

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

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO ATRAVÉS DA SOLUÇÃO MÍNIMA
EM DIFERENTES GERMOPLASMAS DE MILHO.

CAROLINE DE JESUS COELHO

PONTA GROSSA - PR
2011

CAROLINE DE JESUS COELHO

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO ATRAVÉS DA SOLUÇÃO MÍNIMA
EM DIFERENTES GERMOPLASMAS DE MILHO.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração: Agricultura.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires

PONTA GROSSA - PR

2011

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

C672a Coelho, Caroline de Jesus
Avaliação da tolerância ao alumínio através da solução mínima em diferentes germoplasmas de milho / Caroline de Jesus Coelho. Ponta Grossa, 2011.
105f.
Dissertação (Mestrado em Agronomia – Área de Concentração : Agricultura.) , Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador : Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello

1. Variabilidade genética. 2. Toxicidade ao alumínio. 3. Seleção. 4. Crescimento radicular. 5. Híbridos. 6. Variedades crioulas.
I. Matiello, Rodrigo Rodrigues. II. T.

CDD: 633.15



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

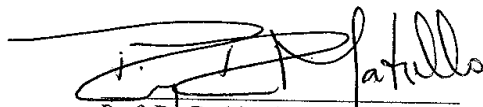
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: "AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO ATRAVÉS DA
SOLUÇÃO MÍNIMA EM DIFERENTES GERMOPLASMAS DE MILHO".


Nome: Caroline de Jesus Coelho

Orientador: Rodrigo Rodrigues Matiello


Aprovado pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Rodrigo Rodrigues Matiello



Prof. Dr. Marcos Ventura Faria



Prof. Dr. Silvana Ohse

Data da Realização: 31 de agosto de 2011.

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seus sinceros agradecimentos à instituição e a todas as pessoas sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

Primeiramente a Deus, minha fortaleza, em quem me apoio e deposito toda a minha fé, tendo a certeza de que por Ele a vitória é certa.

Ao meu marido e filhos, pelo enorme amor, apoio e compreensão em todos os momentos. À minha mãe, amiga e companheira que me ensinou a buscar e conquistar meus sonhos através de muito trabalho e dedicação.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, em especial ao curso de pós-graduação em Agronomia.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Rodrigo Rodrigues Matiello, pela idealização do presente estudo e pela excelente orientação durante a realização do trabalho. Os conselhos e lições por ele transmitidos servirão de suporte e exemplo por toda minha vida.

Ao professor Eduardo Fávero Caires, pela co-orientação e contribuição na conclusão dos resultados.

Aos professores do curso de pós-graduação em Agronomia, pela dedicação, em especial aos coordenadores do curso: Adriel F. da Fonseca e Rodrigo Rodrigues Matiello.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Genética Molecular: Dayane Molin, Débora Máximo, Willian dos Anjos, Guilherme de Jong, Rodrigo Hilbert, Murilo Torrecija, Adliz Budziak, Francyyelly Ferreira, Hélio Joris e em especial ao amigo Felipe Biezus (*in memoriam*), pela participação fundamental na realização deste trabalho, além da enorme amizade e companheirismo.

Às empresas Dow Agrosience, Monsanto, Pioneer e Syngenta pelo fornecimento das sementes para a realização dos experimentos.

Aos funcionários da UEPG, em especial: Zima Richter e Nilcélia Alves de Lara.

A todos que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho e formação da autora. Meus sinceros agradecimentos.

“Para vencer - material ou imaterialmente - três coisas definíveis são precisas: saber trabalhar, aproveitar oportunidades, e criar relações. O resto pertence ao elemento indefinível, mas real, a que, à falta de melhor nome, se chama sorte. Não é o trabalho, mas o saber trabalhar, que é o segredo do êxito no trabalho. Saber trabalhar quer dizer: não fazer um esforço inútil, persistir no esforço até o fim, e saber reconstruir uma orientação quando se verificou que ela era, ou se tornou errada.”

Fernando Pessoa, em “Teoria e Prática do Comércio.”

COELHO, Caroline de Jesus. **Avaliação da tolerância ao alumínio através da solução mínima em diferentes germoplasmas de milho**. 2011. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

RESUMO

A toxidez pelo alumínio tem limitado o potencial de rendimento de grãos na maioria das culturas, principalmente pelos danos ocasionados no sistema radicular como: inibição do crescimento, da alongação e da absorção dos nutrientes. Os objetivos foram padronizar a concentração de alumínio e o tempo de exposição das raízes de plântulas em solução mínima ($\text{Al}^{3+} + \text{Ca}^{2+}$) e posteriormente caracterizar a variabilidade genética para tolerância ao elemento em diferentes germoplasmas (híbridos e variedades crioulas). Os experimentos de adequação da metodologia de solução mínima foram implantados no DBC com três repetições. Os tratamentos foram arranjados em esquema de parcela subdividida, onde na parcela estudou-se o efeito de doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 mg L^{-1}) e na subparcela o efeito de híbridos, que foram expostos por período de 96 h (1° e 2° experimentos) e de 48 h (3° experimento). As variáveis analisadas foram o DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final) e as respectivas diferenças relativas (DIFR1 e DIFR2). As variáveis analisadas foram eficientes para a avaliação da tolerância/sensibilidade ao alumínio em solução mínima. Os resultados revelaram queda drástica no crescimento radicular de todos os híbridos avaliados com o aumento das doses de Al^{3+} , baseados no modelo de regressão raiz quadrada. A partir da dose 4 mg L^{-1} os danos são tão acentuados que praticamente paralisaram o crescimento radicular quando expostos por 96 h. Por outro lado, quando os híbridos foram expostos por 48 h as diferenças de tolerância e ou sensibilidade foram visualizadas. Neste sentido, padronizou-se para os demais experimentos (caracterização de germoplasma), a solução mínima contendo 4 mg L^{-1} de $\text{Al}^{3+} + 40 \text{ mg L}^{-1}$ de Ca^{2+} implantados no DBC com três repetições. No germoplasma de milho híbrido foram realizados dois experimentos (48 e 96 h de exposição) com total de 52 híbridos e um experimento com germoplasma crioulo, com 54 tratamentos: 50 variedades crioulas + 4 híbridos testemunhas (48 h exposição). Os diferentes genótipos foram avaliados para as mesmas variáveis bem como classificados para o índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR_{Al}). Na avaliação dos híbridos, a análise revelou variabilidade genética para tolerância e ou sensibilidade ao Al^{3+} . De maneira geral, a exposição por período de 96 h reduziu sensivelmente o crescimento/recrescimento radicular. A grande maioria dos híbridos (35) apresentou redução no valor do ITR_{Al} em função do aumento do período de exposição, embora 15 híbridos responderam com incremento neste índice. A avaliação das variedades crioulas demonstrou valores bastante elevados de crescimento/recrescimento radicular bem como um predomínio de genótipos (50%) classificados com $\text{ITR}_{\text{Al}} \geq 4$, sendo consideradas excelentes fontes de tolerância ao alumínio. Destaque muito positivo para a variedade Dente de Ouro 2 que apresentou valor de ITR_{Al} superior a testemunha tolerante H 44. As estimativas dos parâmetros genéticos nos dois germoplasmas de milho demonstraram elevados valores de variância genética e dos coeficientes de herdabilidade. Estes índices indicam condição muito favorável para o desenvolvimento e seleção de populações melhoradas com incremento na frequência de alelos de tolerância ao alumínio.

Palavras-chave: variabilidade genética; toxicidade ao alumínio; seleção; crescimento radicular; híbridos; variedades crioulas.

SUMMARY

The aluminum toxicity has limited the potential yield in most crops, especially damage caused by the root system as inhibiting the growth, elongation and absorption of nutrients. The objectives were to standardize the concentration of aluminum and exposure of the roots of seedlings in minimal solution ($\text{Ca}^{2+} + \text{Al}^{3+}$) and subsequently characterize the genetic variability of tolerance to the element in different germplasm (hybrids and landraces). The experiments of the approach of minimal solution in DBC were implanted with three replications. The treatments were arranged in a split plot where the plot studied the effect of doses of Al^{3+} (0, 2, 4 and 6 mg L^{-1}) and the subplot effect of hybrids, which were exposed for a period of 96 h (1 and 2 experiments) and 48 h (experiment 3). The variables analyzed were the DIF1 (root net growth), DIF2 (root final growth) and their relative differences (DIFR1 and DIFR2). The variables analyzed were effective for assessing the tolerance / sensitivity to aluminum in minimal solution. The results revealed dramatic decline in root growth of all the hybrids with increasing doses of Al^{3+} , based on the square root regression model. The starting dose of 4 mg L^{-1} the damage is so pronounced that virtually paralyzed the root growth when exposed for 96 h. On the other hand, when the hybrids were exposed for 48 h and the differences in tolerance or sensitivity were seen. In this sense, we standardized for the other experiments (characterization of germplasm), the minimal solution containing 4 $\text{mg L}^{-1} + \text{Al}^{3+} + 40 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ implanted in the DBC with three replications. Germplasm in hybrid maize were carried out two experiments (48 and 96 h of exposure) with a total of 52 hybrids and germplasm experiment with landraces, with 54 treatments: 50 landraces + 4 hybrid control (48 h exposure). The genotypes were evaluated for the same variables as well as classified for the tolerance on the aluminum (ITR_{Al}). Germplasm in hybrid, the analysis showed genetic variability for tolerance or sensitivity to, and Al^{3+} . In general, the exposure period of 96 h significantly reduced the growth / root regrowth. The majority of the hybrids (35) showed a reduction in the value of ITR_{Al} due to the increase of the exposure period, while 15 hybrids responded with an increase in this index. The evaluation of landraces showed very high values of growth / root regrowth as well as a predominance of genotypes (50%) classified as $\text{ITR}_{\text{Al}} \geq 4$, are considered excellent sources of aluminum tolerance. Featured very positive for the landrace Dente de Ouro 2 that showed a value of more than control ITR_{Al} tolerant H 44. Estimates of genetic parameters in two maize germplasm showed high levels of genetic variance and heritability coefficients. These indices indicate very favorable conditions for development and selection of populations improved with increase in frequency of alleles of aluminum tolerance.

Keywords: genetic variability; aluminum toxicity, selection, root growth, hybrids, landraces.

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Aspecto visual do experimento de doses de Al^{3+} . (A) Visualização dos 8 híbridos de milho (horizontal) e as 12 plântulas por repetição (vertical). (B) Detalhe de uma bandeja (8 x 12) representado a parcela no tratamento de 4 $mg L^{-1}$ de alumínio. (C) Visão geral do experimento. Ponta Grossa, 2011.....	36
Figura 2.	Visualização do experimento de tanque com 4 $mg L^{-1}$ de Al^{3+} + 40 $mg.L^{-1}$ de Ca^{2+} . (A) Visão geral do experimento. (B) Detalhe de parte de uma bandeja contendo as plântulas dos híbridos. (C) Amostra de alguns híbridos de milho e suas respectivas plântulas na repetição. Ponta Grossa, 2011.....	40
Figura 3.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF1 (1° experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.....	48
Figura 4.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF2 (1° experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.....	49
Figura 5.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR1 (1° experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.....	50
Figura 6.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR2 (1° experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.....	51

Figura 7.	Efeito do desdobramento dos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51) nas respectivas doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$). A - DIF1 (crescimento radicular líquido), B - DIF2 (crescimento radicular final), C - DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e D - DIFR2 (crescimento radicular final relativo); (1° experimento). Ponta Grossa, 2011.....	53
Figura 8.	Efeito da desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo de regressão raiz quadrada para a variável DIF1 (2° experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.....	56
Figura 9.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF2 (2° experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.....	57
Figura 10.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR1 (2° experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.....	58
Figura 11.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR2 (2° experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.....	59
Figura 12.	Efeito do desdobramento dos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51) nas respectivas doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$). A - DIF1(crescimento radicular líquido), B - DIF2 (crescimento radicular final), C - DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e D - DIFR2 (crescimento radicular final relativo); (2° experimento). Ponta Grossa, 2011.....	60
Figura 13.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF1 (3° experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.....	63
Figura 14.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF2 (3° experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.....	64
Figura 15.	Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz	

	quadrada para a variável DIFR1 (3° experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.....	65
Figura 16.	Efeito do desdobramento das doses de Al ³⁺ (0, 2, 4 e 6 mg L ⁻¹) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR2 (3° experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.....	66
Figura 17.	Efeito do desdobramento dos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51) nas respectivas doses de Al ³⁺ (0, 2, 4 e 6 mg L ⁻¹) A - DIF1(crescimento radicular líquido), B - DIF2 (crescimento radicular final), C - DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e D - DIFR2 (crescimento radicular final relativo); (3° experimento). Ponta Grossa, 2011.....	68
Figura 18.	Efeito das doses de Al ³⁺ (0, 2, 4 e 6 mg L ⁻¹) nos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44, H 51), após 96 h de exposição. Ponta Grossa, 2011.....	70
Figura 19.	Efeito das doses de Al ³⁺ (0, 2, 4 e 6 mg L ⁻¹) nos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44, H 51), após 48 h de exposição. Ponta Grossa, 2011.....	71
Figura 20.	Valores do índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR _{Al}) do 4° experimento (48 h) para os 52 híbridos de milho. Ponta Grossa, 2011.....	77
Figura 21.	Aspecto visual do sistema radicular de alguns híbridos após 48 h de exposição ao alumínio. A - Híbridos com ITR _{Al} ≥ 4. B - Híbridos com ITR _{Al} ≤ 2. Ponta Grossa, 2011.....	78
Figura 22.	Valores do índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR _{Al}) do 5° experimento (96 h) para os 52 híbridos de milho. Ponta Grossa, 2011.....	81
Figura 23.	Aspecto visual do sistema radicular de alguns híbridos após 96 h de exposição ao alumínio. A - Híbridos com ITR _{Al} ≥ 4. B - Híbridos com ITR _{Al} ≤ 2. Ponta Grossa, 2011.....	82
Figura 24.	Porcentagem de redução ou incremento do ITR _{Al} dos diferentes híbridos após o aumento do período de exposição ao Al ³⁺ de 48 para 96 h. Ponta Grossa, 2011.....	83
Figura 25.	Valores do índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR _{Al}) do 6° experimento (48 h) para as 50 variedades crioulas de milho. Ponta Grossa, 2011.....	87
Figura 26.	Aspecto visual do sistema radicular de algumas variedades crioulas após 48 h de exposição ao alumínio. A - Variedades	

com $ITR_{Al} \geq 4$. **B**- Variedades com $ITR_{Al} \leq 3,5$. Ponta Grossa, 2011..... 88

Figura 27. Distribuição de frequência dos genótipos nas respectivas classes do índice de tolerância relativo ao alumínio (ITR_{Al}). **A**- Híbridos expostos a 48 h, **B**- Híbridos expostos a 96 h, **C**- Variedades crioulas expostas a 48 h. Ponta Grossa, 2011..... 89

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Relação dos híbridos comerciais/pré-comerciais de milho de diferentes empresas produtoras das sementes. Ponta Grossa, 2011.....	38
Tabela 2. Relação dos nomes das variedades crioulas de milho do banco de germoplasma da UEPG com os respectivos locais de coleta. Ponta Grossa, 2011.....	42
Tabela 3. Resumo da análise de variância do 1º experimento para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função das doses de alumínio, híbridos de milho e da interação híbridos x doses. Ponta Grossa, 2011.....	46
Tabela 4. Resumo da análise de variância do 2º experimento para as variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função das doses de alumínio, híbridos de milho e da interação híbridos x doses. Ponta Grossa, 2011.....	54
Tabela 5. Resumo da análise de variância do 3º experimento para as variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função das doses de alumínio, híbridos de milho e da interação híbridos x doses. Ponta Grossa, 2011.....	61
Tabela 6. Resumo da análise de variância do 4º experimento para as variáveis DIF1(crescimento radicular líquido),	

	DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função dos híbridos de milho. Ponta Grossa, 2011.....	73
Tabela 7.	Valor médio das variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) dos 52 híbridos de milho (4° experimento). Ponta Grossa, 2011	75
Tabela 8.	Resumo da análise de variância do 5° experimento para as variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função dos híbridos de milho. Ponta Grossa, 2011.....	78
Tabela 9.	Valor médio das variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) dos 52 híbridos de milho (5° experimento). Ponta Grossa, 2011.....	80
Tabela 10.	Resumo da análise de variância do 6° experimento para as variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função das variedades crioulas de milho. Ponta Grossa, 2011.....	84
Tabela 11.	Valores médios das variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) das 50 variedades de milho crioulo (6° experimento). Ponta Grossa, 2011.....	85
Tabela 12.	Estimativas dos parâmetros genéticos: variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$), variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$), herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}_a^2), média geral (Y_0), desvio padrão da variância genética (dp_{vg}), coeficiente de variação genético (CV_g), coeficiente de variação ambiental (CV_e) e coeficiente b, para as variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) (4° e 5° experimentos). Ponta Grossa, 2011.....	91

Tabela 13. Estimativas dos parâmetros genéticos: variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$), variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$), herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}_a^2), média geral (Y_0), desvio padrão da variância genética (dp_{vg}), coeficiente de variação genético (CV_g), coeficiente de variação ambiental (CV_e) e coeficiente b, para as variáveis DIF1(crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) (6° experimento). Ponta Grossa, 2011.....

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Relação alumínio-planta.....	19
2.2. Mecanismos de tolerância ao alumínio.....	21
2.3. Metodologias de avaliação da tolerância ao alumínio em solução.....	25
2.4. Genética da tolerância ao alumínio.....	28
2.5. Variedades crioulas de milho.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Adequação do método para a seleção de genótipos.....	34
3.2. Caracterização da tolerância/sensibilidade de híbridos de milho.....	37
3.3. Caracterização da tolerância/sensibilidade de variedades crioulas de milho.....	41
3.4. Estimativas de parâmetros genéticos para a tolerância ao Al^{3+} em milho.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Adequação do método para a seleção de genótipos.....	46
4.2. Caracterização da tolerância/sensibilidade de híbridos.....	73
4.3. Caracterização da tolerância/sensibilidade de variedades crioulas de milho.....	83
4.4. Estimativas dos parâmetros genéticos para a tolerância ao Al^{3+} em milho.....	90
5. CONCLUSÕES.....	95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1. INTRODUÇÃO

O Estado do Paraná, maior produtor nacional de milho (*Zea mays* L.), conta com o cultivo bastante tecnificado, fazendo com que a produtividade desta cultura tenha apresentado valores crescentes nas últimas safras. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2011) a área cultivada com milho no Paraná teve um acréscimo de 5,1%, passando de 2,25 para 2,36 milhões de hectares nesta safra. Já a produção total deve apresentar redução de 4,4% no comparativo com o ano anterior. A expectativa para 2010/2011 é de uma produção de 12,8 milhões de toneladas sendo que na safra 2009/2010 foram produzidas 13,4 milhões de toneladas do grão.

Estimativas sugerem que aproximadamente 50% dos solos disponíveis em todo mundo para a produção agrícola sejam ácidos (KOCHIAN et al., 2002). De maneira geral, na América Central e na América do Sul o milho é cultivado neste tipo de solo. No Brasil, a ocorrência de solos ácidos é bastante frequente como na região dos Cerrados ou em áreas de Latossolos Amarelos na região Amazônica e ainda nos planaltos subtropicais que vão do sul do Paraná ao norte do Rio Grande do Sul.

Em regiões tropicais e subtropicais, com elevado regime de precipitação, nutrientes solúveis do solo como cálcio, magnésio, potássio e outros elementos básicos são facilmente lixiviados. Quando a remoção de cátions básicos é maior que sua taxa de liberação pelas intempéries, o pH do solo diminui, tornando-se ácido (ECHART e CAVALLI-MOLINA, 2001). Com isso, o hidrogênio (H^+) passa a atuar sobre os minerais liberando íons de alumínio (Al^{3+}) na solução do solo, ficando disponível para as plantas e causando a toxidez.

Além de ser um metal encontrado em grande quantidade no solo, a química do alumínio é bastante complexa. Sua especiação é afetada pelo pH, constante iônica e pela natureza/concentração de ligantes orgânicos e inorgânicos presentes na fase sólida dos solos (PARENTONI et al., 2001). Fluoreto, fosfato e sulfato são considerados importantes ânions inorgânicos que, dependendo de suas

concentrações e dos valores de pH, influenciam decisivamente na solubilidade e deslocamento do alumínio (MACHADO, 1997). Estes parâmetros podem ser fortemente influenciados pela presença de complexantes orgânicos naturais do solo como o ácido cítrico, o ácido oxálico e os ácidos húmicos (MIYAZAWA et al., 1992). Segundo Pavan (1984) o aumento no teor de matéria orgânica no solo tende a amenizar os efeitos tóxicos dos íons de Al^{3+} para as plantas.

O meio mais comum de reduzir a saturação por alumínio e ainda corrigir a acidez dos solos tem sido a aplicação de calcário (PATERNIANI et al., 2002). Porém, em regiões onde o cultivo é realizado através do Sistema de Plantio Direto esta prática não tem sido muito eficaz, pois o poder corretivo do calcário fica restrito às camadas superficiais do solo, devido a inviabilidade da incorporação deste nas camadas subsuperficiais. Este fato faz com que o uso de níveis mínimos de correção do solo sempre estejam associados a escolha de genótipos mais adaptados à acidez e eficientes no uso dos nutrientes, procurando-se atingir uma agricultura mais sustentável em solos ácidos (PARENTONI et al., 2001).

A seleção a campo para a tolerância ao alumínio é muito complexa, trabalhosa e sujeita a inúmeros erros. Principalmente porque a campo existe a desuniformidade natural dos solos e ainda a dificuldade de avaliar os danos à raiz, ocasionando erros na seleção dos genótipos (MAZZOCATO et al., 2002). Neste sentido, a avaliação dos danos ocasionados no sistema radicular de plântulas em solução nutritiva contendo alumínio em concentrações tóxicas tem sido adotada com eficiência na seleção de genótipos mais tolerantes.

De maneira geral, a tolerância ao alumínio está relacionada a capacidade de algumas espécies de excluir o alumínio das raízes e/ou retirar o alumínio que foi transportado via simplasto (TECHIO, 2009). Recentemente, outros autores têm relacionado a detoxificação interna do elemento através da quelatização, e a exclusão extracelular pela exsudação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (PIÑEROS et al., 2005).

Muitos avanços foram conseguidos nos últimos anos no que se refere ao entendimento dos processos envolvidos na tolerância ao alumínio pelas plantas. Entretanto, muitas questões precisam ser respondidas. Atualmente alguns trabalhos têm abordado novas ferramentas como a genética molecular, visando entender/esclarecer a tolerância das plantas ao alumínio. Embora existam muitos trabalhos relacionados a seleção e incorporação de genes de tolerância a este

elemento, a maior parte encontra-se de forma fragmentada e pouco sistematizada para a rápida utilização (PARENTONI et al., 2001).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivos (i) padronizar a concentração e o tempo de exposição das raízes de plântulas de milho em solução mínima com alumínio, visando melhorar a eficiência na seleção de genótipos sensíveis e/ou tolerantes, (ii) caracterizar a variabilidade genética para tolerância ao alumínio entre diferentes germoplasmas de milho (híbridos e variedades crioulas) e (iii) estimar parâmetros genéticos relacionados à tolerância ao alumínio nestes germoplasmas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Dentre os fatores que restringem o crescimento de plantas em solos ácidos, verifica-se que a toxidez por alumínio é um dos fatores mais limitantes. Estima-se que em mais de 50% do território brasileiro os solos sejam ácidos (OLMOS e CAMARGO, 1976). Adicionalmente, apresentam em menor escala, teores de ferro e manganês que podem causar toxidez. Diversas espécies de plantas são sensíveis às concentrações de alumínio presentes nos solos. O alumínio na forma fitotóxica (Al^{3+}), torna-se disponível à planta quando na solução do solo (alumínio trocável).

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

2.1. Relação alumínio-planta

As plantas respondem à toxidez mineral e a deficiência nutricional com mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (PARENTONI et al., 2001). Breckle (1991) observou que o crescimento e a indução de raízes laterais é estimulado por metais pesados como o alumínio, enquanto a raiz principal e as secundárias (seminal e basal) têm seu crescimento suprimido.

Vários sintomas de injúrias causadas pelo Al^{3+} são verificados em plantas sensíveis. Em algumas espécies os sintomas nas folhas lembram a deficiência de P^{2+} , em outras, a deficiência de Ca^{2+} ou de Fe^{3+} (FOY et al., 1978). As raízes geralmente respondem a toxidez por Al^{3+} tornando-se mais grossas e reduzindo sua taxa de crescimento (PARENTONI et al., 2001).

O sintoma mais facilmente perceptível da toxicidade do alumínio é a inibição do crescimento das raízes. Diversas hipóteses têm sido levantadas ao longo dos

anos para entender o mecanismo de inibição ativado pela presença deste elemento. Alguns autores, como Barceló e Poschenrieder (2002), relacionam a interferência do alumínio no metabolismo do cálcio, na inibição da divisão celular da raiz e na inibição da elongação das células da raiz.

O alumínio também interage com as vias de transdução de sinais, em especial daqueles relacionados com a homeostase e ao transporte de cálcio (HARTWIG et al., 2007). A alteração dos níveis de cálcio pode inibir a enzima fosfolipase C, a qual está associada às vias de transporte do cálcio (KOCHIAN, 1995). Ryan et al. (1994) trabalhando com genótipos de trigo verificaram que a falta de cálcio também interferiu no crescimento radicular. Canal e Mielniczul (1993a; b) observaram que era necessário o suprimento de cálcio na solução com alumínio para evitar a inibição do crescimento radicular. Da mesma forma, relataram que o aumento do cálcio na solução contribuía para o incremento do crescimento da raiz, tanto na presença quanto na ausência do alumínio. Neste sentido, a relação Al^{3+}/Ca^{2+} é extremamente importante na seleção de genótipos com diferentes reações à toxidez por alumínio (CONCEIÇÃO, 2006).

Dados experimentais indicam que o ápice radicular é o sítio primário de indução da inibição do crescimento radicular causada pelo alumínio. O ápice radicular acumula mais alumínio e sofre maior dano físico que os tecidos mais velhos da raiz (RYAN et al., 1995). Quando apenas os 3 mm apicais das radículas de milho foram expostas ao alumínio o crescimento foi inibido (RYAN et al., 1993). Estes mesmos autores utilizaram câmaras divididas e blocos de ágar para aplicar o alumínio em diferentes regiões da raiz e concluíram que a zona de 0 a 3 mm atrás da região quiescente é o sítio mais sensível ao elemento.

A literatura indica dúvidas frequentes em relação ao efeito da inibição pela presença do alumínio: (1) inibição da divisão celular ou (2) inibição da expansão das células (BARCELÓ e POSCHENRIEDER, 2002). Doncheva et al. (2005) verificaram que com 45 minutos de exposição a 50 μM de Al^{3+} , um híbrido simples de milho, com sensibilidade ao alumínio, teve o crescimento da raiz principal inibido. Analisando células da raiz deste mesmo híbrido com relação a influência do alumínio na fase S da intérfase, observaram que apenas 5 minutos de exposição bloquearam completamente a entrada de células oriundas da parte central da zona meristemática nesta fase da divisão celular. A taxa de elongação da raiz depende tanto da divisão quanto da expansão celular. Contudo, apenas a divisão celular não

aumenta o peso radicular. De maneira geral, o tempo de permanência das células da zona meristemática é de várias horas (BEEMSTER e BASKIN, 2000) e a inibição da taxa de alongação celular pelo alumínio foi detectada após 45 minutos da exposição no híbrido sensível. Neste sentido, o efeito da inibição poderia ser melhor explicado pelo decréscimo na taxa de expansão celular do que pela rápida inibição da divisão celular. O efeito tóxico do alumínio sobre a expansão celular das raízes foi verificado em vários outros estudos (RYAN et al., 1993; KOCHIAN, 1995; GUNSE et al., 1997).

Embora o alumínio possa mover-se rapidamente até o citosol das células vegetais (TAYLOR et al., 2000), existem evidências de que o apoplasto desempenha maior papel na percepção do alumínio e na expressão da toxicidade (HORST et al., 2010). O alumínio liga-se no apoplasto com mais de 30 a 90% do total absorvido pela raiz, localizando-se em compartimentos extracelulares (ZHENG e YANG, 2005). Além disso, as propriedades químicas e mecânicas da parede celular parecem ser modificadas pela toxicidade do alumínio (HORST et al., 1999), dando subsídio à hipótese de que a inibição da alongação celular induzida pelo alumínio é causada pelo processo iniciado no apoplasto das células apicais da raiz (DONCHEVA et al., 2005).

Além destes pontos, alguns autores evidenciaram forte ligação do alumínio com a superfície da membrana plasmática das células, atribuída a negatividade dos grupos carboxílicos e grupos fosfatos presentes na sua composição (ZHENG e YANG, 2005). Sendo assim, o acúmulo de alumínio na membrana plasmática poderia ser o primeiro alvo da toxicidade por este elemento.

2.2. Mecanismos de tolerância ao alumínio

A tolerância é uma característica específica que confere vantagem a um genótipo na presença do estresse, podendo atuar em diversos níveis: celular, de tecido, da planta e da interação da planta com o solo (PARENTONI et al., 2001). No caso do alumínio é compreendido que a tolerância deve ser mediada a nível celular. Dependendo da espécie ou do genótipo, existem hipóteses de que os mecanismos de tolerância ao alumínio estejam divididos em dois grupos (CONCEIÇÃO, 2006). O primeiro grupo compreende os mecanismos de exclusão ou apoplásticos, onde ocorre a imobilização ou neutralização do alumínio externamente à célula. No

segundo grupo estão os mecanismos chamados simplásticos onde a imobilização ou neutralização ocorre dentro da célula (PURCINO et al., 2008).

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

A exclusão do alumínio via exsudação de ácidos orgânicos das células da raiz é o mais comum, o melhor documentado e o mais difundido mecanismo de tolerância, principalmente nas espécies cultivadas de importância econômica (DELHAIZE e RYAN, 1995; RYAN et al., 2001; RYAN et al., 2009; HORST et al., 2010). Ácidos orgânicos como o malato, citrato e o oxalato são compostos de baixo peso molecular que formam quelatos com o alumínio na rizosfera, liberando complexos estáveis e atóxicos (MARON et al., 2010). Os primeiros resultados importantes relacionados ao mecanismo de exclusão foram obtidos com a cultura do trigo. Delhaize et al. (1993a; b), avaliando linhas isogênicas de trigo, demonstraram que o alumínio induz a liberação de maior quantidade de malato no ápice da raiz dos genótipos tolerantes, quando comparados com os genótipos sensíveis. Neste mesmo trabalho, os autores propuseram que a tolerância ao alumínio era condicionada por um loco, denominado de *Alt1*, baseado na segregação obtida da geração F_2 e da geração de retrocruzamento.

Outra metodologia utilizada para separar genótipos tolerantes/sensíveis ao alumínio é através da coloração com a hematoxilina, pois este corante permite, através da coloração diferencial no ápice das raízes, separar genótipos contrastantes para a reação ao alumínio. A hematoxilina é um corante que possui a propriedade de tornar-se azul ao formar um complexo com o alumínio, ficando visível a olho nú pela presença ou quando retido nas raízes (CONCEIÇÃO, 2006).

Delhayze e Ryan (1995) lançaram um esquema hipotético da interação entre o alumínio e um possível canal de ânions de malato presente na membrana o qual estimularia o efluxo de malato, sendo codificado pelo gene *Alt1*. Através de um instrumento capaz de detectar correntes elétricas a nível celular (técnica patch-clamp), Zhang et al. (2001) encontraram estímulos gerados pelas cargas negativas dos ânions de malato na membrana. O mesmo foi observado posteriormente na cultura do milho por Pellet et al. (1994). Por outro lado, genótipos tolerantes ao

alumínio de várias espécies vegetais (incluindo o milho) têm exsudado mais citrato ativado pela presença do alumínio do que malato (PIÑEROS et al., 2005).

Baseado nas propriedades físico-químicas, o citrato³⁻ (ácido tricarbóxico), que seque o alumínio mais eficientemente que o ânion dicarbóxico malato²⁻, tornando mais efetiva a detoxificação do alumínio. Vários estudos têm classificado a exsudação de citrato ativada pelo alumínio como o principal mecanismo de exclusão do alumínio em milho (PELLET et al., 1995). Com a técnica de patch-clamp, ficou bem determinado que o alumínio induz a liberação de malato em genótipos tolerantes de trigo (ZHANG et al., 2001) e de citrato em milho, sendo mediado por canais de ânions na membrana plasmática na presença do alumínio (PIÑEROS e KOCHIAN, 2001). Os resultados observados na literatura indicam que a frequência e a magnitude com que o alumínio induz os ânions são maiores em genótipos tolerantes do que nos sensíveis.

Os genes que codificam a proteína destes canais de ânions têm sido identificados em várias espécies de plantas (HORST et al., 2010). Sasaki et al. (2004) isolaram a partir do RNA um cDNA do ápice radicular de um genótipo de trigo tolerante ao alumínio, o ET8, que codifica uma proteína trans-membrana denominada TaALMT1 (*aluminum-activated malate transporter*). Esta proteína é uma transportadora ativada pelo alumínio que facilita o efluxo de malato, tornando-a um membro da família MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) (DELHAIZE et al., 2007). No ano de 2004, um grupo australiano junto com a Universidade de Okayama no Japão, transformaram a cevada com o gene ALMT1, sendo que a expressão deste gene de trigo conferiu efluxo similar de malato ativado pelo alumínio e elevada tolerância ao elemento na cevada (DELHAIZE et al., 2004).

Detalhadamente, Ryan et al. (2009) investigaram o efluxo de citrato nas raízes de trigo. Os resultados forneceram evidências genéticas e fisiológicas de que este caráter é controlado por um único gene de grande efeito, localizado no cromossomo 4B e que contribui para a tolerância ao alumínio. Da mesma forma, identificaram um gene denominado *MATE* que expressa correlação positiva com o fenótipo efluxo de citrato através da avaliação de vários indivíduos de uma família da geração F_{2:3}. Adicionalmente, os resultados comprovaram que o efluxo de citrato seria o segundo maior mecanismo de tolerância ao alumínio em trigo.

Em sorgo (*Sorghum bicolor*) foi mapeado o gene de tolerância ao alumínio, *Alt_{SB}*, na região terminal do cromossomo 3. O mecanismo de tolerância nesta

espécie é baseado no efluxo de citrato ativado pelo alumínio (MAGALHÃES et al., 2007). Em trigo mourisco, uma espécie acumuladora de alumínio além de um mecanismo de exclusão pela exsudação de oxalato no ápice das raízes, existe possivelmente outro mecanismo interno interagindo (ZHENG et al., 1998).

Nos trabalhos realizados pela Embrapa Milho e Sorgo, algumas linhagens classificadas fenotipicamente como tolerantes ao alumínio são capazes de exsudar mais citrato e malato do que linhagens sensíveis. Fato importante observado é que as linhagens tolerantes não apresentaram aumento na exsudação de ácidos orgânicos quando expostos ao alumínio. Demonstrou-se que a exsudação de ânions não era capaz de quelar todo o alumínio presente em solução nutritiva e, portanto, não era o único mecanismo responsável pelo alívio dos sintomas da toxidez (PURCINO et al., 2008). Piñeros et al. (2005) sugeriram que embora a exsudação de citrato desempenhe maior papel na tolerância ao alumínio em milho, outros mecanismos não envolvidos com a exsudação de ácidos orgânicos também poderiam estar agindo no sistema radicular desta espécie.

Outra linha investigada sobre a exclusão do alumínio, diz respeito ao aumento do pH da rizosfera da raiz. Com a alcalinização da superfície radicular há um decréscimo na atividade da espécie rizotóxica do alumínio (Al^{3+}), conferindo um aumento na tolerância ao elemento. Usando a técnica de microelétrodo, pesquisadores caracterizaram mudanças no pH da rizosfera nas pontas das raízes de genótipos de milho na presença e ausência de alumínio (PIÑEROS et al., 2005). Na ausência, o pH da rizosfera foi similar para todos os seis genótipos avaliados, mostrando uma significativa alcalinização ao longo da região apical da raiz, com gradiente máximo ocorrendo acropetalmente na região meristemática. As regiões mais velhas mantiveram-se com o pH ligeiramente mais ácido. Esta habilidade de alcalinização do ápice radicular na presença do alumínio foi observada em todos os genótipos estudados. Essas observações estão de acordo com os experimentos de crescimento radicular, desenvolvidos pelos mesmos autores, onde a exposição ao alumínio causou um decréscimo similar da toxidez (PIÑEROS et al., 2005).

A literatura indica existência de diferenças no aspecto fisiológico da tolerância ao alumínio, mediante a análise de diferentes genótipos de milho. Esta discussão encaixa-se perfeitamente na cultivar de milho Cateto-Colombia, onde podem estar envolvidos vários mecanismos de tolerância (PIÑEROS et al., 2002). Jorge e Arruda (1997) avaliaram plantas de milho sensíveis e tolerantes ao alumínio da variedade

denominada Taiúba na presença e na ausência de alumínio em concentrações fitotóxicas. Nas primeiras 20 horas o desenvolvimento radicular de ambos, sensível e tolerante, foi inibido pela presença de alumínio nas células da ponta da raiz. Após este período, as plantas tolerantes recuperaram o crescimento similarmente ao controle, enquanto as sensíveis permaneceram com o crescimento inibido. Esta recuperação nas plantas tolerantes coincidiu com a exclusão do alumínio absorvido nas primeiras 20 horas e a exsudação de malato e citrato pelas raízes. Estas informações vêm de encontro com a afirmativa de que no milho estão presentes os dois padrões de resposta ao mecanismo de exclusão, mostrando a complexidade envolvida no caráter tolerância ao alumínio nesta espécie (MA et al., 2001).

2.3. Metodologias de avaliação da tolerância ao alumínio em solução

Diferentes métodos de seleção tem sido utilizados para a avaliação de plantas tolerantes ao Al^{3+} : a campo, em casa de vegetação e plântulas em solução nutritiva. Porém, devido às limitações da seleção a campo ou em casa de vegetação, a maioria dos trabalhos que visam seleção de genótipos tolerantes ao Al^{3+} são conduzidos utilizando metodologias que envolvam solução nutritiva (ECHART e CAVALLI-MOLINA, 2001). Além da facilidade na condução e avaliação de um grande número de genótipos, este tipo de metodologia evita a interferência de fatores não controláveis do solo.

De maneira geral, neste tipo de metodologia, as características avaliadas são o crescimento e/ou peso radicular. Um dos principais efeitos tóxicos do alumínio é a inibição do crescimento radicular, inibindo não somente a divisão celular como também o alongamento das células (CAMBRAIA et al., 1991). Outro parâmetro na avaliação é o recrescimento da raiz após a exposição ao alumínio. Em alguns genótipos sensíveis, a raiz principal não cresce, tornando-se engrossada mostrando no ápice uma injúria típica. Com este parâmetro é possível avaliar o recrescimento radicular após o dano causado pelo elemento (ECHART e CAVALLI-MOLINA, 2001).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a condução de experimentos, principalmente aqueles baseados em solução nutritiva completa. A composição ideal da solução nutritiva tem sido objeto de pesquisa de diversos trabalhos (CAMARGO e OLIVEIRA, 1981; CAMARGO, 1985; CAMARGO e FELÍCIO, 1987; CAMBRAIA et al., 1991; CAMBRAIA e CAMBRAIA, 1995; MAZZOCATO et al., 2002; SPHEAR e SOUZA, 2004; CONCEIÇÃO, 2006; MARTINS et al., 2006).

Segundo Cambraia e Cambraia (1995) a escolha da composição ideal da solução nutritiva deve se basear na concentração de Al^{3+} , no pH e nas concentrações de vários outros minerais, principalmente os macronutrientes. Neste sentido, é de extrema importância encontrar a combinação desses fatores para possibilitar que as plantas manifestem plenamente a tolerância ao alumínio. A solução nutritiva completa de Clark (1975) se tornou base para a grande maioria dos trabalhos de tolerância ao Al^{3+} : Magnavaca (1982); Furlani e Furlani (1988); Cambraia et al. (1991); Cambraia e Cambraia (1995); Brondani e Paiva (1996); Martins et al. (1999); Giaveno e Miranda Filho (2000); Prioli et al. (2000); Alves et al. (2004); Andrade Júnior et al. (2005) e Maron et al. (2008).

Porém, existem algumas limitações na utilização da solução nutritiva completa. Além da complexidade no preparo, existe a possibilidade da complexação do alumínio com outros elementos, fazendo com que este não esteja disponível na concentração desejada. Cambraia e Cambraia (1995) estudaram os efeitos do pH, Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe/EDTA e da proporção Fe:EDTA. Apesar de determinar através de testes a concentração ideal destes elementos na solução completa, não foi possível identificar se o Al^{3+} estava disponível às raízes na concentração idealizada. Recentemente, tem-se utilizado um software de especiação, o CHEOCHEM-PC (PARKER et al., 1995), que estima a atividade do Al^{3+} em solução, baseado na concentração dos demais elementos (PIÑEROS et al., 2002; PIÑEROS et al., 2005; MARON et al., 2008).

Alguns autores têm proposto a utilização de solução mínima para a caracterização de genótipos. Neste tipo de solução estão presentes apenas concentrações de Al^{3+} e Ca^{2+} , onde além da economia com relação a quantidade de nutrientes utilizados, verifica-se eficiência na detecção de tolerância ao alumínio. Apesar de não existirem estudos de comparação entre os dois tipos de solução tem se demonstrado a possibilidade de caracterizar genótipos através da solução mínima. Mazzocato et al. (2002) ajustaram o método de avaliação através da utilização de solução mínima contendo 6 mg L^{-1} de Al^{3+} e 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} em milho. Os resultados obtidos permitiram a identificação de dois grupos distintos (tolerante e sensível). Conceição (2006), testou 6 combinações $\text{Al}^{3+}/\text{Ca}^{2+}$ para a composição da solução mínima e observou que a combinação $0,1 \text{ mM Al}/ 0,2 \text{ mM Ca}$, foi a melhor na identificação de genótipos contrastantes. Recentemente, Conceição et al. (2009), utilizando esta mesma solução mínima, observaram

diferenças significativas entre 6 linhagens endogâmicas de milho quando comparadas com 2 híbridos comerciais fenotipicamente conhecidos como tolerante (DKB747) e sensível (DKB205) ao alumínio.

A presença e a concentração adequada de Ca^{2+} na solução mínima são de extrema importância, já que este elemento é indispensável para o crescimento radicular. O Al^{3+} e o Ca^{2+} têm como ponto de ação comum a membrana plasmática e o aumento na concentração de um afeta a intensidade e os efeitos do outro. Cambraia e Cambraia (1995) observaram diminuição no comprimento radicular em híbridos de milho tolerantes ao alumínio apenas quando estes foram expostos a solução completa contendo 5 mg L^{-1} de Al^{3+} na ausência de Ca^{2+} . Camargo (1985), testando diferentes doses de Ca^{2+} em solução completa, verificou inibição irreversível do crescimento radicular quando uma cultivar sensível de trigo foi exposta a 10 mg L^{-1} de Al^{3+} + 16 mg L^{-1} de Ca^{2+} . Quando a mesma cultivar foi exposta a doses mais elevadas de Ca^{2+} (160 e 320 mg L^{-1}) o crescimento radicular não foi afetado.

Cambraia et al. (1991) verificaram através do crescimento radicular de dois cultivares de sorgo a ação protetora exercida pelo Ca^{2+} contra a toxidez do Al^{3+} . Demonstrando uma tendência do aumento da proteção à medida que se aumentava a concentração de Ca^{2+} na solução. Conceição (2006) observou que o aumento da concentração de Ca^{2+} em solução contribuiu para o aumento das diferenças entre os genótipos analisados.

A utilização de soluções nutritivas sem Ca^{2+} deve ser evitada, principalmente em experimentos com períodos de exposição ao Al^{3+} mais prolongados, para que a falta deste elemento não cause danos irreversíveis ao metabolismo da planta. A concentração ideal de Ca^{2+} na solução tratamento deve ser tal que permaneçam os efeitos nocivos do Al^{3+} em genótipos sensíveis, mas não prejudiquem o recrescimento radicular daqueles tolerantes. Mazzocato et al.(2002) apontaram a concentração de 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} como a melhor na discriminação de genótipos de milho.

2.4. Genética da tolerância ao alumínio

O conhecimento e o entendimento da herança do caráter envolvido na tolerância ao alumínio são de extrema importância para o desenvolvimento de

procedimentos que sejam mais adequados para a seleção de genótipos com maior tolerância (CONCEIÇÃO, 2006). Devido ao grande número de rotas bioquímicas envolvidas na tolerância a estresses, é esperado que diferentes genes devam estar envolvidos na tolerância a diferentes níveis de estresse (PARENTONI et al., 2001).

No Brasil, os estudos de tolerância ao alumínio iniciaram-se com a cultura do trigo. Nesta cultura, algumas cultivares apresentaram herança complexa, indicando a possibilidade da presença de diversos genes com efeitos predominantemente aditivos (ANIOL e GUSTAFSON, 1984). Embora, em alguns estudos aponta-se uma herança simples envolvendo 1 ou 2 locos (NODARI et al., 1982; LAGOS et al., 1991). Na cultivar de trigo Chinese Spring foi localizado um gene dominante de grande efeito denominado de *Alt2* (LUO e DVORÁK, 1996). Já na cultivar BH1146 foi chamado de *Alt_{BH}* (RIEDE e ANDERSON, 1996). Este gene foi mapeado no cromossomo 4D (MILLA e GUSTAFSON, 2001). Possivelmente, esse pode ser o gene identificado por Delhaize e Ryan (1993), conhecido mais recentemente por *ALMT1*, que codifica a proteína trans-membrana para um transportador ativo de ânions de malato ativado pela presença do alumínio (SASAKI et al., 2004).

Em cevada, um gene de tolerância ao alumínio presente na cultivar Dayton, foi localizado no braço longo do cromossomo 4, no loco chamado *Alp* (MINELLA e SORRELLS, 1997). Este gene possivelmente é homólogo do gene presente em trigo (PARENTONI et al., 2001). Xu et al. (1993) relataram controle genético variando desde a herança monogênica a poligênica, dependendo da cultivar utilizada como fonte de tolerância. Em centeio, pelo menos dois genes de tolerância foram encontrados na cultivar Ailés. Os genes foram mapeados na região do braço longo do cromossomo 4, no loco denominado *Alt3* (MIFTAHUDIN et al., 2002). Alguns autores indicam a possibilidade dos três locos, *Alt_{BH}*, *Alp* e *Alt3*, pertencentes a mesma tribo Triticeae, serem ortólogos, pois marcadores moleculares em comum estão fortemente ligados nas três espécies (KOCHIAN et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2004). Por outro lado, a variação genética natural para a tolerância ao alumínio em outras Poáceas, como o arroz e o milho parece ser de origem quantitativa (NINAMANGO-CÁRDENAS et al., 2003). Fora da tribo Triticeae, a tolerância ao alumínio pode derivar de genes completamente diferentes. Ainda assim, há evidências de que um número elevado de características agronômicas importantes seja controlado por genes ortólogos em diferentes espécies nesta família (HU et al., 2003).

Magalhães et al. (2004), testaram a hipótese da existência de diferentes genes estarem atuando fora da tribo Triticeae, através da análise de QTL (Quantitative Trait Loci) em sorgo, arroz e Triticeae. Nas análises verificaram que em sorgo a tolerância ao alumínio é codificada por um único gene maior, o *Alt_{SB}*, que foi encontrado no genoma de espécies de Poáceas mas não no gênero Triticeae. Nesse gênero, os genes foram mapeados no cromossomo 4, enquanto que o *Alt_{SB}*, foi mapeado no cromossomo 3 em sorgo, o que indica que os genes não são homólogos. Adicionalmente, verificaram ao avaliar duas cultivares de sorgo geneticamente distintas (SC283 e SC566), que o gene maior de tolerância ao alumínio era o mesmo. Demonstrando que a base genética para a tolerância ao alumínio em sorgo é bastante estreita.

As espécies do gênero *Avena* estão entre as mais tolerantes ao alumínio. Wagner et al. (2001), cruzando três genótipos hexaplóides de aveia branca identificaram a presença de um ou dois genes que contribuíam para a tolerância ao alumínio. Em *Avena strigosa*, uma espécie diplóide, considerada a mais tolerante do gênero, Wight et al. (2006) utilizaram marcadores RFLP's ligados ao caráter tolerância ao alumínio em outras espécies de cereais, na tentativa de encontrar genes ortólogos. Como resultado foram identificados 4 QTL's, sendo que o QTL que explicou maior parte da variância, cerca de 39%, é provavelmente ortólogo aos genes localizados no cromossomo 4 (trigo, centeio e cevada), no cromossomo 10 (milho) e no cromossomo 12 (arroz).

Em 2007, novas investigações sobre a base molecular da tolerância ao alumínio em plantas motivaram a publicação de pesquisas envolvendo as proteínas *MATE* (Multidrug and Toxic Compounds Extrusion), como determinantes da tolerância ao alumínio em plantas. As proteínas *MATE* possuem aproximadamente 400-700 resíduos de aminoácidos e uma característica típica desta família é a presença de 12 hélices transmembrana (OMOTE et al., 2006). Em adição, longas caudas N-terminal e C-terminal expostas no citoplasma sugerem a possibilidade de interações com outras proteínas (MORIYAMA et al., 2008).

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

Como membro da família MATE a *FRD3* (*ferric reductase defective 3*), caracteriza um grupo de proteínas com 12 a 14 domínios transmembrana capaz de transportar compostos orgânicos pequenos. Originalmente esta proteína foi correlacionada com a nutrição de ferro em *Arabidopsis*, mas também encontrada como mediador do efluxo de citrato no tecido vascular das raízes. Além disso, parece que o citrato funciona como um quelador de ferro bem como uma função de distribuir o elemento pela planta (DURRET et al., 2007).

A natureza da tolerância ao alumínio é uma característica quantitativa de nucleotídeos desconhecidos. O estudo dos genes da família MATE pode ser considerado uma estratégia molecular interessante, pois através do relacionamento entre a estrutura destes genes e sua função poderá ser elucidada a tolerância ao alumínio nas plantas (MAGALHÃES, 2010).

Em contraste com outras espécies, verifica-se que em milho a tolerância ao alumínio é um fenômeno complexo que envolve múltiplos genes e provavelmente inúmeros mecanismos fisiológicos. Ninamango-Cárdenas et al. (2003) num estudo de QTL's identificaram cinco regiões genômicas distintas controlando a tolerância ao alumínio em milho. Tentando elucidar a base molecular da tolerância em milho, Maron et al. (2010) usaram uma combinação da genética molecular e a aproximação funcional para identificar e caracterizar por meio de marcadores microssatélites, dois membros da família MATE, *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, que representam fortes candidatos para genes maiores de tolerância ao alumínio em milho. Estes foram mapeados em uma linha endogâmica recombinante gerada das mesmas linhas parentais do estudo realizado por Ninamango-Cárdenas et al. (2003).

O *ZmMATE1*, foi localizado na região telomérica do cromossomo 6. O efeito deste QTL explicou 16,2% da variação fenotípica pela presença do *ZmMATE1* no mapa. Já o *ZmMATE2* foi mapeado entre os marcadores microssatélites Bnlg 105 e Umc 1056, localizados no cromossomo 5, com 16% da variação fenotípica para a tolerância ao alumínio. A adição dos dois genes ao mapa genético aumentou a variância fenotípica de 50 para 66,6%, indicando a importância relativo destes genes para a base genética da tolerância ao alumínio nesta população.

O *ZmMATE1* é um homólogo funcional do gene de tolerância ao alumínio em sorgo, *SbMATE*. Similarmente ao *SbMATE*, a expressão do gene *ZmMATE1* em plantas transgênicas de *Arabidopsis* confere um aumento significativo na tolerância ao alumínio e na exsudação de citrato pelas raízes. A expressão do *ZmMATE1* é

concentrada nos tecidos da raiz sendo consideravelmente maior em genótipos tolerantes, assim como acontece com o *SbMATE*. Entretanto, a exsudação de citrato é ativada somente após a exposição das raízes ao alumínio.

A caracterização do *ZmMATE2* indicou comportamento diferenciado do *ZmMATE1* e de outros MATE's envolvidos na tolerância ao alumínio em vários aspectos. O *ZmMATE2* não compartilha da mesma identidade na sequência dos aminoácidos com os MATE's, indicados para o transporte de citrato (MARON et al., 2010). Neste mesmo trabalho foi realizada a análise funcional do *ZmMATE2* em *Xenopus oocytes*, mostrando que o gene é capaz de mediar uma atividade de corrente interna em experimentos de TEVC (Two Electrode Voltage Clamp Technique) quando a concentração extracelular de cátions é minimizada. Isto sugere que o gene pode ser o mediador do efluxo de ânions. A natureza do substrato transportado neste canal é ainda desconhecida. Possivelmente, o *ZmMATE2* pode estar envolvido como um mecanismo de tolerância diferente. Até hoje não se conhece nenhum outro mecanismo além da exsudação de citrato em milho. As raízes de milho também podem exsudar malato e fosfato, que possivelmente quelam o alumínio, porém a taxa de exsudação não parece responder a exposição ao alumínio (PIÑEROS et al., 2002). Estudos indicam que o alumínio pode liberar um tipo de flavonóide presente nas raízes de milho, sendo que estes compostos fenólicos podem ser efetivos como agentes quelantes do próprio elemento (BARCELÓ e POSCHENRIEDER, 2002).

2.5. Variedades crioulas de milho

As populações crioulas, também conhecidas como raças locais ou *landraces*, são genótipos importantes para o melhoramento de plantas pelo elevado potencial de adaptação que apresentam para condições ambientais específicas (PATERNIANI et al., 2000).

De maneira geral, as variedades crioulas são cultivadas por pequenos agricultores, os quais, devido ao baixo poder de investimento na implantação da lavoura, não fazem a correção de problemas comuns ao solo como a acidez ou a falta de elementos essenciais ao desenvolvimento da planta. Além do baixo nível tecnológico disponível a estes produtores, a falta de informações para a condução da lavoura também se torna um fator limitante. Apesar disto, as variedades crioulas possuem adaptação específica a este tipo de ambiente, produzindo melhor se

comparadas com híbridos de alta tecnologia e potencial produtivo cultivados nesta mesma realidade. Por todas estas características, é esperado em hipótese que as variedades crioulas apresentem um comportamento diferenciado quando submetidas a estresses abióticos, como por exemplo, a tolerância ao alumínio, já que os solos em que são cultivadas são tipicamente ácidos e com elevada saturação por Al^{3+} .

Em alto nível tecnológico, as variedades crioulas, geralmente, são menos produtivas que os cultivares comerciais. Entretanto, essas populações são importantes por constituírem fonte de variabilidade genética que podem ser exploradas na busca de genes de interesse agrícola (ARAÚJO e NASS, 2002). Machado et al. (1998) classificaram pelo menos 7 variedades de milho crioulo como tolerantes após avaliação de 36 genótipos em solução completa contendo $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ de alumínio. Nas últimas décadas os melhoristas têm procurado ampliar a base genética dos programas de melhoramento, principalmente devido a catástrofes históricas e/ou surtos epidêmicos ocorridos nas grandes culturas agrícolas no mundo em função da restrição da variabilidade genética. Neste sentido, diversos trabalhos têm sido realizados para caracterizar agronomicamente populações crioulas de milho, visando sua utilização em programas de pré-melhoramento.

Araújo e Nass (2002), avaliando o potencial genético *per se* de populações de milho crioulo do banco de germoplasma do IAPAR, verificaram um grupo que apresentou produtividade em níveis elevados, variando de 75,5 a 86,9% em relação a um híbrido comercial (AG122). Estes valores indicam um excelente desempenho destas populações, considerando que são crioulas e não foram submetidas a nenhum processo de seleção artificial. Fato que ficou evidente quando a produtividade destas foi comparada as variedades melhoradas BR 105 e BR 106, onde as variedades crioulas Cayano Sobrália e Tupy Pita Sopé apresentaram comportamento superior. Embora a grande maioria das variedades crioulas apresentem rendimento de grãos inferior aos híbridos comerciais, elas podem ser consideradas importantes fontes de variabilidade genética para outras características agrônômicas de interesse como: estatura, precocidade e resistência/tolerância aos estresses bióticos ou abióticos. Por outro lado, variedades crioulas com desempenho inferior a 50% em relação à testemunha, limitariam a sua utilização direta pelos programas de melhoramento, onde a busca por genótipos

superiores em produtividade, resistência a pragas e doenças, é bastante competitiva e de custo elevado (NASS e PATERNIANI, 2000).

A baixa utilização do germoplasma de milho crioulo pelos programas de melhoramento da cultura é atribuída principalmente: (1) ausência da caracterização agrônômica dos acessos, (2) redução do valor agrônômico do germoplasma elite e (3) tempo necessário de recombinação/seleção para retornar ao germoplasma elite visando o desenvolvimento de genótipos comerciais. Por outro lado, na presença de genes de interesse específicos, particularmente aqueles associados à tolerância a estresses abióticos, poderiam ser incrementados a incorporação deste germoplasma crioulo através de programas específicos de pré-melhoramento da cultura.

Considerando que a grande maioria dos solos onde as variedades crioulas são cultivadas, são tipicamente ácidos e com elevada saturação por alumínio é esperado que a avaliação da tolerância/sensibilidade de uma amostra de variedades crioulas, oriundas de diferentes locais permita prospectar novas fontes de genes de tolerância ao alumínio possivelmente presentes neste germoplasma tropical de milho.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente foram implantados experimentos com 8 diferentes híbridos de milho com o objetivo de avaliar o tempo de exposição e a dose de alumínio mais adequada para a separação dos genótipos tolerantes dos sensíveis ao elemento. Na sequência, foram instalados experimentos com dose de alumínio e tempo de exposição constantes, objetivando a seleção de fontes de tolerância/sensibilidade numa amostra aleatória de híbridos de diferentes empresas e também da avaliação de uma amostra de variedades crioulas de milho do Banco de Germoplasma da UEPG. Todos os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Genética Molecular e de Sementes da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

3.1. Adequação do método para a seleção de genótipos

Os experimentos visaram adequar um sistema mais simples e eficaz na seleção de genótipos tolerantes/sensíveis ao alumínio baseado na exposição de radículas de milho em solução mínima contendo apenas o alumínio e o cálcio, elemento indispensável para o crescimento radicular.

Para os experimentos de adequação de doses de alumínio e tempo de exposição foram utilizados 8 híbridos, sendo: H 13 e H 14 da empresa Pioneer Sementes; H 22 e H 30 da empresa Syngenta e H 38, H 43, H 44 e H 51 da empresa Dow Agrosiences. As sementes dos híbridos foram colocadas para germinar em papel de germinação esterilizado. Para cada híbrido foram acondicionadas 50 sementes por rolo de germinação num total de 8 rolos por híbrido avaliado. Os rolos permaneceram em câmara de germinação por 3 dias a 24°C e umidade relativa de 100%, período suficiente para que as raízes principais atingissem um comprimento médio de 3,5 a 4,5 cm.

As plântulas dos híbridos foram submetidas a uma solução contendo 40 mg L⁻¹ de Ca²⁺ (CaCl₂) e alumínio nas doses de 0, 2, 4 e 6 mg L⁻¹ na forma de cloreto de alumínio (AlCl₃.6H₂O). O experimento foi implantado no delineamento de blocos casualizados com três repetições. Os tratamentos foram arrançados em esquema de

parcela subdividida, onde nas parcelas estudou-se o efeito de doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 mg L^{-1}) e na subparcela o efeito de híbridos de milho (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51). Para cada híbrido na respectiva dose de Al^{3+} foram avaliadas 12 plântulas por repetição.

Após a seleção das plântulas pré-germinadas foi medido o comprimento inicial da raiz principal (cm) e as mesmas foram imediatamente transferidas para bandejas de isopor com 96 células (12 x 8). A bandeja foi depositada sob a solução contendo a respectiva dose do alumínio em um pote plástico transparente com capacidade de 8 L, onde as raízes ficaram submersas (Figura 1). Neste experimento as raízes permaneceram em solução por 96 h com aeração constante e pH em torno de 4,2. Após 96 h de exposição foi medido novamente o comprimento da raiz principal de todas as plantas nas respectivas doses de Al^{3+} (comprimento após 96 h). Na sequência os potes plásticos contendo a solução tratamento ($\text{Ca}^{2+} + \text{Al}^{3+}$) foram substituídos por outros contendo apenas solução de 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} (CaCl_2). As plântulas permaneceram nesta solução por mais 48 h, com aeração constante e pH próximo de 4,2. Após este período foi realizada a última avaliação do comprimento da raiz principal (comprimento após 48 h).

A partir do comprimento inicial da raiz, do comprimento após 96 h no Al^{3+} e do comprimento após 48 h no Ca^{2+} foram calculados o crescimento radicular líquido (DIF1), crescimento radicular final (DIF2) e seus relativos (DIFR1 e DIFR2), conforme descrito abaixo:

DIF1= comprimento após 96 h no Al^{3+} (cm) – comprimento inicial (cm);

DIF2= comprimento após 48 h no Ca^{2+} (cm) – comprimento inicial (cm);

DIFR1= DIF1/ comprimento inicial (cm);

DIFR2= DIF2/ comprimento inicial (cm).

O segundo experimento foi realizado nas mesmas condições (híbridos, doses de Al^{3+} , tempo de exposição e respectivas avaliações) citadas no primeiro experimento. A realização deste experimento foi motivada pelo baixo rigor adotado na escolha das plântulas dos respectivos híbridos que compuseram os tratamentos

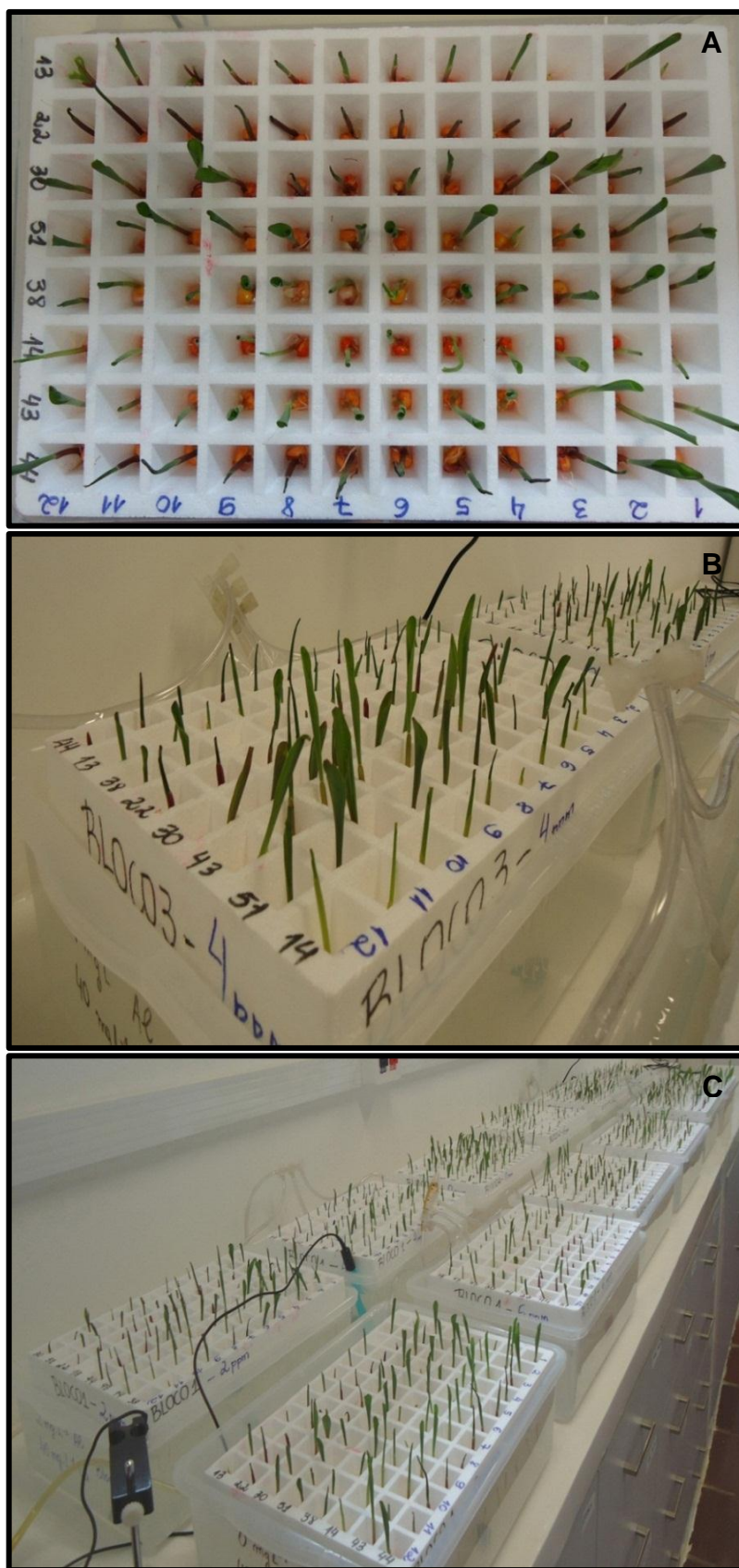


Figura 1. Aspecto visual do experimento de doses de Al^{3+} . **A-** Visualização dos 8 híbridos de milho (horizontal) e as 12 plântulas por repetição (vertical), **B-** Detalhe de uma bandeja (8 x 12) representado a parcela no tratamento de 4 mg L^{-1} de alumínio, **C-** Visão geral do experimento. Ponta Grossa, 2011.

do experimento anterior. Apesar de se tratar de genótipos que apresentam basicamente a mesma composição genética entre indivíduos, diferenças pronunciadas no comprimento inicial da raiz dentro de cada híbrido foram visualizadas. Neste sentido, procurou-se neste ensaio uniformizar o comprimento inicial das raízes dos respectivos híbridos estudados.

O 3º experimento foi concebido com o intuito de estudar o tempo de exposição das raízes na solução contendo o alumínio. O ensaio foi instalado nas mesmas condições (híbridos, doses de Al^{3+} e avaliações) do primeiro e segundo experimentos. A diferença diz respeito ao tempo de exposição ao alumínio das plântulas de milho, com apenas 48 h, seguido das mesmas 48 h na solução contendo apenas 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} .

As variáveis estudadas DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2, dos três experimentos foram submetidas à análise de variância. Para o 1º e 2º experimentos na presença de efeito significativo da interação doses x híbridos procedeu-se o desdobramento das doses do alumínio dentro de cada híbrido estudado, através da análise de regressão, ajustando as equações para o modelo raiz quadrada. O desdobramento dos híbridos dentro das doses foi realizado através do teste de Tukey a 5% de probabilidade para o 1º e 2º experimentos, enquanto que para o 3º experimento a comparação das médias foi realizada através do teste de DMS a 5% de probabilidade. As análises de variância e os testes de médias foram realizados no programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 1999). As análises de regressão foram realizadas no programa SAEG (RIBEIRO JÚNIOR e MELO, 2008).

3.2. Caracterização da tolerância/sensibilidade de híbridos de milho

A partir dos resultados obtidos nos experimentos preliminares, foi possível estabelecer a dose do alumínio e o tempo de exposição mais adequados para a separação dos genótipos tolerantes e sensíveis ao elemento. Visando a prospecção de novas fontes de tolerância ao Al^{3+} dentro de uma amostra aleatória de híbridos comerciais ou pré-comerciais de diferentes empresas de sementes, foram avaliados 52 híbridos, sendo eles: 7 oriundos da Monsanto, 14 da Pioneer Sementes, 14 da Syngenta e 17 híbridos da empresa Dow Agrosiences (Tabela 1).

Para a realização do 4º experimento, as sementes dos 52 híbridos foram colocadas para germinar em papel de germinação esterilizado. Foram utilizadas 50

Tabela 1. Relação dos híbridos comerciais/pré-comerciais de milho de diferentes empresas produtoras de sementes. Ponta Grossa, 2011.

Híbrido *	Tipo	Condição	Empresa
H 1	Duplo	Comercial	Monsanto
H 2	Triplo	Comercial	
H 3	Simples	Comercial	
H 4	Simples	Comercial	
H 5	Simples	Comercial	
H 6	Simples	Comercial	
H 7	Duplo	Comercial	
H 8	Simples	Comercial	Pioneer Sementes
H 9	Triplo	Comercial	
H 10	Simples	Comercial	
H 11	Triplo	Comercial	
H 12	Simples	Comercial	
H 13	Simples	Comercial	
H 14	Simples	Comercial	
H 15	Simples	Comercial	
H 16	Simples	Comercial	
H 17	Simples	Comercial	
H 18	Simples	Comercial	
H 19	Triplo	Comercial	
H 20	Triplo	Comercial	
H 21	Simples	Comercial	
H 22	Simples	Pré-comercial	Syngenta
H 23	Simples	Pré-comercial	
H 24	Simples	Pré-comercial	
H 25	Simples	Comercial	
H 26	Simples	Pré-comercial	
H 27	Simples	Comercial	
H 28	Simples	Pré-comercial	
H 29	Simples	Pré-comercial	
H 30	Simples	Pré-comercial	
H 31	Simples	Comercial	
H 32	Simples	Pré-comercial	
H 33	Simples	Pré-comercial	
H 34	Simples	Pré-comercial	
H 35	Simples	Comercial	
H 36	Simples	Comercial	Dow Agrosiences
H 37	Simples	Comercial	
H 38	Simples	Comercial	
H 39	Triplo	Comercial	
H 40	Triplo	Comercial	
H 41	Simples	Comercial	
H 42	Simples	Comercial	
H 43	Simples	Comercial	
H 44	Simples modificado	Comercial	
H 45	Simples	Comercial	
H 46	Simples	Comercial	
H 47	Simples modificado	Comercial	
H 48	Triplo	Comercial	
H 49	Simples	Comercial	
H 50	Triplo	Comercial	
H 51	Simples	Comercial	
H 52	Simples	Comercial	

*Os nomes dos híbridos das diferentes empresas foram codificados com a letra maiúscula H seguido de uma numeração sequencial.

sementes por rolo de germinação e 6 rolos por híbrido. Estes permaneceram em câmara de germinação por aproximadamente 3 dias a 24°C e 100% de umidade relativa, período suficiente para que as raízes principais atingissem um comprimento médio de 3,5 a 4,5 cm.

O experimento foi instalado no delineamento de blocos casualizados com três repetições. Os tratamentos foram constituídos por 52 híbridos (Tabela 1). Após rigorosa seleção das plântulas foi medido o comprimento inicial da raiz principal (cm) e as mesmas foram imediatamente transferidas para a solução mínima contendo o alumínio. As plântulas foram acondicionadas em bandejas de isopor com 288 células (12 x 24). Cada linha da bandeja (12 células) representou as 12 plântulas avaliadas por repetição em cada híbrido. As bandejas foram dispostas em tanque de fibra de vidro medindo 2,1 m x 0,9 m x 0,25 m, com volume de 280 litros da solução tratamento (Figura 2). A solução tratamento foi composta de água deionizada, 4 mg L⁻¹ de alumínio (AlCl₃.6H₂O) e 40 mg L⁻¹ de cálcio (CaCl₂).

As raízes permaneceram submersas na solução por 48 h com aeração constante e pH em torno de 4,2. Após este período de exposição foi avaliado novamente o comprimento da raiz principal em cm. As bandejas foram submetidas a outro tanque com as mesmas dimensões e capacidade, porém contendo solução com apenas 40 mg L⁻¹ de cálcio. Da mesma forma, a solução foi mantida com aeração constante e o pH em torno de 4,2. Após 48 h na solução de cálcio, as raízes das plântulas foram submetidas a avaliação do comprimento final em cm (comprimento após 48 h no Ca²⁺). As variáveis analisadas neste experimento foram o DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2. Calculou-se ainda o Índice de Tolerância Relativo ao alumínio (ITR_{Al}) pela expressão adaptada de Camargo et al. (1991) sendo:

$$ITR_{Al} = \left[\frac{(DIF_X - DIF_S)}{(DIF_T - DIF_S)} \times 4,0 \right] + 1,0$$

Onde:

DIF_X = dados de DIF obtidos para cada híbrido;

DIF_S = dados de DIF obtido no controle sensível;

DIF_T = dados de DIF obtido no controle tolerante.

Dessa forma, os controles sensível e tolerante assumem valores de ITR_{Al} iguais a 1,0 e 5,0, respectivamente.

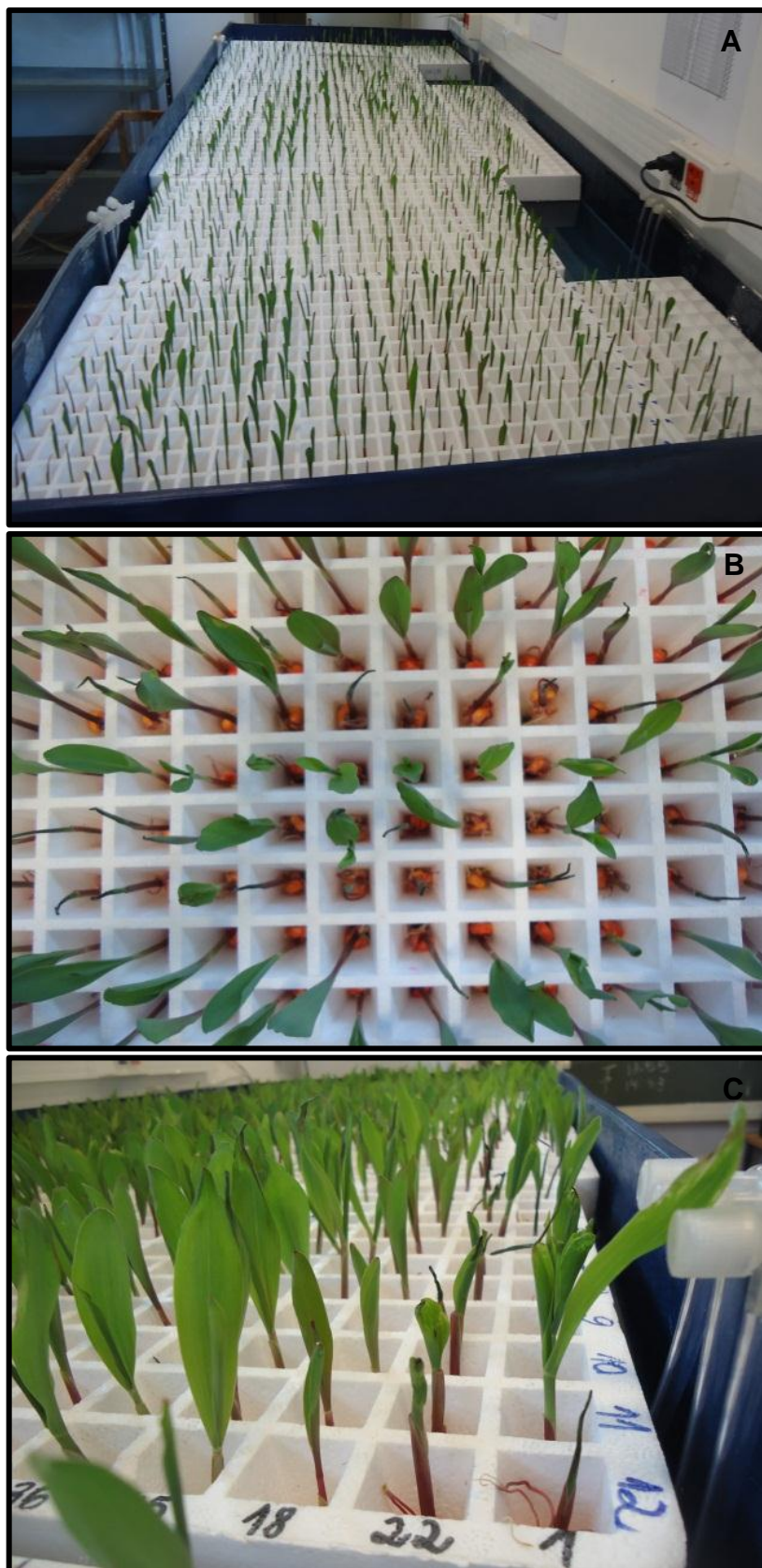


Figura 2. Visualização do experimento de tanque com 4 mg L^{-1} de Al^{3+} + 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} . **A-** Visão geral do experimento. **B-** Detalhe de parte de uma bandeja contendo as plântulas dos híbridos. **C-** Amostra de alguns híbridos de milho e suas respectivas plântulas na repetição. Ponta Grossa, 2011.

O 5º experimento foi realizado com a mesma metodologia (híbridos, dose e avaliações) adotada no experimento anterior, porém com alteração no período de exposição das raízes na solução tratamento (Al^{3+}) de 48 h para 96 h. Esta hipótese foi levantada no sentido de confirmar o ranqueamento dos híbridos previamente expostos ao Al^{3+} por 48 h e verificar uma possível resposta de tolerância em parte destes híbridos quando expostos ao elemento por um período mais prolongado.

3.3. Caracterização da tolerância/sensibilidade de variedades crioulas de milho

O 6º experimento visou avaliar a tolerância/sensibilidade ao alumínio numa amostra aleatória de variedades crioulas do banco de germoplasma da UEPG (Tabela 2). Estas variedades foram obtidas através de parcerias entre a UEPG e centros de pesquisa pública como: FEPAGRO – Veranópolis / RS, EMBRAPA – CPACT – Pelotas / RS, associações de pequenos produtores rurais nos municípios de Ponta Grossa e Rio Azul, no estado do Paraná e do município de Muqui no estado do Espírito Santo.

Neste experimento foram utilizados 2 híbridos como tratamentos testemunhas. Os híbridos H 44 (Dow Agrosiences) como padrão de tolerância e os híbridos H 22 (Syngenta) como padrão de sensibilidade. As sementes das variedades crioulas passaram por um processo de desinfestação superficial, no qual foram rinsadas em álcool 70% por 40 segundos, seguido da imersão em solução de hipoclorito de sódio (5%) por 60 segundos e uma sequência final de três lavagens em água deionizada esterilizada. As sementes foram colocadas para germinar em papel de germinação esterilizado. Foram utilizadas 50 sementes por rolo de germinação e 8 rolos por variedade. Estes permaneceram em câmara de germinação por aproximadamente 3 dias com temperatura de 24°C e umidade relativa de 100%, período suficiente para que as raízes atingissem um comprimento médio de 3,5 a 4,5 cm.

O experimento foi instalado no delineamento de blocos casualizados com três repetições. Os tratamentos foram constituídos de 50 variedades crioulas mais 2 híbridos como testemunhas, totalizando 52 tratamentos. Após a seleção das plântulas foi medido o comprimento inicial da raiz principal (cm) e as mesmas foram

Tabela 2. Relação das variedades crioulas de milho do banco de germoplasma da UEPG com os respectivos locais de coleta. Ponta Grossa, 2011.

Tratamento	Variedade Crioula	Local de coleta
V 1	Caiano FE 121	Tenente Portela – RS
V 2	Pintadinho FE 109	Canela – RS
V 3	Catete Amarelo	Canguçu – RS
V 4	Cunha	Ibarama – RS
V 5	Roxo Índio I	Canguçu – RS
V 6	Dente de Ouro 2	Pelotas – RS
V 7	Branco Dentado	Canguçu – RS
V 8	Argentino FE128	Alto União – RS
V 9	Cinquentinha	Ibarama – RS
V 10	Roxo Índio II	Canguçu – RS
V 11	Caiano Rajado	Canguçu – RS
V 12	BR 451	Pelotas – RS
V 13	Argentino Flint	Canguçu – RS
V 14	Pop.5 (CNMS 5)	Pelotas – RS
V 15	Dente de Ouro	Canguçu – RS
V 16	Branco Duro Canguçu	Pelotas – RS
V 17	Colonial	Pelotas – RS
V 18	Crioulo Rosa	Veranópolis – RS
V 19	Crioulo Rajado	Veranópolis – RS
V 20	Branco Oito Carreiras	Veranópolis – RS
V 21	Crioulo	Veranópolis – RS
V 22	Crioulo Riscado	Veranópolis – RS
V 23	Crioulo Sabugo Fino	Veranópolis – RS
V 24	Sabuguinho Cabo Roxo	Veranópolis – RS
V 25	RS-22	Veranópolis – RS
V 26	Crioulo Veranópolis	Veranópolis – RS
V 27	Crioulo Palha Roxa	Veranópolis – RS
V 28	Crioulo Asteca	Veranópolis – RS
V 29	Crioulo Cunha Roxo	Veranópolis – RS
V 30	IPR-119	Londrina – PR
V 31	Milho Caiano	Ponta Grossa – PR
V 32	Milho Branco	Ponta Grossa – PR
V 33	Cravinho	Rio Azul
V 34	Milho Paiol	Ponta Grossa – PR
V 35	Milho Carioca	Rio Azul – PR
V 36	Milho Amarelo Antigo	Rio Azul – PR
V 37	Milho Encantado	Rio Azul – PR
V 38	Asteca	Rio Azul – PR
V 39	Nutricional	Rio Azul – PR
V 40	Milho Branco	Rio Azul – PR
V 41	Caiano	Rio Azul – PR
V 42	Milho Palha Roxa	Rio Azul – PR
V 43	Milho Pérola	Rio Azul – PR
V 44	Milho Mistura	Rio Azul – PR
V 45	Carioca	Rio Azul – PR
V 46	Milho Branco para Palha	Rio Azul – PR
V 47	Milho Amarelo Antigo	Rio Azul – PR
V 48	Milho Palha Roxa	Rio Azul – PR
V 49	Eldorado	Muqui – ES
V 50	Fortaleza	Muqui – ES

imediatamente transferidas para bandejas de isopor com 288 células (12 x 24). Cada linha da bandeja (12 células) representou as 12 plântulas avaliadas em cada repetição por tratamento. As bandejas foram dispostas em tanque de fibra de vidro (2,1 x 0,9 x 0,25 m), com volume de 280 litros da solução tratamento (4 mg L⁻¹ de Al³⁺ e 40 mg L⁻¹ Ca²⁺).

As raízes permaneceram submersas na solução por 48 h com aeração constante e pH em torno de 4,2. Após este período de exposição foi avaliado novamente o comprimento da raiz principal em cm. As bandejas foram submetidas a outro tanque com as mesmas dimensões e capacidade, porém contendo apenas solução mínima com 40 mg L⁻¹ de cálcio. As plântulas permaneceram por 48 h quando foi realizada a última avaliação do comprimento da raiz principal em cm (comprimento após 48 h Ca²⁺). As variáveis analisadas foram DIF1, DIF2, DIFR1, DIFR2 e ITR_{Al}.

Os dados coletados de todas as variáveis foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos submetidos a análise de agrupamento de Scott & Knott a 5% de probabilidade através do programa SASM-Agri versão 8.2 (CANTERI et al., 2001).

3.4. Estimativas de parâmetros genéticos para a tolerância ao Al³⁺ em milho

Para as variáveis estudadas DIF1, DIF2, DIFR1, DIFR2 nos respectivos experimentos (híbridos e variedades crioulas), foram estimados os parâmetros genéticos através da esperança matemática dos quadrados médios da análise de variância de acordo com Vencovsky e Barriga (1992).

A estimativa da variância genética foi obtida por: $\hat{\sigma}^2g = 1/r(QMt - QMe)$, sendo (r) o número de repetições, (QMt) o quadrado médio de híbridos ou variedades crioulas e (QMe) o quadrado médio do erro, obtidos através da análise de variância. A variância ambiental foi calculada através: $\hat{\sigma}^2e = QMe$. A herdabilidade no sentido amplo foi estimada através: $\hat{h}^2 = \frac{\hat{\sigma}^2g}{[\hat{\sigma}^2g + (\hat{\sigma}^2e/r)]}$. O desvio padrão da variância genética foi calculado por: $dp_{vg} = \sqrt{\hat{\sigma}^2g}$. Além disto, foram estimados o coeficiente de variação genética: $CV_g = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}^2g}}{Y_0} \cdot 100$, o coeficiente de

variação do erro experimental: $CV_e = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}^2_e}}{Y_0} \cdot 100$, sendo Y_0 a média geral da variável e o quociente $\hat{b} = \frac{CV_g}{CV_e}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários métodos para a avaliação da tolerância ao alumínio em plantas têm sido desenvolvidos, principalmente aqueles baseados em solução nutritiva completa. Além da facilidade na condução e avaliação de um grande número de genótipos, este tipo de metodologia evita a interferência de fatores não controláveis do solo. A composição ideal da solução nutritiva tem sido objeto de estudo de diversos trabalhos (CAMARGO e OLIVEIRA, 1981; CAMARGO, 1985; CAMARGO e FELÍCIO, 1987; CAMBRAIA et al., 1991; CAMBRAIA e CAMBRAIA, 1995; MAZZOCATO et al., 2002; SPHEAR e SOUZA, 2004; CONCEIÇÃO, 2006; MARTINS et al., 2006). A grande maioria dos trabalhos de tolerância ao Al^{3+} : Magnavaca (1982); Furlani e Furlani (1988); Cambraia et al. (1991); Cambraia e Cambraia (1995); Brondani e Paiva (1996); Martins et al. (1999); Giaveno e Miranda Filho (2000); Prioli et al. (2000); Alves et al. (2004); Andrade Júnior et al. (2005); Maron et al. (2008) são baseados em adaptações da solução nutritiva completa de Clark (1975).

Nos últimos anos, alguns autores têm proposto a utilização de solução mínima (alumínio + cálcio) para a caracterização de genótipos (MAZZOCATO et al., 2002; CONCEIÇÃO, 2006; CONCEIÇÃO et al., 2009). Além da complexidade no preparo da solução nutritiva completa, existe a possibilidade da complexação do Al^{3+} com outros elementos fazendo com que este não esteja disponível na concentração desejada. O ajuste adequado do Ca^{2+} na solução mínima é de extrema importância, já que este elemento é indispensável para o crescimento radicular. O Al^{3+} e o Ca^{2+} tem como ação comum a membrana plasmática, sendo que o aumento na concentração de um afeta a intensidade e os efeitos do outro. A realização de diferentes experimentos de doses de alumínio e tempo de exposição permitiram adequar a metodologia de solução mínima visando melhorar a eficiência na seleção de genótipos tolerantes e sensíveis ao elemento. Particularmente, as variáveis

analisadas (DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2) foram eficientes na separação e classificação de diferentes germoplasmas de milho com relação a tolerância ao alumínio em solução.

4.1. Adequação do método para a seleção de genótipos

Os resultados das análises de variância do 1° e 2° experimentos, evidenciaram efeito significativo ($Pr < 0,01$) para as fontes de variação dose, híbrido e da interação híbrido x dose para as variáveis DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2 (Tabelas 3 e 4).

No 1° experimento, os coeficientes de variação na parcela oscilaram de 26,3 (DIF2) a 42,3% (DIFR1) e na subparcela de 7,1 (DIF1) a 17,4% (DIFR2) (Tabela 3). A maior magnitude e amplitude de variação observada na parcela pode ser atribuída a desuniformidade no comprimento inicial das raízes no momento da instalação do experimento.

Tabela 3. Resumo da análise de variância do 1° experimento para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função das doses de alumínio, híbridos de milho e da interação híbridos x doses. Ponta Grossa, 2011.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrado Médio (Q.M.)			
		DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
Blocos	2	1,60	2,21	0,17	0,29
Doses	3	531,24 **	1429,46 **	24,31 **	66,30 **
Resíduo (a)	6	1,50	2,22	0,14	0,24
Híbridos	7	0,68 **	2,17 **	0,11 **	0,34 **
Híbridos x Doses	21	0,91 **	2,99 **	0,08 **	0,29 **
Resíduo (b)	56	0,08	0,19	0,02	0,04
Desdobramento					
Dose 0	7	2,76 **	10,39 **	0,30 **	1,17 **
Dose 2	7	0,23 *	0,34	0,02	0,02
Dose 4	7	0,28 **	0,30	0,014	0,010
Dose 6	7	0,13	0,11	0,010	0,009
CV _{parcela} (%)		30,6	26,3	42,3	39,5
CV _{subparcela} (%)		7,1	7,7	15,4	17,4
Média		4,00	5,67	0,88	1,24

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

O mesmo comportamento foi observado por Mazzocato et al. (2002), onde diferenças de germinação entre os híbridos avaliados resultaram em coeficientes de variação bastante elevados. Os autores propuseram para reduzir a desuniformidade, a utilização de maior número de sementes na germinação e seleção mais criteriosa das plântulas para a composição das repetições dos tratamentos. Estas medidas foram adotadas na realização do 2º experimento, as quais ocasionaram uma certa redução na magnitude e na amplitude dos coeficientes. Para parcela os valores do CV variaram de 11,0 (DIFR2) a 31,2% (DIFR1) e na subparcela de 14,6 (DIF2) a 29,2% (DIF1) (Tabela 4). De acordo com Scapim et al. (1995) os valores de CV obtidos neste experimento estariam adequados para experimentos desta natureza.

O desdobramento da interação doses de Al^{3+} dentro de cada híbrido de milho, no 1º experimento, demonstrou queda drástica no crescimento radicular de todos os híbridos avaliados com o aumento das doses de alumínio, com ajuste adequado ao modelo da regressão raiz quadrada ($R^2 = 0,99$), para todas as variáveis DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2 (Figuras 3, 4, 5, e 6). Com apenas 2 mg L^{-1} de Al^{3+} na solução mínima o sistema radicular sofre acentuada redução. Esta tendência de queda, porém em menor magnitude, foi observada para todos os híbridos até a dose de 4 mg L^{-1} , a partir da qual os efeitos prejudiciais do elemento são tão evidentes que praticamente paralisaram o crescimento do sistema radicular das plântulas. A avaliação dos híbridos de milho para a variável DIF1 demonstrou o crescimento radicular líquido depois da exposição por 96 h ao Al^{3+} nas respectivas doses. Por outro lado, o DIF2 representou o crescimento radicular final dos híbridos após 48 h em solução mínima contendo apenas 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} . De maneira geral, a análise gráfica do desdobramento de cada híbrido nas respectivas doses de Al^{3+} , demonstrou comportamento muito similar para o crescimento líquido e para o crescimento radicular final (Figuras 3 e 4), bem como para seus valores relativos (Figuras 5 e 6).

A partição da interação híbridos de milho dentro de cada dose de alumínio demonstrou diferenças significativas ($Pr < 0,01$) entre os híbridos nas doses 0 e 4 mg L^{-1} e diferenças significativas ($Pr < 0,05$) na dose 2 mg L^{-1} para a variável DIF1. Para as variáveis DIF2, DIFR1 e DIFR2 a análise demonstrou diferenças significativas entre os híbridos apenas na dose 0 (Tabela 3).

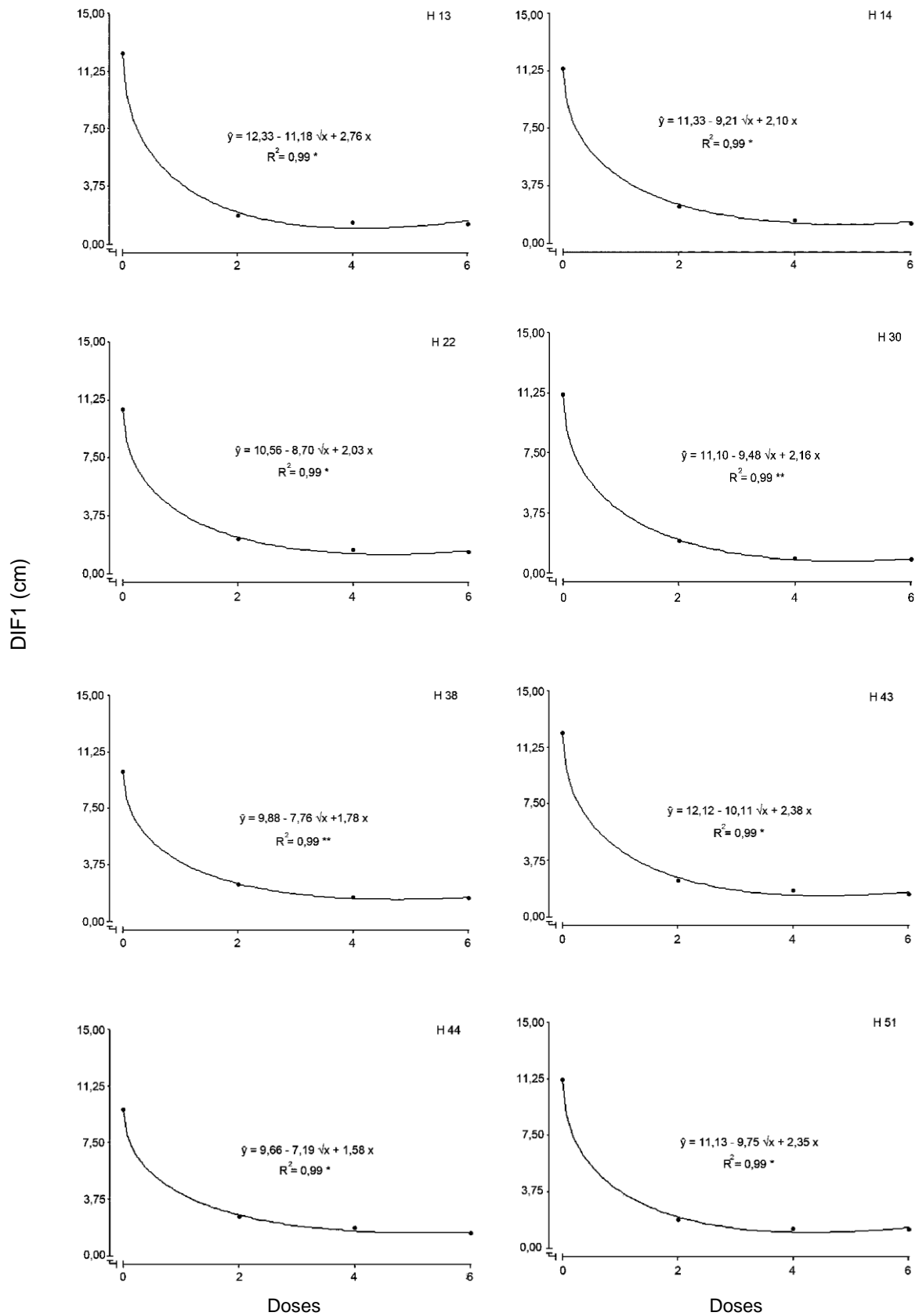


Figura 3. Efeito do descalcramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 mg L⁻¹) em cada híbrido através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF1 (1º experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.

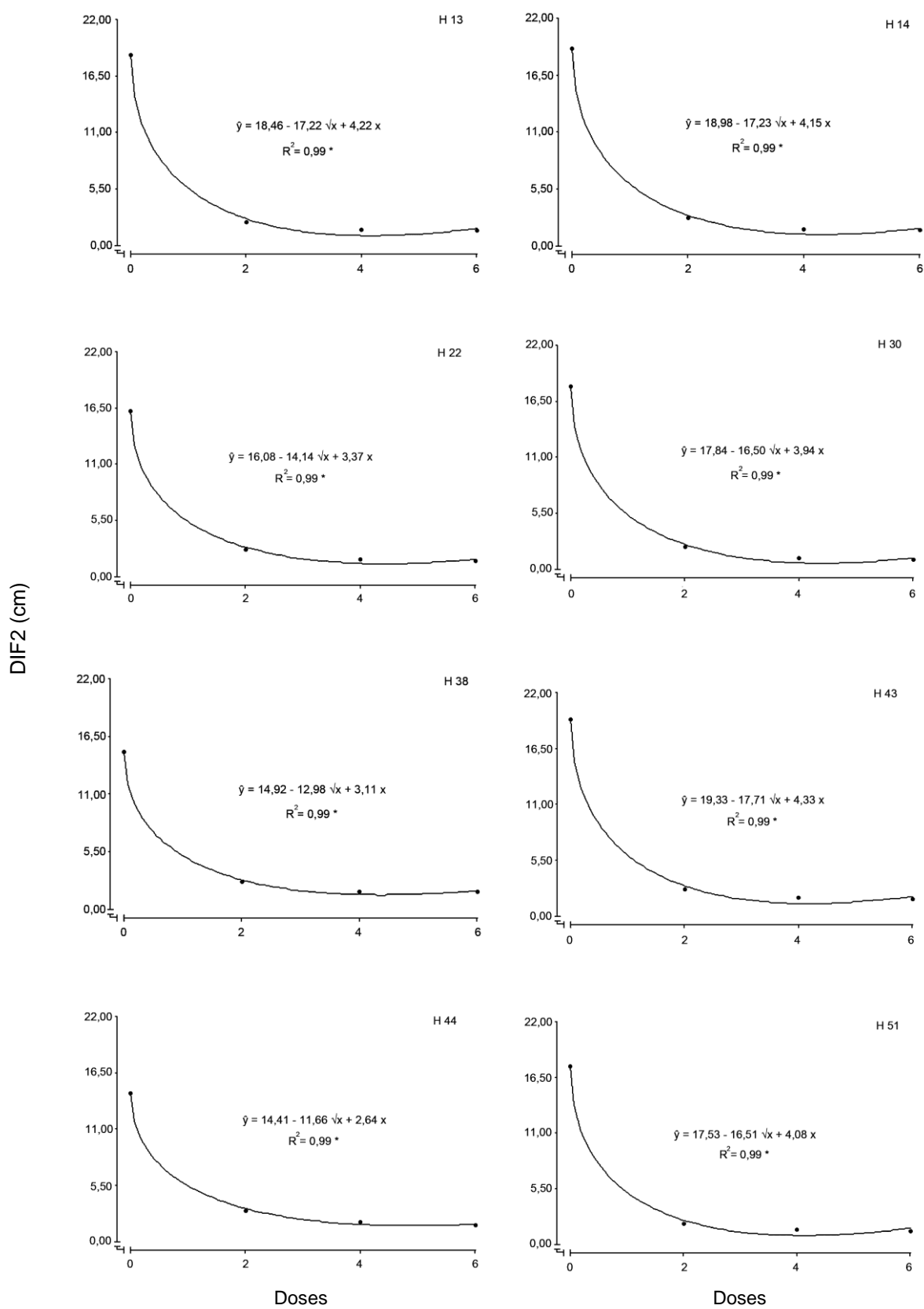


Figura 4. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF2 (1° experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.

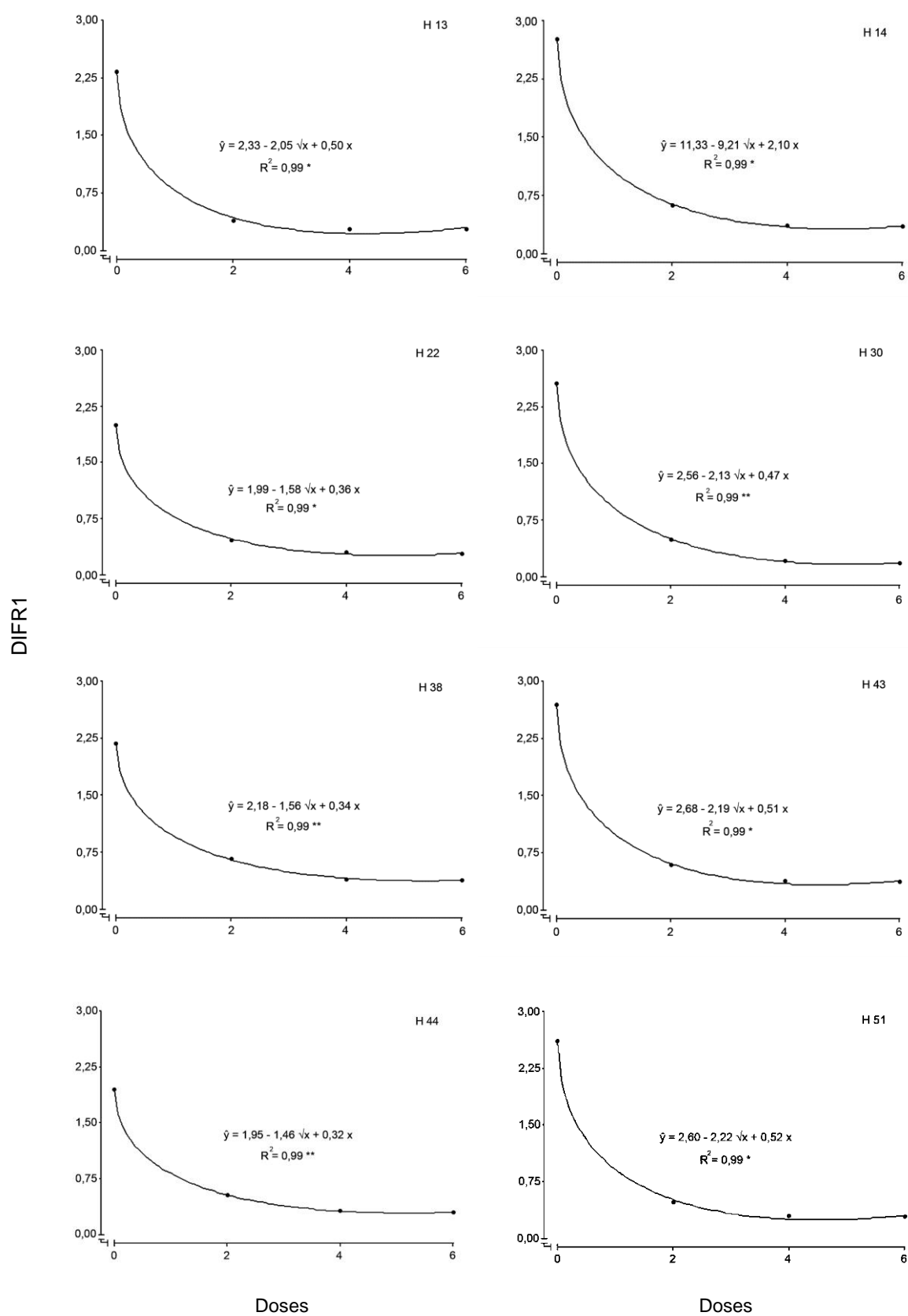


Figura 5. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR1 (1° experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.

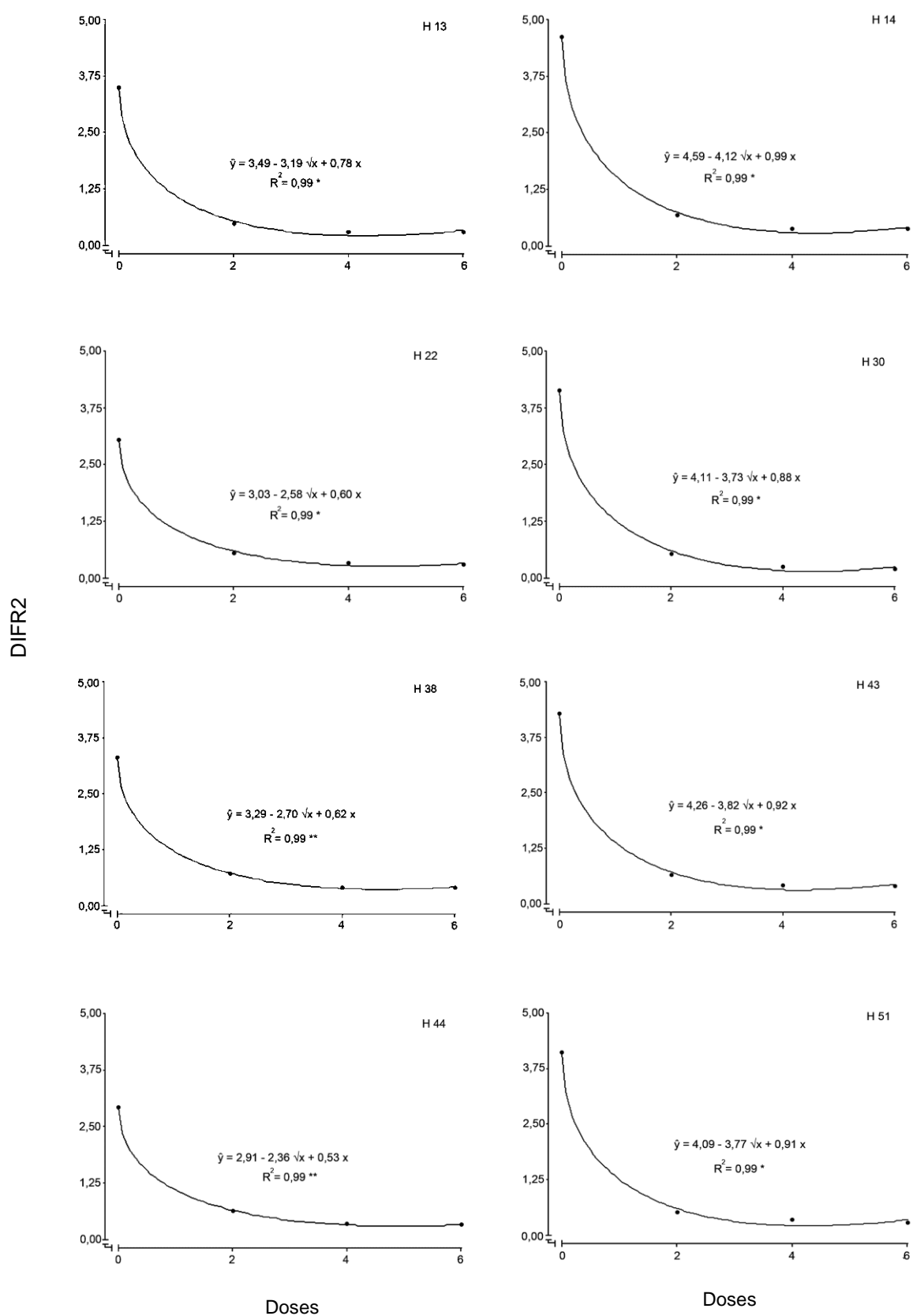


Figura 6. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR2 (1° experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.

Para a variável DIF1 a análise das médias evidenciou grande variação no crescimento radicular entre os híbridos analisados na ausência do Al^{3+} . O menor crescimento na dose 0 foi observado nos híbridos H 44 e H 38 com 9,68 e 9,89 cm de comprimento radicular, respectivamente. Por outro lado, os híbridos H 13 e H 43 apresentaram maior comprimento radicular com 12,36 e 12,14 cm, respectivamente (Figura 7-A). As diferenças de crescimento observadas nesta dose possivelmente estejam associadas ao vigor inicial existente entre os híbridos.

Ainda, com relação à DIF1, na dose de 2 mg L⁻¹ o crescimento radicular variou de 1,81 no H 13 a 2,64 cm no H 44, os quais diferiram estatisticamente entre si, não diferindo dos demais híbridos. Ao observar a dose de 4 mg L⁻¹, o híbrido que teve o crescimento radicular mais afetado foi o H 30 com apenas 0,83 cm de DIF1. Nesta mesma dose, os híbridos H 44, H 43 e H 38 destacaram-se com crescimento radicular de 1,82, 1,73 e 1,57 cm, respectivamente, porém não diferiram estatisticamente de H 13, H 14 e H 22 (Figura 7-A).

A ausência de diferenças significativas no crescimento radicular entre os híbridos de milho quando expostos a dose de 6 mg L⁻¹, possivelmente esteja associada a alta toxidez provocada pela elevada concentração do alumínio em solução. A interferência no crescimento radicular causada pelo Al^{3+} afetou inclusive aqueles híbridos (H 38, H 43 e H 44) que apresentaram comportamento tolerante nas doses mais baixas. A mesma tendência foi observada por Cambraia et al. (1991) ao testar dois cultivares de sorgo em solução nutritiva contendo Al^{3+} nas doses 2, 4, 6, 8 e 10 ppm. Os autores relataram que a partir de 6 ppm as diferenças entre as cultivares sensíveis e tolerantes tenderam a desaparecer, enfatizando a importância da escolha correta da concentração de alumínio, para maximizar o diferencial de resposta a este elemento.

O crescimento radicular final (DIF2) variou de 14,43 no H 44 a 19,37 cm no H 43 na dose 0 (Figura 7-B). Para o DIFR1, nesta mesma dose, observou-se que o híbrido com o maior crescimento radicular foi o H 14 com 2,75, equivalente a 275% de crescimento em relação ao comprimento inicial. Por outro lado, o híbrido H 44 cresceu apenas 199% (Figura 7-C). Para o crescimento relativo final (DIFR2) houve variação de 291% (H 44) a 460% (H 14) em relação ao comprimento radicular inicial (Figura 7-D).

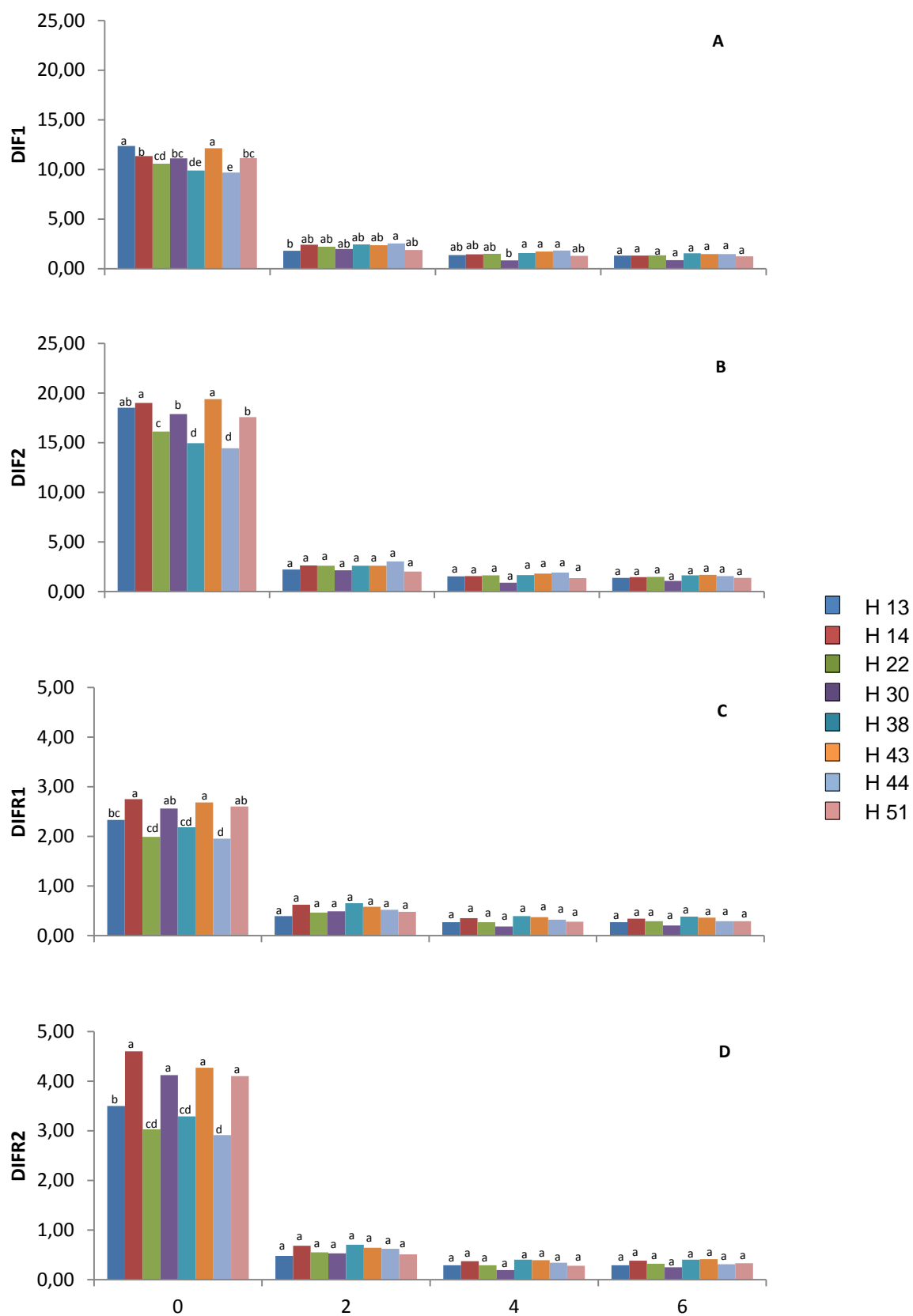


Figura 7. Efeito do desdobramento dos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51) nas respectivas doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$). **A** - DIF1 (crescimento radicular líquido), **B** - DIF2 (crescimento radicular final), **C** - DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e **D** - DIFR2 (crescimento radicular final relativo); (1° experimento). Ponta Grossa, 2011. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Observa-se que o sistema radicular do híbrido H 43 apresentou alto vigor quando exposto a solução mínima na ausência de Al^{3+} , estando ranqueado entre os genótipos superiores em todas as variáveis analisadas. Por outro lado, o híbrido H 44 apresentou menor vigor quando comparado aos demais híbridos nesta mesma dose para DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2. Entretanto, quando exposto nas doses 2 e 4 $mg L^{-1}$ (DIF1), destacou-se com maior crescimento radicular. Possivelmente, este comportamento seja explicado pela presença de genes de tolerância neste genótipo. Embora este crescimento não tenha sido visualizado para as demais variáveis nas respectivas doses do 1º experimento.

O 2º experimento apresentou resultados bastante semelhantes. As fontes de variação doses e a interação híbridos x doses revelaram diferenças significativas ($Pr < 0,01$) para todas as variáveis analisadas. Da mesma forma para a fonte de variação híbridos nas variáveis DIF2, DIFR1 e DIFR2. Apenas para a variável DIF1 a análise demonstrou diferenças significativas numa probabilidade mais elevada a 5% (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância do 2º experimento para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função das doses de alumínio, híbridos de milho e da interação híbridos x doses. Ponta Grossa, 2011.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrado Médio (Q.M.)			
		DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
Blocos	2	1,60	1,26	0,36	0,17
Doses	3	1179,93 **	2358,01 **	68,04 **	138,54 **
Resíduo (a)	6	1,80	1,36	0,22	0,04
Híbridos	7	7,61 *	8,35 **	0,57 **	1,01 **
Híbridos x Doses	21	8,39 **	7,23 **	0,46 **	0,64 **
Resíduo (b)	56	3,40	1,33	0,09	0,12
Desdobramento					
Dose 0	7	30,55 **	27,28 **	1,76 **	2,72 **
Dose 2	7	0,81	1,43	0,07	0,10
Dose 4	7	1,04	0,90	0,08	0,07
Dose 6	7	0,39	0,43	0,039	0,04
$CV_{parcela}$ (%)		21,2	14,7	31,2	11,0
$CV_{subparcela}$ (%)		29,2	14,6	20,2	18,1
Média		6,32	7,91	1,50	1,89

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

As Figuras 8, 9, 10 e 11 representam os resultados do desdobramento das doses de Al^{3+} dentro de cada híbrido analisado. O comportamento dos 8 híbridos foi bastante similar ao observado no 1º experimento, verificando-se decréscimo acentuado no crescimento radicular a medida que a concentração de alumínio aumentou. Da mesma forma, o modelo de regressão raiz quadrada explicou este comportamento com coeficiente de determinação de 99%, sendo possível observar as maiores quedas no crescimento radicular até a dose de 4 mg L^{-1} , a partir da qual verificou-se uma tendência de paralização do crescimento radicular na presença do elemento.

O desdobramento da interação híbridos de milho dentro das respectivas doses de alumínio evidenciou a ausência de diferenças significativas entre os híbridos nas doses 2, 4 e 6 mg L^{-1} para todas as variáveis analisadas. Da mesma forma que no 1º experimento diferenças significativas ($\text{Pr} < 0,01$) foram reveladas apenas na dose 0 (Tabela 4). De maneira geral, houve grande variação no crescimento radicular dos híbridos na ausência do Al^{3+} . Para a variável DIF1 o híbrido H 22 atingiu crescimento máximo de 21,19 cm (Figura 12-A). Os híbridos H 43 apresentou maior crescimento radicular final (DIF2) com 27,84 cm, não diferindo estatisticamente de H 30 (Figura 12-B). Quando observado o crescimento relativo verificou-se que os híbridos H 14 com DIFR1 de 5,57 ou 537% e H 38 de 2,94 ou 294% apresentaram maior e menor crescimento, respectivamente, em relação ao comprimento inicial (Figura 12-C). Para o crescimento relativo final o híbrido H 14 destacou-se em relação aos demais genótipos com 689% em relação ao comprimento inicial diferindo estatisticamente de H 13, H 22, H 38, H 44 e H 51 (Figura 12-D). As diferenças apresentadas entre os híbridos para todas as variáveis analisadas nesta dose são decorrentes das diferenças no vigor inicial das sementes para cada híbrido.

A tendência observada neste experimento confirmam os resultados do 1º experimento. Em ambos os ensaios verificou-se que a partir da dose 4 mg L^{-1} a inibição causada pelo Al^{3+} no crescimento radicular tende a atingir um patamar, não sendo necessário a utilização de doses maiores para a discriminação dos genótipos. Porém, para a maioria das variáveis analisadas não foram observadas diferenças significativas entre os genótipos nesta dose, exceto para a variável DIF1 no 1º experimento. Provavelmente, o período de 96 h de exposição ao alumínio, ao qual os híbridos foram submetidos, foi muito prolongado. Alguns autores têm observado

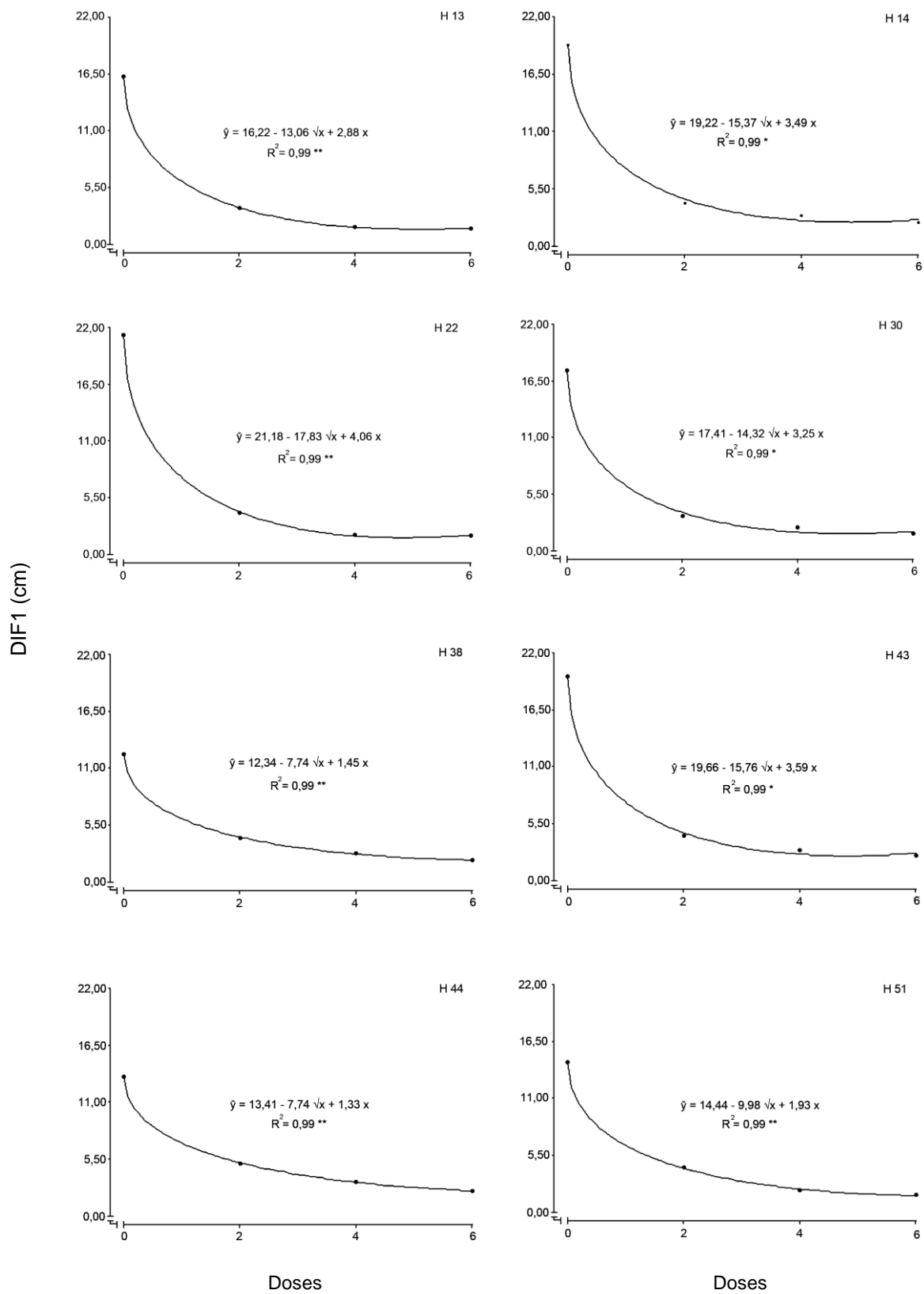


Figura 8. Efeito do desdobramento das doses de Al³⁺ (0, 2, 4 e 6 mg L⁻¹) em cada híbrido, através do modelo de regressão raiz quadrada para a variável DIF1 (2º experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.

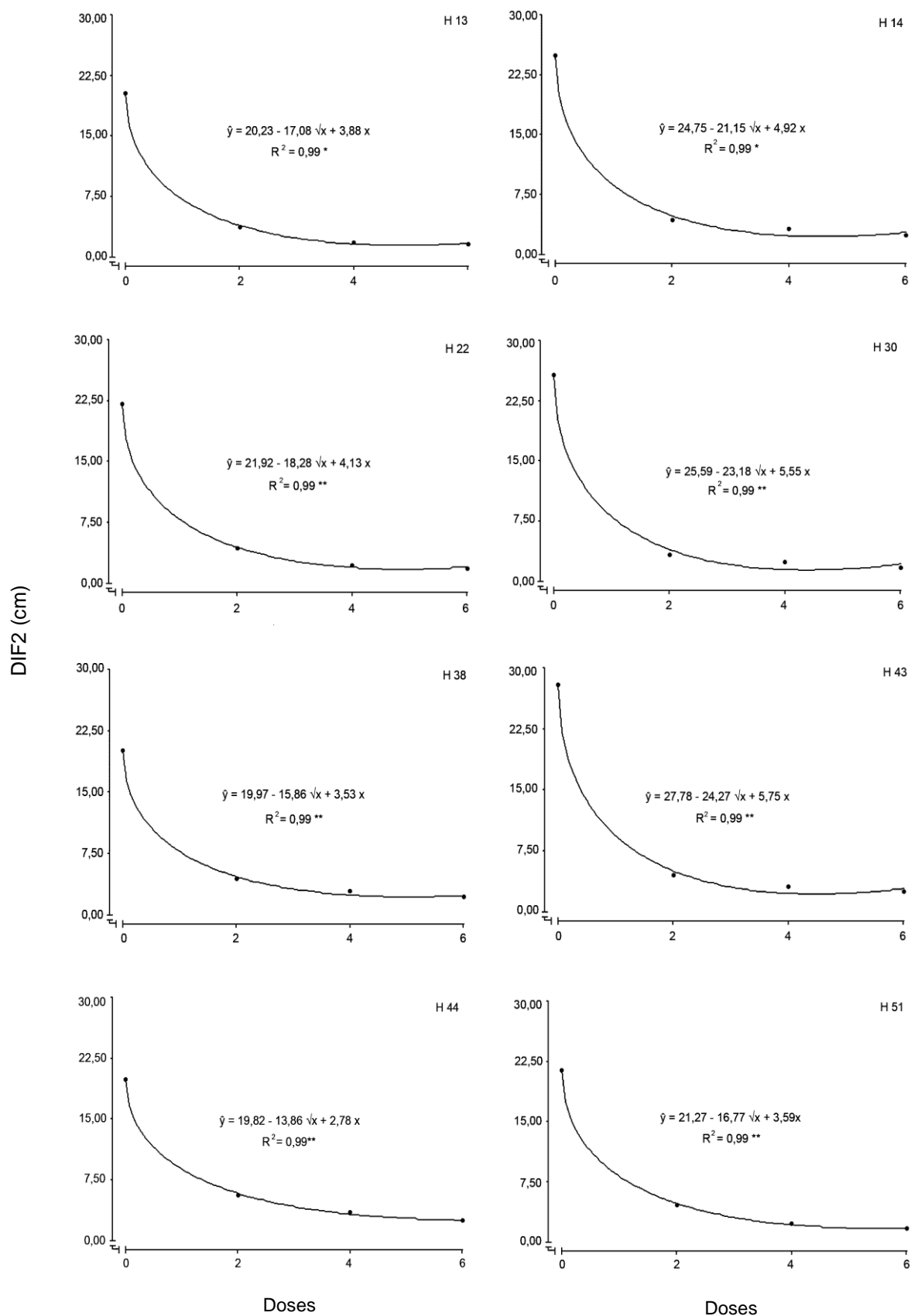


Figura 9. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 mg L⁻¹) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF2 (2º experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.

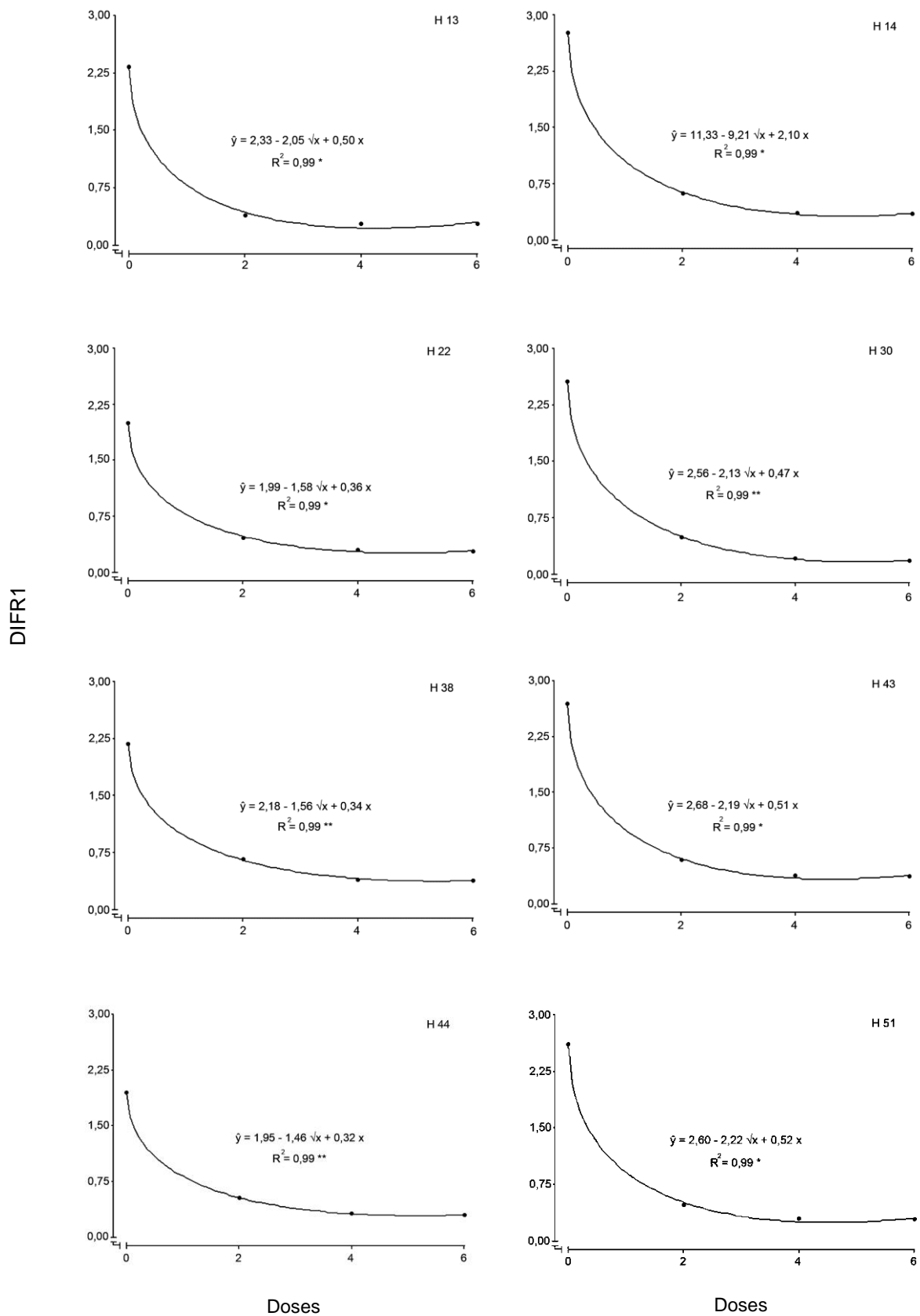


Figura 10. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR1 (2º experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.

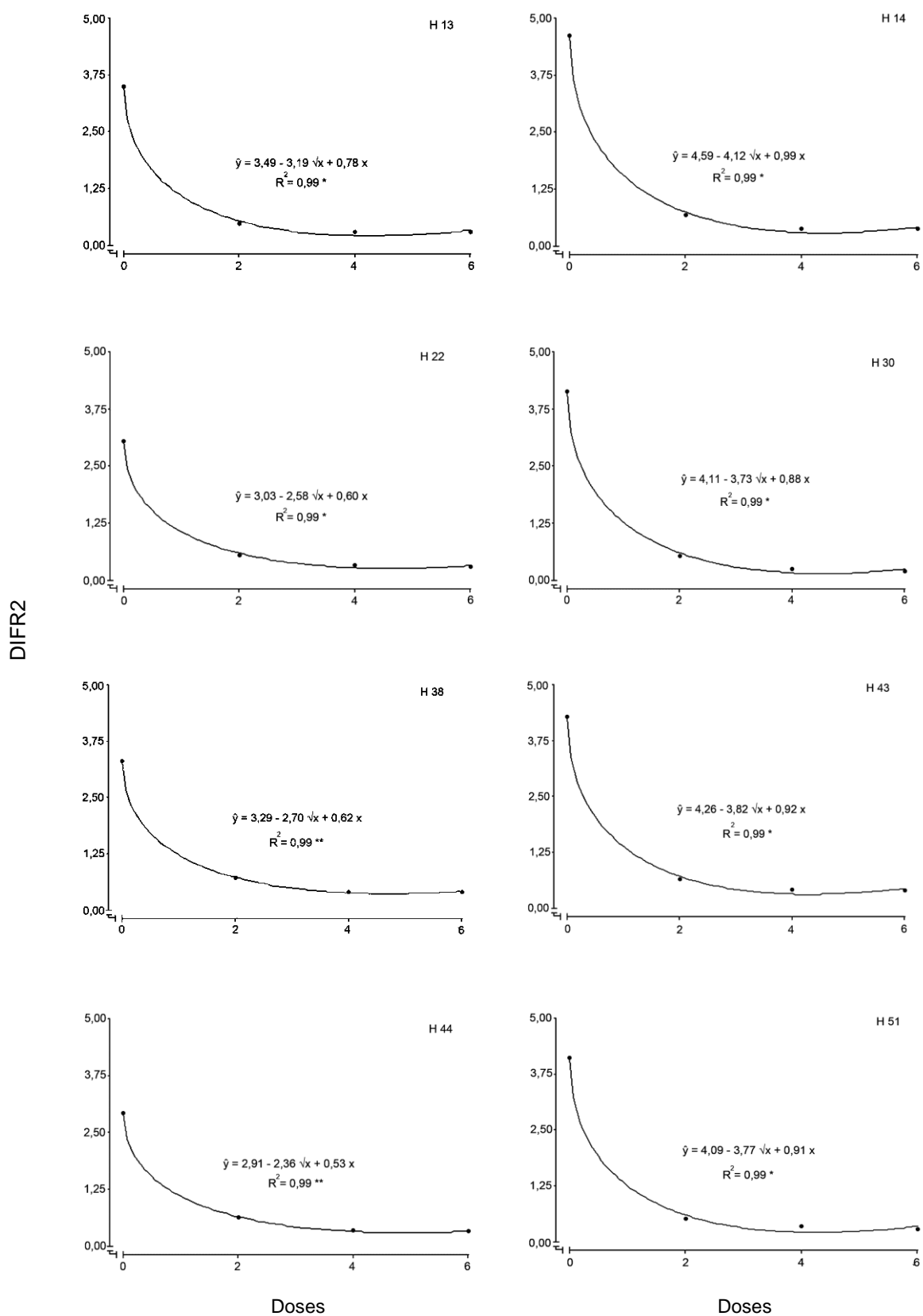


Figura 11. Efeito do desdobramento das doses de Al³⁺ (0, 2, 4 e 6 mg L⁻¹) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR2 (2º experimento). * Pr < 0,05 e ** Pr < 0,01. Ponta Grossa, 2011.

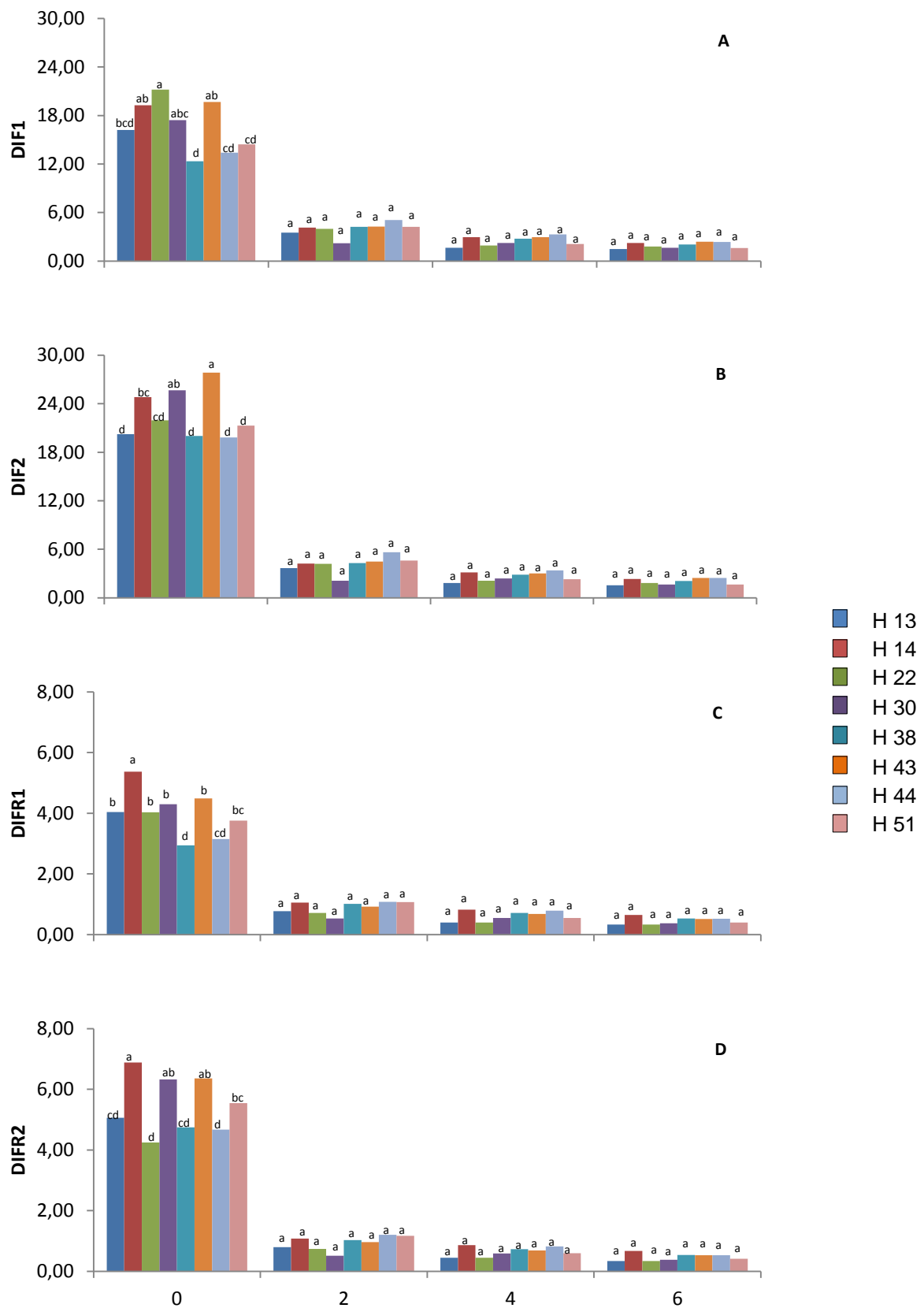


Figura 12. Efeito do desdobramento dos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51) nas respectivas doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$). **A** - DIF1 (crescimento radicular líquido), **B** - DIF2 (crescimento radicular final), **C** - DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e **D** - DIFR2 (crescimento radicular final relativo); (1° experimento). Ponta Grossa, 2011. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

diferenças entre genótipos de milho mesmo quando estes são expostos a solução completa com Al^{3+} por um período maior que 96 h (MARTINS et al., 1999; PRIOLI et al., 2000; PATERNIANI e FURLANI, 2002; ALVES et al., 2004). Por outro lado, Mazzocato et al. (2002), Conceição (2006) e Conceição et al. (2009) utilizando solução mínima, verificaram diferenças significativas entre genótipos após 48 h de exposição ao elemento. Neste sentido, optou-se por reduzir o período de exposição ao Al^{3+} nas respectivas doses para 48 h, visando a melhor discriminação dos genótipos em estudo.

No 3º experimento os resultados das análises de variância demonstraram diferenças altamente significativas ($Pr < 0,01$) para as fontes de variação doses, híbridos e da interação híbridos x doses para as variáveis DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2. Os coeficientes de variação deste experimento apresentaram valores relativamente baixos, com oscilação de 12,6 (DIF1) a 21,8% (DIFR2) nas parcelas e de 8,9 (DIFR1) a 10,1% (DIFR2) nas subparcelas, fato que indica a boa precisão experimental com que os dados foram coletados (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo da análise de variância do 3º experimento para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função das doses de alumínio, híbridos de milho e da interação híbridos x doses. Ponta Grossa, 2011.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrado Médio (Q.M.)			
		DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
Blocos	2	1,03	0,20	0,04	0,21
Doses	3	248,51 **	1226,02 **	12,21 **	59,06 **
Resíduo (a)	6	0,27	0,73	0,02	0,09
Híbridos	7	3,18 **	11,20 **	0,26 **	0,85 **
Híbridos x Doses	21	0,96 **	14,13 **	0,05 **	0,72 **
Resíduo (b)	56	0,16	0,34	0,01	0,02
Desdobramento					
Dose 0	7	3,39 **	50,86 **	0,25 **	2,85 **
Dose 2	7	1,21 **	1,19 **	0,06 **	0,062 *
Dose 4	7	0,75 **	0,78 *	0,057 **	0,060 **
Dose 6	7	0,70 **	0,77 *	0,04 **	0,03
$CV_{parcela}$ (%)		12,6	13,4	17,3	21,7
$CV_{subparcela}$ (%)		9,6	9,1	8,9	10,1
Média		4,11	6,39	0,88	1,37

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

As análises revelaram diferenças significativas ($Pr < 0,01$) para o desdobramento da interação doses de alumínio dentro de cada híbrido de milho para todas as variáveis. De modo geral, o comportamento dos híbridos foi muito similar ao ocorrido nos dois primeiros experimentos. Verificou-se queda acentuada no crescimento radicular na dose 2 até 4 mg L⁻¹, a partir da qual o mesmo foi estabilizado. A dose 4 tende a ser o ponto de maior queda no crescimento a partir da qual os efeitos do Al³⁺ são mantidos. O modelo de regressão raiz quadrada explicou este comportamento com coeficiente de determinação de 99% nos 8 híbridos para as variáveis DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2 (Figuras 13, 14, 15 e 16).

Para as variáveis DIF1 e DIFR1, a análise do desdobramento dos híbridos dentro das doses de alumínio, demonstrou diferenças altamente significativas ($Pr < 0,01$) para todas as doses avaliadas. Para o DIF2, diferenças altamente significativas ($Pr < 0,01$) foram visualizadas nas doses 0 e 2 mg L⁻¹ e diferenças significativas ($Pr < 0,05$) nas doses 4 e 6 mg L⁻¹. Por outro lado, para a variável DIFR2, apenas na dose 6 mg L⁻¹ não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 5).

Os resultados obtidos através das comparações de médias das variáveis DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2 dos 8 híbridos de milho nas respectivas doses de Al³⁺ podem ser visualizados na Figura 17. Para a variável DIF1 na ausência de alumínio, houve grande a variação no crescimento radicular entre os híbridos que dizem respeito ao vigor inicial das sementes de cada genótipo, sendo o H 43 com maior crescimento e os híbridos H 44, H 22 e H 13 com o menor vigor inicial (Figura 17-A). De maneira geral, os resultados demonstraram uma alteração no posicionamento dos híbridos em relação a dose 0, quando os mesmos foram expostos a doses crescentes de Al³⁺. Na dose 2 mg L⁻¹, houve destaque positivo para os híbridos H 44, com maior crescimento radicular (4,25 cm) e H 38. Ao passo que os híbridos H 13, H 51, H 30 e H 22 apresentaram o menor crescimento radicular com amplitude variando de 2,67 a 2,58 cm possivelmente pela maior sensibilidade ao elemento tóxico (Figura 17-A). A exposição destes híbridos na dose 4 mg L⁻¹ possibilitou visualizar que o maior crescimento radicular foi obtido novamente para o H 44 com 3,03 cm e H 38 com 3,10 cm, os quais não diferiram estatisticamente do H 43 e do H 14. Por outro lado, os híbridos H 22 e H 30 apresentaram um crescimento radicular de apenas 1,98 e 1,76 cm, respectivamente. Da mesma forma, a exposição à dose

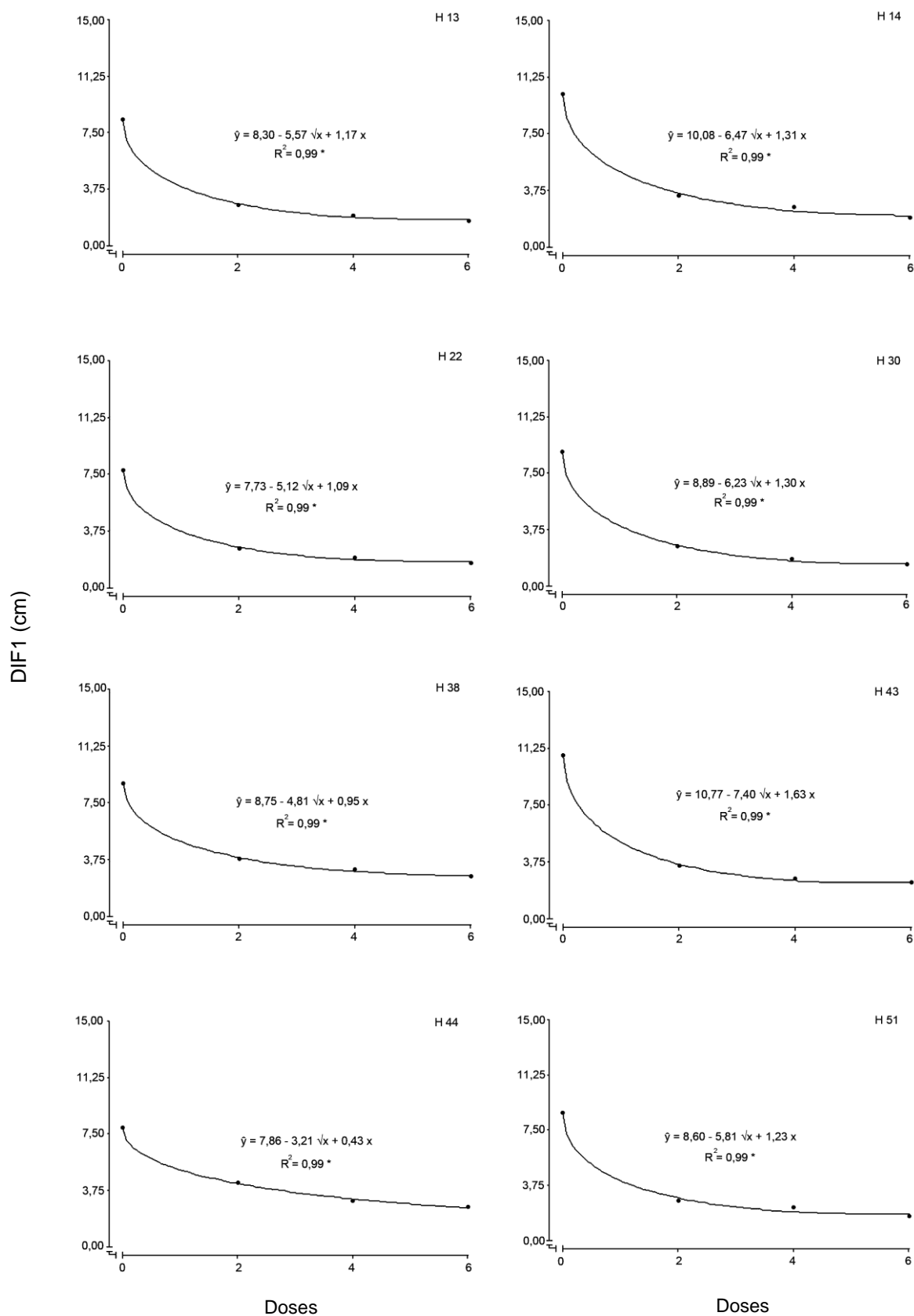


Figura 13. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF1 (3º experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.

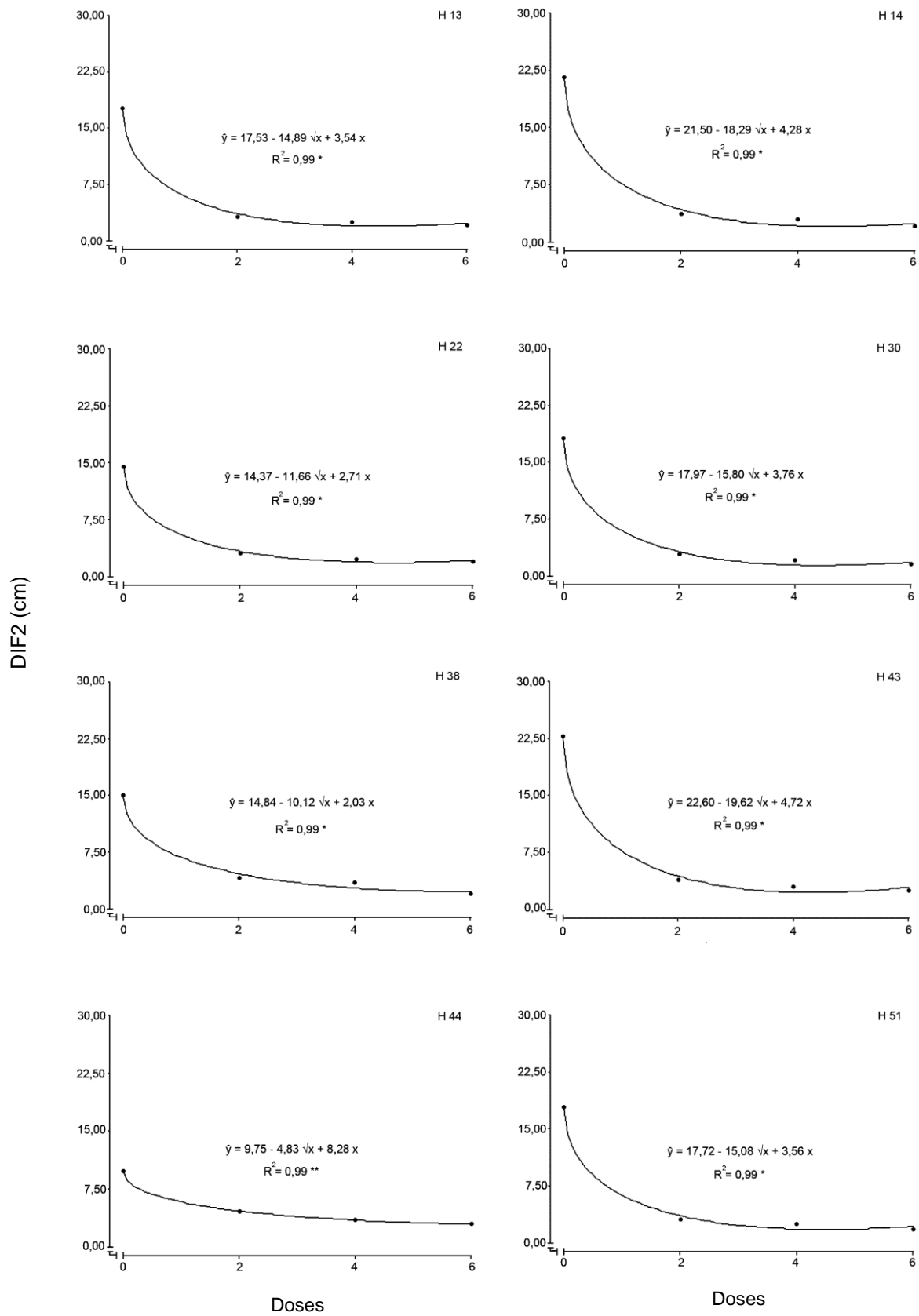


Figura 14. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIF2 (3º experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.

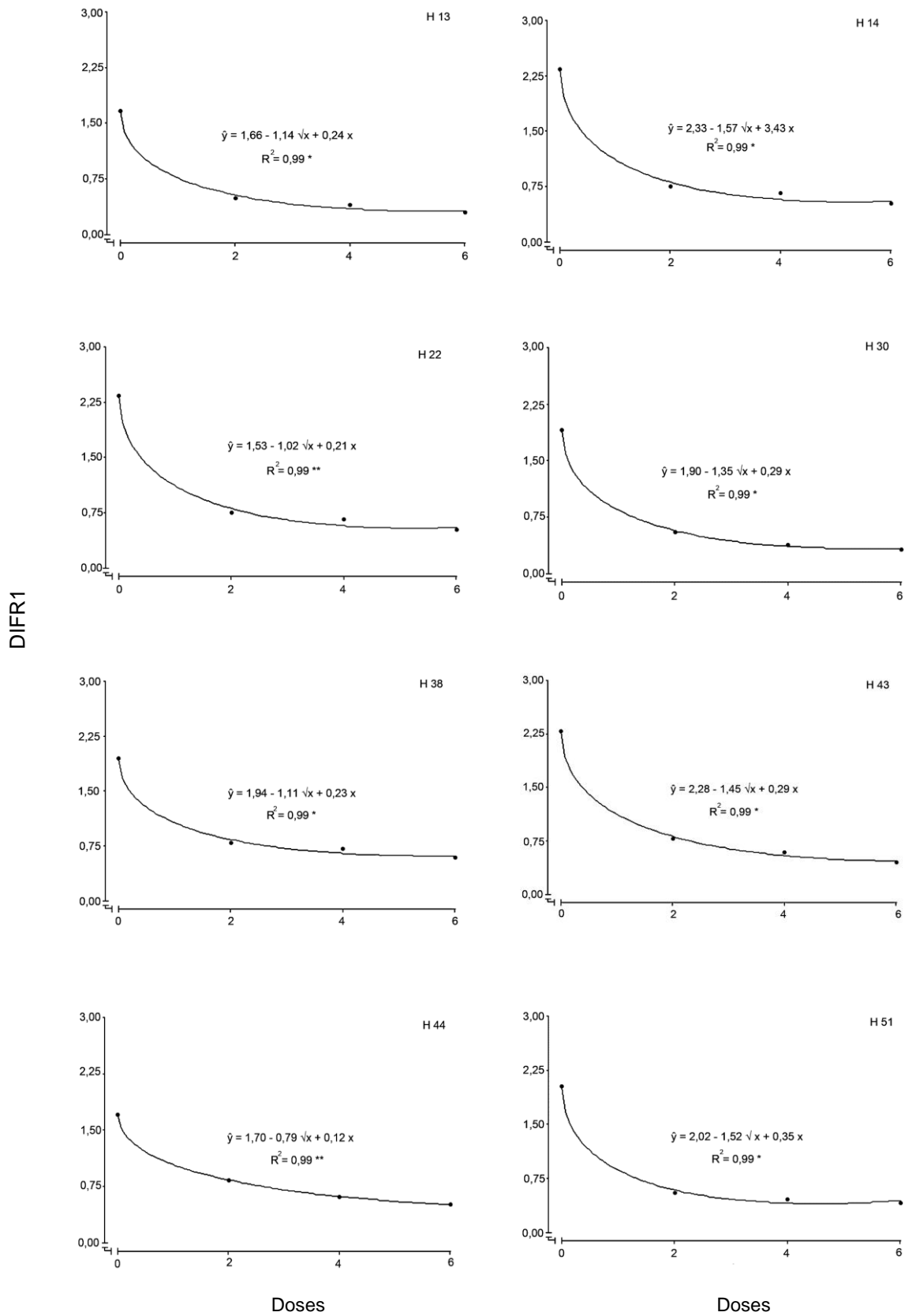


Figura 15. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR1 (3º experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.

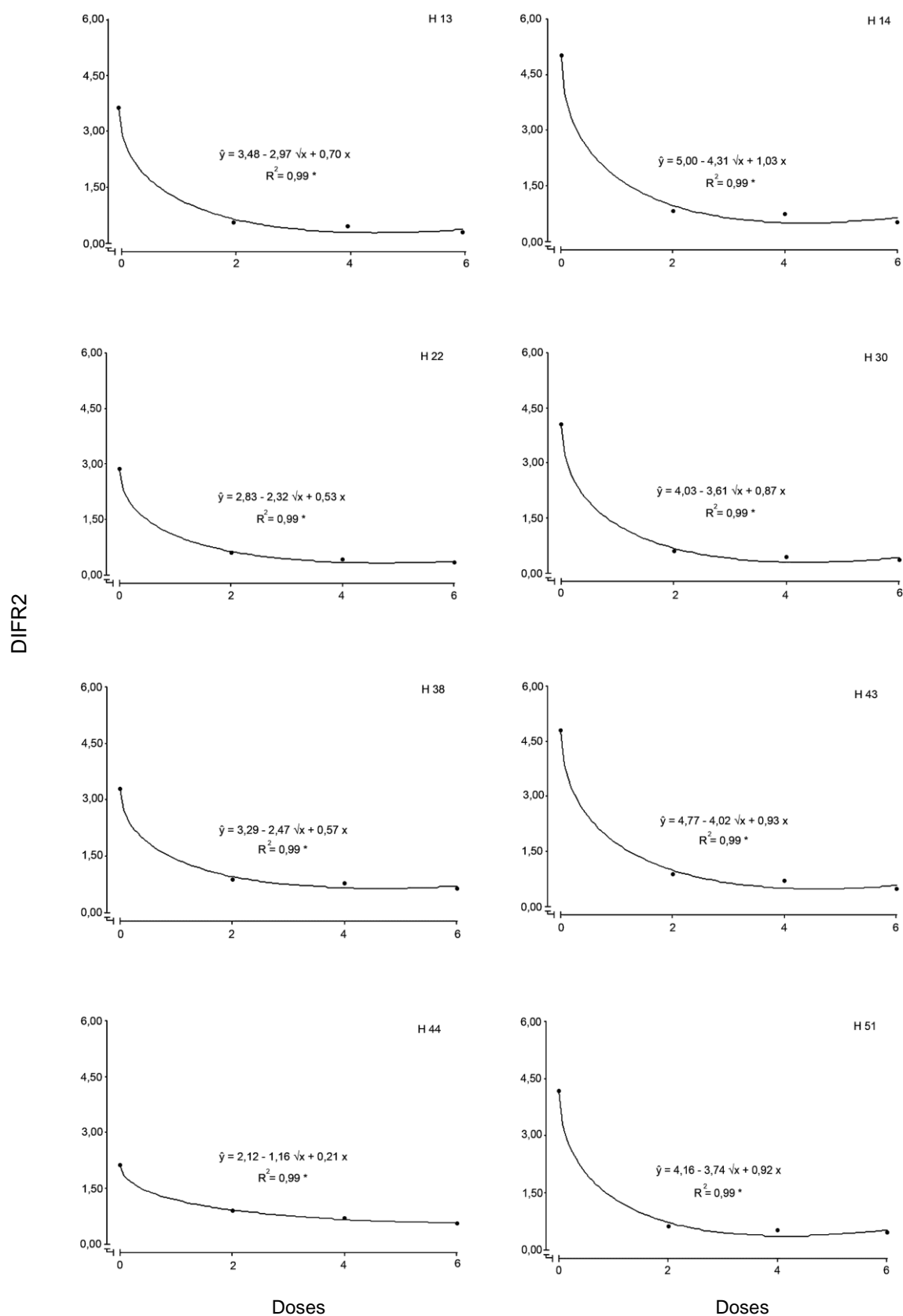


Figura 16. Efeito do desdobramento das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) em cada híbrido, através do modelo da regressão raiz quadrada para a variável DIFR2 (3º experimento). * $Pr < 0,05$ e ** $Pr < 0,01$. Ponta Grossa, 2011.

6, manteve os híbridos H 44, H 38 e ainda o H 43 com maior crescimento radicular. Por outro lado, os híbridos H 22, H 51, H 13 e H 30 apresentaram o menor desenvolvimento radicular (Figura 17-A). Estes resultados demonstram claramente uma relação de tolerância dos híbridos H 44 e H 38 ao alumínio presente na solução mínima nas doses 2, 4 e 6 mg L⁻¹ em função da avaliação da variável DIF1. Particularmente, a maior sensibilidade ao alumínio nas respectivas doses, foi observada para os híbridos H 13, H 22, H 30 e H 51 (Figura 17-A).

Para a variável DIF2, representada pelo crescimento radicular final após exposição ao Al³⁺ (48 h) seguido de 48 h em solução mínima contendo apenas Ca²⁺, a análise revelou na dose 0, grandes diferenças de crescimento radicular que dizem respeito aos diferentes níveis de vigor apresentados pelos híbridos. Na dose 2, a análise das médias demonstrou que os híbridos H 44 e H 38 apresentaram crescimento radicular de 4,60 e 4,14 cm, respectivamente, porém não diferiram estatisticamente de H 14 e H 43. O híbrido H 30 teve o menor crescimento radicular nesta dose com apenas 2,78 cm (Figura 17-B). Este comportamento reflete claramente o padrão de tolerância para os primeiros híbridos citados e de sensibilidade para o último. O posicionamento destes híbridos manteve-se inalterado nas doses 4 e 6 mg L⁻¹. Ou seja, os híbridos H 44, H 38 e H 43 continuaram apresentando o maior crescimento radicular diferindo estatisticamente dos demais e o H 30 ranqueado com o menor crescimento radicular (Figura 17-B). A análise desta segunda variável (DIF2) vem de encontro com o observado para o DIF1, onde os híbridos H 44 e H 38 mesmo quando expostos a doses crescentes de Al³⁺, demonstraram crescimento radicular estatisticamente superior aos demais, confirmando a hipótese de que os mesmos sejam considerados fontes de tolerância a este elemento. Por outro lado, o híbrido H 30, estatisticamente inferior em todas as doses de Al³⁺ e os híbridos H 13, H 22 e H 51 (intermediário a inferior) poderiam ser considerados como genótipos mais sensíveis a exposição ao alumínio em função da ausência de genes de tolerância a este elemento.

Os resultados obtidos para as variáveis DIFR1 e DIFR2 (crescimento líquido e crescimento relativo final) demonstraram praticamente o mesmo ranqueamento dos híbridos nas respectivas doses de Al³⁺, com pequenas alterações em alguns híbridos. Na dose 2 a variável DIFR1 revelou que os híbridos H 14, H 38, H 43 e H 44 apresentaram crescimento líquido variando de 75 a 83% em relação ao comprimento inicial. Na dose 4, para esta variável, o híbrido H 38 destacou-se com

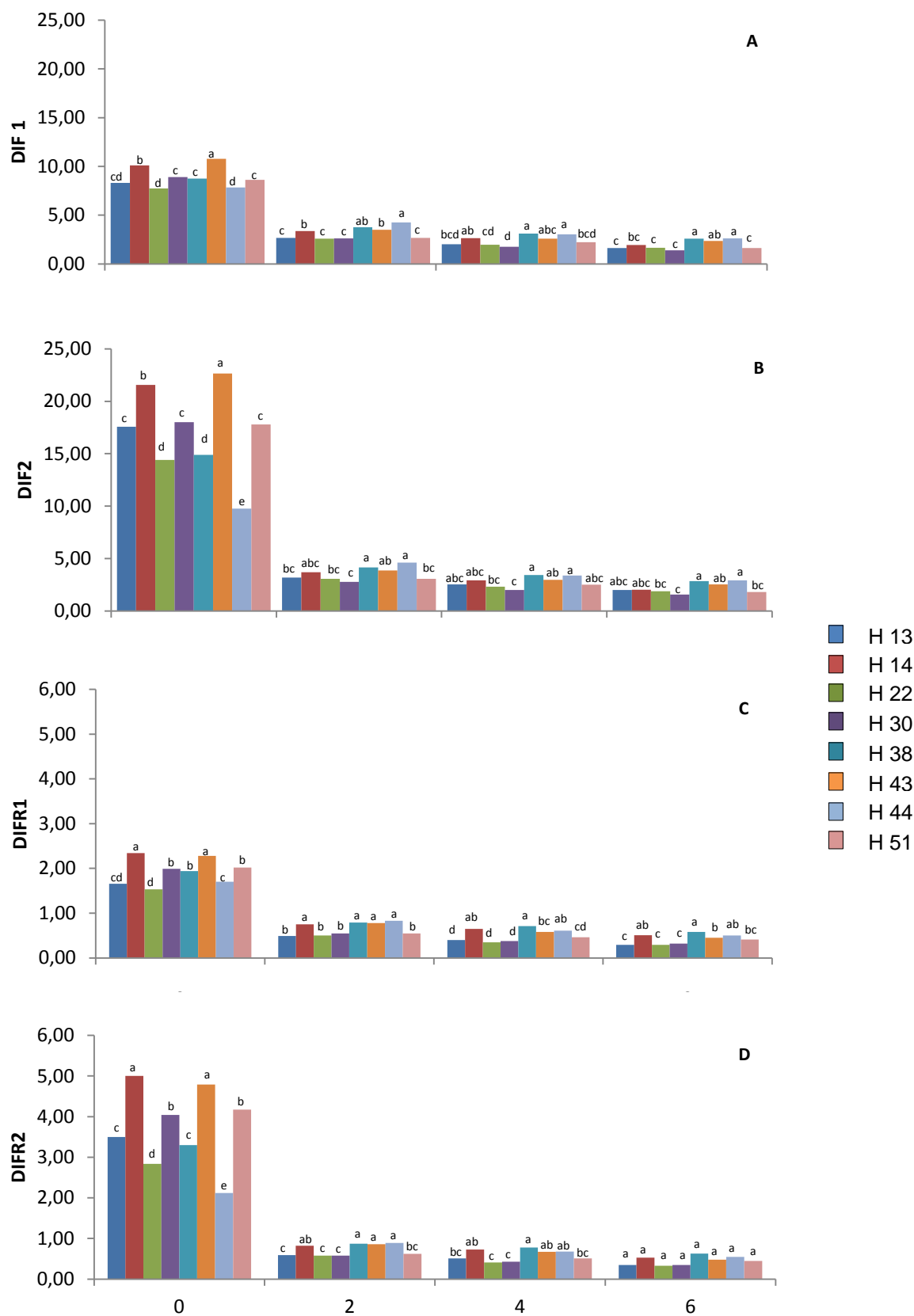


Figura 17. Efeito do desdobramento dos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51) nas respectivas doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 $mg L^{-1}$) **A** - DIF1 (crescimento radicular líquido), **B** - DIF2 (crescimento radicular final), **C** - DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e **D** - DIFR2 (crescimento radicular final relativo); (1º experimento). Ponta Grossa, 2011. *Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

crescimento de 71%. Por outro lado, os híbridos H 13, H 30 e H 22 cresceram apenas 40, 38 e 35%, respectivamente, não diferindo estatisticamente de H 51. Mesmo na dose mais elevada de alumínio o híbrido H 38 destacou-se com 58% de crescimento do sistema radicular, não diferindo estatisticamente dos híbridos H 14 e H 44. Por outro lado, a maior sensibilidade foi observada para os híbridos H 22, H 13 e H 30 (Figura 17-C).

Para DIFR2 as diferenças entre os híbridos na presença do Al^{3+} em solução foram observadas apenas nas doses 2 e 4 $mg L^{-1}$. Na menor dose do elemento (2 $mg L^{-1}$) destaque para os híbridos H 44, H 38 e H 43 com crescimento relativo final de 89, 87 e 86%, respectivamente, não diferindo estatisticamente do H 14. Na dose 4, o maior crescimento foi observado no híbrido H 38 com 78% em relação ao crescimento inicial, o qual não diferiu estatisticamente de H 44, H 43 e H 14. Os híbridos H 30 e H 22 apresentaram menor crescimento com 43 e 41%, respectivamente (Figura 17-D).

De maneira geral, os híbridos H 38 e H 44 na ausência de Al^{3+} apresentaram menor vigor inicial para o crescimento radicular ao passo que quando expostos a doses crescentes deste elemento sempre ranquearam no grupo estatístico superior. Esta observação, possivelmente esteja correlacionada com a presença de regiões genômicas responsáveis pela expressão fenotípica da tolerância ao Al^{3+} . Ao avaliar o efeito do alumínio na presença de cálcio, Cambraia e Cambraia (1995) observaram que o híbrido sensível apresentava comprimento da raiz principal superior ao híbrido tolerante quando estes foram submetidos à solução contendo 5,2 mM de Ca^{2+} e 0 ppm de Al^{3+} . Quando 5 ppm de Al^{3+} foram acrescentados a solução, o comprimento da raiz principal no híbrido tolerante passou a ser superior.

Os resultados apresentados para o 1º, 2º e 3º experimentos demonstraram que a inibição do crescimento radicular aumentou com os níveis de alumínio na solução mínima (Figuras 18 e 19). Cambraia et al. (1991) verificaram comportamento semelhante ao avaliar duas cultivares de sorgo em solução nutritiva completa com 2, 4, 6, 8 e 10 ppm de Al. Os autores observaram diferenças entre as cultivares até a dose de 4 ppm, acima da qual atingiu-se um patamar, sendo as maiores diferenças observadas na dose de 2 ppm.

Nos três experimentos observou-se tendência de inibição do crescimento radicular sendo mantida a partir de 4 $mg L^{-1}$ de Al^{3+} , indicando a potencialidade desta dose em solução mínima para a melhor discriminação dos genótipos de milho.

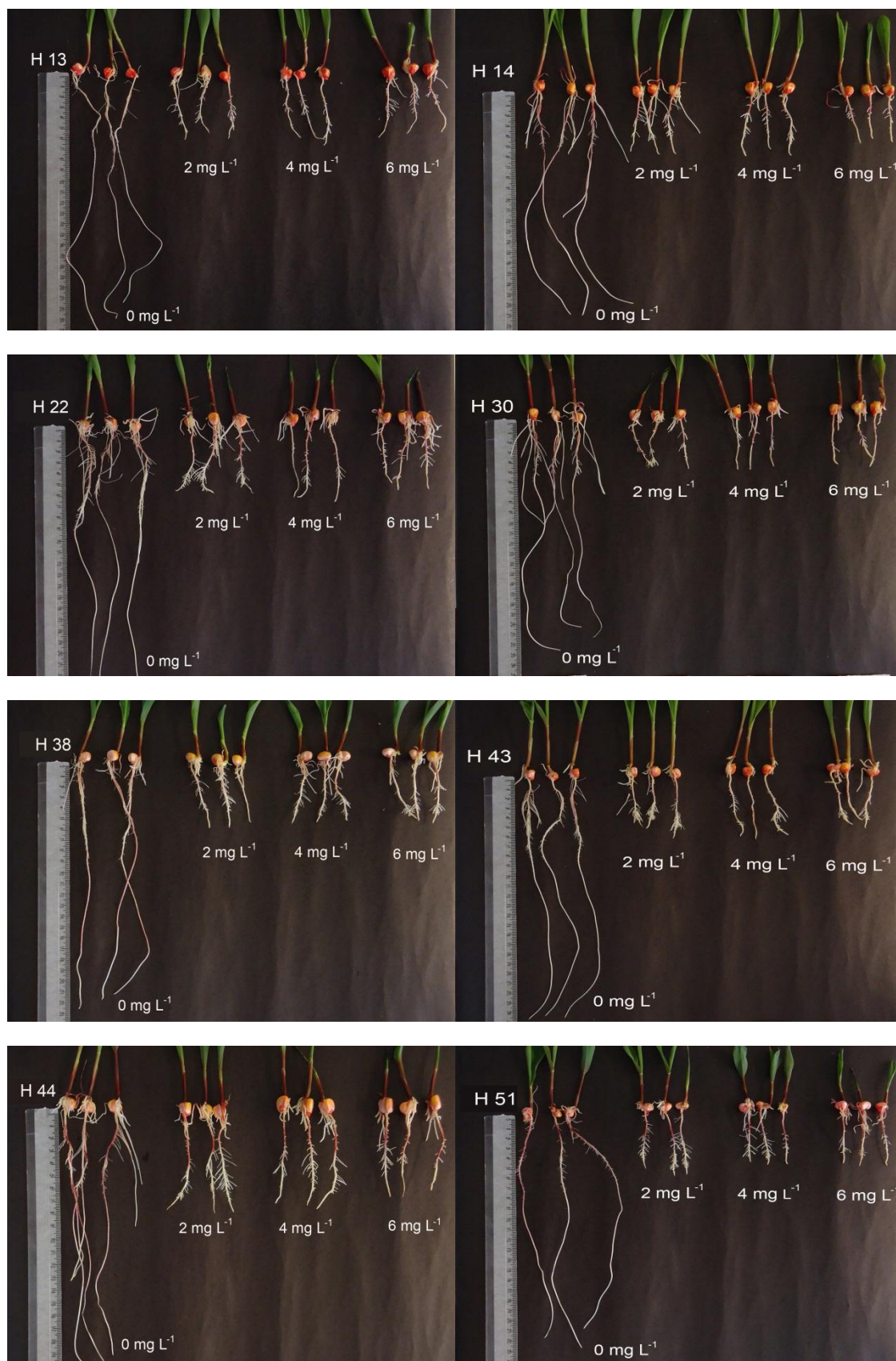


Figura 18. Efeito das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 mg L^{-1}) nos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51), após 96 h de exposição. Ponta Grossa, 2011.

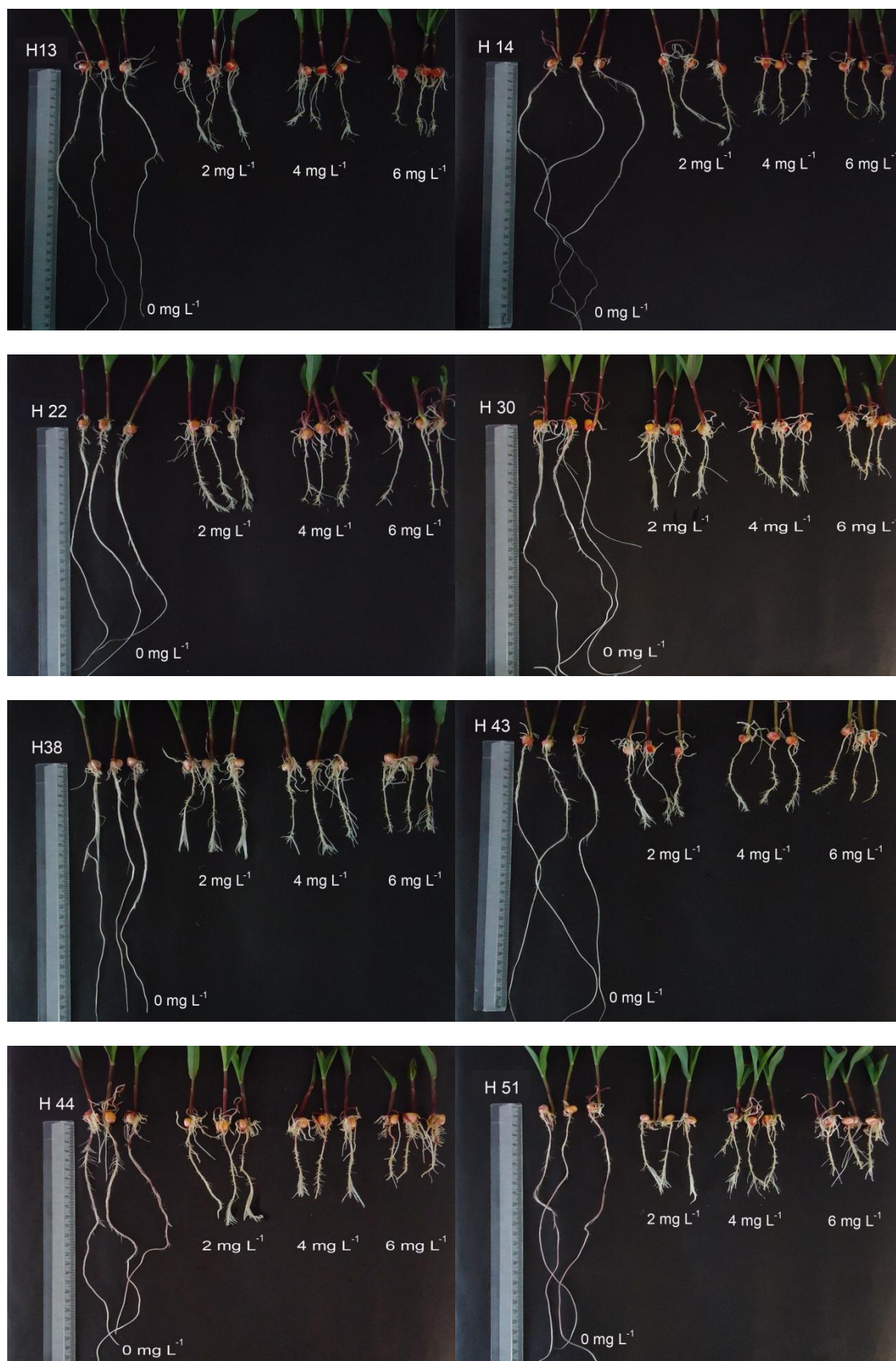


Figura 19. Efeito das doses de Al^{3+} (0, 2, 4 e 6 mg L^{-1}) nos híbridos (H 13, H 14, H 22, H 30, H 38, H 43, H 44 e H 51), após 48 h de exposição. Ponta Grossa, 2011.

A dose adequada de Al^{3+} na solução tratamento é causa de muita divergência entre os trabalhos que visam a identificação de fontes de tolerância ao elemento. Diversos autores têm utilizado a dose de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ (FURLANI et al., 1986; SAWAZAKI e FURLANI, 1987; MACHADO e PEREIRA, 1990; MACHADO et al., 1998; PRIOLI et al., 2000; PATERNIANI e FURLANI, 2002) ou 6 mg L^{-1} de Al^{3+} (MARTINS et al., 1999; SIBOV et al., 1999; MAZZOCATO et al., 2002). Embora alguns autores utilizem doses específicas em função da melhor diferenciação do germoplasma avaliado.

A maioria dos estudos que realizam testes para o período de exposição ao alumínio, tem demonstrado diminuição no crescimento radicular após períodos de exposição de 24 a 96 h (JORGE e ARRUDA, 1997; PIÑEROS et al., 2005). Doncheva et al. (2005) verificaram redução na taxa de alongação das células da raiz principal de uma variedade sensível ao Al^{3+} , apenas com 45 minutos de exposição a $50 \text{ }\mu\text{M}$ do elemento. Para Maron et al. (2008), na presença de genótipos extremamente contrastantes, apenas 24 h de exposição ao Al^{3+} , foi suficiente para detectar diferenças no crescimento radicular. Porém, quando são testados períodos maiores de exposição (96 h), dependendo da dose utilizada, torna-se quase imperceptível a diferença entre os genótipos contrastantes para o caráter.

Os resultados do 1º e 2º experimentos demonstraram que apesar de haver diferenças entre as doses de alumínio não foi possível observar diferenças significativas entre os híbridos de milho nas respectivas doses. Este fato pode ser explicado pelo longo período de exposição, onde o Al^{3+} inibiu o crescimento radicular dos híbridos avaliados com a mesma intensidade dentro de cada dose, possivelmente pelo efeito acumulativo do elemento nas células da raiz. Maron et al. (2008), estudando o acúmulo de alumínio nas raízes de dois genótipos de milho contrastantes, quando expostos a $39 \text{ }\mu\text{M}$ de Al^{3+} (solução completa) por 0, 2, 6 e 24 h. Verificaram diferenças entre os genótipos na quantidade de alumínio presente nas raízes, bem como um acúmulo crescente deste elemento à medida que o período de exposição aumentava. Andrade Junior et al. (2005) verificaram, através da exposição das raízes de sorgo ao alumínio que até, 24 h são visíveis acúmulos crescentes do elemento e que a partir deste tempo de exposição a concentração acumulada aumentaria em menor proporção.

No 3º experimento, além das diferenças entre as doses de Al^{3+} , observou-se diferenças entre os híbridos nas respectivas doses, assim como verificado nos

resultados obtidos por Mazzocato et al. (2002), Conceição (2006) e Conceição et al. (2009), onde diferenças significativas entre genótipos de milho foram constatadas após 48 h de exposição ao elemento.

Através dos resultados obtidos nesta primeira fase dos experimentos foi possível visualizar a adequação do método de solução mínima empregado para avaliar com precisão tolerância ou sensibilidade ao Al^{3+} em genótipos de milho. A melhor adequação da metodologia foi através da utilização da solução mínima contendo 4 mg L^{-1} de Al^{3+} + 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} por um período de exposição de 48 h.

4.2. Caracterização da tolerância/sensibilidade de híbridos

Após a definição da melhor concentração de Al^{3+} (4 mg L^{-1}) e do período de exposição mais adequado (48 h), procedeu-se no 4º experimento a avaliação da tolerância/sensibilidade de uma amostra de 52 híbridos de milho, de diferentes empresas de melhoramento (Tabela 1).

O resumo da análise de variância revelou diferenças significativas ($\text{Pr} < 0,01$) para a fonte de variação híbridos nas variáveis DIF1, DIF2, DIFR1, DIFR2 (Tabela 6). O efeito significativo para híbridos evidencia presença de variabilidade genética para todas as variáveis analisadas, o que possivelmente reflete em diferenças neste germoplasma para tolerância ou sensibilidade ao alumínio. Os coeficientes de variação foram baixos com amplitude de 10,9 a 12,0% (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância do 4º experimento para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função dos híbridos de milho. Ponta Grossa, 2011.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrado Médio (Q.M.)			
		DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
Blocos	2	0,27	0,02	0,03	0,002
Híbridos	51	0,69 **	0,89 **	0,04 **	0,05 **
Resíduo	102	0,04	0,05	0,003	0,004
C.V. (%)		10,9	10,9	11,9	12,0

** significativo a 1% de probabilidade.

A análise das médias para a variável DIF1 revelou a formação de 6 grupos estatisticamente diferentes com crescimento radicular variando de 0,60 a 2,65 cm entre os 52 híbridos. Os híbridos H 44, H 27, H 38, H 41, H 7, H 10, H 50, H 19, H 2, H 52 e H 43 destacaram-se no grupo superior com o maior crescimento líquido com

valores variando de 2,29 (H 43) a 2,65 cm (H 44). O pior desempenho foi visualizado para o H 22 que teve o crescimento radicular mais prejudicado pelo Al^{3+} , crescendo apenas 0,60 cm. O segundo grupo mais sensível foi composto pelos híbridos H 30, H 46 e H 11 com crescimento radicular máximo de 1,01 cm. Os demais híbridos analisados apresentaram desempenho intermediário, com variação de 1,17 a 2,07 cm (Tabela 7).

O crescimento radicular final dos híbridos (DIF2) manteve praticamente o mesmo ranqueamento da variável anterior, porém, com a formação de 5 grupos estatisticamente diferentes. O grupo superior teve recrescimento radicular variando de 2,65 cm (H 19) a 3,27 cm (H 44). O híbrido H 22 demonstrou novamente maior sensibilidade ao Al^{3+} , crescendo apenas 0,79 cm. Nos três grupos intermediários o crescimento radicular final oscilou de 1,34 a 2,54 cm (Tabela 7).

Para o crescimento líquido relativo (DIFR1) a análise revelou taxa de recrescimento variando de 15 (H 22) a 65% (H 44). No grupo superior a análise ranqueou híbridos com taxa de recrescimento acima de 55% em relação ao comprimento inicial. Os híbridos H 30 e H 46 cresceram apenas 26% e foram classificados no segundo grupo mais sensível. O híbrido H 22 mais uma vez teve o menor crescimento, confirmando sua elevada sensibilidade ao Al^{3+} (Tabela 7).

O desempenho dos híbridos de milho para o crescimento final relativo foi praticamente o mesmo ao das demais variáveis analisadas, exceto para os híbridos H 38 e H 2 que foram posicionados no grupo intermediário. Para esta variável as taxas de recrescimento apresentaram amplitude de 19 a 79% para os híbridos H 22 e H 44, respectivamente (Tabela 7).

Através das 4 variáveis estudadas foi possível identificar um grupo de híbridos com comportamento mais tolerante, outro mais sensível e ainda, um grupo com maior número de genótipos apresentando comportamento intermediário ao efeito do alumínio em solução. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Mazzocato et al. (2002), que ao avaliar o crescimento radicular de 22 genótipos de milho desconhecidos para o caráter em solução mínima, verificaram a formação de dois grupos distintos (sensíveis e tolerantes ao Al^{3+}). Paterniani e Furlani (2002) avaliando a resposta de 45 híbridos simples e 10 linhagens endogâmicas em solução nutritiva completa contendo o Al^{3+} , observaram que 13 híbridos e 3 linhagens destacaram-se com os maiores valores de comprimento líquido da

Tabela 7. Valor médio das variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) dos 52 híbridos de milho (4º experimento). Ponta Grossa, 2011.

Híbridos	DIF1 (cm)	DIF2 (cm)	DIFR1	DIFR2
H 44	2,65 a	3,27 a	0,65 a	0,79 a
H 27	2,56 a	2,86 a	0,64 a	0,71 a
H 38	2,49 a	2,71 a	0,58 a	0,63 b
H 41	2,47 a	2,88 a	0,61 a	0,71 a
H 7	2,42 a	2,91 a	0,61 a	0,73 a
H 10	2,41 a	2,87 a	0,62 a	0,74 a
H 50	2,38 a	2,81 a	0,60 a	0,71 a
H 19	2,31 a	2,65 a	0,57 a	0,65 a
H 2	2,30 a	2,54 b	0,55 a	0,61 b
H 52	2,30 a	2,71 a	0,55 a	0,65 a
H 43	2,29 a	2,88 a	0,57 a	0,72 a
H 29	2,07 b	2,29 b	0,53 b	0,58 b
H 25	2,05 b	2,19 b	0,52 b	0,56 b
H 42	2,04 b	2,24 b	0,51 b	0,56 b
H 14	2,02 b	2,50 b	0,49 b	0,61 b
H 32	2,01 b	2,32 b	0,49 b	0,57 b
H 37	1,98 b	2,26 b	0,50 b	0,56 b
H 40	1,94 b	2,18 b	0,47 b	0,53 b
H 15	1,92 b	2,31 b	0,46 b	0,55 b
H 49	1,82 b	2,01 c	0,48 b	0,53 b
H 21	1,82 b	2,11 b	0,45 b	0,52 b
H 34	1,78 c	1,96 c	0,44 c	0,48 c
H 39	1,75 c	2,05 c	0,44 c	0,52 b
H 5	1,73 c	2,28 b	0,44 c	0,58 b
H 36	1,72 c	1,89 c	0,41 c	0,45 c
H 48	1,71 c	1,89 c	0,42 c	0,47 c
H 9	1,69 c	2,06 c	0,43 c	0,53 b
H 23	1,68 c	1,82 c	0,42 c	0,45 c
H 17	1,67 c	1,79 c	0,41 c	0,44 c
H 51	1,67 c	1,85 c	0,39 c	0,43 c
H 26	1,63 c	1,78 c	0,42 c	0,47 c
H 31	1,62 c	1,71 c	0,41 c	0,44 c
H 47	1,60 c	1,88 c	0,39 c	0,46 c
H 6	1,54 c	1,79 c	0,37 c	0,43 c
H 18	1,39 d	1,63 d	0,35 d	0,41 c
H 13	1,38 d	1,61 d	0,35 d	0,41 c
H 33	1,38 d	1,71 c	0,35 d	0,44 c
H 45	1,37 d	1,60 d	0,33 d	0,39 d
H 35	1,34 d	1,49 d	0,33 d	0,37 d
H 8	1,30 d	1,35 d	0,35 d	0,37 d
H 1	1,30 d	1,64 d	0,35 d	0,44 c
H 24	1,29 d	1,56 d	0,30 d	0,37 d
H 16	1,28 d	1,55 d	0,33 d	0,40 c
H 12	1,28 d	1,47 d	0,32 d	0,37 d
H 20	1,24 d	1,44 d	0,32 d	0,37 d
H 3	1,21 d	1,44 d	0,33 d	0,40 c
H 4	1,19 d	1,44 d	0,30 d	0,36 d
H 28	1,17 d	1,42 d	0,33 d	0,40 c
H 30	1,01 e	1,34 d	0,26 e	0,34 d
H 46	1,00 e	1,28 d	0,26 e	0,33 d
H 11	0,95 e	1,34 d	0,29 d	0,42 c
H 22	0,60 f	0,79 e	0,15 f	0,19 e
Média	1,73	2,01	0,43	0,50

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

radícula (CLR). Das linhagens endogâmicas, 3 demonstraram comportamento extremamente sensível ao alumínio na avaliação desta característica.

A utilização de índices fenotípicos que melhor caracterizem a tolerância/sensibilidade de um genótipo tem gerado diferenças de opiniões entre os autores. Contudo, as diferenças no comprimento radicular (final – inicial) ou através do comprimento líquido da radícula e seus valores relativos, tem sido os mais eficientes para a avaliação de genótipos, principalmente quando se utilizam médias de vários indivíduos (MARTINS et al., 1999).

Visando a caracterização de germoplasmas para o caráter tolerância/sensibilidade ao alumínio, Camargo et al. (1991) propuseram o índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR_{Al}) da raiz principal para diferentes genótipos de triticales, com o qual foi possível estabelecer valores para sensibilidade e tolerância ao elemento numa escala de notas variando de 1 (> sensibilidade) a 5 (> tolerância). Este índice de tolerância tem sido utilizado para classificar genótipos de milho quanto a tolerância ou sensibilidade ao alumínio (MACHADO et al., 1998; FURLANI, 2001; PATERNIANI e FURLANI, 2002). Este cálculo foi realizado para avaliar os 52 híbridos de milho utilizados neste experimento, a partir dos dados coletados da variável DIF1.

O híbrido H 44 teve crescimento radicular superior a todos os demais genótipos quando expostos ao Al^{3+} para todas as variáveis analisadas, assim como o H 22 mostrou-se como o mais sensível à ação do elemento. Deste modo, estes híbridos foram utilizados como controles sensível (H 22) e tolerante (H 44), para o cálculo do ITR_{Al} , assumindo valores de 1 e 5, respectivamente. Os híbridos que melhor se destacaram para a tolerância ao Al^{3+} apresentando valores de ITR_{Al} maior que 4,0 foram: H 2 (4,3); H 7 (4,6); H 10 (4,5); H 19 (4,3); H 27 (4,8); H 38 (4,7); H 41 (4,6); H 43 (4,3); H 50 (4,5) e H 52 (4,3). A grande maioria dos híbridos (37) foram classificados como intermediários para tolerância com índices variando de 2,1 (H 28) a 3,9 (H 29). Por outro lado, os híbridos H 11 (1,7), H 30 (1,8) e H 46 (1,8) apresentaram os menores valores de ITR_{Al} , sendo considerados os híbridos mais sensíveis ao alumínio em níveis tóxicos (Figuras 20 e 21). Resultados semelhantes foram obtidos por Paterniani e Furlani (2002), que verificaram 13 híbridos e 2 linhagens com ITR_{Al} maior que 4, a partir de uma análise de uma amostra de 45 híbridos simples e 10 linhagens endogâmicas de milho. Os autores observaram que

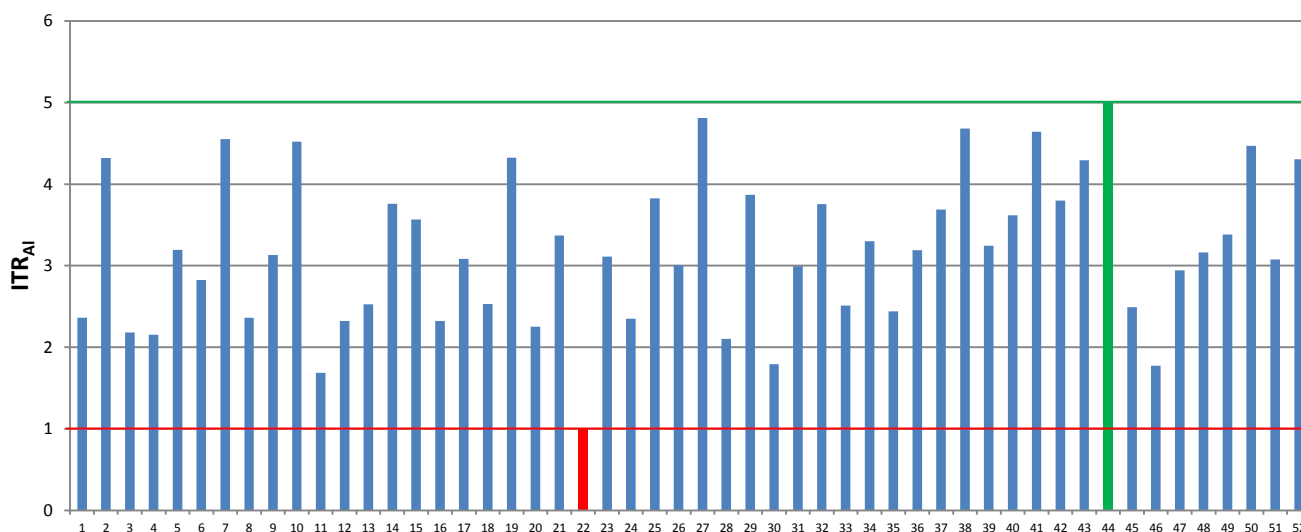


Figura 20. Valores do índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR_{Al}) do 4º experimento (48 h) para os 52 híbridos de milho. Ponta Grossa, 2011.

entre as 10 linhagens, 4 apresentavam ITR_{Al} menor que 1, o que indica elevada sensibilidade ao alumínio.

Os resultados apresentados no 4º experimento demonstraram, através de todas as variáveis analisadas, genótipos com crescimento radicular superior mesmo quando expostos em solução mínima com 4 mg L^{-1} de Al^{3+} . Estes resultados possivelmente estejam associados a presença de genes, como por exemplo *ZmMATE1* e *ZmMATE2*, indicados na literatura recente como os principais genes que são responsáveis pela tolerância ao elemento em milho. Na tentativa de elucidar a base molecular envolvida na tolerância ao alumínio, Maron et al. (2010) verificaram através da análise de QTL de uma linha endogâmica recombinante de milho, que os genes *ZmMATE1* e *ZmMATE2* explicaram grande parte da variância fenotípica para a tolerância ao alumínio.

A avaliação da tolerância ao Al^{3+} a partir de uma amostra com grande número de genótipos por um período de 48 h de exposição permitiu hipotetizar se os mesmos genótipos (híbridos) poderiam apresentar resposta diferencial ao aumento no período de exposição ao alumínio. Neste sentido, foi implantado o 5º experimento, onde os mesmos híbridos estudados foram expostos a 4 mg L^{-1} de Al^{3+} + 40 mg L^{-1} de Ca^{2+} por um período de 96 h.

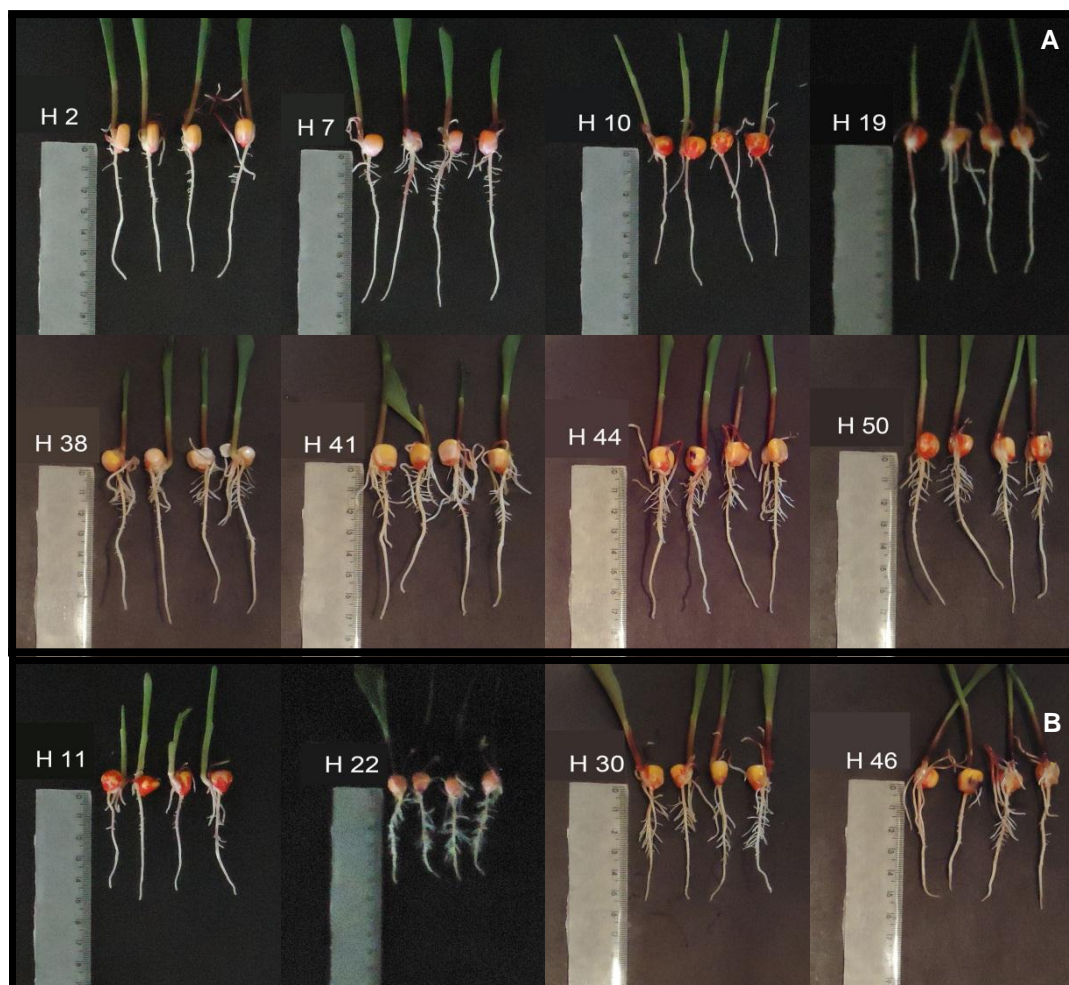


Figura 21. Aspecto visual do sistema radicular de alguns híbridos após 48 h de exposição ao alumínio. **A-** Híbridos com $ITR_{Al} \geq 4$. **B-** Híbridos com $ITR_{Al} \leq 2$. Ponta Grossa, 2011.

Neste experimento, a análise de variância revelou diferenças significativas ($P < 0,01$) entre os híbridos para todas as variáveis analisadas (Tabela 8). Estes resultados confirmam a hipótese da presença de grande variabilidade genética existente neste germoplasma para tolerância e ou sensibilidade ao alumínio, mesmo após o aumento no período de exposição ao Al^{3+} .

Tabela 8. Resumo da análise de variância do 5º experimento para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função dos híbridos de milho. Ponta Grossa, 2011.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrado Médio (Q.M.)			
		DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
Blocos	2	0,016	0,003	0,003	0,002
Híbridos	51	0,65 **	0,67 **	0,039 **	0,041 **
Resíduo	102	0,043	0,039	0,0044	0,0042
C.V. (%)		12,2	10,24	15,08	12,92

** significativo a 1% de probabilidade.

De modo geral, o incremento no período para 96 h fez com que o ranqueamento dos híbridos fosse alterado, fazendo com que um número menor de híbridos mantivesse comportamento tolerante ao elemento. Estes resultados estão em acordo com aqueles obtidos na primeira fase de experimentos, em que o aumento no período de exposição afetou o crescimento radicular, inclusive de alguns híbridos que apresentavam comportamento tolerante, possivelmente pelo acúmulo de Al^{3+} nas células das raízes, bem como pela inibição do recrescimento radicular.

A análise das médias para a variável DIF1 revelou a formação de 6 grupos estatisticamente diferentes. Os híbridos H 44 (2,83 cm), H 43 (2,53 cm), H 14 (2,50 cm) destacaram-se com maior crescimento radicular. Por outro lado, os híbridos H 30, H 51, e H 22 apresentaram o menor crescimento radicular possivelmente pela ação tóxica do Al^{3+} . A grande maioria dos híbridos (46) demonstraram comportamento intermediário, com crescimento da raiz principal variando de 1,13 (H 13) a 2,37 cm (H 38) (Tabela 9).

Devido ao baixo crescimento do sistema radicular dos híbridos após o longo período de exposição ao alumínio (96 h), o ranqueamento para a variável DIF2 pelo teste de médias permaneceu praticamente inalterado em relação ao DIF1. Os híbridos H 44, H 43 e H 14 apresentaram o maior crescimento radicular final sendo superiores aos demais híbridos. O pior desempenho no crescimento radicular foi mantido para os mesmos híbridos H 30, H 51 e H 22 com variação de 1,10 e 0,90 cm, respectivamente (Tabela 9).

Os valores observados nas diferenças relativas confirmaram a hipótese de que o período de exposição ao alumínio por 96 h foi muito prolongado. De maneira geral, os híbridos passaram a ocupar posições diferentes no ranqueamento, com a formação de 5 grupos estatisticamente diferentes. O número de híbridos no grupo de genótipos mais tolerantes ao Al^{3+} passou de 3 para 7, com valores variando de 58 (H 50) a 70% (H 44) para DIFR1 e de 67% (H 50, H 7, H 10 e H 43) a 76% (H 44) para o DIFR2. Os híbridos H 30, H 51 e H 22 demonstraram o pior desempenho em relação ao comprimento inicial, tanto para DIFR1 quanto para o DIFR2, com amplitude mínima de 16 e máxima de 26% (Tabela 9).

Através dos dados obtidos para a variável DIF1 foram calculados os índices de tolerância relativa ao alumínio (ITR_{Al}). Apenas 7 híbridos mostraram-se tolerantes

Tabela 9. Valor médio das variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) dos 52 híbridos de milho (5º experimento). Ponta Grossa, 2011.

Híbridos	DIF1 (cm)	DIF2 (cm)	DIFR1	DIFR2
H 44	2,83 a	3,10 a	0,70 a	0,76 a
H 43	2,53 a	2,83 a	0,61 a	0,67 a
H 14	2,50 a	2,77 a	0,68 a	0,74 a
H 38	2,37 b	2,60 b	0,63 a	0,69 a
H 10	2,37 b	2,53 b	0,63 a	0,67 a
H 27	2,33 b	2,47 b	0,54 b	0,58 b
H 7	2,33 b	2,50 b	0,62 a	0,67 a
H 52	2,30 b	2,57 b	0,55 b	0,61 b
H 41	2,20 b	2,47 b	0,54 b	0,60 b
H 42	2,17 b	2,37 b	0,52 b	0,56 b
H 2	2,13 b	2,43 b	0,53 b	0,60 b
H 50	2,10 c	2,40 b	0,58 a	0,67 a
H 36	2,00 c	2,20 c	0,48 b	0,53 b
H 48	1,93 c	2,17 c	0,47 b	0,53 b
H 37	1,90 c	2,10 c	0,55 b	0,60 b
H 33	1,87 c	2,07 c	0,43 c	0,48 c
H 32	1,87 c	2,07 c	0,43 c	0,48 c
H 3	1,87 c	2,07 c	0,47 b	0,51 c
H 1	1,87 c	2,13 c	0,47 b	0,53 b
H 21	1,83 c	2,00 c	0,46 b	0,50 c
H 19	1,83 c	2,03 c	0,45 b	0,50 c
H 40	1,80 c	2,00 c	0,51 b	0,58 b
H 16	1,80 c	1,97 c	0,46 b	0,51 c
H 9	1,80 c	2,17 c	0,49 b	0,58 b
H 18	1,77 c	1,97 c	0,46 b	0,51 c
H 34	1,73 c	1,93 d	0,44 b	0,49 c
H 45	1,70 c	1,90 d	0,43 c	0,49 c
H 15	1,67 d	1,87 d	0,46 b	0,52 c
H 4	1,67 d	1,90 d	0,41 c	0,46 c
H 29	1,57 d	1,87 d	0,49 b	0,58 b
H 11	1,57 d	1,73 d	0,42 c	0,46 c
H 25	1,53 d	1,90 d	0,39 c	0,49 c
H 12	1,50 d	1,70 d	0,36 c	0,40 d
H 47	1,47 d	1,70 d	0,37 c	0,44 c
H 5	1,47 d	1,70 d	0,38 c	0,45 c
H 31	1,43 d	1,70 d	0,35 c	0,41 c
H 26	1,43 d	1,77 d	0,37 c	0,46 c
H 23	1,40 d	1,57 e	0,38 c	0,43 c
H 6	1,37 e	1,67 d	0,37 c	0,45 c
H 28	1,33 e	1,53 e	0,40 c	0,45 c
H 49	1,30 e	1,50 e	0,32 c	0,38 d
H 20	1,30 e	1,47 e	0,40 c	0,46 c
H 17	1,27 e	1,50 e	0,32 c	0,37 d
H 8	1,27 e	1,43 e	0,34 c	0,39 d
H 46	1,23 e	1,40 e	0,37 c	0,41 c
H 39	1,23 e	1,43 e	0,39 c	0,47 c
H 35	1,23 e	1,53 e	0,28 d	0,36 d
H 24	1,20 e	1,50 e	0,29 d	0,36 d
H 13	1,13 e	1,40 e	0,31 d	0,38 d
H 30	0,87 f	1,10 f	0,22 e	0,28 e
H 51	0,77 f	0,93 f	0,21 e	0,27 e
H 22	0,70 f	0,90 f	0,16 e	0,22 e
Média	1,70	1,93	0,44	0,50

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Scott & Knott a 5% de probabilidade.

ao alumínio apresentando ITR_{Al} maior ou igual a 4: H 7, H 10, H 14, H 27, H 38, H 43 e H 52. Por outro lado, os híbridos H 13, H 24, H 30, H 35, H 39, H 46 e H 51 foram os mais sensíveis ao elemento com ITR_{Al} menor ou igual a 2 (Figuras 22 e 23).

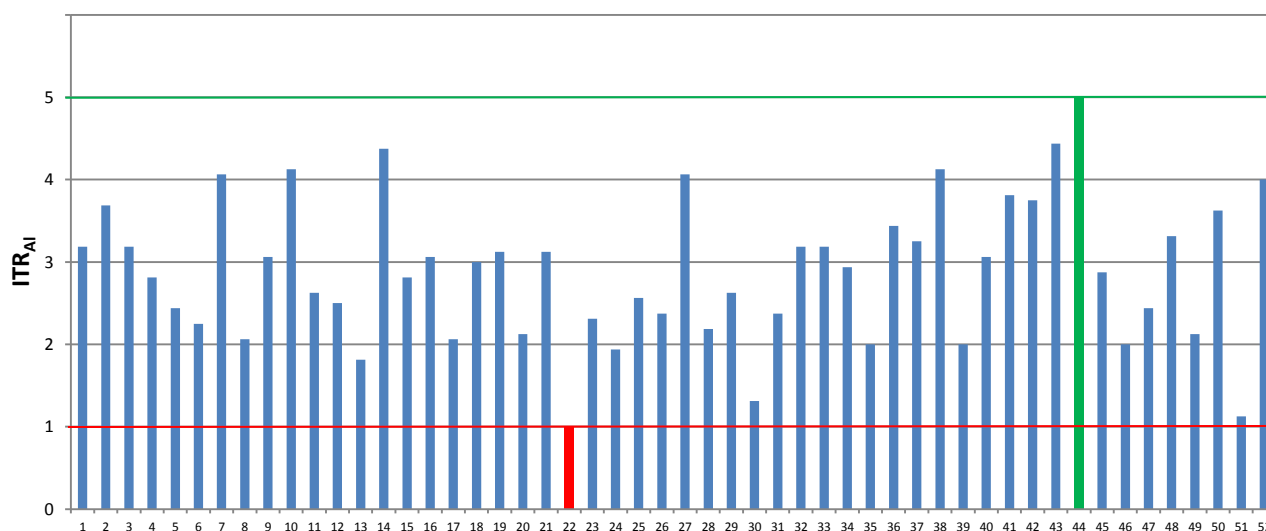


Figura 22. Valores do índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR_{Al}) do 5º experimento (96 h) para os 52 híbridos de milho. Ponta Grossa, 2011.

As hipóteses levantadas de que o aumento no período de exposição ao alumínio (48 para 96 h) modificariam o ranqueamento dos híbridos bem como uma possível resposta diferencial no crescimento radicular foi confirmada através do percentual de redução ou incremento nos valores de ITR_{Al} (Figura 24). De maneira geral, o aumento no período de exposição ao Al^{3+} provocou redução no ITR_{Al} para a maioria dos híbridos analisados (35) com amplitude de queda variando desde 1 (H 42) até 63% (H 51). Por outro lado, incrementos nos valores do ITR_{Al} foram visualizados em 15 híbridos mesmo quando expostos ao elemento por 96 h. Destes híbridos, 6 demonstraram incremento percentual superior a 25% no ITR_{Al} , sendo os híbridos H 3 (46%) e H 11 (55%) aqueles que demonstraram a maior resposta diferencial para o aumento do período de exposição (Figura 24).

É importante destacar que os híbridos H 3 e H 11 foram classificados a princípio como medianamente sensíveis ao alumínio. O grande incremento no ITR_{Al} observado para estes híbridos pode estar correlacionado a presença de genes que se expressam diferentemente do que foi possível observar até o momento. Maron et al. (2010) observaram que o gene *ZmMATE2* possui um padrão de expressão diferente do *ZmMATE*. Os autores verificaram ao comparar dois genótipos (sensível

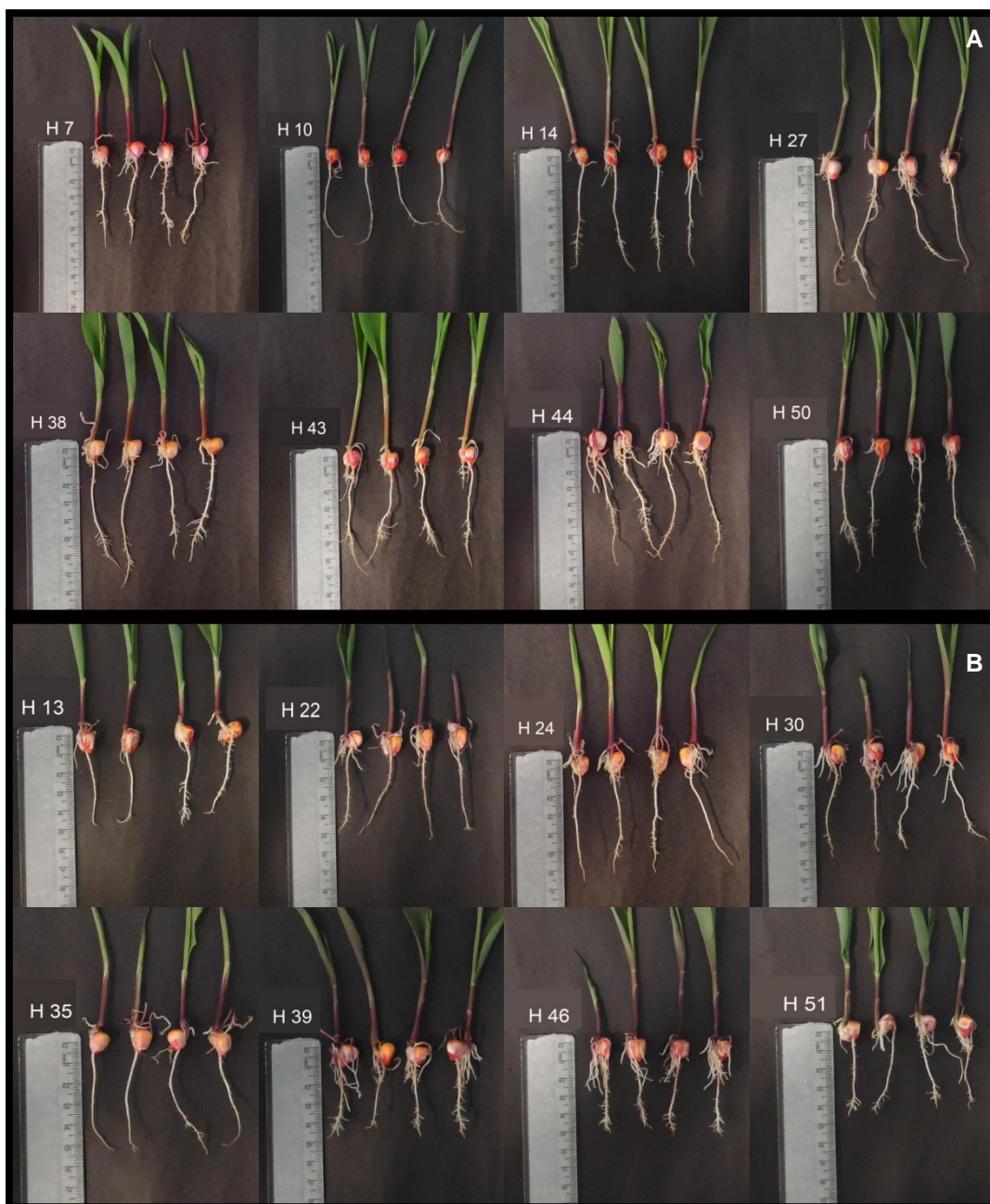


Figura 23. Aspecto visual do sistema radicular de alguns híbridos após 96 h de exposição ao alumínio. **A-** Híbridos com $ITR_{Al} \geq 4$. **B-** Híbridos com $ITR_{Al} \leq 2$. Ponta Grossa, 2011.

e tolerante) que a expressão do *ZmMATE2* era praticamente constante em ambos, mesmo após 24 h de exposição ao Al^{3+} , não sendo regulada pela presença do elemento. Enquanto a expressão do *ZmMATE1* era maior no genótipo tolerante e regulada pela presença do Al^{3+} . Piñeros et al. (2005) demonstraram que a exsudação de citrato (ativado pela expressão do gene *ZmMATE1*) não é o único mecanismo de tolerância ao alumínio presente em milho. Porém, ainda não se sabe quais mecanismos poderiam estar envolvidos neste padrão diferenciado de tolerância ao alumínio.

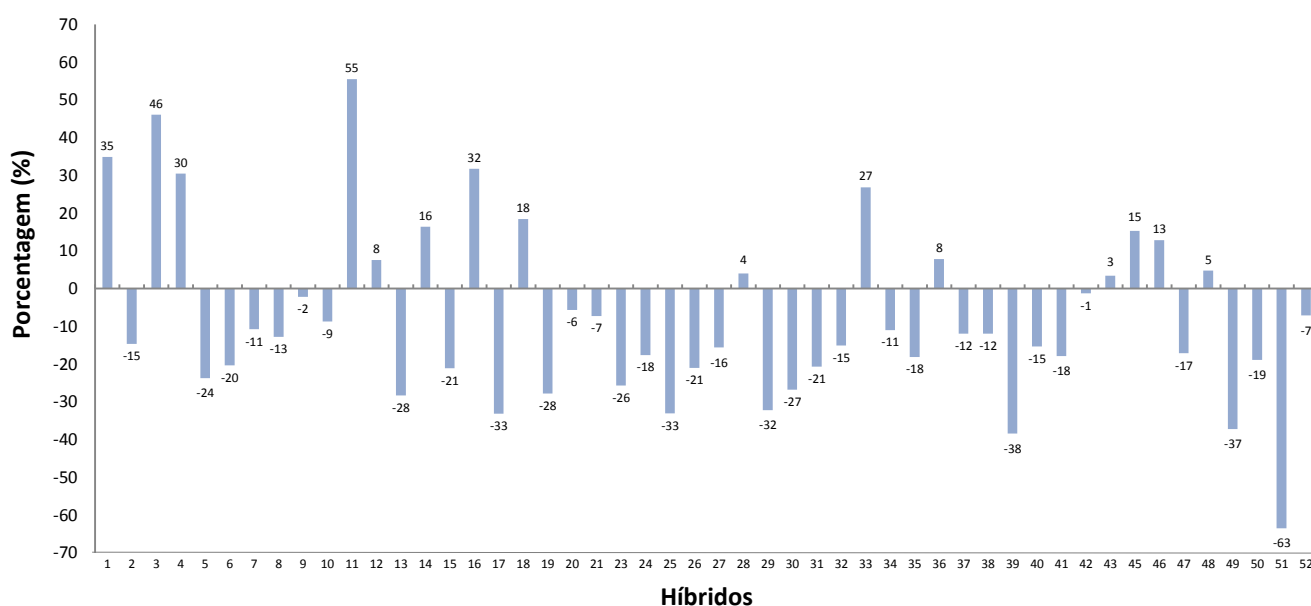


Figura 24. Porcentagem de redução ou incremento do ITR_{Al} dos diferentes híbridos após o aumento do período de exposição ao Al^{3+} de 48 para 96 h. Ponta Grossa, 2011.

4.3. Caracterização da tolerância/sensibilidade de variedades crioulas de milho

As variedades crioulas de milho, normalmente são cultivadas de maneira rústica por agricultores de subsistência, onde a ausência de tecnologias como controle fitossanitários e práticas de correção dos solos e adubação mineral são comuns. Agricultores tem multiplicado as sementes destas variedades ao longo dos anos, procurando excluir aquelas que apresentam características agrônômicas indesejáveis. Pela grande adaptação destes genótipos a condições ambientais específicas, é esperado em hipótese, que estes apresentem comportamento diferenciado quando submetidos a estresses abióticos como a presença do alumínio.

Neste sentido, foi instalado o 6º experimento visando avaliar a tolerância ou sensibilidade ao alumínio de uma amostra de 50 variedades crioulas de milho do banco de germoplasma da UEPG e centros de pesquisa pública. Os diferentes genótipos foram submetidos a solução mínima contendo 4 mg L^{-1} de Al^{3+} por 48h de exposição.

A análise de variância do 6º experimento revelou diferenças significativas ($Pr < 0,01$) para tratamentos (variedades crioulas + testemunhas) em todas as variáveis analisadas. Os coeficientes de variação apresentaram valores reduzidos, variando de 7,7 para DIF2 a 12,1% para DIFR1 (Tabela 10). As diferenças apresentadas entre os genótipos de milho refletem a variabilidade genética para tolerância ao

alumínio presente neste germoplasma avaliado. Resultados semelhantes foram encontrados por Machado et al. (1998) ao avaliar tolerância ao Al^{3+} em germoplasma de milho crioulo.

Tabela 10. Resumo da análise de variância do 6º experimento para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) em função das variedades crioulas de milho. Ponta Grossa, 2011.

Fontes de Variação	G.L.	Quadrado Médio (Q.M.)			
		DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
Blocos	2	0,03	7,30	0,32	2,09
Tratamentos	51	2,83 **	7,91 **	0,35 **	1,31 **
Resíduo	106	0,41	1,01	0,02	0,06
C.V. (%)		9,2	7,7	12,1	10,7

** significativo a 1% de probabilidade.

A análise de agrupamento de médias por Scott & Knott evidenciou a formação de 4 grupos estatisticamente diferentes para a variável DIF1. As variedades crioulas V 6, V 50, V 11, V 27, V 2, V 18, V 49, V 16, V 35, V 15 e V 19 e o híbrido H 44 destacaram-se como genótipos mais tolerantes ao alumínio, respondendo com a maior diferença no comprimento radicular, com amplitude de 7,73 (V 19) a 8,87 cm (V 6). É importante destacar o desempenho da variedade crioula Dente de Ouro 2 (V 6) que apresentou crescimento radicular numericamente maior que a testemunha tolerante (H 44). O menor crescimento radicular líquido foi observado para o híbrido H 22 (testemunha sensível) que ranqueou no grupo inferior. De maneira geral, as demais variedades crioulas tiveram um elevado crescimento radicular mesmo na presença do Al^{3+} (Tabela 11).

Para a variável DIF2 houve a formação de 5 grupos estatisticamente diferentes, com algumas alterações no ranqueamento de alguns genótipos. As variedades crioulas que mantiveram-se no grupo de maior tolerância foram: V 6, V 50, V 11, V 27, V 2, V 18, V 49 e V 16 com a inclusão da variedade V 3. Estas variedades tiveram crescimento final variando de 14,83 (V 2) a 16,67 cm (V 6), sendo estatisticamente superiores ao próprio híbrido H 44 utilizado como padrão de tolerância. O grupo intermediário apresentou amplitude de crescimento de 10,13 (V12) a 14,33 (V 34). Da mesma forma, o híbrido H 22 demonstrou maior sensibilidade ao alumínio com crescimento radicular final de apenas 8,33 cm (Tabela

Tabela 11. Valores médios das variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) das 50 variedades de milho crioulo (6º experimento). Ponta Grossa, 2011.

Tratamentos	Variedade Crioula	DIF1 (cm)	DIF2 (cm)	DIFR1	DIFR2
V 6	Dente de Ouro 2	8,87 a	16,67 a	2,03 a	3,83 a
H 44	Testemunha Tolerante	8,47 a	13,67 b	1,24 d	2,00 d
V 50	Fortaleza – ES	8,40 a	15,27 a	1,56 c	2,84 c
V 11	Caiano Rajado	8,37 a	16,13 a	1,71 b	3,30 b
V 27	Crioulo Palha Roxa	8,07 a	15,60 a	1,43 c	2,78 c
V 2	Pintadinho FE129	8,07 a	14,83 a	2,00 a	3,68 a
V 18	Crioulo Rosa	8,00 a	15,63 a	1,69 b	3,32 b
V 49	Eldorado – ES	7,90 a	15,40 a	1,21 d	2,35 d
V 16	Branco Duro Canguçu	7,90 a	15,57 a	1,80 a	3,56 a
V 35	Milho Carioca	7,80 a	13,93 b	1,70 b	3,03 c
V 15	Dente de Ouro	7,77 a	13,67 b	1,25 d	2,21 d
V 19	Crioulo Rajado	7,73 a	13,50 b	0,84 e	1,48 e
V 3	Catete Amarelo	7,47 b	15,07 a	1,44 c	2,91 c
V 23	Crioulo Sabugo Fino	7,43 b	14,27 b	1,61 b	3,10 c
V 47	Milho Amarelo Antigo	7,37 b	14,20 b	1,02 d	1,98 d
V 26	Crioulo Veranópolis	7,37 b	12,57 c	1,02 d	1,75 e
V 28	Crioulo Asteca	7,33 b	12,47 c	1,17 d	2,00 d
V 46	Milho Branco para Palha	7,30 b	13,77 b	1,14 d	2,15 d
V 13	Argentino Flint	7,30 b	13,13 c	1,48 c	2,67 c
V 34	Milho Paiol	7,27 b	14,33 b	1,65 b	3,27 b
V 5	Roxo Índio I	7,23 b	14,07 b	1,65 b	3,21 b
V 39	Nutricional	7,20 b	12,90 c	1,53 c	2,73 c
V 33	Cravinho	7,17 b	12,63 c	0,93 e	1,64 e
V 10	Roxo Índio II	7,17 b	12,70 c	1,16 d	2,07 d
V 7	Branco Dentado	7,17 b	12,97 c	0,95 e	1,73 e
V 37	Milho Encantilado	7,10 b	13,90 b	1,16 d	2,27 d
V 20	Branco Oito Carreiras	7,03 b	13,43 b	0,96 e	1,82 e
V 44	Milho Mistura (brs 194)	7,00 b	12,57 c	0,88 e	1,58 e
V 48	Milho Palha Roxa	6,97 b	13,43 b	0,82 e	1,58 e
V 38	Asteca	6,93 b	12,90 c	0,79 e	1,47 e
V 29	Crioulo Cunha Roxo	6,80 c	11,53 d	0,78 e	1,33 e
V 17	Colonial	6,80 c	13,10 c	0,96 e	1,84 e
V 9	Cinquentinha	6,80 c	11,43 d	0,86 e	1,46 e
V 43	Milho Pérola	6,73 c	12,60 c	1,48 c	2,76 c
V 8	Argentino FE128	6,73 c	12,30 c	1,36 c	2,48 d
V 40	Milho Branco	6,70 c	11,87 c	1,10 d	1,93 d
V 22	Crioulo Riscado	6,63 c	12,70 c	1,15 d	2,22 d
V 4	Cunha	6,60 c	12,80 c	1,10 d	2,12 d
V 36	Milho Amarelo Antigo	6,53 c	12,33 c	0,95 e	1,79 e
V 30	IPR-119	6,53 c	13,17 c	1,53 c	3,07 c
V 14	Pop.5	6,47 c	11,83 c	1,25 d	2,29 d
V 42	Milho Palha Roxa	6,37 c	12,63 c	1,10 d	2,18 d
V 31	Milho Caiano	6,33 c	11,10 d	0,69 e	1,20 e
V 24	Sabuguinho Cabo Roxo	6,27 c	12,80 c	0,75 e	1,55 e
V 32	Milho Branco	6,20 c	10,87 d	1,15 d	2,02 d
V 25	RS-22	6,17 c	11,97 c	1,18 d	2,29 d
V 21	Crioulo	6,00 c	11,03 d	0,92 e	1,68 e
V 45	Carioca	5,83 c	11,43 d	1,00 e	1,95 d
V 1	Caiano FE121	5,60 c	10,93 d	0,97 e	1,88 d
V 12	BR451	5,57 c	10,13 d	1,08 d	1,96 d
V 41	Caiano	5,47 c	11,13 d	0,83 e	1,70 e
H 22	Testemunha Sensível	2,77 d	8,33 e	0,68 e	2,04 d
Média		7,01	13,16	1,21	2,28

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

11).

As variedades crioulas Dente de Ouro 2 (V 6), Pintadinho FE129 (V 2) e Branco Duro Canguçú (V 16) demonstraram o mesmo comportamento para as 4 variáveis em relação a testemunha tolerante (H 44). Possivelmente, este padrão de tolerância estaria relacionado ao mecanismo de exclusão do alumínio. Ou seja, na presença do elemento em solução, a imobilização ou neutralização do alumínio ocorreu externamente a célula. E quando as mesmas foram submetidas a solução mínima contendo apenas Ca^{2+} , continuaram com crescimento radicular normal. Este padrão de comportamento não foi observado no híbrido H 44. Os resultados demonstraram que o crescimento radicular deste híbrido não foi afetado pela presença do elemento, possivelmente, porque nele atuam mecanismos de tolerância do tipo simplástico, onde a imobilização do Al^{3+} ocorre a nível celular. Dentro deste tipo de imobilização o alumínio pode ser fixado na parede celular das raízes e quando submetido a solução mínima contendo apenas cálcio, existe a possibilidade de que o Al^{3+} seja desligado da parede celular. Porém, outras avaliações, principalmente a nível celular, deveriam ser realizadas para confirmar estas hipóteses.

As diferenças relativas demonstraram ranqueamento diferente das variedades crioulas para as variáveis DIF1 e DIF2, havendo a formação de 5 grupos estatísticos. Para DIFR1 apenas as variedades V 6 (203%), V 2 (200%) e V 16 (180%) permaneceram no grupo superior. Por outro lado, as variedades crioulas V 45, V 1, V 20, V 17, V 7, V 36, V 33, V 21, V 44, V 9, V 19, V 41, V 48, V 38, V 29, V 24, V 31 e o híbrido H 22 passaram a compor o grupo inferior com crescimento variando de 68% (H 22) a 100% (V 45) em relação ao comprimento inicial (Tabela 11). Para a variável DIFR2, as variedades crioulas V 6, V 2 e V 16 mantiveram a mesma superioridade observada em DIFR1. Porém, de modo inesperado o híbrido H 22, apresentou grande recuperação no comprimento radicular após permanecer em solução mínima de Ca^{2+} (40 mg L^{-1}), com 204% de recrescimento. Estes resultados vêm de encontro com as hipóteses levantadas para a variável DIF2, onde este comportamento poderia ser explicado pelo mecanismo de tolerância do tipo simplástico observado para o híbrido H 44.

Os resultados de todas as variáveis analisadas no 4º experimento (híbridos) e no 6º (variedades crioulas), em que ambos foram submetidos ao mesmo período de exposição (48 h) ao Al^{3+} , evidenciaram claramente comportamento superior do

germoplasma de milho crioulo para tolerância ao alumínio quando comparado ao germoplasma de milho híbrido. Estas diferenças observadas podem ser reflexo dos ciclos continuados de seleção natural e artificial que estas variedades crioulas tem sido submetidas nos seus respectivos ambientes de cultivo. Ao passo que, os híbridos passaram por ciclos acentuados de seleção artificial durante o seu desenvolvimento principalmente para características como o rendimento de grãos e a adequação agrônômica para o ideotipo de planta com: ciclo vegetativo e reprodutivo, estatura de planta, índice de acamamento, arquitetura de planta, entre outros.

Os valores de ITR_{Al} para as variedades crioulas também foram calculados com os dados do DIF1, bem como os híbridos H 22 e H 44 como testemunhas sensível e tolerante ao alumínio. A variedade V 6 (Dente de Ouro 2) com ITR_{Al} de 5,3 destacou-se com maior índice de tolerância relativo dentre todos os genótipos analisados, mesmo quando comparada ao híbrido H 44 (padrão de tolerância). Através do índice foi possível verificar neste germoplasma que 25 das 50 variedades avaliadas apresentaram comportamento tolerante a toxidez pelo alumínio com valores de ITR_{Al} maior ou igual a 4. Nenhuma das variedades crioulas apresentou valores de ITR_{Al} menor que 2, sendo o menor índice observado para a variedade Caiano (V 41) com 2,9 (Figuras 25 e 26).

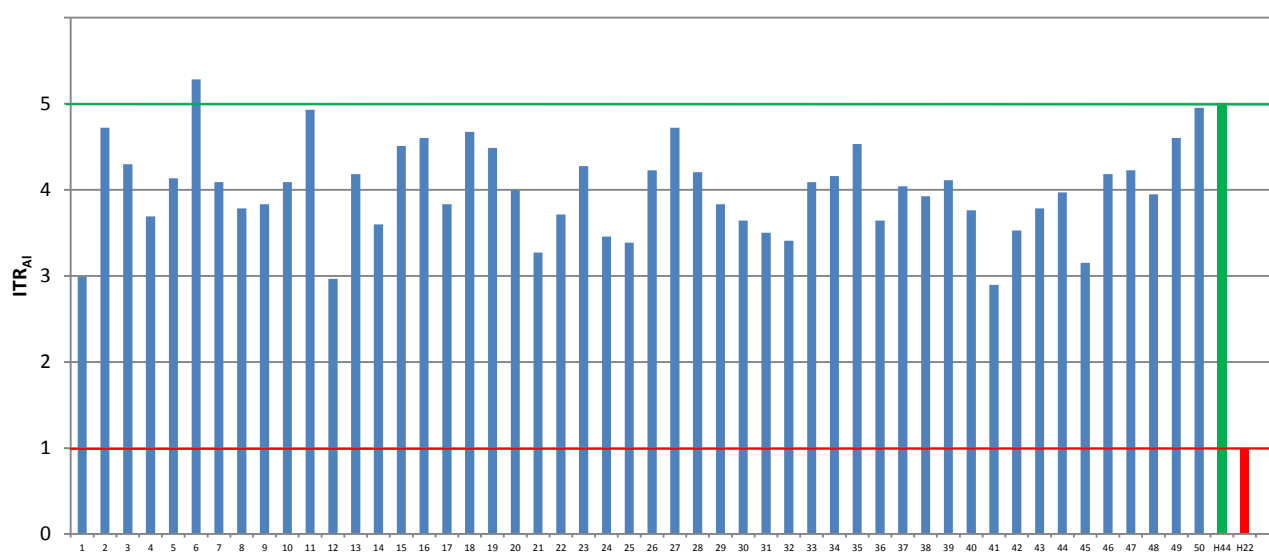


Figura 25. Valores do índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR_{Al}) do 6º experimento (48 h) para as 50 variedades crioulas de milho. Ponta Grossa, 2011.



Figura 26. Aspecto visual do sistema radicular de algumas variedades crioulas após 48 h de exposição ao alumínio. **A-** Variedades com $ITR_{Al} \geq 4$. **B-** Variedades com $ITR_{Al} \leq 3,5$. Ponta Grossa, 2011.

O número de variedades crioulas consideradas tolerantes ao alumínio foi bastante superior quando comparado com os resultados obtidos por Machado et al. (1998) na avaliação de 36 variedades crioulas de milho coletadas das regiões sul e sudeste do Brasil. Os autores verificaram que apenas 3 variedades (Brancão, Quarentão e Sabugo Fino) obtiveram ITR_{Al} acima de 4, sendo ambas oriundas de regiões com problemas de toxidez por alumínio. Por outro lado, outras 3 variedades (Bico de Ouro, Asteca VA e Caiano de Sobrália) apresentaram ITR_{Al} menor que 1, demonstrando comportamento extremamente sensível ao elemento em níveis tóxicos. Os resultados obtidos neste experimento serviram para confirmar a hipótese inicial de que estas variedades crioulas oriundas de pequenas propriedades de

diferentes locais de coleta (Espírito Santo, Paraná e Rio Grande do Sul), são compostas em sua grande maioria por genótipos com elevada tolerância ao alumínio, possivelmente pela presença de genes de tolerância a este elemento.

A classificação dos diferentes genótipos de milho mediante o cálculo do índice de tolerância relativa permitiu, através da análise de distribuição de frequências, confirmar a maior toxidez do Al^{3+} nos híbridos de milho quando expostos a um período de 96 h, pelo aumento na frequência de genótipos da classe 2 e respectiva redução na classe 3 do ITR_{Al} (Figura 27-A,B). A maior tolerância ao Al^{3+} pode ser

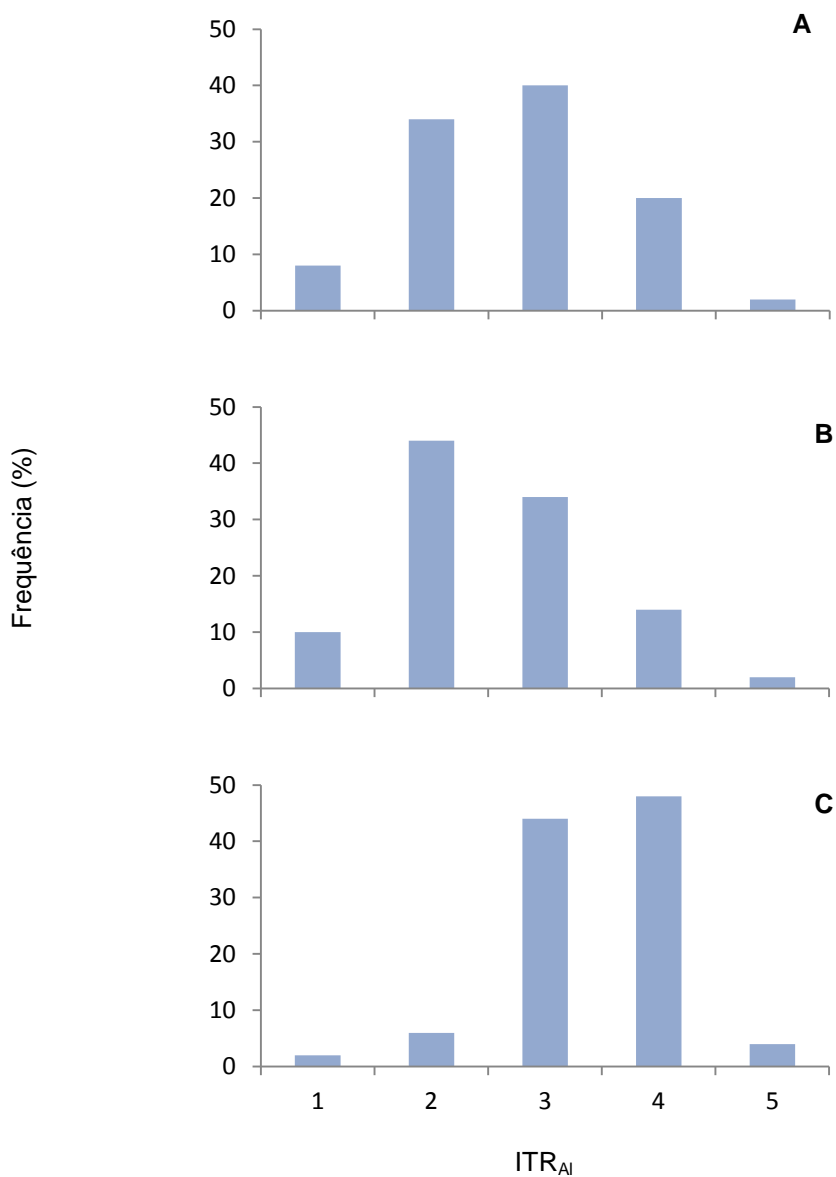


Figura 27. Distribuição de frequência dos genótipos nas respectivas classes do índice de tolerância relativo ao alumínio (ITR_{Al}). **A-** Híbridos expostos a 48 h, **B-** Híbridos expostos a 96 h, **C-** Variedades crioulas expostas a 48 h. Ponta Grossa, 2011.

visualizada no germoplasma de milho crioulo, uma vez que apresentou maior frequência de genótipos (92%) nas classes 3 e 4 do ITR_{AI} quando comparado ao germoplasma de híbridos expostos por 48 h (60%) nas mesmas classes do referido índice (Figura 27-A,C).

4.4. Estimativas dos parâmetros genéticos para a tolerância ao Al^{3+} em milho

A estimativa de parâmetros genéticos através dos componentes da variância fenotípica tem possibilitado aos melhoristas conhecer a base genética do germoplasma sob seleção bem como prever ganhos genéticos com a seleção artificial para características de interesse agrônomo. As magnitudes estimadas da variância genética, variância ambiental, herdabilidade e os coeficiente de variação genético e ambiental indicam para aquela amostra aleatória de genótipos a possibilidade de sucesso na obtenção de populações melhoradas bem como situação favorável para a seleção artificial (VENCOVSKI,1987).

A avaliação da tolerância e ou sensibilidade ao alumínio numa amostra aleatória de 52 híbridos oriundos de diferentes empresas de melhoramento através das variáveis DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2 em dois experimentos possibilitaram conhecer a variabilidade genética deste caráter bem como prever sucesso seletivo no desenvolvimento de populações melhoradas para a tolerância a alumínio.

As estimativas dos parâmetros genéticos para o 4° e 5° experimentos revelaram para todas as variáveis (DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2) estimativas de variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$) superiores em relação a variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$), indicando que estas variáveis fenotípicas podem ser confiáveis na discriminação de híbridos para tolerância ao Al^{3+} , estando de acordo com os resultados obtidos por Martins et al. (1999). As estimativas da variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$) variaram de 0,003 para DIFR1 a 0,050 para DIF2 no 4° experimento e de 0,004 (DIFR1 e DIFR2) a 0,040 (DIF1 e DIF2) no 5° experimento. Esses valores demonstram a baixa interferência do ambiente na obtenção destas variáveis, já que o experimento foi realizado em laboratório sob condições ambientais mais controláveis. As estimativas da variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$) no 4° experimento variaram de 0,01 (DIFR1) a 0,28 (DIF2) e no 5° experimento de 0,01 (DIFR1 e DIFR2) a 0,21 (DIF2) (Tabela 12). Os valores obtidos da variância genética confirmaram a grande variabilidade genética para tolerância existente entre os diferentes híbridos de milho, bem como a hipótese de que esta característica seja controlada por poucos genes com grande efeito dos respectivos

alelos para o fenótipo tolerância e ou sensibilidade ao alumínio. Resultados semelhantes foram observados por Priolli et al. (2000) ao avaliar o comprimento líquido da raiz principal de milho. Os autores verificaram grande efeito genético para a característica através da ação de 2 a 3 genes envolvidos na expressão da tolerância ao alumínio em milho.

Tabela 12. Estimativas dos parâmetros genéticos: variância ambiental ($\hat{\sigma}^2_e$), variância genética ($\hat{\sigma}^2_g$), herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}^2_a), média geral (Y_0), desvio padrão da variância genética (dp_{vg}), coeficiente de variação genético (CV_g), coeficiente de variação ambiental (CV_e) e coeficiente b, para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) (4° e 5° experimentos). Ponta Grossa, 2011.

Parâmetro	4° Experimento (48 h)			
	DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
$\hat{\sigma}^2_e$	0,04	0,05	0,003	0,004
$\hat{\sigma}^2_g$	0,22	0,28	0,01	0,02
\hat{h}^2_a	0,95	0,95	0,93	0,93
Y_0	7,01	13,16	1,21	2,28
dp_{vg}	0,45	0,52	0,11	0,12
CV_g (%)	6,66	4,03	9,10	5,45
CV_e (%)	2,69	1,66	4,24	2,65
Coeficiente b	2,47	2,42	2,14	2,05
Parâmetro	5° Experimento (96 h)			
	DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
$\hat{\sigma}^2_e$	0,04	0,04	0,004	0,0042
$\hat{\sigma}^2_g$	0,20	0,21	0,0118	0,012
\hat{h}^2_a	0,93	0,94	0,89	0,90
Y_0	1,70	1,93	0,44	0,50
dp_{vg}	0,45	0,46	0,11	0,11
CV_g (%)	26,36	23,71	24,68	21,88
CV_e (%)	12,20	10,24	15,08	12,92
Coeficiente b	2,16	2,32	1,64	1,69

O controle genético desta característica em milho parece bastante divergente entre os diversos autores a partir da avaliação de diferentes germoplasmas de milho, bem como de técnicas diferenciadas de avaliação (campo e solução nutritiva). Na literatura parece existir um consenso quanto a existência de poucos genes, com ação dominante (RHUE et al., 1978; GARCIA JÚNIOR e SILVA, 1979 e MIRANDA et al., 1984) a efeitos aditivos (SAWAZAKI e FURLANI, 1987). Embora o padrão mais

complexo de herança (quantitativo) a tolerância ao alumínio tenha sido proposto por Magnavaca (1982) e Pandey e Gardner (1992).

A estimativa dos coeficientes de herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}^2_a) evidenciaram herdabilidade variando de 93 (DIFR1 e DIFR2) a 95% (DIF1 e DIF2) no 4° experimento. De modo similar a herdabilidade variou de 89 (DIFR1) a 94% (DIF2) no 5° experimento (Tabela 12). Esses valores são semelhantes aos obtidos por Mendes et al. (2010), os quais estimaram herdabilidade no sentido amplo em 89,7% para o comprimento líquido da raiz (CLR) através da avaliação das gerações de segregação do cruzamento entre as linhagens Cateto (tolerante) e L53 (sensível). Os valores elevados da herdabilidade destas variáveis indicam facilidade no processo de seleção artificial pela ampla variabilidade genética existente e pequenos efeitos ambientais associados. Esta proposição é confirmada quando se observa os valores do coeficiente b (CV_g/CV_e) superiores a 1, para todas as variáveis, o que indica situação bastante favorável para a seleção de tolerância ao alumínio neste germoplasma de milho (Tabela 12).

As estimativas dos parâmetros genéticos para tolerância ao alumínio a partir do germoplasma de milho crioulo (6° experimento) revelou tendência similar mas com magnitudes diferenciadas em relação ao germoplasma de milho híbrido. Com relação a variância ambiental ($\hat{\sigma}^2_e$) os valores estimados variaram de 0,02 para DIFR1 a 1,01 para DIF2. Enquanto que para a variância genética ($\hat{\sigma}^2_g$) as estimativas variaram de 0,11 para DIFR1 a 2,30 para DIF2 (Tabela 13). Estas estimativas estão em acordo com as obtidas nos experimentos anteriores, onde a variância genética ($\hat{\sigma}^2_g$) foi superior em relação a variância ambiental ($\hat{\sigma}^2_e$), possivelmente pelo controle genético estar relacionado a poucos genes. Embora a magnitude das variâncias genéticas neste germoplasma crioulo sejam substancialmente superiores ao germoplasma de milho híbrido.

A avaliação do desvio padrão da variância genética (dp_{vg}) permitiu uma interpretação direta da variação genética obtida para cada variável. Os valores observados para o desvio padrão da variância genética foram relativamente baixos e bastante similares para o germoplasma de milho híbrido (4° e 5° experimentos). Para as variáveis DIF1 e DIF2 os desvios variaram de 0,45 a 0,52, enquanto que para DIFR1 e DIFR2 foram de 0,11 a 0,12 (Tabela 12). No 6° experimento (germoplasma crioulo), os desvios foram superiores para todas as variáveis analisadas com variação de 0,9 (DIF1) a 1,52 (DIF2) e de 0,33 (DIFR1) a 0,65

(DIFR2) (Tabela 13). As evidências observadas sugerem maior variabilidade genética para todas as variáveis estudadas dentro do germoplasma de milho crioulo para tolerância ao alumínio tóxico. Esta afirmação pode ser confirmada pela origem destas variedades uma vez que estes genótipos de milho passaram por ciclos continuados de seleção natural e artificial em ambientes com elevada saturação por alumínio, o que possivelmente acarretou na incorporação de diferentes alelos de tolerância neste germoplasma. Sawazaki e Furlani (1987) relataram que a tolerância em linhagens endogâmicas originárias de milho Cateto é condicionada por genes menores com efeitos genéticos prioritariamente aditivos. Da mesma forma que nas variedades crioulas, este milho Cateto tem sido cultivado por indígenas e pequenos produtores em solos com elevada saturação por alumínio, o que através da seleção natural tem propiciado o incremento no nível de tolerância deste germoplasma.

Tabela 13. Estimativas dos parâmetros genéticos: variância ambiental ($\hat{\sigma}_e^2$), variância genética ($\hat{\sigma}_g^2$), herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}_a^2), média geral (Y_0), desvio padrão da variância genética (dp_{vg}), coeficiente de variação genético (CV_g), coeficiente de variação ambiental (CV_e) e coeficiente b, para as variáveis DIF1 (crescimento radicular líquido), DIF2 (crescimento radicular final), DIFR1 (crescimento radicular líquido relativo) e DIFR2 (crescimento radicular final relativo) (6° experimento). Ponta Grossa, 2011.

Parâmetros	6° Experimento (48 h)			
	DIF1	DIF2	DIFR1	DIFR2
$\hat{\sigma}_e^2$	0,41	1,01	0,02	0,06
$\hat{\sigma}_g^2$	0,81	2,30	0,11	0,42
\hat{h}_a^2	0,86	0,87	0,94	0,95
Y_0	6,98	13,06	1,21	2,27
dp_{vg}	0,90	1,52	0,33	0,65
CV_g (%)	12,85	11,61	27,50	28,47
CV_e (%)	9,21	7,70	12,11	10,72
Coeficiente b	1,40	1,51	2,27	2,66

As estimativas dos coeficientes de herdabilidade no sentido amplo (\hat{h}_a^2) foram estimados em 86, 87, 94 e 95% para as variáveis DIF1, DIF2, DIFR1 e DIFR2, respectivamente (Tabela 13). Estes coeficientes foram superiores a herdabilidade observada por Sawazaki e Furlani (1987) para o comprimento líquido da radícula em milho cateto (79%). Da mesma forma que no germoplasma de milho híbrido, valores elevados da herdabilidade para todas as variáveis indicam presença de grande variabilidade genética, possivelmente pela ação de poucos genes com grande efeito

na manifestação do caráter tolerância ao alumínio entre as diferentes variedades de milho crioulo do banco de germoplasma da UEPG.

Os coeficientes b mostraram as mesmas tendências observadas com relação a variância genética e as suas magnitudes revelaram uma situação bastante favorável para a seleção. Para as variáveis DIF1 e DIF2 as estimativas do coeficiente b foram de 1,40 e de 1,51, respectivamente. Para os valores relativos (DIFR1 e DIFR2) os coeficientes b apresentaram valores superiores a 2 (Tabela 13). De maneira geral, coeficientes b superiores a 1, indicam precisão experimental na coleta dos dados bem como situação bastante favorável para a seleção artificial de fontes de tolerância ao alumínio (VENCOVSKY e BARRIGA, 1992).

A partir das estimativas dos parâmetros genéticos obtidos para os três experimentos, foi possível visualizar grande contribuição da variância genética, pequenos efeitos do componente ambiental e elevadas estimativas dos coeficientes de herdabilidade no sentido amplo para as quatro variáveis estudadas tanto no germoplasma de milho híbrido quanto no germoplasma de variedades crioulas. Possivelmente, o controle genético da tolerância ao alumínio nos dois germoplasmas avaliados é baseado na ação de poucos genes com grande efeito para o caráter tolerância. Estes fatores associados aos valores elevados da relação CV_g/CV_e para as quatro variáveis analisadas, pressupõem uma condição muito favorável para a seleção artificial no sentido de desenvolvimento de populações melhoradas com maior tolerância ao alumínio em milho.

5. CONCLUSÕES

A metodologia de solução mínima (alumínio + cálcio) foi eficiente na separação de genótipos sensíveis e tolerantes ao alumínio nos diferentes germoplasmas de milho;

A dose de 4 mg L⁻¹ de alumínio em solução mínima associada ao período de exposição de 48 h permitiu a melhor discriminação entre os genótipos para a tolerância ao elemento em níveis tóxicos;

A avaliação do germoplasma híbrido, através das variáveis crescimento radicular líquido (DIF1), crescimento radicular final (DIF2) e seus valores relativos (DIFR1 e DIFR2) revelou variabilidade genética para tolerância ou sensibilidade ao alumínio, independente do período de exposição;

O período de exposição por 96 h ao alumínio reduziu sensivelmente o crescimento/recrescimento radicular na maioria dos híbridos de milho, embora alguns genótipos tenham apresentado resposta positiva ao maior período de exposição;

O germoplasma de milho crioulo apresentou grande variabilidade genética com predomínio para maior tolerância ao Al³⁺ entre os genótipos estudados;

A utilização do índice de tolerância relativa ao alumínio (ITR_{Al}) permitiu visualizar classes fenotípicas distintas para o caráter quando comparado com as medidas de crescimento radicular. Os ITR_{Al}'s confirmaram o predomínio da tolerância ao Al³⁺ no germoplasma crioulo em relação aos genótipos híbridos;

As elevadas estimativas dos parâmetros genéticos (variância genética, herdabilidade e coeficiente b) em ambos germoplasmas (híbridos e variedades crioulas) indicam a possibilidade de que o controle genético da tolerância seja baseado na ação de poucos genes com grande efeito para o caráter. Situação muito favorável para a seleção artificial no sentido de desenvolver populações melhoradas com maior tolerância ao alumínio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDRADE JÚNIOR, V.C.; MOTA, J.H.;CASTRO, N.E.A. Avaliação da tolerância a alumínio de dois genótipos de sorgo. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v.4, n.7, 2005.

ANIOL, A.; GUSTAFSON, J.P. Chromosom elocaion of genes controlling aluminium tolerance in wheat, rye and triticale. **Canadian Journal of Genetic and Citology**, Ottawa, v.26, p.701-705, 1984.

ARAÚJO, P.M.; NASS, L.L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v.59, n.3, p.589-593, 2002.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exsudates, and internal detoxification as clues to the mecanismos of aluminium toxicity and resistance: **Annual Review of environmental Experimental Botany**, Elmsford, v.48, p.75-92, 2002.

BEEMSTER, G.T.S.; BASKIN, T.I. Stunted Plant 1 mediate effects of cytokinin, but not of auxin, on cell division and expansion in the root of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.124, p.1718-1727, 2000.

BRECKLE, A.W. Growth under stress: heavy metals. In: WAISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. **Plant root: the hidden half**. New York: Marcel Dekker, p.274-351, 1991.

BRONDANI, C.; PAIVA, E. Análise de RFLP da tolerância à toxidez do alumínio no cromossomo 2 do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.8, p.575-579, 1996.

CAMARGO, C.E.O.; FELÍCIO, J.C. Tolerância de cultivares de trigo, triticale e centeio em diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v.43, n.1, p. 9-16, 1987.

CAMARGO, C.E.O.; OLIVEIRA, O.F. efeito de diferentes concentrações de sais em solução nutritiva na tolerância de cultivares de trigo à toxicidade ao alumínio. **Bragantia**, Campinas, v.40, n.8, p. 93-100, 1981.

CAMARGO, C.E.O. Efeitos de níveis de cálcio combinados com diferentes concentrações de sais na tolerância de trigo à toxicidade de alumínio, em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v.44, p.659-668, 1985.

CAMARGO, C.E.O.; FELÍCIO, J.C.; FERREIRA FILHO, A.W.P. Triticale: tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v.50, n.2, p. 323-330, 1991.

CAMBRAIA, J.; CAMBRAIA, M.C. Avaliação de híbridos de milho quanto à tolerância ao alumínio, em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.241, p.297-307, 1995.

CAMBRAIA, J.; SILVA, M.A.; CANO, M.A.O.; SANT'ANNA, R. Método simples para a avaliação de cultivares de sorgo quanto à tolerância ao alumínio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.3, n.2, p.87-95, 1991;

CANAL, I.N.; MIELNICZUK, J. Parâmetros de absorção de potássio em milho (*Zea mays* L.), afetadas pela interação alumínio-cálcio. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.35, n.3, p.336-340, 1983b.

CANAL, I.N.; MIELNICZUK, J. Translocação de cálcio e alumínio em raízes intactas de milho (*Zea mays* L.). **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.35, n.3, p.331-336, 1983a.

CANTERI, M. G., ALTHAUS, R. A., VIRGENS FILHO, J. S., GIGLIOTI, E. A., GODOY, C. V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24. 2001.

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal Agriculture Food and Chemical**, v. 23, p.458-460, 1975.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira, grãos, quarto levantamento, janeiro de 2011. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília: Conab, 2011.

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

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

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

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

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

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; HEBB, D.M.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley whit the *ALMT1* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.101, n.42, p.15249-15254, 2004.

DELHAIZE, E.; GRUBER, B.D.; RYAN, P.R. The roles of organic anion permeases in aluminium tolerance and mineral nutrition. **FEBS Lett**, v.581, p.2255-2262, 2007.

DONCHEVA, S.; AMENÓS, M.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Root cell patterning: a primary target for aluminium toxicity in maize. **Journal of Experimental Botany**, v.56, n.414, p.1213-1220, 2005.

DURRET, T.P.; GASSMAN, W.; ROGERS, E.E. The FRD3-mediated efflux of citrate into root vasculature is necessary for efficient iron translocation. **Plant Physiology**, v.144, p.197-205, 2007.

ECHART, C.L.; CAVALLI-MOLINA, S. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismos de tolerância e seu controle genético. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.3, p.531-541, 2001.

FERREIRA, D.F. SISVAR: programa estatístico. Versão 5.3. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 1999.

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

FURLANI, A.M.C.; FURLANI, P.R. Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas. **Boletim Técnico**, 121. Campinas, Instituto Agrônomo, 34 p., 1988.

FURLANI, P.R.; LIMA, M.; MIRANDA, L.T. Avaliação de linhagens, materiais comerciais e duas populações de milho para tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.6, p.655-660, 1986.

FURUKAWA, J.; YAMAJI, N.; WANG, H.; MITANI, N.; MURATA, Y.; SATO, K.; KATSUHARA, M.; TAKEDA, K.; MA, J.F. An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant Cell Physiology**, v.48, p.1081-1091, 2007.

GARCIA JÚNIOR, O.; SILVA, W.J. Herança da tolerância ao alumínio na variedade de milho Pirão. **Revista Ceres**, Viçosa, v.25, n.137, p.71-78, 1979.

GIAVENO, C.D.; MIRANDA FILHO, J.B.; Rapid Screening for aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.4, p.847-850, 2000.

GUNSÉ, B.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Water transport properties of roots and root cortical cell in próton and Al-stressed maize varieties. **Plant Physiology**, Bethesda, v.113, p.595-602, 1997.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F.; BERTAN, I.; SILVA, J.A.G.; SCHMIDT, D.A.M.; VALÉRIO, I.P.; MAIA, L.C.; FONSECA, D.A.R.; REIS, C.E.S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.2, p.219-228, 2007.

HORST, W.J.; SCHMOHL, N.; KOLLMEIER, M.; BALUSKA, F. SIVAGURU, M. Does aluminium affect root growth of maize through interaction with the cell wall – plasma membrane - citoeskeleton continuum? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.215, p.163-174, 1999.

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

HU, F.Y.; TAO D.Y.; SACKS, E.; FU, B.Y.; XU, P. Convergent evolution of perenniality in rice and sorghum. **Proceeding National Academy Science**, USA, v.100, p.4050-4054, 2003.

JORGE, R.A.; ARRUDA, P. Aluminium-induced organic acid exudation by roots of na aluminium-tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, Oxford, v.45, n.4, p.675-681, 1997.

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

KOCHIAN, L.V.; PENCE, N.S.; LETHAM, L.D.; PIÑEROS, M.A.; MAGALHÃES, J.V.; HOEKENGA, O.A.; GARVIN, D.F. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. **Plant Soil**, The Hague, v.247, p.109-119, 2002.

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

LAGOS, M.B.; FERNANDES, M.I.M.; CAMARGO, C.E.O.; FEDERIZZI, L.C.; CARVALHO, F.I.F. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.14, p.1011-1020, 1991.

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

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

MACHADO, E.C.; PEREIRA, A.R. Eficiência de conversão e coeficiente de manutenção da planta inteira, das raízes e da parte aérea em milho e arroz submetidos ao estresse de alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, p.845-855, 1990.

MACHADO, P.L.O.A. Considerações gerais sobre a toxicidade do alumínio nas plantas. EMBRAPA-CNPS. **Documentos**, n.2, Rio de Janeiro, 1997.

MACHADO, A.T.; MACHADO, C.T.T.; FURLANI, P.R. Avaliação e caracterização de variedades locais de milho para a condições adversas de ambiente. In: SOARES, A.C.; MACHADO, A.T.; SILVA, B.M.; WEID, J.M. (Orgs.). *Milho Crioulo: Conservação e uso da biodiversidade*. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e serviços a projetos em agricultura alternativa, p.151-185, 1998.

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

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

MAGALHÃES, J.V. How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. **Annals of Botany**, v.106, p.199-203, 2010.

MAGNAVACA, R. Genetic variability and the inheritance of aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). Thesis (Doctor of Philosophy in Agronomy) – University of Nebraska, Lincoln, 135 p., 1982.

MARON, L.G.; KIRST, M.; MAO, C.; MILNER, M.J.; MENOSSE, M.; KOCHIAN, L.V. Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots. **New Phytologist**, v.179, p.116-128, 2008.

MARON, L.G.; PIÑEROS, M.A.; GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V.; PLEIMAN, J.K.; MAO, C.; SHAFF, J.; BELICUAS, S.N.J.; KOCHIAN, L.V. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, v.61, p.728-740, 2010.

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

MARTINS, A.C.; SOUZA SOBRINHO, F.; GOMES, F.T.; CÔSER, A.C.; MACHADO, V.S.; FERNANDES, N.R.A.; ALVES, F.C.T.; ALVES, D.B.; ALMEIDA, M. Resposta da *Brachiaria brizantha* a diferentes concentrações de alumínio e valores de pH em solução nutritiva. In: FERTBIO, 27. **Anais**. Bonito, 2006.

MAZZOCATO, A.C.; ROCHA, P.S.G.; SERENO, M.J.C.M.; BOHNEM, H.; GRONGO, V.; BARBOSA NETO, J.F. Tolerância ao alumínio em plântulas de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, p.19-24, 2002.

MENDES, F.F.; PARENTONI, S.N.; GUIMARÃES, L.J.M.; GUIMARÃES, P.E.O.; PACHECO, C.A.P.; MACHADO, J.R.A.; MEIRELLES, W.F.; SILVA, A.R. Controle genético da tolerância ao alumínio em milho. **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, Goiânia: Associação Brasileira da Milho e Sorgo, 2010.

MIRANDA, L.T.; FURLANI, P.R.; MIRANDA, L.E.C.; SAWAZAKI, E. Genetics of environmental resistance and super genes: latente aluminum tolerance. **Maize Genetics Cooperation News Letter**, Columbia, v.58, p.46-48, 1984.

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

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

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

MIYAZAWA, M.; CHIARICE, G.D.; PAVAN, M.A. Amenização da toxicidade de alumínio às raízes do trigo pela complexação com ácidos orgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.16, p.209-215, 1992.

MORIYAMA, Y.; HIASA, M.; MATSUMOTO, T.; OMOTE, H. Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. **Xenobiotica**, v.38, p.1107-1118, 2008.

NASS, L.L.; PATERNIANI, E. Pre-breeding: a link between genetic resources and maize breeding. **Scientia Agricola**, v.57, p.581-587, 2000.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F.E.; GUIMARÃES, C.T.; MARTINS, P.R.; PARENTONI, S.N.; CARNEIRO, N.P.; LOPES, M.A.; MORO, J.R. Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. **Euphytica**, Wageningen, v.130, p.223-232, 2003.

NODARI, R.O.; CARVALHO, F.I.F.; FEDERIZZI, L.C. Genetic bases of the inheritance of Al-toxicity tolerance in wheat genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.17, n.2, p.269-280, 1982.

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

OMOTE, H. HIASA, M.; MATSUMOTO, T.; OTSUKA, M. E MORIYAMA, Y. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. **Trends Pharmacology Science**, v.27, p.587-593, 2006.

PANDEY, S.; GARDNER, C.O. Recurrent selection for population, variety, and hybrid improvement in tropical maize. **Advanced Agronomy**, v.48, p.1-87, 1992.

PARENTONI, S.N.; ALVES, V.M.C. ; MILACH, S.K.; CANÇADO, G.M.A.; BAHIA FILHO, A. F. C. Melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos. In: Nass, L.L; Valois, A.C.C.; Melo, I.S de; Valadares-Ingliš, M.C.. (Org.). **Recursos genéticos e melhoramento - Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, v. 1, p. 783-851, 2001.

PARKER, D.R.; NORVELL, W.A.; CHANEY, R.L. GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible computers. In: LOEPPERT, R.H.; SCHWAB, A.P.;

GOLDBERG, S. eds, Chemical Equilibrium and Reaction Models. **Soil Society of America**, Madison, WI, p.253-269, 1995.

PATERNIANI, E.; NASS, L.L.; SANTOS, M.X. O valor dos recursos genéticos de milho para o Brasil: uma abordagem histórica da utilização do germoplasma. In: UDRY, C.W.; DUARTE, W. (Org.) Uma história brasileira do milho: o valor dos recursos genéticos. Brasília: Paralelo 15, p.11-41, 2000.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z. Fatores bióticos e abióticos em cultivares de milho e estratificação ambiental: avaliação IAC/CATI /Empresas – 1999-2000. **Boletim Científico**, Campinas: Instituto Agrônomo, p.11-17, 2000.

PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; FURLANI, P.R. Tolerância à toxicidade de alumínio de linhagens e híbridos de milho em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v.61, n.1, p.11-16, 2002.

PAVAN, M.A.; BINGHAM, F.T.; PRATT, P.F. Redistribution of exchangeable calcium, magnesium, and aluminum following lime or gypsum applications to a Brazilian Oxisol. **Soil Science Society of America Journal**, v.48, p.33-38, 1984.

PELLET, D.M.; GRUNES, D.L.; KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Heidelberg, v.196, p.788-795, 1994.

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

PIÑEROS, M.A.; KOCHIAN, L.V. A patch clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize, identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 125, p.292-305, 2001.

PIÑEROS, M.A.; MAGALHÃES, J.V.; ALVES, V.M.C.; KOCHIAN, L.V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Lancaster, v.129, p.1194-1206, 2002.

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

PRIOLI, A.J.; SCAPIM, C.A.; PRATI, R.M.; PRIOLLI, S.M.A.P.; BRAVO, J.P.; HOSHINO, A.A.; BONI, T.A.; MUNHOZ, R.E.F. Genetic analysis of means and variances of aluminum tolerance in maize. **Acta Scientiarum**, v.22, n.4, p.869-875, 2000.

PURCINO, A.A.C; ALVES, V.M.C.; GUIMARÃES, C.T.; SOUZA, I.R.P.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, E.; PARENTONI, S.N. Aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da toxidez de alumínio em milho. **Repositório Alice**, Embrapa Milho e Sorgo, 2008, disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/browse>.

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

RIBEIRO JÚNIOR, I.V.; MELO, A.L.P. SAEG: Software estatístico, Viçosa, MG, 2008.

RIEDE, C.R.; ANDERSON, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. **Crop Science**, Madison, v.36, p.905-909, 1996.

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

RYAN, P.R.; KINRAIDE, T.B.; KOCHIAN, L.V. Al^{3+} - Ca^{2+} interactions in aluminum rhizotoxicity. I. Inhibition of root growth is not caused by reduction of calcium uptake. **Planta**, Heidelberg, v.192, p.98-103, 1994.

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; JONES, D.L. Function and mechanism os organic anion exudation from plant roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.22, p.531-536, 1995.

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

RYAN, P.R.; RAMAN, H.; GUPTA, S.; HORST, W.J.; DELHAIZE, E. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, v.149, p.340-351, 2009.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y; ÉZAKI, B. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, v. 37, p.645-653, 2004.

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

SCAPIM, C.A.; CARVALHO, C.G.P.; CRUZ, C.D. Uma proposta de classificação dos coeficientes de variação para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.5, p.683-686, 1995.

SIBOV, S.T.; GASPAR, M.; SILVA, M.J.; OTTOBONI, L.M.M.; ARRUDA, P.; SOUZA, A.P. Two genes control aluminum tolerance in maize: Genetic and molecular mapping analyses. **Genome**, Ottawa, v.42, p.475-482, 1999.

SPHEAR, C.R.; SOUZA, L.A.C. Tempo de exposição e fonte de cálcio na seleção de soja tolerante ao alumínio em hidroponia. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa, 2004, 16p.

TAYLOR, G.J.; STEPHENS, J.L., HUNTE, D.B.; BERSTCH, P.M.; ELMORE, D.; RENGEL, Z.; REID, R. Direct measurement of aluminium uptake and distribution in single cells of *Chara coralline*. **Plant Physiology**, v.123, p.987-996, 2000.

TECHIO, J.W. Crescimento de milho em solução com alumínio e produção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular. Universidade de Passo Fundo. Março de 2009. 106 p. Dissertação de Mestrado.

VENCOVSKI, R. Herança Quantitativa. In: PATRENIANI, E. & VIÉGAS, G.P. (Eds.). **Melhoramento e Produção de Milho**. Fundação Cargill, Campinas, 1987.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992, 496 p.

WAGNER, C.M.; MILACH, S.C.K.; FEDERIZZI, L.C. Genetic inheritance of aluminum tolerance in oat. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v.1, p.22-26, 2001.

WIGHT, C.P.; KIBITE, S.; TINKER, N.A.; MOLNAR, S.J. Identification of molecular markers for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.100, p.222-231, 2006.

XU, A.B.; ZHU, M.Y.; DANG, B.Y.; YUAN, M.B.; HUANG, C.N.; YU, J.J. Studies on genetic improvement of barley yield on reddish soil. **Journal of Hangzhou University**, v.20, p.88-92, 1993.

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

ZHENG, S.J.; YANG, J.L. Target sites of aluminum toxicity. **Biologia Plantarum**, v.49, p.321-331, 2005.

ZHENG, S.J.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced specific secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiology**, Lancaster, v.117, p.745-751, 1998.