3	26.2	850	UMC27	---	---	---	---
	4	25.3	1000	CSU36	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	5	12.5	800	CSU93	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	6	24.5	670	UMC126	“Smear”	“Smear”	“Smear”	“Smear”
	7	21.6	970	UMC108	“Smear”	“Smear”	“Smear”	“Smear”
	8	21.5	2500	BNL5.24	---	---	---	---
	9	20.0	470	PHP10017	NP	NP	P/NP	P/NP

Cr.	Nº	cM	pb	Sonda	<i>EcoRI</i> Parentais/ “bulks”	<i>HindIII</i> Parentais/ “bulks”	<i>BamHI</i> Parentais/ “bulks”	<i>EcoRV</i> Parentais/ “bulks”
6	1	0.0	800	CSU71	---	---	---	---
	2	0.0	600	CSU70	NP	P/NP	P/P	P/P
	3	0.0	600	UMC85	P/?	P/P	P/P	P/P
	4	3.0	710	NPI235	P/P	P/P	P/P	P/P
	5	12.0	600	CSU94	“Smear”	“Smear”	“Smear”	“Smear”
	6	16.3	930	UMC59	P/P(BS)	P/P(BS)	P/P(BS)	P/P(BS)
	7	<20.0	640	UMC39	NP	P/P	NP	NP
	8	<20.0	2000	BNL6.22	P/NP	P/P	P/P	NP
	9	<20.0	2300	BNL6.29	---	---	---	---
	10	<20.0	750	UMC51	P/NP	P/NP	NP	NP
	11	20.0	1200	NPI393	---	---	---	---
	12	16.5	650	UMC65	P/NP	P/P(BS)	P/NP	P/NP
	13	2.5	1580	NPI223	P/NP	P/P	NP	P/NP
	14	4.5	630	UMC113	P/NP	P/NP	NP	P/NP
	15	23.1	1050	UMC21	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	16	28.5	1010	UMC38	P/NP	P/NP	NP	?
	17	19.1	500	UMC132	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	18	23.4	550	ASG7	P/P(BS)	P/P	P/P(BS)	P/P(BS)

7	1	0.0	820	UMC7	---	---	---	---
	2	<20.0	500	ASG8	NP	P/P	P/P(BT)	P/P(BT)
	3	15.2	900	NPI400	---	---	---	---
	4	3.5	600	CSU13	NP	P/P(BT)	NP	P/P(BT)
	5	2.3	1350	ASG34	NP	NP	P/P	P/P
	6	3.9	1950	BNL15.40	---	---	---	---
	7	2.9	1300	CSU11	P/NP	P/P(BS)	P/NP	P/NP
	8	0.0	700	CSU81	P/P(BT)	P/P	P/P	P/P(BT)
	9	<10.0	850	UMC5	P	P	?	?
	10	0.0	1190	UMC98	---	---	---	---
	11	<10.0	820	UMC136	---	---	---	---
	12	<10.0	470	UMC116	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	13	0.9	400	ASG49	NP	P/NP	P/NP	P/NP
	14	5.5	1250	BNL15.21	---	---	---	---
	15	<10.0	1000	NPI394	P/NP	P/NP	P/NP	P/P
	16	<10.0	750	UMC110	“Smear”	“Smear”	“Smear”	“Smear”
	17	2.8	1050	UMC254	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	18	6.7	1030	UMC125	---	---	---	---
	19	0.0	2400	BNL8.32	---	---	---	---
	20	0.9	2200	BNL8.21	?	NP	P/P	NP
	21	0.9	1200	BNL14.07	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	22	3.8	810	UMC137	P/NP	NP	P/NP	P/NP
	23	2.9	2200	BNL8.39	P/NP	?	P/NP	NP
	24	12.2	700	UMC245	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	25	<10.0	1400	NPI113	NP	NP	NP	P/NP
	26	<10.0	1800	BNL16.06	?	P/NP	P/NP	P/NP

Cr.	Nº	cM	pb	Sonda	<i>EcoRI</i> Parentais/ “bulks”	<i>HindIII</i> Parentais/ “bulks”	<i>BamHI</i> Parentais/ “bulks”	<i>EcoRV</i> Parentais/ “bulks”
7	27	2.8	920	UMC45	VB	VB	VB	VB
	28	<20.0	650	UMC35	P/NP	P/NP	NP	NP
	29	<10.0	1080	UMC168	NP	NP	NP	NP
8	1	0.0	400	NPI220	P/P(BS)	P/P	P/NP	P/NP
	2	25.1	2400	BNL9.11	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	3	21.6	1160	UMC124	---	---	---	---
	4	19.1	2300	BNL7.08	?	P/NP	NP	?
	5	0.0	600	CSU66	P/NP	P/NP	NP	P/NP
	6	18.4	700	BNL2.369	---	---	---	---
	7	5.0	820	UMC2	P/NP	P/NP	NP	P/NP
	8	22.2	800	CSU31	P/NP	P/P	NP	NP
	9	21.6	670	NPI268	P/P(BT)	P/NP	P/P(BT)	P/NP
	10	18.7	870	NPI414	NP	NP	NP	NP
	11	22.8	2000	NPI107	P/NP	NP	NP	P/NP
9	1	0.0	840	UMC109	P/NP	NP	P/NP	P/NP
	2	20.7	1800	UMC192	---	---	---	---
	3	26.2	2300	UMC25	---	---	---	---
	4	17.8	2100	BNL5.04	---	---	---	---
	5	0.9	1070	UMC114	P/P	P/NP	NP	NP
	6	19.1	680	UMC95	“Smear”	“Smear”	“Smear”	“Smear”
	7	24.1	500	CSU61	P/P	P/NP	NP	?
	8	17.0	2300	BNL5.09	NP	P/P	P/P	NP
	9	<20.0	1000	CSU12	“Smear”	“Smear”	“Smear”	“Smear”
	10	<20.0	580	UMC94	NP	P/NP	P/NP	P/NP
	11	<20.0	1100	CSU50	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
10	1	0.0	710	UMC152	---	---	---	---
	2	3.0	1600	PHP20626	?	?	NP	P/NP
	3	14.8	1400	PHP20075	---	---	---	---
	4	0.0	2200	BNL3.04	NP	NP	NP	NP
	5	21.0	970	NPI285	“Smear”	“Smear”	“Smear”	“Smear”
	6	31.0	640	UMC130	P/P	NP	P/P	P/P
	7	17.6	710	UMC64	P/NP	P/P	P/NP	P/NP
	8	5.0	1500	CSU46	P/NP	P/NP	NP	P/NP
	9	9.0	500	CSU86	P/P	?	P/P	P/P
	10	24.2	410	UMC163	P/NP	P/NP	NP	NP
	11	10	1000	NPI303	P/NP	P/NP	P/NP	P/NP
	12	19.3	800	UMC44	“Smear”	“Smear”	“Smear”	“Smear”
	13	24.6	2100	BNL7.49	---	---	---	---
	14	8.3	1100	NPI232	P/P	P/P	NP	P/P
	15	6.0	2000	CSU6	NP	P/NP	NP	P/NP
	16	7.9	1000	CSU48	NP	NP	NP	P/P(BS)

ANEXO III

Cálculos do teste de χ^2 para a verificação da segregação dos alelos

Após hibridização das sondas com membranas contendo DNA dos indivíduos da população F2. As sondas cujos nomes estão em **negrito** correspondem àquelas selecionadas entre as 112 primeiras. As sondas que não estão em negrito, correspondem àquelas selecionadas entre as outras 47 sondas dos cromossomos 4, 6, 7 e 10, utilizadas na análise de ligação com a tolerância ao Al. Foram indicados na coluna **Valores observados**, o número de indivíduos: homozigotos para o alelo “a” (letra **A**), homozigotos para o alelo “b” (letra **B**) e os heterozigotos, contendo ambos os alelos “a” e “b” (letra **H**). Os valores na proporção de 1:2:1, esperados na segregação de um caráter monogênico codominante, entre os 56 indivíduos da população F2 utilizados na confecção das membranas eram: 14 homozigotos para o alelo “a”, 14 homozigotos para o alelo “b” e 28 heterozigotos. Os valores observados e esperados foram utilizados no cálculo “ $(O-E)^2/E$ ”, onde **O** = observados e **E** = esperados. Os resultados obtidos para os indivíduos homozigotos e heterozigotos foram somados, resultando no valor do χ^2 . Adotou-se um nível de significância de 5%, e para 2 graus de liberdade o valor da probabilidade é 5,991. As sondas cujos resultados indicaram desvios significativos no teste de χ^2 estão indicadas em vermelho.

Nº	Cr	Sonda	Valores observados			(O-E) ² /E			χ^2
			A	B	H	A	B	H	$\Sigma(O-E)^2/E$
1	1	CSU33	7	13	34	3,500	0,071	1,286	4,857436
2	1	UMC128	9	16	31	1,786	0,286	0,321	2,392857
3	2	UMC49	15	17	24	0,071	0,643	0,571	1,285714
4	3	CSU25	9	18	29	1,786	1,142	0,036	2,964857
5	4	UMC14	17	10	29	0,643	1,143	0,036	1,821429
6	4	UMC19	15	14	27	0,071	0	0,036	0,107143
7	4	UMC23_1	11	11	34	0,643	0,643	1,286	2,571429
8	4	UMC23_2	14	9	33	0	1,786	0,893	2,678571
9	4	UMC31	13	13	30	0,071	0,071	0,143	0,285714
10	4	UMC66	12	9	35	0,286	1,786	1,75	3,821429
11	4	UMC133	18	13	25	1,143	0,071	0,321	1,535714
12	5	UMC90	18	16	22	1,143	0,286	1,286	2,714286
13	6	ASG7	13	9	34	0,071	1,786	1,286	3,142857
14	6	BNL6.22	26	10	20	10,29	1,143	2,286	13,71429
15	6	CSU70	14	15	26	0,005	0,114	0,082	0,2
16	6	NPI223	15	13	28	0,071	0,071	0	0,142857
17	6	NPI235	12	14	30	0,286	0	0,143	0,428571
18	6	UMC39	13	12	31	0,071	0,286	0,321	0,678571
19	6	UMC59	11	13	32	0,643	0,071	0,571	1,285714
20	6	UMC85	13	12	31	0,071	0,286	0,321	0,678571
21	7	ASG8	11	15	30	0,643	0,071	0,143	0,857143
22	7	CSU81	22	10	24	4,571	1,143	0,571	6,285714
23	7	UMC5b_1	17	10	29	0,643	1,143	0,036	1,821429
24	7	UMC5b_2	21	13	22	3,5	0,071	1,286	4,857143
25	8	NPI220	4	13	35	7,142	0,071	1,750	8,963421
26	8	NPI268	12	11	33	0,286	0,643	0,893	1,821429
27	9	BNL5.09	14	14	28	0	0	0	0
28	10	CSU86	14	12	30	0	0,286	0,143	0,428571
29	10	NPI232	14	11	31	0	0,643	0,321	0,964286
30	10	PHP20626	20	13	21	3,13	0,019	1,333	4,481481
31	10	UMC64	15	11	30	0,071	0,643	0,143	0,857143
32	10	UMC130	15	11	30	0,071	0,643	0,143	0,857143

ANEXO IV

Listagens dos arquivos de entrada de dados para o programa MAPMAKER

No arquivo **MMDATA1** estão listados os dados genotípicos das primeiras 20 sondas selecionadas para a análise de ligação entre estes locos e a tolerância ao Al. O arquivo **MMDATA2** contém os dados genotípicos das 9 sondas selecionadas para a confirmação da ligação das sondas **UMC85** localizada no cromossomo 6, e **UMC130** localizada no cromossomo 10, com a tolerância ao Al.

A primeira linha dos arquivos (**DATA TYPE F2 INTERCROSS**) fornece o tipo de população estudada: neste caso, uma população F2. Na segunda linha são indicados três valores: o número de progênies utilizadas (**56**), o número de locos genéticos estudados (**21** no arquivo **MMDATA1** e **12** no arquivo **MMDATA2**) e o número de características quantitativas ("**0**") presentes no conjunto de dados fornecido. Em seguida, são indicados o nome do arquivo e a sequência das 56 progênies divididas de cinco em cinco indivíduos, para facilitar a leitura e correção dos dados. Na sequência, foram indicados os dados genotípicos dos locos estudados.

O primeiro loco indicado (**loco-Al**) refere-se a característica de tolerância/sensibilidade de cada indivíduo F2. Os locos restantes, representando os marcadores, são seguidos por um traço e por um número que representa o cromossomo onde ele foi mapeado. Assim "***ASG7-06**", indica os resultados com a sonda ASG7, localizada no cromossomo 6. O "*****" precedendo cada nome é uma indicação para o MAPMAKER considerar aquela linha, como uma linha de dados.

DATA TYPE F2 INTERCROSS												
56 21 0												
# MMDATA1.TXT												
#	00000	00001	11111	11112	22222	22223	33333	33334	44444	44445	55555	5
#	12345	67890	12345	67890	12345	67890	12345	67890	12345	67890	12345	6
*loco-A1	BHAAA	AAHAB	B BBBH	HHHHB	HBBBH	HHHHH	HHHHH	B BBH	AAAAA	AHHA	HHHHH	H
*ASG7-06	HABHA	HAANA	HHNAH	AAAHB	B BBBH	HBNAH	HHHHH	HHHHH	ABNAH	HHHHA	HBHHH	H
*ASG8-07	HBAHB	AHHBH	HHHHA	HBAVB	HBBVB	HHHHH	BHHAH	BHHHB	BHAHA	HABAH	HABAB	H
*BNL509-09	BBHBA	HHABH	HHAAH	HBNAH	HBBH	BHAAA	BAANH	BHHHB	HHHHA	HAHAH	HBBBA	H
*CSU25-03	BBHBH	BHHHA	AABVB	BHHVB	ABVHA	HHHHH	ABHHH	HBVBH	HHAAB	HBBVB	HBAHH	H
*CSU33-01	HHBHB	HHHHH	HBHHA	HBBH	BHABA	ABBBH	HHHHH	BAH--	HAHAH	BHHVB	HHHHH	H
*NPI268-08	HHBHA	AAHHA	HBBVB	HHHVB	HBHHA	BHHVB	ABHBA	HHAHB	HHHHH	HAHAA	BHHHH	A
*UMC128-01	BAAHB	HHHVB	HBBH	AHHH	HBBVA	HBBHB	HHHVB	HHHVB	HAHAH	HABAH	BABHH	B
*UMC130-10	BAAAA	AAHAB	BHHA	HHHHH	HBBH	AHHH	BHHH	BHBBB	HAHAH	AHHA	HHABH	H
*UMC133-04	BHHHB	AHBAH	AHAAB	HBAHA	HVBHA	AAHHA	HABHA	HAHHB	HHAAN	BBAHB	HAHBH	B
*UMC14-04	BAHAH	AHAAN	AHBHA	HHHVB	HBNAH	BABHH	BHHH	AAHHA	HBBH	AHAB	HHANA	H
*UMC19-04	BHHAB	AHAAN	AHAAB	ABAH	BHHH	HAHBA	HABHB	HAHHB	HHAAN	BHHVB	HHHVB	H
*UMC231-04	HAAHB	HHHVB	HBBH	AAHVB	HHHVB	HBBH	HHHVB	HHHHA	BAHHH	HAHAH	BAHHH	A
*UMC232-04	HHBHH	HAHAH	HBAHA	ABAH	HHHVB	HAANH	HABAA	HHANA	HHHHH	BHHVB	HHHHH	A
*UMC31-04	HHBHH	HHHAA	HHANA	ABHHH	BAHHB	BHBH	HAHAH	BBAHA	HBAHA	BHHVB	HHHHH	A
*UMC49-02	HAAAA	AAANH	HBBH	BHBBA	BHHA	BAAAH	BAHHH	HBHHH	BHHVB	BHBAB	HHBHA	H
*UMC5b1-07	BAHAH	AHAAN	AHBHA	HHHVB	HBAHH	BABHH	BHHH	AAHHA	HBBH	AHAB	HHAAH	H
*UMC5b2-07	HHAHB	AABVB	AAANH	HBAVB	AABHH	HHHAA	ABHHA	BVBAA	HBAHA	HAANH	HHABA	B
*UMC66-04	HHHHA	AAHHA	HBBHB	HHHVB	HBHHA	BHHVB	ABHBA	HHAH	HHHHH	HAHAA	BHHHH	A
*UMC85-06	HHAAA	AAHHB	B BBBB	AHHVB	HBBVB	HHHHH	HHHHH	HBBAA	AHANA	HHHHH	AHNAH	H
*UMC90-05	HAHHA	BAHHH	ABAAA	HBBHA	BABBA	HHBAA	AAHHH	BBAH	HBAVA	HAHBH	HBBHB	H

DATA TYPE F2 INTERCROSS												
56 12 0												
# MMDATA2.TXT												
#	00000	00001	11111	11112	22222	22223	33333	33334	44444	44445	55555	5
#	12345	67890	12345	67890	12345	67890	12345	67890	12345	67890	12345	6
*loco-A1	BHAAA	AAHAB	B BBBH	HHHHB	HBBBH	HHHHH	HHHHH	B BBH	AAAAA	AHHA	HHHHH	H
*CSU70-06	H-AAA	AAHHB	B BBBB	AHHVB	B BBBB	HHHHH	HHHHH	BVBAA	AHANA	HAHHH	AHNAH	H
*NPI223-06	BHAAB	AHHVB	ABBBH	HABVB	HHHHA	HBBVB	HBAHH	HABHH	HHANA	HAANH	AHHA	H
*NPI235-06	BHAAN	AAHHB	B BBBB	AHHVB	HBBVB	HHHHH	BHHH	HVBAA	AHANA	HHHHH	AHNAH	H
*UMC39-06	HHAAA	AAHHB	B BBBB	AHHVB	HBBVB	HHHHH	HHHHH	HVBAA	AHANA	HHHHH	AHNAH	H
*UMC59-06	BHAAN	AHHVB	B BBBB	HHHVB	HBBH	HHHVB	BHHH	HVBAA	AHANA	HAHHH	AHNAH	H
*UMC85-06	HHAAA	AAHHB	B BBBB	AHHVB	HBBVB	HHHHH	HHHHH	HVBAA	AHANA	HHHHH	AHNAH	H
*CSU86-10	BAHAA	AAHAB	BHHH	HBNAH	HBBH	AHHVB	BHAHH	BHBVB	HAHAH	AHHA	HHHHB	H
*NPI232-10	BAHHA	AAHAB	BHHH	HBAAN	HBBH	AHHVB	BHAHH	BHBVB	HAHAH	AHHA	HHHHH	H
*PHP20626-10	HAAAA	AAHVB	HHHAA	BABHA	HBBH	AHAB	BAHHB	BHABV	BAAAA	AHH-H	-AHVB	B
*UMC64-10	BAHAA	AAAAB	BHHA	HHNAH	HHHVB	AHHVB	BHHH	BHBVB	HAHAH	AHHA	HHHHB	H
*UMC130-10	BAAAA	AAHAB	BHHA	HHHHH	HBBH	AHHH	BHHH	BHBBB	HAHAH	AHHA	HHABH	H

ANEXO V

Listagem da seção de análise do arquivo MMDATA1 pelo programa MAPMAKER

A seção comentada neste anexo, refere-se as análises do arquivo de dados MMDATA1, que resultou no primeiro grupo de ligação envolvendo a tolerância/sensibilidade ao Al.

Os caracteres em **negrito** no estilo **Courier** representam o que ocorre na tela do computador durante a análise. Os caracteres em *itálico* indicam os comentários e explicações sobre cada comando.

```
*****
* Output from:                               Fri Feb 07 09:53:19 1997 *
*
*                               MAPMAKER/EXP                      *
*                               (version 3.0b)                     *
*
*****

1> PHOTO RELATMM1
'photo' is on: file is 'RELATMM1.OUT'

{O comando PHOTO é usado para salvar uma cópia de uma seção no MAPMAKER
(todas as entradas e saídas) em um arquivo texto. No comando acima, todos os
comandos utilizados e os resultados por eles produzidos, serão arquivados em um
arquivo chamado RELATMM1. A extensão default para este arquivo é .OUT}
```

```
2> PREPARE DATA MMDATA1.TXT
preparing data from file 'MMDATA1.TXT'... ok
F2 intercross data (56 individuals, 21 loci)... ok
unable to run file 'MMDATA1.PRE'... skipping initialization
saving genotype data in file 'MMDATA1.DAT'... ok
saving map data in file 'MMDATA1.MAP'... ok

{O comando PREPARE DATA carrega os dados para a análise no MAPMAKER. Este
comando também cria outros arquivos a partir do arquivo de dados, para facilitar sua
entrada para outros tipos de análises utilizando o MAPMAKER/QTL por exemplo}
```

```
3> CENTIMORGAN FUNCTION HALDANE
centimorgan function: Haldane
```

*{O parâmetro **CENTIMORGAN FUNCTION** seleciona a função de mapeamento que o MAPMAKER irá utilizar para mostrar as distâncias no mapa. As duas funções mais utilizadas estão disponíveis: as funções de **HALDANE** e de **KOSAMBI**. A função **HALDANE** é selecionada por default}*

```
4> UNITS cM
the 'units' are now set to (Haldane) centimorgans.
```

*{O parâmetro **UNITS** é utilizado para dizer ao MAPMAKER que tipo de unidade será usada no momento de mostrar as distâncias no mapa. Duas opções estão disponíveis: porcentagem de recombinação (0.00 até 0.50) e distância em Centimorgans (0.50 até 999.0). Distância em Centimorgans é a unidade selecionada por default}*

```
5> SEQUENCE ALL
sequence #1= ALL
```

*{O comando **SEQUENCE** seleciona quais marcadores e em que ordem eles serão analisados pelos próximos comandos do MAPMAKER. No caso da opção **ALL**, todos os marcadores contidos no arquivo de entrada serão analisados na ordem em que foram colocados neste arquivo}*

```
6> DEFAULT LINKAGE CRITERIA 3.0 40.0
default LOD score threshold is 3.00
default centimorgan distance threshold is 40.00
```

*{O comando **DEFAULT LINKAGE CRITERIA** indica ao programa, o valor mínimo do escore LOD e o valor máximo da distância entre os marcadores, que serão utilizados como parâmetros na análise de ligação de dois pontos. No comando acima, o limite mínimo para o escore LOD foi ajustado para 3.0 e a distância máxima entre os marcadores em 40.0 cM}*

```
7> TWO POINT
two-point data are available.
```

*{O comando **TWO POINT** instrue o MAPMAKER a calcular as distâncias e os escores LOD para todas as combinações de pares de marcadores possíveis na sequência especificada. Esta informação é armazenada e pode ser acessada por outros comandos como "**GROUP**", "**LOD TABLE**", "**BIG LODS**", e outros}*

```
8> GROUP
Linkage Groups at min LOD 3.00, max Distance 40.0
```

```
group1= 1 9 20
-----
group2= 7 19
-----
group3= 8 13
-----
group4= 10 12
-----
group5= 11 17
```

```
-----
group6= 14 15
-----
```

```
unlinked= 2 3 4 5 6 16 18 21
```

*{O comando **GROUP** exibe os possíveis grupos de ligação formados pela análise de dois pontos, a partir da sequência de marcadores indicada. Todo par de marcadores com uma distância menor ou igual à distância máxima especificada e um escore **LOD** maior do que o estipulado, será considerado ligado. No momento da formação dos grupos de ligação se o marcador **A** está ligado a **B**, e **B** está ligado a **C**, então **A**, **B** e **C** serão incluídos no mesmo grupo}*

```
9> PRINT NAMES ON
'print names' is on.
```

*{A opção **PRINT NAMES** quando ligada, instrue o MAPMAKER a mostrar os nomes dos locos ao invés de seus números. Estes números correspondem à sequência dos marcadores no arquivo de entrada}*

```
10> GROUP
Linkage Groups at min LOD 3.00, max Distance 40.0
```

```
group1= loco_A1 UMC130_10 UMC85_06
```

```
-----
group2= NPI268_08 UMC66_04
```

```
-----
group3= UMC128_01 UMC231_04
```

```
-----
group4= UMC133_04 UMC19_04
```

```
-----
group5= UMC14_04 UMC5b1_07
```

```
-----
group6= UMC232_04 UMC31_04
```

```
-----
unlinked= ASG7_06 ASG8_07 BNL509_09 CSU25_03 CSU33_01 UMC49_02 UMC5b2_07
          UMC90_05
```

```
11> SEQUENCE GROUP1
sequence #2= GROUP1
```

```
12> LOD TABLE
Bottom number is LOD score, top number is centimorgan distance:
```

```

          loco_A1
              UMC130_10

UMC130_10  20.2
          7.00

UMC85_06   18.7  62.4
          7.43  0.81
```

*{O comando **LOD TABLE** mostra uma tabela com as distâncias entre os marcadores e os escores **LOD** para todas as possíveis combinações de marcadores listados na sequência indicada. Pela tabela mostrada acima, podemos constatar a ligação entre os*

dois marcadores e o caráter de tolerância ao Al pelas distâncias em cM. Podemos constatar também, que estes dois marcadores não estão ligados entre si, indicando a possibilidade de dois locos distintos estarem envolvidos com a tolerância/sensibilidade ao Al: um no cromossomo 6 e outro no cromossomo 10}

13> QUIT

save data before quitting? [yes] NO

...goodbye...

ANEXO VI

Listagem da seção de análise do arquivo MMDATA2 pelo programa MAPMAKER

A análise dos dados iniciais contidos no arquivo MMDATA1 (ANEXO I), indicaram as primeiras sondas ligadas ao caráter de tolerância ao Al. Estes dados iniciais foram verificados e melhor analisados nesta segunda seção de análises, envolvendo o arquivo MMDATA2.

Os caracteres em **negrito** no estilo **Courier** representam o que ocorre na tela do computador durante a análise. Os caracteres em *itálico* indicam os comentários e explicações sobre cada comando.

```
*****
* Output from:                               Fri Feb 07 09:56:34 1997 *
*
*                               MAPMAKER/EXP
*                               (version 3.0b)
*
*****

'photo' is on: file is 'RELATMM2.OUT'

2> PREPARE DATA MMDATA2.TXT
preparing data from file 'MMDATA2.TXT'... ok
  F2 intercross data (56 individuals, 12 loci)... ok
map data in file 'MMDATA2.MAP' is old... not loading
unable to run file 'MMDATA2.PRE'... skipping initialization
saving genotype data in file 'MMDATA2.DAT'... ok
saving map data in file 'MMDATA2.MAP'... ok

3> CENTIMORGAN FUNCTION HALDANE
centimorgan function: Haldane

4> UNITS cM
the 'units' are now set to (Haldane) centimorgans.

5> SEQUENCE ALL
sequence #1= ALL
```

```

6> TRANSLATE
 1 loco_A1      2 CSU70_06      3 NPI223_06      4 NPI235_06      5 UMC39_06
 6 UMC59_06     7 UMC85_06     8 CSU86_10      9 NPI232_10     10 PHP20626_10
11 UMC64_10     12 UMC130_10

```

*{O comando **TRANSLATE** mostra os nomes e os números de todos os marcadores que fazem parte da sequência que está sendo utilizada}*

```

7> DEFAULT LINKAGE CRITERIA 3.0 40.0
default LOD score threshold is 3.00
default centimorgan distance threshold is 40.00

```

```

8> TWO POINT
two-point data are available.

```

```

9> GROUP
Linkage Groups at min LOD 3.00, max Distance 40.0

```

```

group1= 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

```

```

10> DELETE 1
sequence #2= 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

```

*{O comando **DELETE** remove um ou mais marcadores da sequência em uso. No comando acima, o marcador numero 1 (correspondendo ao “loco-AL”) foi removido}*

```

11> GROUP
Linkage Groups at min LOD 3.00, max Distance 40.0

```

```

group1= 2 3 4 5 6 7
-----
group2= 8 9 10 11 12

```

*{Com a remoção do “loco-AL”, o comando **GROUP** exibe agora dois grupos de ligação: o primeiro formado pelas sondas do cromossomo 6 e o segundo pelas sondas do cromossomo 10 (isto fica mais claro após o comando **PRINT NAMES**, logo abaixo). Este resultado confirma a suspeita de dois locos envolvidos com a tolerância ao Al, pois apenas o loco “loco-AL” era responsável pela união entre estes dois grupos}*

```

12> PRINT NAMES ON
'print names' is on.

```

```

13> GROUP
Linkage Groups at min LOD 3.00, max Distance 40.0

```

```

group1= CSU70_06 NPI223_06 NPI235_06 UMC39_06 UMC59_06 UMC85_06
-----
group2= CSU86_10 NPI232_10 PHP20626_10 UMC64_10 UMC130_10

```

```

14> SEQUENCE 1 2 3 4 5 6 7
sequence #3= 1 2 3 4 5 6 7

```

{No comando acima, uma nova sequência foi selecionada, com todos os marcadores do cromossomo 6 mais o "loco-Al". O comando **TRANSLATE**, logo abaixo, indica isto mais claramente}

15> **TRANSLATE**

1 loco_Al 2 CSU70_06 3 NPI223_06 4 NPI235_0 5 UMC39_06
6 UMC59_06 7 UMC85_06

16> **LOD TABLE**

Bottom number is LOD score, top number is centimorgan distance:

	loco_Al	NPI223_06	UMC39_06		
	CSU70_06	NPI235_06	UMC59_06		
CSU70_06	18.8				
	7.84				
NPI223_06	57.2	49.4			
	1.19	1.77			
NPI235_06	20.2	7.1	39.9		
	7.00	14.62	2.52		
UMC39_06	18.7	3.9	44.3	2.8	
	7.43	17.84	1.88	18.99	
UMC59_06	23.7	11.9	25.9	5.9	9.2
	5.67	10.79	4.78	15.17	12.08
UMC85_06	18.7	3.9	44.3	2.8	0.0
	7.43	17.84	1.88	18.99	24.38
					9.2
					12.08

{O comando **LOD TABLE** mostra uma tabela com as distâncias entre os marcadores e os escores LOD para todas as possíveis combinações de marcadores listados na sequência indicada. Pela tabela acima podemos verificar que mais quatro marcadores estão ligados ao "loco-Al" além do marcador UMC85. Este resultado confirma a presença no cromossomo 6 de um loco envolvido com a tolerância/sensibilidade ao Al. Uma outra forma de visualizar estas ligações entre os marcadores é através do comando **BIG LODS**}

17> **BIG LODS**

Linked Marker Pairs at min LOD 3.00, max Distance 40.0

Marker-1	Marker-2	Theta	LOD	cM
loco_Al	CSU70_06	0.16	7.84	18.85
loco_Al	NPI235_06	0.17	7.00	20.19
loco_Al	UMC39_06	0.16	7.43	18.67
loco_Al	UMC59_06	0.19	5.67	23.73
loco_Al	UMC85_06	0.16	7.43	18.67
CSU70_06	NPI235_06	0.07	14.62	7.05
CSU70_06	UMC39_06	0.04	17.84	3.85
CSU70_06	UMC59_06	0.11	10.79	11.88
CSU70_06	UMC85_06	0.04	17.84	3.85
NPI223_06	UMC59_06	0.20	4.78	25.93
NPI235_06	UMC39_06	0.03	18.99	2.80
NPI235_06	UMC59_06	0.06	15.17	5.86

NPI235_06	UMC85_06	0.03	18.99	2.80
UMC39_06	UMC59_06	0.08	12.08	9.25
UMC39_06	UMC85_06	0.00	24.38	0.00
UMC59_06	UMC85_06	0.08	12.08	9.25

{O comando **BIG LODS** mostra a distância em cM e o escore LOD para todos os pares de marcadores ligados, isto é, que possuam um escore LOD maior ou igual ao mínimo especificado, além de uma distância menor ou igual a máxima distância especificada}

```
18> TRIPLE LINKAGE CRITERIA 3.0 40.0 3
triplet LOD score threshold is 3.00
triplet centimorgan distance threshold is 40.00
number of linkages required is 3
```

{O comando **TRIPLE LINKAGE CRITERIA** especifica os parâmetros que serão utilizados pelo MAPMAKER para determinar os conjuntos de três marcadores mais estreitamente ligados um ao outro através da análise de três pontos. Três valores são especificados: o escore LOD mínimo, a distância máxima e o número de ligações. Quando este último parâmetro é ajustado para "3", cada loco precisa estar ligado com os outros dois marcadores restantes para formar um "tripleto"}

```
19> THREE POINT
Linkage Groups at min LOD 3.00, max Distance 40.0
Triplet criteria: LOD 3.00, Max-Dist 40.0, #Linkages 3
'triple error detection' is off.
counting...20 linked triplets in 1 linkage group
```

count	markers	log-likelihood differences		
		a-b-c	b-a-c	a-c-b
1:	loco_A1 CSU70_06 NPI235_0	0.00	-7.75	-0.97
2:	loco_A1 CSU70_06 UMC39_06	0.00	-10.56	-0.55
3:	loco_A1 CSU70_06 UMC59_06	0.00	-5.23	-2.28
4:	loco_A1 CSU70_06 UMC85_06	0.00	-10.56	-0.55
5:	loco_A1 NPI235_0 UMC39_06	-0.43	-11.99	0.00
6:	loco_A1 NPI235_0 UMC59_06	0.00	-9.50	-1.33
7:	loco_A1 NPI235_0 UMC85_06	-0.43	-11.99	0.00
8:	loco_A1 UMC39_06 UMC59_06	0.00	-6.41	-1.76
9:	loco_A1 UMC39_06 UMC85_06	0.00	-16.93	0.00
10:	loco_A1 UMC59_06 UMC85_06	-1.76	-6.41	0.00
11:	CSU70_06 NPI235_0 UMC39_06	-3.22	-4.15	0.00
12:	CSU70_06 NPI235_0 UMC59_06	0.00	-4.21	-3.83
13:	CSU70_06 NPI235_0 UMC85_06	-3.22	-4.15	0.00
14:	CSU70_06 UMC39_06 UMC59_06	0.00	-1.10	-7.05
15:	CSU70_06 UMC39_06 UMC85_06	0.00	-6.28	0.00
16:	CSU70_06 UMC59_06 UMC85_06	-7.05	-1.10	0.00
17:	NPI235_0 UMC39_06 UMC59_06	-3.09	0.00	-6.91
18:	NPI235_0 UMC39_06 UMC85_06	0.00	-5.37	0.00
19:	NPI235_0 UMC59_06 UMC85_06	-6.91	0.00	-3.09
20:	UMC39_06 UMC59_06 UMC85_06	-12.28	0.00	0.00

{O comando **THREE POINT** calcula todas as probabilidades de ligação entre os marcadores pela análise de três pontos, utilizando os critérios estabelecidos pelo comando **TRIPLE LINKAGE CRITERIA**. A listagem fornecida com as probabilidades de ligação entre os "tripleto", podem fornecer mais informações sobre a ordem correta

dos marcadores no mapa. No entanto, a análise multiponto é a ferramenta mais poderosa e simples de ser utilizada para estabelecer a ordem mais provável dos marcadores, quando estamos trabalhando com poucos locos}

```
20> SEQUENCE { 1 2 3 4 5 6 7 }
sequence #4= { 1 2 3 4 5 6 7 }
```

{Especificando a sequência de marcadores entre chaves (“{“ e “}”), indicamos ao MAPMAKER que considere qualquer mudança na ordem dos marcadores colocados entre as chaves. Assim o programa poderá calcular a probabilidade de ligação com todas as ordens possíveis dentro do número de marcadores especificados na sequência indicada}

```
21> COMPARE 10
```

Best 10 orders (2464 excluded by three-point analysis):

```
1: NPI223_0 UMC59_06 NPI235_0 UMC85_06 UMC39_06 CSU70_06 loco_A1 Like: 0.00
2: NPI223_0 UMC59_06 NPI235_0 UMC39_06 UMC85_06 CSU70_06 loco_A1 Like: 0.00
3: UMC59_06 NPI235_0 UMC85_06 UMC39_06 CSU70_06 loco_A1 NPI223_0 Like: -3.58
4: UMC59_06 NPI235_0 UMC39_06 UMC85_06 CSU70_06 loco_A1 NPI223_0 Like: -3.58
5: loco_A1 UMC59_06 NPI235_0 UMC85_06 UMC39_06 CSU70_06 NPI223_0 Like: -5.27
6: loco_A1 UMC59_06 NPI235_0 UMC39_06 UMC85_06 CSU70_06 NPI223_0 Like: -5.27
7: NPI223_0 loco_A1 UMC59_06 NPI235_0 UMC85_06 UMC39_06 CSU70_06 Like: -5.90
8: NPI223_0 loco_A1 UMC59_06 NPI235_0 UMC39_06 UMC85_06 CSU70_06 Like: -5.90
9: NPI223_0 UMC59_06 UMC85_06 UMC39_06 NPI235_0 CSU70_06 loco_A1 Like: -6.32
10: NPI223_0 UMC59_06 UMC39_06 UMC85_06 NPI235_0 CSU70_06 loco_A1 Like: -6.32
```

order1 is set

*{O comando **COMPARE** calcula e compara a probabilidade entre todas as possíveis ordens de marcadores especificadas em uma determinada sequência. O número 10 que vêm depois do comando, apenas especifica o limite de sequências a serem mostradas na tela no final da execução do comando. Resumidamente, o processo começa com a criação de uma sequência inicial. A probabilidade desta sequência vai sendo comparada com a probabilidade de outras sequências, que vão sendo estabelecidas a partir da mudança no posicionamento de cada marcador em relação aos demais. No final, o comando indica a melhor ordem possível em relação aos marcadores fornecidos. Obs.: a execução anterior do comando **THREE POINT**, embora não seja necessária, torna mais selectiva a escolha das sequências pelo comando **COMPARE**, pois este utiliza-se dos cálculos efetuados durante a análise de três pontos, para suas comparações}*

```
22> SEQUENCE ORDER1
sequence #5= ORDER1
```

```
23> MAP
```

```
=====
```

Map:

Markers	Distance
3 NPI223_06	25.9 cM
6 UMC59_06	5.9 cM
4 NPI235_06	2.8 cM
7 UMC85_06	0.0 cM

```

5  UMC39_06      3.8 cM
2  CSU70_06     18.5 cM
1  loco_A1      -----
                        56.8 cM   7 markers   log-likelihood= -83.97
=====

{O comando MAP calcula e exibe o mapa da ordem mais provável, entre os marcadores
presentes na sequência indicada}

24> SEQUENCE 1 8 9 10 11 12
sequence #6= 1 8 9 10 11 12

{Finalizada a análise com o grupo de ligação do cromossomo 6, vamos analisar agora
os marcadores do grupo de ligação do cromossomo 10}

25> TRANSLATE
1  loco_A1      8  CSU86_10    9  NPI232_10    10  PHP20626_10    11  UMC64_10
12  UMC130_10

26> LOD TABLE
Bottom number is LOD score, top number is centimorgan distance:

                loco_A1      NPI232_10    UMC64_10
                  CSU86_10    PHP20626_10

CSU86_10      23.5
              5.95

NPI232_10     25.4   2.8
              5.33 18.99

PHP20626_10   74.6   60.4   68.7
              0.70   1.23   0.80

UMC64_10      23.5    5.9    9.2   58.3
              5.95 15.47 12.38   1.42

UMC130_10     20.2   10.4   11.7   34.7   10.4
              7.00 11.66 10.71   3.74 11.66

27> DELETE 10
sequence #7= 1 8 9 11 12

{Analisando a tabela com os valores dos escores LOD e das distâncias em cM, notamos
que o marcador PHP20626 está ligado apenas ao marcador UMC130, e mesmo assim a
34.7 cM. Assim para agilizar os calculos, decidimos eliminá-lo da sequência}

28> THREE POINT
Linkage Groups at min LOD 3.00, max Distance 40.0
Triplet criteria: LOD 3.00, Max-Dist 40.0, #Linkages 3
'triple error detection' is off.
counting...10 linked triplets in 1 linkage group

                                log-likelihood differences
count  markers                  a-b-c  b-a-c  a-c-b

```

```

1: loco_A1 CSU86_10 NPI232_10 0.00 -13.67 -0.62
2: loco_A1 CSU86_10 UMC64_10 0.00 -9.52 0.00
3: loco_A1 CSU86_10 UMC130_10 -1.05 -5.72 0.00
4: loco_A1 NPI232_10 UMC64_10 -0.62 -7.05 0.00
5: loco_A1 NPI232_10 UMC130_10 -1.67 -5.38 0.00
6: loco_A1 UMC64_10 UMC130_10 -1.05 -5.72 0.00
7: CSU86_10 NPI232_10 UMC64_10 -3.09 0.00 -6.62
8: CSU86_10 NPI232_10 UMC130_10 -0.96 0.00 -8.29
9: CSU86_10 UMC64_10 UMC130_10 0.00 0.00 -3.80
10: NPI232_10 UMC64_10 UMC130_10 0.00 -0.96 -1.67

29> SEQUENCE { 1 8 9 11 12 }
sequence #8= { 1 8 9 11 12 }

30> COMPARE 10

Best 10 orders (48 excluded by three-point analysis):
1: NPI232_10 CSU86_10 UMC64_10 UMC130_10 loco_A1 Like: 0.00
2: UMC64_10 CSU86_10 NPI232_10 UMC130_10 loco_A1 Like: -0.96
3: loco_A1 NPI232_10 CSU86_10 UMC64_10 UMC130_10 Like: -1.67
4: loco_A1 UMC64_10 CSU86_10 NPI232_10 UMC130_10 Like: -2.01
5: UMC64_10 NPI232_10 CSU86_10 UMC130_10 loco_A1 Like: -3.09
6: CSU86_10 NPI232_10 UMC64_10 UMC130_10 loco_A1 Like: -3.09
7: loco_A1 UMC64_10 NPI232_10 CSU86_10 UMC130_10 Like: -4.14
8: loco_A1 CSU86_10 NPI232_10 UMC64_10 UMC130_10 Like: -4.14
9: loco_A1 UMC64_10 UMC130_10 CSU86_10 NPI232_10 Like: -4.85
10: UMC64_10 UMC130_10 CSU86_10 NPI232_10 loco_A1 Like: -5.47
order1 is set

31> SEQUENCE ORDER1
sequence #9= ORDER1

32> MAP
=====
Map:
Markers      Distance
  9 NPI232_10    2.8 cM
  8 CSU86_10     5.9 cM
 11 UMC64_10    10.4 cM
 12 UMC130_10   20.1 cM
  1 loco_A1     -----
                        39.2 cM   5 markers   log-likelihood= -70.30
=====

33> QUIT
save data before quitting? [yes] NO

...goodbye...

```