

# ANÁLISE DE "RFLP" DA TOLERÂNCIA À TOXIDAZ DO ALUMÍNIO NO CROMOSSOMO 2 DO MILHO<sup>1</sup>

CLAUDIO BRONDANI<sup>2</sup> e EDILSON PAIVA<sup>3</sup>

**RESUMO** - O presente trabalho objetivou, via técnica de RFLP, localizar, no cromossomo 2 do milho, regiões genômicas relacionadas com a resistência ao alumínio tóxico, o qual encontra-se presente em cerca de 60% do território brasileiro. Linhagens de milho tolerantes (15, 16, 699 e 1327) e suscetíveis (19, 53 e 57) ao alumínio, foram utilizadas nos cruzamentos 57 x 1.327, 57 x 699, 53 x 16, 53 x 15 e 19 x 1.327. Avaliaram-se a resistência ao alumínio dos parentais, dos F<sub>1</sub>'s e de 300 indivíduos F<sub>2</sub> de cada cruzamento em solução nutritiva contendo 222 µmol Al/L, medindo-se o Comprimento Relativo da Raiz Seminal como marcador morfológico. A análise de RFLP foi efetuada nas seis plantas mais tolerantes e nas seis mais suscetíveis ao Al, em cada cruzamento, testando-se as combinações de duas enzimas de restrição e cinco sondas mapeadas em diferentes regiões do cromossomo 2 do milho. Foram identificados marcadores relacionados com a tolerância ou suscetibilidade ao alumínio específicos para cada cruzamento. Tais marcadores têm uso potencial para a seleção assistida por RFLP's no melhoramento genético visando à tolerância ao alumínio tóxico em milho.

**Termos para indexação:** solos ácidos, *Zea mays*, sondas de DNA, solução nutritiva, enzimas de restrição.

## "RFLP" ANALYSIS OF ALUMINUM TOLERANCE IN CHROMOSOME 2 IN MAIZE

**ABSTRACT** - This paper aimed to look for genomic regions related with the aluminum tolerance in chromosome 2 of maize using the RFLP technique. Four aluminum tolerant maize lines (15, 16, 699 and 1327) and three non-tolerant ones (19, 53 and 57) were crossed: 57 x 1327, 57 x 699, 53 x 16, 53 x 15 and 19 x 1327. The degree of tolerance to aluminum of the parents, F<sub>1</sub>'s and F<sub>2</sub> were determined through measurements of the Relative Seminal Root Length of seedlings grown in nutrient solution containing 222 µmol of Al/L. The RFLP analysis was made in the 6 more tolerant F<sub>2</sub> plants and in the 6 more susceptible plants of each cross, testing two restriction enzymes and five probes from different regions of chromosome 2 of maize, which have loci to Al tolerance. Tolerant and susceptible RFLP different markers were identified to each cross. These markers are potentially useful in marker assisted selection with RFLP's in the genetic breeding for Al tolerance in maize.

**Index terms:** acid soils, *Zea mays*, DNA probes, nutritive solution, restriction enzymes.

## INTRODUÇÃO

A toxidez do alumínio é o principal problema associado aos solos ácidos, presentes em 60% do

território brasileiro. Nestas condições, as plantas não desenvolvem bem seu sistema radicular, e reduzem a produção. Para contornar este problema, associam-se a calagem e a seleção de genótipos mais tolerantes ao Al (Magnavaca, 1982). Estudos de herança da tolerância ao Al demonstraram que se trata de um caráter quantitativo, mas que pode haver a ocorrência de genes maiores (Magnavaca et al., 1987; Sawazaki & Furlani, 1988). Miranda et al. (1987) propuseram que estes genes estariam localizados nos cromossomos 2 e 10. O emprego da técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) na

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 18 de abril de 1996.

<sup>2</sup> Eng. Agr., M.Sc., EMBRAPA - Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Caixa Postal 02372, CEP 70849-970 Brasília, DF.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (CNPMS), Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG.

etapa de seleção permite que sejam avaliados um grande número de genótipos em breve intervalo de tempo, e com alta precisão na localização dos locos gênicos de interesse (Tanksley et al., 1989; Zehr et al., 1992). A técnica utiliza sondas (fragmentos de DNA com localização cromossômica conhecida) para detectar diferenças na informação genética entre plantas. Estando a sonda próxima a um alelo favorável de um dado caráter de maneira que possa ser considerada como ligada a ele, poder-se-ia utilizá-la mesma como um marcador para selecionar os indivíduos que tenham o referido alelo.

O presente trabalho objetivou averiguar a presença de regiões genômicas no cromossomo 2, envolvidas na tolerância ao alumínio tóxico.

## MATERIAL E MÉTODOS

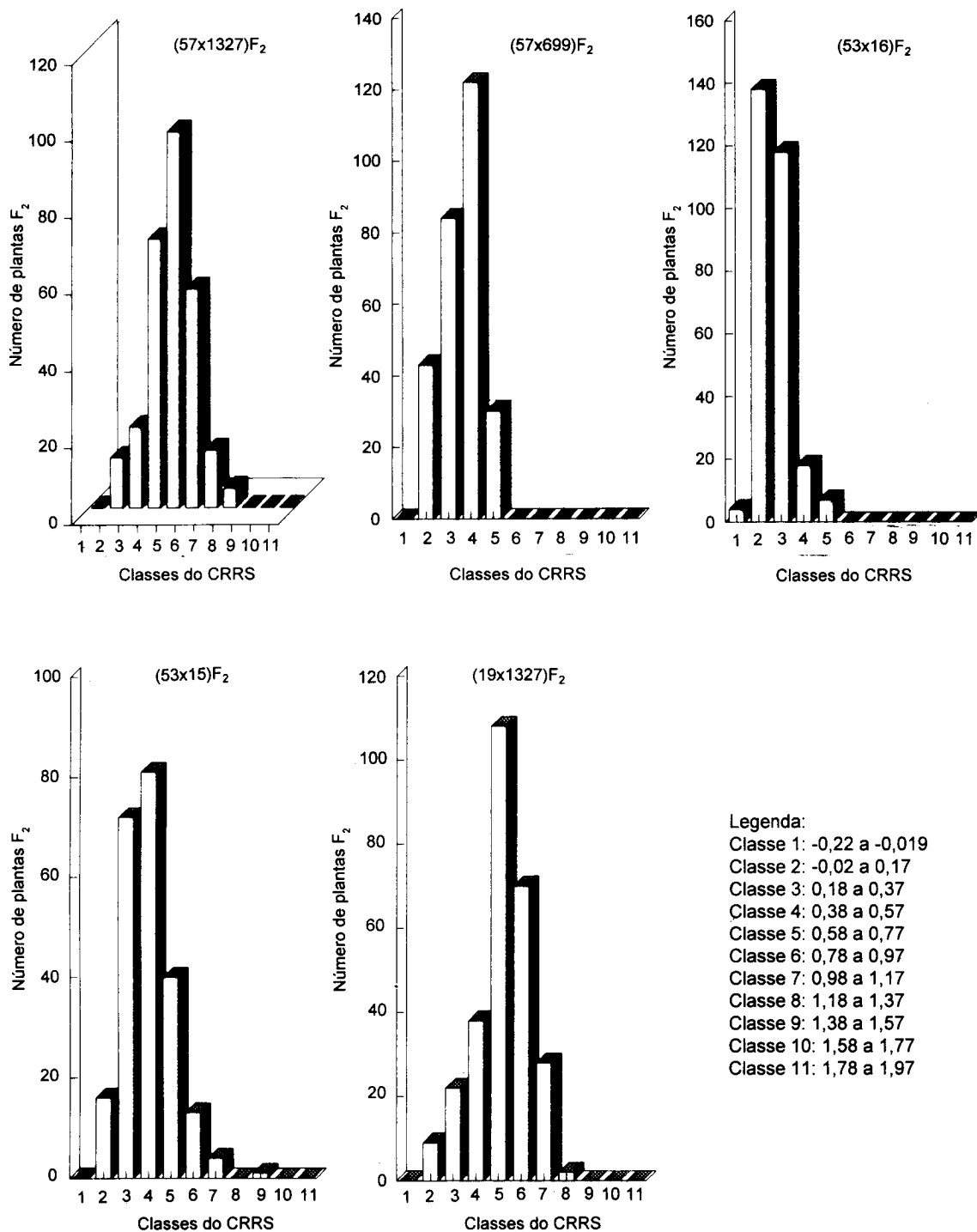
A tolerância ao Al foi testada utilizando solução nutritiva com 222  $\mu\text{mol}$  Al/litro (Magnavaca, 1982) avaliando-se a geração  $F_2$  dos cruzamentos 57 x 1327, 57 x 699, 53 x 16, 57 x 15 e 19 x 1327, sendo as linhagens 19, 53 e 57 suscetíveis, e 15, 16 e 1327 tolerantes ao Al tóxico. Cerca de 300 plântulas  $F_2$  por cruzamento foram distribuídas no delineamento inteiramente casualizado em solução nutritiva. A medida do comprimento das raízes foi efetuada no primeiro e oitavo dias, obtendo-se com isto dados para o cálculo do Comprimento Relativo da Raiz Seminal [CRRS= (comprimento ao 8º dia - comp. 1º dia)/comp. 1º dia]. As 6 plantas de maior e menor CRRS (o que equivale a uma maior e menor tolerância ao Al, respectivamente) foram selecionadas em cada cruzamento. Os procedimentos de isolamento, digestão, transferência do DNA para uma membrana de nylon, marcação não-radiativa das sondas e hibridização das sondas com o DNA genômico, foram efetuados de acordo com Hoisington (1992). As sondas localizadas no cromossomo 2 utilizadas no experimento para hibridizarem com o DNA genômico previamente digerido com as enzimas de restrição Eco RI e Eco RV foram: UMC 34 (de 970 pares de base), UMC 6 (590 p.b.), UMC 122 (490 p.b.), UMC 49 (630 p.b.) e UMC 36 (690 p.b.). A análise das bandas foi efetuada de acordo com o padrão de presença ou ausência de bandas de mesmo peso molecular. A ligação de uma banda com uma provável região de controle da tolerância ao alumínio foi determinada via distribuição binomial, ou seja, a probabilidade de que a ligação fosse devida ao acaso seria de  $(0,5)^x$ , em que x equivale ao número de indivíduos tolerantes ou suscetíveis que apresentaram a banda.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição de frequência das classes de CRRS (Fig. 1) tendeu para a quase continuidade na geração  $F_2$ , em todos os cruzamentos, o que indica que o caráter tolerância ao alumínio é controlado quantitativamente, em conformidade com os resultados obtidos por Magnavaca et al. (1987). Proce-deu-se à seleção dos indivíduos mais tolerantes e mais suscetíveis ao alumínio pertencentes às classes extremas para o CRRS. A Tabela 1 mostra a quantidade de bandas de RFLP obtidas das combinações sonda x enzima de restrição. De acordo com Helentjaris et al. (1988), o padrão de múltiplas bandas deve-se às regiões cromossômicas duplicadas encontradas nos cromossomos 2 e 7. Deste modo, a análise foi efetuada levando-se em conta a presença ou ausência de determinada banda de igual peso molecular. A Tabela 2 indica quais bandas provenientes de cada combinação sonda x enzima de restrição foram capazes de discriminar indivíduos tolerantes ou suscetíveis. Observa-se que no cruzamento 53 x 16 houve três casos onde uma banda apareceu em todos os cinco indivíduos suscetíveis testados: sonda UMC 36, banda 7; sonda UMC 49, banda 3; e sonda UMC 122, banda 5. Utilizando a distribuição binomial, determinada pela presença ou ausência de uma banda específica, a probabilidade de que estas bandas tenham ocorrido ao acaso foi de  $(0,5)^5$ , ou 3,1%. Ainda na Tabela 2 podem ser observadas outras bandas com níveis de significância de 6,25%, ou seja, quatro indivíduos testados equivalem a  $(0,5)^4$ , tal como a banda 10 da sonda UMC 122 no cruzamento 19 x 1327, específica para os indivíduos tolerantes. Os marcadores RFLP relacionados com a tolerância ou suscetibilidade foram específicos para cada cruzamento, mesmo para os

**TABELA 1. Número de bandas de RFLP produzidas em cada combinação de sonda x enzima de restrição.**

Sondas	Número de bandas de RFLP	
	Enzima Eco RV	Enzima Eco RI
UMC 6	10	10
UMC 34	10	1
UMC 36	9	12
UMC 49	16	13
UMC 122	9	10



**FIG. 1.** Distribuição de frequência do Comprimento Relativo da Raiz Seminal (CRRS) de plantas F<sub>2</sub> crescidas em solução nutritiva com Al tóxico, nos 5 cruzamentos testados.

**TABELA 2. Padrões de bandas que discriminaram indivíduos tolerantes (T) ou suscetíveis(S) nos cruzamentos testados em cada combinação sonda x enzima de restrição.**

Combinações	Cruzamentos				
	57 x 1327	57 x 699	53 x 16	53 x 15	19 x 1327
Eco RI x					
UMC 6	6(1/5)T <sup>1</sup>	9(1/6)T	1(2/5)S	2(1/3)T	9(3/4)T
		10(4/5)S	5(4/5)S	3(4/4)S*	
UMC 36	1(1/2)S	2(2/6)	2(1/5)S	2(1/3)T	1(1/4)T
		10(1/6)T	5(2/5)S		
			6(1/5)S		
			7(5/5)S**		
UMC 49	4(2/5)S	4(2/6)T	1(4/5)S	2(1/3)T	2(2/6)S
	11(1/2)S	10(3/6)T	3(5/5)S**	9(1/3)T	4(2/6)S
	12(1/5)T		6(3/5)S		
			8(2/5)S		
UMC 122	-	3(1/6)T	3(3/5)S	1(4/4)S*	1(1/5)S
		4(1/6)T	5(5/5)S**	2(1/4)S	3(2/4)T
		9(4/5)S	7(2/5)S		10(4/4)T*
			9(3/5)S		
Eco RV x					
UMC 6	5(2/2)S	1(1/6)T	9(1/4)S	4(2/2)T	3(3/4)S
	7(2/2)S	2(2/6)T		5(1/4)S	5(2/4)S
		4(1/6)T		8(2/2)T	6(1/4)T
		8(1/6)T			8(4/4)S*
		10(4/5)S			10(3/4)T
UMC 34	1(2/2)S	3(5/6)T	-	2(1/2)T	6(1/4)T
	8(1/2)S	4(2/6)T			10(3/4)T
UMC 36	1(1/2)S	2(4/6)T	4(3/4)S	5(1/2)T	6(1/4)T
		3(1/6)T			6(3/4)T
UMC 49	1(2/2)S	6(3/6)T	4(1/2)S	4(1/2)S	3(1/4)T
	2(1/2)S		10(1/4)S	5(2/2)T	16(2/4)T
	12(1/2)S		13(3/4)S	6(1/4)S	
				7(4/4)S*	
				13(2/2)T	
				14(1/2)T	
				16(1/2)T	
UMC 122	1(1/2)S	1(2/6)T	-	2(1/2)T	3(1/4)T
	3(2/2)S	3(2/6)T		3(1/3)S	7(1/4)T
	6(1/2)S	4(3/6)T			9(2/5)S
	7(2/2)S				
	8(1/2)T				
	9(1/2)S				

<sup>1</sup> O primeiro valor corresponde ao número da banda, equivalente à ordem crescente no filme de raio-x. Os valores entre parênteses equivalem ao número de vezes que a banda está presente/número de indivíduos testados. A letra T ou S representam indivíduos tolerantes ou suscetíveis, respectivamente.  
\*, \*\* Probabilidade de que a banda relacionada com a tolerância ou suscetibilidade tenha ocorrido ao acaso, a 6,25 ou 3,1% de probabilidade, respectivamente.

casos onde o parental tolerante ou suscetível eram comuns. Como no presente trabalho não se obteve o padrão de bandas dos parentais e  $F_1$ 's, não foi possível determinar se as bandas eram, ou não, alélicas, e deste modo definir os alelos de tolerância ou suscetibilidade de cada parental. Mesmo assim, a determinação de bandas relacionadas com a tolerância ou suscetibilidade na geração  $F_2$  indicaram uma possível ligação destas com regiões genômicas envolvidas no caráter tolerância ao alumínio tóxico no cromossomo 2.

### CONCLUSÃO

A análise de RFLP indica haver regiões no cromossomo 2 relacionadas com locos do caráter tolerância à toxidez do alumínio, identificadas por marcadores de tolerância ou suscetibilidade, diferentes para cada cruzamento.

### REFERÊNCIAS

- HELENTJARIS, T.; WEBER, D.; WRIGHT, S. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism. *Genetics*, Austin, v.118, p.353-363, Feb. 1988.
- HOISINGTON, D.A. **Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory**. Mexico: CIMMYT, 1992. 66p.
- MAGNAVACA, R. **Genetic variability and inheritance of aluminum tolerance in maize**. Lincoln: University of Nebraska, 1982. 135p. Tese de Doutorado.
- MAGNAVACA, R.; GARDNER, C.O.; CLARK, R.B. **Comparison of maize populations for aluminum tolerance in nutrient solution**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987.
- MIRANDA, L.E.C.; MIRANDA, L.T.; BRUNINI, O. A summing up of the latent systems, latent-1 stomatal control and linkages in chromosome 2S. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Bloomington, v.61, p.27-29, 1987.
- SAWAZAKI, E.; FURLANI, P.R. Genética da tolerância à toxidez do alumínio em linhagens de milho cateto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MILHO E SORGO, 16., 1986, Belo Horizonte. **Anais...** Sete Lagoas: CNPMS, 1988. p.82-92.
- TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H.; BONIERBALE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology**, New York, v.7, p.257-264, Mar. 1989.
- ZEHR, B.E.; DUDLEY, J.W.; CHOJECKI, J.; MAROOF, M.A.S.; MOWERS, R.P. Use of molecular markers to search for alleles in maize population for improvement of an elite hybrid. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, p.903-911, Apr. 1992.