

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

SELEÇÃO DE *Lotus corniculatus* L. TOLERANTE AO ALUMÍNIO

ALINE JANKE
Engenheira Agrônoma (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Zootecnia
Área de Concentração Plantas Forrageiras

Porto Alegre (RS), Brasil
Maio, 2009

*"Tantas vezes pensamos ter chegado,
Tantas vezes é preciso ir além."*

Fernando Pessoa

*Aos meus pais, NAIR e RUBERT, pelo amor incondicional.
A minha irmã, AMANDA, pelo amor e incentivo.
Sem vocês eu nada seria...*

DEDICO

AGRADEÇO...

Ao Pai do Céu pela minha vida e por sempre estar ao meu lado!

A minha família pelo amor, carinho, incentivo e educação! Família é a base de tudo!

Ao meu Amor, Clebersom, pelo seu amor, amizade, carinho e compreensão, tornando assim minha vida mais bela!

Aos professores da Pós-graduação pelo aprendizado e principalmente ao meu orientador Miguel Dall'Agnol, pela sua confiança, amizade e sobretudo pelos seus ensinamentos de vida!

Aos meus colegas e amigos da pós-graduação, que tornaram esta caminhada repleta de aprendizados... Foi bom ter convivido com vocês!

A CAPES pela concessão da bolsa e a todos os brasileiros, que graças aos seus esforços patrocinaram os meus estudos.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste sonho,

Muito obrigada!

SELEÇÃO DE *Lotus corniculatus* L. TOLERANTE AO ALUMÍNIO¹

Autora: Aline Janke

Orientador: Miguel Dall'Agnol

RESUMO

A utilização de pastagens capazes de tolerar o alumínio em níveis elevados apresenta-se como uma alternativa viável para contornar um dos principais problemas existentes em áreas de cultivo com solos ácidos. Entre as leguminosas forrageiras, o cornichão (*Lotus corniculatus* L.) destaca-se pela sua qualidade nutricional e versatilidade de adaptação. Em função disso, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de selecionar plantas de *L. corniculatus* tolerantes ao alumínio, bem como analisar a diversidade genética existente entre estes materiais com o auxílio de marcadores moleculares do tipo microssatélites. Foram utilizados três genótipos de cornichão (Draco, São Gabriel e UFRGS) em solução nutritiva, contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 100 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio (AlCl_3) e pH controlado em uma faixa de 4,1 - 4,3. Realizaram-se dois ciclos de seleção, sendo as plântulas selecionadas pelo comprimento final das radículas. Posteriormente, testou-se o progresso alcançado pelos ciclos de seleção através de um experimento em solução nutritiva, semelhante ao utilizado nas seleções, com as populações originais e melhoradas, em quatro concentrações de alumínio (0, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3). Foram avaliados o comprimento inicial, final e o crescimento das radículas. Após o término do segundo ciclo de seleção, realizou-se a análise da diversidade genética existente entre os genótipos de cornichão estudados. Foram utilizados 18 pares de *primers* desenvolvidos para *Lotus japonicus* (Regel) Larsen e *Trifolium repens* L. As similaridades genéticas, com base no coeficiente de Jaccard, foram utilizadas para fazer o agrupamento dos genótipos pelo método UPGMA, através do programa NTSYS pc 2.1. O número de alelos e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) também foram calculados para cada loco. A seleção em solução nutritiva mostra-se eficiente na seleção de plântulas de cornichão tolerantes ao alumínio. Os materiais analisados apresentam diferenças em relação a esta característica, destacando-se como o genótipo mais tolerante UFRGS F2, proveniente de dois ciclos de seleção. Os marcadores microssatélites revelam-se adequados para acessar a variabilidade genética entre os genótipos de *L. corniculatus*.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Plantas Forrageiras, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (93p.). Maio, 2009.

SELECTION OF *Lotus corniculatus* L. TOLERANT TO ALUMINUM¹

Author: Aline Janke

Adviser: Miguel Dall'Agnol

ABSTRACT

The use of grasslands capable to tolerate high levels of aluminum is a viable alternative to bypass one of the main problems existing in cultivated areas with acid soils. Among the forage legumes, the birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) stands out for its nutritional quality and versatility of adaptation. Given the importance, this work was carried out to select plants of *L. corniculatus* tolerant to aluminum, and analyze the genetic diversity between these materials with the aid of microsatellite molecular markers. Three genotypes of birdsfoot trefoil were used (Draco, São Gabriel and UFRGS) in nutrient solution containing 200 $\mu\text{mol/L}$ of calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 100 $\mu\text{mol/L}$ of aluminum (AlCl_3) and controlled in a pH range of 4.1 - 4.3. Two selection cycles were made, where the seedlings were selected by the root length. Subsequently, the progress achieved by cycles of selection was tested in an experiment in nutrient solution, similar to that used in the selections, with the original and improved populations, in four concentrations of aluminum (0, 50, 100 and 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3). The initial, final and the growth of the radicle were evaluated. After the end of the second cycle of selection it was carried out the analysis of genetic diversity among genotypes of birdsfoot trefoil studied. Eighteen pairs of primers developed for *Lotus japonicus* (Regel) Larsen and *Trifolium repens* L. were used. The genetic similarities based on Jaccard coefficient was used to make the grouping of genotypes by the UPGMA method, using the program NTSYS pc 2.1. The number of alleles and the polymorphism information content (PIC) were calculated for each locus. The selection in nutrient solution was efficient in the selection of seedlings of birdsfoot trefoil tolerant to aluminum. The materials analyzed differ for this characteristic, with the genotype UFRGS F2, being the most tolerant. The microsatellite markers are suitable for accessing the genetic variability among genotypes of *L. corniculatus*.

¹ Master of Science Dissertation in Forage Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93p.). May, 2009.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 Considerações gerais sobre a toxidez por alumínio..... | 4 |
| 2.1.1 Solos ácidos..... | 4 |
| 2.1.2 Toxidez por alumínio..... | 6 |
| 2.1.3 Mecanismos de tolerância ao alumínio..... | 9 |
| 2.1.4 Controle genético..... | 12 |
| 2.1.5 Métodos de seleção..... | 13 |
| 2.1.6 Fixação simbiótica..... | 17 |
| 2.2 Microssatélites..... | 19 |
| 2.3 <i>Lotus corniculatus</i> L., uma boa espécie forrageira..... | 24 |
| 2.3.1 Origem e biologia..... | 24 |
| 2.3.2 Características agrônômicas..... | 27 |
| 2.3.3 Melhoramento..... | 30 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 33 |
| 3.1 Seleção em solução nutritiva..... | 33 |
| 3.1.1 Avaliação da tolerância ao alumínio..... | 37 |
| 3.2 Análise molecular..... | 38 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 44 |
| 4.1. Avaliação da tolerância ao alumínio..... | 44 |
| 4.2. Análise molecular..... | 54 |
| 5. CONCLUSÕES..... | 61 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 62 |
| 7. APÊNDICES..... | 73 |
| 8. VITA..... | 93 |

RELAÇÃO DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| 1. Primers de microssatélites utilizados na amplificação de seis genótipos de <i>Lotus corniculatus</i> L..... | 41 |
| 2. Comprimento radicular inicial (cm) dos genótipos de cornichão (<i>Lotus corniculatus</i> L.) e alfafa crioula (<i>Medicago sativa</i> L.) utilizados na implantação do experimento de avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva..... | 45 |
| 3. Comprimento radicular final (cm) dos genótipos de cornichão (<i>Lotus corniculatus</i> L.) e alfafa crioula (<i>Medicago sativa</i> L.) aos 14 dias em solução nutritiva contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em quatro concentrações de alumínio (0, 50, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3)..... | 46 |
| 4. Crescimento radicular (cm) dos genótipos de cornichão (<i>Lotus corniculatus</i> L.) e alfafa crioula (<i>Medicago sativa</i> L.) aos 14 dias em solução nutritiva contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em quatro concentrações de alumínio (0, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3)..... | 48 |
| 5. Tamanho alélico (pb), número de alelos (A) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), de cada um dos 18 marcadores de microssatélites analisados na caracterização de seis genótipos de cornichão (<i>Lotus corniculatus</i> L.)..... | 55 |
| 6. Matriz de similaridade genética de seis genótipos de <i>Lotus corniculatus</i> L. analisados através da técnica de microssatélites..... | 56 |

RELAÇÃO DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| 1. Seleção de genótipos de <i>Lotus corniculatus</i> L. tolerantes ao alumínio, em solução nutritiva contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 100 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio (AlCl_3)..... | 34 |
| 2. Polinização de <i>Lotus corniculatus</i> L. (A) inflorescência; (B) retirada da quilha; (C) polinização; (D) formação das vagens..... | 36 |
| 3. Gel de agarose com bandas de DNA das populações de <i>Lotus corniculatus</i> L. em análise do primer de microssatélite TM0817..... | 42 |
| 4. Crescimento radicular médio (cm) de alfafa crioula (<i>Medicago sativa</i> L.) e de três populações originais e melhoradas de cornichão (<i>Lotus corniculatus</i> L.) após 14 dias em solução nutritiva contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em quatro concentrações de alumínio (0, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3)..... | 50 |
| 5. Efeitos da toxidez por alumínio em plântulas de <i>Lotus corniculatus</i> L. | 51 |
| 6. Avaliação da tolerância ao alumínio de nove populações de cornichão (<i>Lotus corniculatus</i> L.) em relação ao crescimento radicular médio das plântulas submetidas a diferentes concentrações de alumínio (0, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3)..... | 52 |
| 7. Dendrograma obtido com base na similaridade genética de seis genótipos de <i>Lotus corniculatus</i> L., utilizando-se 18 marcadores microssatélites..... | 58 |

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| A..... | número de alelos por loco |
| Al ³⁺ | Alumínio |
| ALF..... | Alfafa |
| CF..... | comprimento radicular final |
| CI..... | comprimento radicular inicial |
| CIMMYT..... | Centro Internacional de Melhoramento de Trigo e Milho |
| CR..... | crescimento radicular |
| cv..... | Cultivar |
| DIVMO..... | digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria orgânica |
| DPFA..... | Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia |
| DR..... | genótipo de <i>Lotus corniculatus</i> L. INIA Draco |
| DR-F1..... | genótipo de <i>L. corniculatus</i> INIA Draco após um ciclo de seleção |
| DR-F2..... | Genótipo de <i>L. corniculatus</i> INIA Draco após dois ciclos de seleção |
| FDA..... | Fibra em Detergente Ácido |
| FDN..... | Fibra em Detergente Neutro |
| IAC..... | Instituto Agronômico de Campinas |
| MS..... | Matéria seca |
| pb..... | par de base |
| PIC..... | conteúdo de informação de polimorfismo |
| QTL..... | <i>Quantitative Trait Loci</i> |
| rpm..... | rotações por minuto |
| RS..... | Rio Grande do Sul |
| SG..... | genótipo de <i>L. corniculatus</i> São Gabriel |
| SG-F1..... | Genótipo de <i>L. corniculatus</i> São Gabriel após um ciclo de seleção |
| SG-F2..... | Genótipo de <i>L. corniculatus</i> São Gabriel após dois ciclos de seleção |
| SSR..... | Microssatélite |
| UF..... | Genótipo de <i>L. corniculatus</i> UFRGS |
| UF-F1..... | Genótipo de <i>L. corniculatus</i> UFRGS após um ciclo de seleção |
| UF-F2..... | Genótipo de <i>L. corniculatus</i> UFRGS após dois ciclos de seleção |
| UFC..... | Unidade Formadora de Colônia |
| USDA..... | <i>United States Department of Agriculture</i> |

1. INTRODUÇÃO

Os solos ácidos compreendem grande parte do mundo, principalmente as regiões tropicais e subtropicais úmidas, onde o volume considerável de chuvas e as temperaturas elevadas acabam acelerando a ação do intemperismo. Nesses solos, o principal fator limitante é a presença de alumínio tóxico (Al^{3+}) em elevadas concentrações, resultando em uma redução no crescimento e na produtividade das plantas (Delhaize & Ryan, 1995).

A redução na quantidade do Al^{3+} pode ser realizada através de práticas de calagem, pois este elemento é totalmente neutralizado quando o pH do solo é superior a 5,5. Por outro lado, o uso de corretivos representa um acréscimo nos custos de produção. Além do mais, o alumínio não ocorre apenas na camada arável do solo, mas também em maiores profundidades, tornando difícil a realização desta operação.

Outra maneira de superar as dificuldades relativas à presença do Al^{3+} no solo é através da utilização de cultivares tolerantes (Foy et al., 1978), obtidas por meio da exploração do potencial genético de cada espécie. O uso destes materiais pode diminuir os custos de implantação e manutenção da cultura e, também, permitir um melhor desenvolvimento em situações de estresse hídrico, pois as plantas tolerantes apresentam um melhor desenvolvimento do sistema radicular.

Pesquisas vêm sendo realizadas através de diversos métodos de seleção, dentre os quais se destaca a seleção em solução nutritiva, por ser uma técnica relativamente fácil e rápida, além de apresentar baixos custos. Outro fator que deve ser ressaltado em relação a este método é a escolha dos materiais pela visualização das raízes, já que o principal sintoma de toxidez por alumínio nas plantas é a redução do crescimento radicular.

A utilização de técnicas moleculares concomitantes ao programa de melhoramento permite uma melhor elucidação do comportamento genético dos materiais analisados, não estando restrito apenas a características morfológicas e agronômicas. Os microssatélites ou SSR são marcadores que possuem expressão co-dominante, são somaticamente estáveis, multialélicos e altamente reprodutíveis. Esses marcadores possuem um elevado conteúdo de informação de polimorfismo, sendo ideais para serem utilizados na identificação e discriminação de genótipos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O cornichão (*Lotus corniculatus* L.) apresenta-se como uma espécie promissora em programas de melhoramento, encontrando-se amplamente distribuído no mundo, destacando-se pelo seu alto valor nutritivo, palatabilidade, capacidade de desenvolvimento em diversos ambientes e por não provocar timpanismo (Beuselinck, 1999).

Nas consorciações, *L. corniculatus* apresenta um bom comportamento, contribuindo de maneira efetiva para o aumento da produtividade da pastagem, fixando nitrogênio atmosférico através de simbiose e adicionando proteína à dieta animal. Por ser uma leguminosa hibernal, também permite a distribuição da forragem de maneira adequada ao longo do

ano, principalmente quando utilizada no melhoramento do campo nativo do Rio Grande do Sul, visto que este possui em sua maioria espécies estivais.

O cornichão também é capaz de tolerar a acidez e a baixa fertilidade do solo, situações essas pouco toleráveis por outras leguminosas de importante valor forrageiro. Apesar disso, em função dos elevados teores de Al^{3+} encontrados nos solos do Sul do Brasil, ainda há a necessidade de melhorar esta característica.

Em razão desses fatores, o trabalho foi desenvolvido visando à obtenção de populações com maior tolerância ao alumínio, de três genótipos de *L. corniculatus*, através de seleção em solução nutritiva. O estudo também objetivou a caracterização genética de genótipos de cornichão, com o auxílio de marcadores moleculares do tipo SSR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações gerais sobre a toxidez por alumínio

2.1.1 Solos ácidos

Os solos ácidos são freqüentes nas regiões tropicais e subtropicais, ocupando aproximadamente 3,95 bilhões de hectares, correspondendo a 30% da área cultivável no mundo (von Uexküll & Mutert, 1995). No Rio Grande do Sul (RS), um levantamento realizado por Rheinheimer et al. (2001) indicou que 44% dos solos do estado apresentavam pH em água inferior a 5,5.

Nas regiões de clima árido e semi-árido, os solos são geralmente alcalinos, pois a precipitação pluviométrica não é suficiente para percolar os cátions básicos do solo. Por outro lado, nas regiões tropicais e subtropicais, o processo de acidificação do solo é intenso. Devido à elevada precipitação pluviométrica, ocorre à lixiviação de cátions (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) e ânions (cloreto, nitrato e sulfato) de menor valência, associada à retenção de cátions de maior valência (Al^{3+} e Mn^{2+}), nos sítios de troca da argila e da matéria orgânica. Havendo uma remoção de cátions básicos maior do que a taxa de liberação pelo intemperismo, o pH do solo diminui (Bohnen et al., 2006).

A solubilização da rocha ocorre porque a água da chuva que entra em contato com a mesma é levemente ácida (pH 5,5 a 6,5), em decorrência da dissolução parcial do gás carbônico do ar na água. Os íons hidrogênio (H^+)

formados a partir desta reação irão reagir com a rocha, e assim serão liberados cátions e ânions que servirão de nutrientes para os organismos que começarão a se estabelecer sobre a rocha matriz (Tedesco & Bissani, 2004; Bohnen et al., 2006).

Os minerais primários das rochas passam pelos processos de hidratação e hidrólise. A hidratação consiste na associação de moléculas de água nos minerais, sem causar alteração direta nos mesmos. Todavia, na hidrólise, ocorre uma substituição dos cátions básicos e do íon alumínio (Al^{3+}) por íons H^+ , podendo resultar em uma diminuição do pH do solo. O alumínio liberado poderá ocupar os sítios de troca ou passar pelo processo de hidrólise, liberando assim mais íons H^+ , favorecendo dessa maneira a dissolução da rocha (Wiethölter, 2000).

A decomposição dos resíduos vegetais pelos microrganismos, a utilização de fertilizantes e a própria absorção dos nutrientes pelas plantas também contribuem para a acidificação do solo. A mineralização da matéria orgânica ocasiona a liberação de H^+ e nitrato (NO_3^-). Quando ocorre a percolação do NO_3^- no perfil do solo, há obrigatoriamente o arraste de um cátion (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) para manter a eletroneutralidade da solução. Em decorrência da percolação desses cátions, os sítios de troca são ocupados gradativamente pelos íons Al^{3+} e Mn^{2+} (Bohnen et al., 2006).

Quando as plantas absorvem um cátion (+) ou um ânion (-) acabam liberando na rizosfera, respectivamente, íons H^+ ou OH^- para a manutenção da eletroneutralidade. As leguminosas absorvem mais cátions, tornando esse processo mais intenso em relação às gramíneas. Além disso, as leguminosas

não absorvem grandes quantidades de nitrato devido à fixação simbiótica, resultando em maior liberação de íons H^+ para o solo, contribuindo dessa maneira para sua acidificação (Bohnen et al., 2006).

Entretanto, a concentração de íons H^+ na solução do solo, mesmo com um valor elevado de 0,1 mmol/L correspondente ao pH 4,0, não é considerada um fator limitante ao crescimento normal das plantas, desde que haja suprimento adequado de todos os nutrientes essenciais e ausência de elementos em concentrações tóxicas. Esta situação não acontece naturalmente no solo, pois, em condições ácidas, podem ocorrer íons em concentrações tóxicas para as plantas, como o Al^{3+} e o Mn^{2+} . Além do mais, pode ocorrer menor disponibilidade de alguns nutrientes, por exemplo, o fósforo, bem como a interferência na atividade dos microrganismos do solo (Tedesco & Bissani, 2004; Sousa et al., 2007).

2.1.2 Toxidez por alumínio

O alumínio é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum da crosta terrestre após o oxigênio e o silício (Haug & Foy, 1984). Destaca-se como o principal fator limitante em solos com pH abaixo de 5,5, tornando-se mais fitotóxico em pH inferior a 5,0 (Foy et al., 1978). Além disso, apresenta-se como um dos principais problemas agronômicos relacionados a limitações abióticas, sendo superado apenas pelo estresse hídrico (von Uexküll & Mutert, 1995).

O alumínio pode estar presente em diferentes formas no solo. Em condições ácidas (pH<5,0), o alumínio se hidrolisa em solução, predominando

a forma $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$, chamado convencionalmente por Al^{3+} . Conforme o aumento do pH, o $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ sofre sucessivas desprotonações para formar $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^+$. Nos solos com pH próximos da neutralidade, ocorre a forma sólida $\text{Al}(\text{OH})_3$, enquanto que em solos alcalinos predomina $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ (Kochian, 1995).

O Al^{3+} forma complexos de baixo peso molecular quando se une a ligantes orgânicos e inorgânicos, como por exemplo, PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , F^- , ácidos orgânicos, proteínas e lipídios (Delhaize & Ryan; Kochian, 1995). Uma forma de alumínio polinuclear, Al_{13} , também pode se formar quando soluções de alumínio são parcialmente neutralizadas com uma base forte (Parker & Bertsch, 1992), entretanto sua ocorrência natural e a contribuição para a toxidez no solo ainda não estão claros (Delhaize & Ryan; Kochian, 1995).

O alumínio interfere em vários processos fisiológicos e celulares, podendo ser a toxicidade o resultado de interações complexas do Al^{3+} com o apoplasto (parede celular), membrana plasmática e com alvos simplásticos (citosol) (Kochian et al., 2005). O alumínio atua no ápice da raiz, mais precisamente na parte distal da zona de transição, afetando o alongamento e a divisão celular (Sivaguru & Horst, 1998).

A inibição do crescimento radicular é o sintoma primário de toxidez por alumínio nas plantas. Ocorrem mudanças morfológicas nas raízes, tais como crescimento reduzido, intumescimento do ápice, formação de pouca ou nenhuma ramificação, coloração castanha devido à necrose dos tecidos, além de tornarem-se quebradiças (Foy et al., 1978; Kochian, 1995). Os danos podem levar à deficiência mineral e ao estresse hídrico (Degenhardt et al., 1998).

Por outro lado, a redução do crescimento da parte aérea é um sintoma secundário, onde as plantas apresentam sinais de deficiência de fósforo (crescimento anormal das folhas; coloração púrpura das folhas, colmos e nervuras; amarelecimento e morte das folhas da extremidade da planta) ou de cálcio (enrolamento das folhas jovens e morte das gemas apicais), e parecem ser uma consequência dos danos que ocorrem no sistema radicular (Foy et al., 1978).

Os efeitos da toxidez por alumínio são muito variáveis, dependendo da concentração de Al^{3+} , do tempo de exposição e principalmente do nível de tolerância ou sensibilidade da espécie utilizada (Čiamporová, 2002). Algumas espécies são capazes de apresentar sintomas detectáveis em poucos minutos após a exposição ao alumínio, entretanto, outras são apenas visíveis após um maior período de exposição (Ma et al., 2001).

A redução na quantidade de alumínio tóxico presente na solução do solo pode ser realizada através da elevação do pH, utilizando práticas de calagem, pois o Al^{3+} é totalmente neutralizado quando o pH do solo é superior a 5,5 (Bohnen et al., 2006). Entretanto, o uso de corretivos representa um acréscimo nos custos de produção, podendo ser, em determinadas situações, economicamente inviável. Ainda assim, o alumínio não ocorre apenas na camada arável do solo (0 – 30 cm), mas também em maiores profundidades. Devido a isso, o sistema radicular irá se desenvolver apenas nas camadas superficiais, o que é prejudicial ao crescimento das plantas, pois estas não conseguem absorver água e nutrientes nas regiões mais profundas do solo (Sousa et al., 2007).

Uma das alternativas para solucionar este problema seria a utilização de cultivares tolerantes ao alumínio (Foy et al., 1978), obtidas através de um estudo do potencial genético das espécies de interesse, selecionando ou melhorando aquelas plantas que apresentam resistência ao alumínio.

2.1.3 Mecanismos de tolerância ao alumínio

Algumas espécies desenvolveram mecanismos que possibilitam o desenvolvimento das mesmas em solos ácidos onde concentrações de alumínio tóxicas podem limitar o crescimento das plantas (Ma et al., 2001).

Os mecanismos de tolerância podem ser divididos naqueles que atuam no sentido de excluir o Al^{3+} depois de absorvido ou de impedir sua entrada pela raiz (mecanismos de exclusão) e naqueles que permitem a planta acumular o alumínio em locais específicos, tolerando-o dentro da célula (mecanismos de tolerância) (Kochian, 1995; Hartwig et al., 2007).

Dentre os mecanismos, o mais comum é o de exclusão. A detoxicação ocorre principalmente pela exudação de ácidos orgânicos, os quais são liberados na rizosfera, atuando como quelantes do Al^{3+} (Hoekenga et al., 2003). Os principais ácidos orgânicos secretados pelas raízes são o ácido cítrico, ácido oxálico e ácido málico, sendo que o ácido cítrico forma complexos mais estáveis com o alumínio, além de ser o mais comum entre as espécies estudadas (Barceló & Poschenrieder, 2002).

Existem dois padrões de secreção de ácidos orgânicos em resposta ao alumínio. No padrão I, a liberação de ácidos orgânicos ocorre logo após a exposição ao alumínio, enquanto no padrão II a secreção ocorre após várias

horas de exposição. A resposta rápida do padrão I sugere que o Al^{3+} ative um mecanismo pré-existente e a indução de novas proteínas não seja necessária. Por outro lado, o atraso observado no padrão II indica a necessidade de indução de novas proteínas (Ma et al., 2001).

As cultivares tolerantes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) exudam citrato em ambos os padrões; as de arroz (*Oryza sativa* L.) e triticale (*Triticale* ssp.) exudam citrato e malato no padrão II; as de trigo (*Triticum aestivum* L.) liberam malato e as de trigo mourisco (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) oxalato no padrão I (Ma & Furukawa, 2003).

Santos et al. (2008a) observaram um aumento na secreção de ácido oxálico em genótipos de cornichão, quando submetidos a um tratamento com alumínio (200 $\mu\text{mol/L}$), indicando ser um mecanismo de tolerância ativado pela presença do elemento tóxico.

Apesar dos ácidos orgânicos exercerem um papel relevante na detoxicação do Al^{3+} , este não é o único mecanismo de exclusão existente. Um experimento realizado com um mutante de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (*alr-104*) resistente ao alumínio, comprovou que há um aumento no pH da rizosfera destes indivíduos quando expostos a níveis tóxicos de Al^{3+} , acarretando em uma redução da solubilidade deste elemento (Degenhardt et al., 1998).

Ainda pode ocorrer a liberação de compostos fenólicos, que atuam na complexação do alumínio. No experimento realizado por Kidd et al. (2001), com uma variedade tolerante (Sikuani) de milho (*Zea mays* L.), observou-se a exudação dos flavonóides catequina e quercetina após quatro horas de

exposição das plântulas a 50 μmol de Al^{3+} , resultando em uma recuperação do crescimento radicular.

A secreção de mucilagem também pode atuar como uma barreira de entrada ao Al^{3+} nas células. Entretanto, uma avaliação precisa destas rizodeposições é complicada, pois a sua produção é fortemente influenciada pela composição e resistência física do substrato (Barceló & Poschenrieder, 2002).

Os mecanismos de tolerância permitem o acúmulo de alumínio em altas concentrações, sendo baseados na complexação e detoxicação do alumínio após sua entrada no citoplasma (Kochian et al., 2005). A eliminação do elemento tóxico pode estar relacionada à quelação do Al^{3+} por ácidos orgânicos, proteínas ou outros ligantes orgânicos; compartimentação do Al^{3+} nos vacúolos; síntese de proteínas tolerantes ao Al^{3+} e elevação da atividade enzimática (Kochian, 1995).

A planta ornamental *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. é capaz de acumular mais de 3.000 mg de Al^{3+} por quilo de matéria seca (MS) em suas folhas. A cor das suas sépalas pode variar do vermelho ao azul, conforme a acidificação do solo. A mudança para a cor azul é devida ao acúmulo de Al^{3+} nas sépalas, resultando na formação de um complexo de alumínio com dois componentes, delphinidina-3-glucosídeo e ácido 3-cafeoilquínico (Ma et al., 1997a).

As variedades tolerantes de trigo mourisco, além de exudarem oxalato de suas raízes, também conseguem acumular Al^{3+} em grande quantidade (até 15 mg/kg MS) nas suas folhas quando expostas em um meio

ácido. O alumínio é armazenado nos vacúolos na forma de um complexo alumínio-oxalato (Zheng et al., 1998; Ma et al., 2001).

2.1.4 Controle genético

A tolerância ao alumínio é uma característica herdável, que pode ser controlada por um ou mais genes dominantes ou por diversos genes recessivos (Kochian, 1995), existindo uma grande variação genética tanto entre quanto dentro das espécies (Delhaize & Ryan, 1995).

Larsen et al. (1998) demonstraram, através de um estudo em mutantes de *A. thaliana*, que a resistência ao Al^{3+} é semidominante. Também identificaram dois loci que conferem resistência a este caráter, o *alr-108*, localizado no cromossomo um, atuando na liberação de ácidos orgânicos e, o *alr-104*, localizado no cromossomo quatro, atuando na alcalinização da rizosfera.

Existe uma controvérsia em relação ao número de loci que possam estar relacionados à tolerância ao Al^{3+} no trigo. Alguns trabalhos sugerem que a resistência é atribuída a um único locus dominante (*Alt_{BH}*) que está localizado no cromossomo 4D (Delhaize et al., 1993; Riede & Anderson, 1996; Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001), enquanto outros, realizados em linhas ditelossômicas da variedade *Chinese Spring*, sugerem estar relacionada a diversos loci (Aniol, 1990; Papernik et al., 2001).

Magalhães et al. (2004) mapearam em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) o maior locus para tolerância ao alumínio, *Alt_{SB}*, na região terminal do cromossomo três. A cevada apresenta um locus maior para tolerância ao Al^{3+} ,

Alp, localizado no braço longo do cromossomo quatro. Essa espécie é extremamente sensível e demonstra tolerância apenas em níveis muito baixos de Al^{3+} (Minella & Sorrells, 1992).

No arroz, a herança é oligogênica, determinada por alelos dominantes, sendo controlada por pelo menos dois loci independentes, *Alt1*, localizado no cromossomo 6RS e, *Alt3*, no cromossomo 4R (Gallego et al., 1998). A resistência ao Al^{3+} em milho é uma característica quantitativa, tendo sido identificados pelo menos dois loci, *Alm1* e *Alm2*, localizados no braço curto dos cromossomos 10 e seis, respectivamente. O locus *Alm1* mostra um efeito sobre o fenótipo três vezes mais intenso do que o *Alm2* (Sibov et al., 1999).

2.1.5 Métodos de seleção

Várias técnicas estão sendo utilizadas para identificar plantas capazes de tolerar o Al^{3+} , dentre as quais se pode destacar os métodos de seleção em solo e solução nutritiva.

A seleção em solo consiste na avaliação do crescimento das plantas em um solo com alta saturação de alumínio, podendo ser realizado a campo ou em ambiente controlado, onde são escolhidas aquelas que se apresentarem mais tolerantes (Echart & Cavalli-Molina, 2001).

A seleção realizada a campo permite a seleção de germoplasma em condições climáticas e de solo naturais, além de possibilitar a visualização do estresse causado pelo Al^{3+} na planta durante um ciclo de crescimento. As desvantagens do método estão no custo elevado, na vulnerabilidade do material em relação às condições ambientais, na complexidade das interações

planta-ambiente, além de ser necessário um maior período de tempo, geralmente um ciclo de crescimento completo (Echart & Cavalli-Molina, 2001).

Na seleção realizada com solo em ambiente controlado, os principais problemas estão na obtenção de solos adequados, pois a toxicidade do alumínio não é o único fator limitante e, na observação das raízes, já que o efeito primário do alumínio é a inibição do crescimento. Devido às dificuldades mencionadas acima, trabalhos realizados utilizando estas metodologias estão diminuindo consideravelmente (Samac & Tesfaye, 2003).

Um método capaz de avaliar e selecionar plântulas de espécies que possuam sementes pequenas, em relação à acidez do solo, foi desenvolvido por Voigt et al. (1997), com trevo branco, utilizando uma fina camada de solo ácido sobre ágar, durante um período aproximado de 10 dias. Nesse sistema, a avaliação da tolerância é dada pela rapidez com que as raízes atravessam a camada de solo e penetram no ágar. Essa técnica foi testada com sucesso em 28 cultivares pertencentes a 15 espécies de forrageiras leguminosas, dentre elas *Lotus corniculatus* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium pratense* L. e *Trifolium subterraneum* L., visando à avaliação dos materiais quanto à tolerância ao Al^{3+} (Voigt & Mosjidis, 2002).

O método de seleção em solução nutritiva vem sendo muito utilizado para selecionar, bem como, testar diversas espécies em relação ao caráter tolerância ao Al^{3+} , dentre as quais estão a alfafa (*Medicago sativa* L.) (Caetano, 1998; Martins et al., 2007; Rocha et al., 2007a), a braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.) (Wenzl et al., 2006), o cornichão (*L. corniculatus*) (Santos et al., 2007), a cevada (Ma et al., 1997b; Echart et al., 2002), o milho (Martins et

al., 1999; Paterniani & Furlani, 2002), a soja (*Glycine max* (L.) Merrill.) (Menosso et al., 2000; Souza, 2001), o trigo (Camargo & Oliveira, 1981; Mistro et al., 2001), entre outras.

Nessa metodologia as plântulas são mantidas, geralmente, em uma solução ácida contendo Al^{3+} , sendo o crescimento radicular medido após alguns dias. A tolerância é avaliada pela comparação do crescimento radicular das plântulas que foram tratadas com Al^{3+} em relação aquelas que não receberam o elemento tóxico (controle). A principal vantagem está na rapidez do método e na manutenção da integridade das raízes, além de permitir o controle rigoroso sobre a disponibilidade dos nutrientes e do pH e apresentar custo baixo. Por outro lado, não se recomenda o método em plantas que expressem a tolerância ao alumínio apenas na fase adulta ou naquelas que apresentam propagação vegetativa (Samac & Tesfaye, 2003).

Menosso et al. (2000) realizaram ensaios com diferentes níveis de Al^{3+} e Ca, em solução nutritiva, com o objetivo de identificar a melhor concentração destes elementos, bem como o tempo necessário para a diferenciação de plântulas de soja em relação à tolerância ao Al^{3+} . Os níveis estabelecidos foram de 0,2 mg/L de alumínio e 50 mg/L de cálcio. A avaliação das raízes nove dias após o transplante das plântulas para a solução nutritiva permitiu a separação de genótipos tolerantes e sensíveis.

A tolerância ao Al^{3+} de 38 genótipos de trigo provenientes do Centro Internacional de Melhoramento de Trigo e Milho (CIMMYT), no México e de um programa de melhoramento do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), foi avaliada em solução nutritiva, com seis concentrações de alumínio (0, 2, 4, 6, 8

10 mg/L). A tolerância foi medida pela capacidade de crescimento das raízes primárias após serem mantidas por um período de 48 horas na solução contendo alumínio. Os genótipos provenientes do CIMMYT demonstraram maior sensibilidade, ocorrendo uma paralisação do crescimento radicular, em grande parte dos materiais, nas baixas concentrações de Al^{3+} (2 e 4 mg/L). Por outro lado, os genótipos do IAC demonstraram maior tolerância, com crescimento radicular satisfatório até mesmo na dose mais elevada de Al^{3+} (Mistro et al., 2001).

Wenzl et al. (2006) analisaram a resistência ao Al^{3+} de 41 genótipos de braquiária. A avaliação foi feita através da comparação do comprimento e do diâmetro das radículas submetidas a duas soluções nutritivas. Uma contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de CaCl_2 e, a outra, 200 $\mu\text{mol/L}$ de CaCl_2 e 200 $\mu\text{mol/L}$ de AlCl_3 , ambas com pH 4,2. Os materiais sensíveis foram caracterizados por uma redução no comprimento radicular e por um aumento no diâmetro das radículas. Por outro lado, os genótipos tolerantes apresentaram maior comprimento e menor diâmetro das radículas.

Utilizando três métodos, Caetano (1998) selecionou genótipos de alfafa tolerantes ao Al^{3+} , em solução nutritiva, solo e solo seguido de solução (cruzada). As plântulas foram mantidas por 12 dias na solução contendo 0,62 mmol/L de cálcio, 3,7 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio e pH controlado a 4,5. O solo utilizado foi do tipo argiloso, onde se adotou o nível de saturação de alumínio de 2,5%, sendo os materiais mantidos por um período de seis semanas. Na seleção cruzada utilizaram-se plantas previamente selecionadas em solo e posteriormente em solução. Todos os métodos mostraram-se eficientes.

Posteriormente, Santos et al. (2008b) avaliaram o crescimento radicular dos genótipos selecionados por Caetano (1998) em solução nutritiva com 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio e cinco níveis de alumínio (0, 6, 12, 24 e 48 $\mu\text{mol/L}$), por um período de 15 dias. Utilizou-se a alfafa crioula como testemunha e pH ajustado para 4,2. Em todas as concentrações de alumínio, foi observado um aumento de 20 e 40% no comprimento radicular das populações cruzada e, solo e solução, respectivamente, em relação à testemunha. Os resultados indicaram a possibilidade de distinguir genótipos de alfafa, com diferentes graus de tolerância ao alumínio, em curto prazo, utilizando solução nutritiva. Além disso, comprovou-se que o progresso obtido na população selecionada em solução nutritiva foi tão eficiente quanto à realizada em solo.

Santos et al. (2007) determinaram a concentração de alumínio capaz de discriminar, em solução nutritiva, genótipos de *L. corniculatus* em relação a sensibilidade ao alumínio. Avaliaram-se dois materiais contrastantes (Draco e UFRGS) em relação à resposta ao Al^{3+} , em solução com 200 $\mu\text{mol/L}$ de Ca, quatro níveis de alumínio (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol/L}$) e pH controlado a 4,2. As plântulas foram mantidas nas soluções por um período de 13 dias. A avaliação do comprimento radicular demonstrou que a dose 100 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio foi eficiente na discriminação de genótipos tolerantes e sensíveis ao Al^{3+} .

2.1.6 Fixação simbiótica

As plantas da família Leguminosae possuem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico através de associações endosimbióticas com bactérias pertencentes, principalmente, aos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. A

interação entre estes organismos é altamente específica, podendo ocorrer em nível de espécie ou até mesmo de cultivares (Freire, 1992). Uma pesquisa realizada no Uruguai identificou dois rizóbios altamente específicos para o cornichão, *Rhizobium loti* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, além da existência de variabilidade entre os isolados (Baraibar et al., 1999).

A eficácia desta relação pode ser afetada em solos ácidos, pois o Al^{3+} se liga as células do rizóbio interferindo na síntese de DNA dessas bactérias, levando a uma redução na colonização do solo (Johnson & Wood, 1990). O número de rizóbios em solos corrigidos chega a 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC)/g, enquanto que em solos ácidos esse valor não ultrapassa 10^2 UFC/g (Brockwell et al., 1991). Alguns trabalhos revelam que o alumínio em altas concentrações e o baixo pH afetam com maior severidade a formação dos nódulos e a fixação simbiótica de nitrogênio, quando comparado ao crescimento radicular das plantas hospedeiras (Jo et al., 1980).

Watkin et al. (2000) analisaram a tolerância a solos ácidos de seis estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* em trevo subterrâneo (*T. subterraneum*). Uma delas foi identificada como tolerante, apresentando maior capacidade de colonização e persistência, além de fixar uma maior quantidade de nitrogênio nas plantas em relação às demais estirpes estudadas. Brose (1992) relatou resultados semelhantes em cornichão quando avaliou estirpes de *Rhizobium loti* em relação à acidez do solo. As estirpes tolerantes ao Al^{3+} mostraram-se tão produtivas e eficientes na fixação de nitrogênio quanto às recomendadas para a espécie, sendo que as menos tolerantes apresentaram menor eficiência simbiótica.

Entretanto, nem sempre as estirpes que apresentam maior tolerância ao Al^{3+} são as mais produtivas, indicando a dificuldade de selecionar rizóbios tolerantes e ao mesmo tempo eficientes. Papa et al. (1999) classificaram uma coleção de rizóbios de alfafa, coletados em solos moderadamente ácidos da Argentina e do Uruguai, de acordo com a tolerância a acidez. O grupo formado por *Sinorhizobium meliloti* demonstrou crescimento restrito em solos com baixo pH, e o outro, constituído por um rizóbio semelhante geneticamente ao *Rhizobium* sp. Or191, capaz de se desenvolver em solos ácidos, manifestou maior tolerância ao Al^{3+} . Porém, os rizóbios com menor sensibilidade ao Al^{3+} mostraram-se ineficientes na fixação de nitrogênio.

Devido à importância da associação benéfica entre as bactérias fixadoras de nitrogênio e as leguminosas, bem como a existência de diferenças entre as estirpes em relação à resposta ao Al^{3+} , programas de melhoramento de leguminosas tolerantes a solos ácidos devem estar associados a programas de seleção de rizóbios tolerantes ao Al^{3+} .

2.2 Microssatélites

O avanço da genética e da biologia molecular permitiu o desenvolvimento de marcadores genéticos valiosos na identificação, caracterização e avaliação do germoplasma vegetal. O princípio da utilização destes marcadores é baseado na suposição de que diferenças genéticas significam, geralmente, diferenças fenotípicas (Faleiro, 2007). Entende-se por marcadores moleculares aquelas características herdáveis do DNA capazes de diferenciar dois ou mais indivíduos geneticamente (Millach, 1999). Entre as

vantagens dos marcadores moleculares pode-se destacar a identificação direta do genótipo sem influência ambiental, a detecção de polimorfismos em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, além da obtenção de um número elevado de polimorfismos genéticos (Faleiro, 2007).

Os principais marcadores moleculares podem ser classificados de acordo com a metodologia utilizada para identificá-los. O método da hibridização utiliza enzimas de restrição que fragmentam o DNA, os quais são hibridizados com sequências homólogas de DNA. Entre os marcadores identificados por esta técnica estão o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e os Minissatélites ou loci VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). No outro método, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que consiste na amplificação de fragmentos de DNA, estão incluídos os marcadores do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e os Microsatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Ferreria & Grattapaglia, 1998; Millach, 1999).

A escolha do marcador a ser utilizado deve ser baseada no objetivo do trabalho. Na maioria das vezes, marcadores moleculares multilocos utilizados em DNA *fingerprinting*, como por exemplo, RAPD, AFLP e Microsatélites, são mais apropriados para estudos de identidade genética, testes de paternidade e estudos de variabilidade dentro da mesma espécie. Marcadores baseados em comprimentos de fragmentos de restrição como os RFLPs obtidos de DNA mitocondrial (*mtDNA*), DNA cloroplasmático (*cpDNA*) e DNA ribossomal (*rDNA*) são mais apropriados para estudos de diversidade

genética de espécies fortemente relacionadas. Por outro lado, marcadores baseados em análises de sequências, por exemplo, o *PCR sequencig*, são apropriados para análises de espécies com alto nível de divergência evolucionária, embora possam ser utilizados para análises de espécies ou acessos com qualquer nível de divergência (Faleiro, 2007).

Os microsatélites são pequenas sequências de um a seis nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* ao longo da molécula de DNA, estando presente no genoma de eucariotos e procariotos (Tóth et al., 2000). Essas sequências estão sujeitas a elevadas taxas de mutação, sendo manifestadas principalmente através de alterações no número de repetições das sequências motivo dos SSR. As mutações ocorrem principalmente devido ao escorregamento da fita de DNA durante a replicação (*slippage*) e na recombinação (*crossing-over*) (Li et al., 2002).

A distribuição genômica dos SSR não é aleatória, sendo encontrada em maior quantidade nas regiões não codificantes do DNA e em menor quantidade nas regiões codificantes. Essa diferença é atribuída à seleção negativa contra mutações estruturais nas regiões codificantes (Metzgar et al., 2000). Apesar disso, 14% de todas as proteínas contêm sequências repetidas. Dessa maneira, a seleção pode estar atuando contra a contração ou expansão aleatória de pelo menos parte dos *loci* de SSR, visto que esses atuam na organização da cromatina, regulação da atividade gênica, recombinação, replicação do DNA, ciclo celular, sistema de reparo, entre outros (Li et al., 2002).

Nos vegetais ocorre em maior frequência uma sequência motivo de

SSR perfeita, ou seja, aquela onde nenhuma interrupção é observada entre as sequências repetidas e, o elemento repetido que aparece com maior assiduidade é o di-nucleotídeo AT (Morgante & Olivieri, 1993).

Os SSR possuem expressão co-dominante, são somaticamente estáveis, multialélicos e altamente reprodutíveis. A elevada variabilidade entre os organismos relacionados faz com que estes marcadores sejam altamente informativos, possuindo o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (*PIC, Polymorphism Information Content*) e sejam ideais para serem utilizados no mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos, testes de paternidade e seleção assistida por marcadores (Faleiro, 2007).

Por outro lado, a limitação desta técnica está na necessidade da utilização de sequências de nucleotídeos que flanqueiam os SSR (*primer*), específicas para cada espécie. O desenvolvimento dos *primers* é muito laborioso, pois requer a construção de bibliotecas genômicas, seleção e seqüenciamento dos clones positivos e o desenho dos *primers* (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Faleiro, 2007). Entretanto, *primers* de espécies geneticamente relacionadas também são capazes de fornecer bons marcadores em algumas situações. Wang et al. (2006) utilizaram com sucesso *primers* desenvolvidos para trigo, milho e sorgo em *Paspalum vaginatum* Swartz, obtendo uma taxa de transferência média de SSR de 61% entre as espécies.

A capacidade do emprego de microssatélites em estudos de diversidade genética pode ser confirmada em diversos trabalhos. Sawasato et

al. (2008) utilizando sete pares de *primers* heterólogos, discriminaram 64 acessos de *Paspalum urvillei* Steudel, os quais foram agrupados em sete grupos, de acordo com a região da coleta do material. Dias et al. (2008) observaram a existência de uma elevada diversidade genética entre 56 acessos da coleção básica de trevo vermelho (*T. pratense*) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), utilizando sete marcadores de SSR. Sardaro et al. (2008) avaliaram a diversidade genética presente em 11 populações italianas de cornichão com SSR e AFLP. Ambos marcadores apresentaram medidas similares de variabilidade entre os indivíduos, entretanto, os SSR permitiram uma melhor diferenciação genética entre as populações.

A construção de mapas de ligação é muito importante, pois fornece informações a respeito da organização do genoma, podendo ser utilizado em estudos genéticos e programas de melhoramento. Röder et al. (1998) e Barret et al. (2004) construíram mapas de ligação para trigo e trevo branco (*T. repens*), respectivamente, baseados exclusivamente em SSR. Outra aplicação importante dos SSR é na identificação de marcadores que estejam ligados a genes que confirmam características importantes em programas de melhoramento. Genes que conferem tolerância ao alumínio já foram identificados em trigo e sorgo. Sasaki et al. (2004) identificaram no trigo o gene ALTM1 que atua na exudação de malato e, Magalhães et al. (2007) descobriram o gene SbMATE, que libera ácido cítrico quando as plantas estão em contato com Al^{3+} .

Ma et al. (2005) identificaram dois marcadores SSR (Xwmc331 e

Xgdm125) flanqueados a um dos principais QTLs responsáveis pela tolerância ao alumínio, no cromossomo 4DL, da cultivar tolerante de trigo Atlas 66. Em um estudo realizado com cevada, foram identificados quatro marcadores SSR (Bmac310, Bmag353, HVM68 e HVMCABG) fortemente ligados ao gene *Alt* responsável pela tolerância ao alumínio nesta espécie. O marcador Bmag353 detectou grande variação alélica permitindo sua implementação em programas de seleção assistida por marcadores (Raman et al., 2002).

A utilização de SSR como uma ferramenta auxiliar em programas tradicionais de melhoramento apresenta grande relevância, pois conforme o mencionado, a técnica permite diferenciar indivíduos muito próximos, além de atuar na identificação de genes associados a características importantes. Dessa maneira, a escolha de progenitores pode ser realizada através de características fenotípicas e genotípicas.

2.3 *Lotus corniculatus*, uma boa espécie forrageira

2.3.1 Origem e biologia

O gênero *Lotus* compreende aproximadamente 125 - 180 espécies, perenes e anuais, exibe uma grande diversidade de formas e adapta-se a vários ambientes. O *L. corniculatus* se destaca como uma das principais espécies agrônomicas deste gênero, devido principalmente ao seu elevado valor forrageiro (Sokoloff & Lock, 2005).

O cornichão é uma leguminosa perene, hibernal, de origem européia e mediterrânea, amplamente distribuída no mundo, ausente apenas em regiões muito frias, tendo sido naturalizado nas regiões temperadas da América do Sul

e do Norte, Austrália e Nova Zelândia. A capacidade de adaptação a vários ambientes deve-se à alta variabilidade genética encontrada nessa espécie, tendo como maior centro de diversidade a região do Mediterrâneo (Steiner, 1999).

No Brasil, o único cultivar (cv) comercialmente disponível é o São Gabriel. O material foi desenvolvido pela Estação Experimental Agronômica da Secretaria de Agricultura de São Gabriel, RS, a partir de pesquisas realizadas entre os anos de 1955 e 1965. O cultivar é caracterizado pela boa produtividade e elevada qualidade de forragem, tendo sido difundido em outros estados e também em países vizinhos, como o Uruguai e a Argentina (Paim, 1988).

O cornichão é uma espécie tetraplóide ($2n=4X=24$), embora tenha sido descoberta uma forma diplóide ($2n=2x=12$) rizomatosa no Marrocos, semelhante à forma rizomatosa tetraplóide. O achado sugere a possibilidade da existência de diplóides ou até mesmo que estes sejam os progenitores diretos do tetraplóide (Steiner, 1999).

Ainda não existe um consenso em relação à origem do cornichão. Os primeiros trabalhos sugeriam que o mesmo tivesse surgido como um autotetraplóide de espécies diplóides relacionadas - *Lotus glaber* Mill. ($2n=12$) ou *Lotus alpinus* (DC.) Ramond ($2n=12$) (Steiner, 1999). Um estudo posterior avaliou características fisiológicas e bioquímicas, e sugeriu que *L. corniculatus* fosse um alotetraplóide segmentar, originado a partir da hibridização de *L. glaber* ou *L. alpinus* como parentais maternos e *Lotus uliginosus* Schk. ($2n=12$) como parental paterno, seguido por uma duplicação cromossômica do híbrido

(Ross & Jones, 1985). Por outro lado, um estudo realizado com o marcador RFLP indicou um modelo de herança tetrassômica, suportando a hipótese de *L. corniculatus* ser uma espécie autotetraplóide (Fjellstrom et al., 2001).

Steiner & Garcia de Los Santos (2001) caracterizaram morfologicamente 28 genótipos de *L. corniculatus* coletados no Velho Mundo. Foram observadas variações entre os caracteres, principalmente em relação à inflorescência, hábito de crescimento, formato e tamanho da folha. As diferenças visualizadas foram correlacionadas com o local de origem do material, como por exemplo, as plantas decumbentes sendo provenientes de locais de elevada altitude e, as prostradas, de menores altitudes.

Soster et al. (2004) também encontraram variação fenotípica no cornichão quando avaliaram oito populações do cv São Gabriel. As maiores diferenças foram em relação ao hábito de crescimento (ereto, ascendente e decumbente) e ao diâmetro da coroa. Acredita-se que os diferentes fenótipos existentes no cornichão sejam o resultado da adaptação aos diversos ambientes no qual é encontrado e, também, devido às contínuas hibridizações interespecíficas (Steiner, 1999).

De uma forma geral, *L. corniculatus* apresenta-se como uma planta herbácea, glabra ou pouco pilosa, com hábito de crescimento variável de decumbente a ereto. A raiz é pivotante com ramificações laterais, sendo que alguns genótipos possuem rizoma. As hastes principais se desenvolvem a partir de gemas situadas na coroa da planta; as ramificações secundárias e terciárias surgem das axilas das folhas, formando multirramificações. As folhas são trifolioladas e possuem um par de estípulas grandes. A inflorescência é do

tipo umbela, geralmente com quatro a seis flores amarelas, apresentando polinização cruzada. Os estames são diadelfos, com filetes engrossados no ápice; ovário reto, estilete longo e estigma capitado. O fruto é um legume, linear e elasticamente deiscente (Izaguirre & Beyhaut, 1998; Kirkbride Junior, 1999).

O cornichão é classificado como uma planta de dia longo, necessitando de pelo menos 16 horas de luz por dia para obtenção de um florescimento abundante. Com um menor fotoperíodo, as plantas produzem poucas inflorescências e mais flores estéreis, quando comparado as plantas que crescem sob um fotoperíodo longo (Jones & Turkington, 1986).

2.3.2 Características agronômicas

O cornichão destaca-se pela capacidade de se manter em solos relativamente ácidos e pouco férteis, onde outras leguminosas de importante valor agronômico geralmente não se estabelecem ou apresentam pouca persistência. A forragem possui ainda boa qualidade e alta palatabilidade, além de poder ser utilizada diretamente como pastagem ou feno (Blumenthal & McGraw, 1999).

Os valores de proteína bruta (PB) do cornichão são consideráveis. Scheffer-Basso et al. (2001) encontraram valores de PB nas folhas que variaram de 22% no estágio de florescimento pleno a 30% no estágio vegetativo. No caule, os valores variaram de 8 a 14% de PB nos estádios de florescimento pleno e vegetativo, respectivamente.

A digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO) no cornichão é

elevada, estando associada aos baixos níveis de lignina. No trabalho realizado por Scheffer-Basso et al. (2001), o valor de DIVMO foi de 75% nas folhas e, no caule, houve uma variação de 50 a 61% nos estádios de florescimento pleno e vegetativo, respectivamente.

Outros fatores que determinam a qualidade de uma forragem são os teores de fibra em detergente ácido (FDA) e fibra em detergente neutro (FDN), onde os mesmos não devem ultrapassar a 30 e 60%, respectivamente (Paterson et al., 1994). Soster et al. (2004) encontraram valores de FDA em média de 24% e de FDN de 57%.

A espécie apresenta baixa concentração de taninos condensados (30 g/kg MS), os quais são benéficos na dieta dos ruminantes quando encontrados em quantidades que variam de 20 a 40 g/kg MS. Nessas concentrações, os taninos condensados atuam na prevenção do timpanismo, reduzem a degradação da proteína no rúmen e aumentam a absorção de aminoácidos essenciais da dieta (Waghorn & Shelton, 1997; Barry & McNabb, 1999).

O manejo, em relação à altura e a frequência dos cortes, influencia a produção de MS das plantas (Araújo & Jacques, 1974). Flaresso & Saibro (1992) observaram maiores rendimentos de MS de *L. corniculatus* em cortes menos frequentes, com intervalos de seis e nove semanas, realizados a 5 cm. Os cortes realizados em intervalos de nove semanas a uma altura de 5 cm, também permitiram uma maior ressemeadura natural.

Araújo e Jacques (1974) avaliaram a produção de MS do cv São Gabriel em relação à altura de corte (3 e 6 cm) e ao estágio fenológico

(vegetativo, pré-florescimento e florescimento). A produção de MS do cornichão foi favorecida nos cortes realizados em estádios avançados de crescimento (pré-florescimento e florescimento) a uma altura de 6 cm. O corte mais alto preservou em maior quantidade as gemas e hastes axilares e as hastes da coroa, acarretando em um aumento do vigor na rebrota e na produção de MS.

Bosworth et al. (2003) recomendam que no ano de estabelecimento da pastagem, o primeiro corte deve ser realizado no estádio de florescimento pleno. Nos estandes já estabelecidos, o primeiro corte deve ser feito no início do florescimento, com um intervalo entre os cortes de seis semanas. Rocha et al. (2007b) relataram a produção de 6.627 kg/ha MS do cv São Gabriel, com o primeiro corte realizado no estádio de florescimento pleno, na Depressão Central do RS.

O cornichão pode ser utilizado em misturas com outras espécies hibernais, como por exemplo, o azevém (*Lolium multiflorum* Lam) e o trevo branco (Paim, 1988). Da mesma maneira, a planta também pode ser empregada no melhoramento do campo nativo, aumentando o rendimento de MS e permitindo uma melhor distribuição da forragem ao longo do ano, diminuindo o efeito negativo da sazonalidade da pastagem natural (Prestes, 1995).

Scheffer-Basso et al. (2002) obtiveram 13.663 kg/ha MS de uma mistura de cornichão, festuca (*Festuca arundinaceae* Schreb.) e azevém, no Planalto Médio do RS, em 475 dias de experimento. O cornichão contribuiu com 80% da mistura na primavera-verão, com 3.500 kg/ha MS. A mistura destacou-se também por apresentar baixa incidência de espécies invasoras no

verão e no outono do segundo ano. Isso demonstra que o crescimento do cornichão é favorecido durante a estação primaveril, tornando-se efetivo na competição com as espécies indesejadas.

2.3.3 Melhoramento

Existe uma grande variabilidade genética entre as espécies do gênero *Lotus* que poderia ser utilizada em programas de melhoramento, visando à obtenção de cultivares modernas e com maior potencial produtivo (Steiner, 1999).

Garcia de Los Santos et al. (2001) estudaram a habilidade de cruzamento entre diferentes fontes de germoplasma de cornichão, indicando a possibilidade de transferência de características desejáveis através de técnicas convencionais de melhoramento. Esse resultado sugere a possibilidade de sucesso naqueles programas que não possuem muitos recursos.

Um dos principais problemas relacionados à produção do cornichão é a falta de persistência dos materiais, sendo acentuada nas regiões com clima quente no verão. Geralmente, a limitada persistência é atribuída à interação de fatores bióticos e abióticos, incluindo estresses edáficos e climáticos, pragas e doenças e práticas de manejo inadequadas (Blumenthal & McGraw, 1999). Beuselinck et al. (1984) relataram uma redução de 90% na densidade das plantas, durante um período de dois anos, devido a doenças na coroa e nas raízes, causadas por fungos dos gêneros *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Rhizoctonia* em um experimento no Missouri (EUA).

A seleção para resistência a doenças tem sido um dos objetivos nos

programas de melhoramento, visando o aumento da persistência nesta espécie. Entretanto, a condução destas pesquisas é difícil e laboriosa, pois as doenças afetam a sobrevivência das plantas, inclusive das plântulas. O *Colletotrichum acutatum*, por exemplo, infecta as estruturas reprodutivas, reduzindo o florescimento e a produção de sementes (English, 1999).

Altier et al. (2000) selecionaram genótipos de *L. corniculatus* resistentes à podridão da raiz, causada por *Fusarium oxysporum*, através de seleção recorrente. Em adição a tolerância, houve também um aumento no tamanho da coroa e na quantidade de raízes laterais.

A descoberta de acessos rizomatosos de cornichão no Marrocos permitiu a transferência desta característica para cultivares adaptados, representando outra maneira de aumentar a persistência nesta espécie. Os híbridos F1, derivados destes cruzamentos apresentaram-se férteis e vigorosos. A seleção resultou no lançamento da primeira cultivar rizomatosa, ARS-2620 (Beuselinck & Steiner, 1996).

Outro fator importante, a ser considerado em programas de melhoramento, é a tolerância ao pastejo. Perez (2003) avaliou e selecionou genótipos de cornichão a campo e em casa de vegetação, resultando na obtenção de uma população com boa produção de forragem e tolerância ao pastejo. Além disso, identificou um marcador morfológico (altura do primeiro nó) nas plântulas, capaz de separar precocemente os genótipos contrastantes quanto à aptidão ao pastejo.

Trabalhos relacionados ao melhoramento de cornichão para solos ácidos são escassos, entretanto, a tolerância natural inerente a espécie deve

ser explorada, visto que outras forrageiras leguminosas de importante valor forrageiro não são capazes de se adaptar a essas condições.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção em solução nutritiva

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia (DPFA) da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizada no município de Porto Alegre - RS, no período de 11 de junho de 2007 a 19 de dezembro de 2008.

A metodologia utilizada, assim como os detalhes e a escolha das concentrações de cálcio e alumínio, para a seleção das plantas em solução nutritiva, descritas a seguir, foram baseadas em um experimento realizado com *L. corniculatus* por Santos et al. (2007).

Três genótipos de *L. corniculatus* foram utilizados como populações originais: INIA Draco (DR), material uruguaio, selecionado para persistência em condições de campo; São Gabriel (SG), material brasileiro, selecionado para produção de forragem; e, UFRGS (UF), material selecionado pelo DPFA da Faculdade de Agronomia da UFRGS para persistência ao pastejo.

Foram utilizadas cerca de 0,60 g de sementes de cada genótipo, tendo sido previamente tratadas com hipoclorito de sódio a 1% e escarificadas manualmente com lixa nº 100. As sementes foram semeadas em caixas plásticas sobre papel filtro, onde foram umedecidas desde o primeiro dia da

semeadura com uma solução de 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 100 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio (AlCl_3), permanecendo em temperatura ambiente durante todo esse período.

Após sete dias, quando as radículas dos três genótipos atingiram cerca de 10 mm de comprimento, as plântulas que apresentaram uniformidade e normalidade das radículas foram transplantadas para telas plásticas com malha de 1,5 mm de diâmetro coladas sob lâminas de isopor, com um cm de espessura, visando à sustentação das plântulas sobre a solução nutritiva.

Foram utilizadas quatro bandejas, cada uma contendo os três genótipos de *L. corniculatus* a serem selecionados. Em cada bandeja foram transplantadas cerca de 100 plântulas de cada genótipo, constituindo um total de 300 plântulas por bandeja. As bandejas plásticas apresentavam capacidade nominal de oito litros e dimensões 25 x 40 x 8 cm (Figura 1).

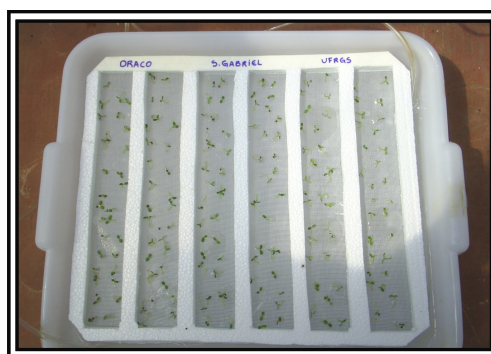


FIGURA 1. Seleção de genótipos de *Lotus corniculatus* L. tolerantes ao alumínio, em solução nutritiva contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 100 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio (AlCl_3). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007 -2008.

A solução nutritiva era composta por 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 100 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio (AlCl_3). O pH da solução foi ajustado

para uma faixa de 4,1 – 4,3 com ácido clorídrico (HCl), sendo verificado diariamente e ajustado quando necessário. A troca total da solução ocorria a cada três dias, tendo por objetivo evitar o acúmulo de exsudados e a alteração das concentrações de cálcio e alumínio. Cada bandeja possuía um volume final de solução de cinco litros que foi aerada constantemente com compressores para aquário.

Após as plântulas serem mantidas por 14 dias em solução foi realizada a seleção das populações originais, levando-se em consideração o maior comprimento radicular, sendo imposta uma pressão de seleção de 10%. Portanto, foram selecionadas cerca de 40 plântulas por genótipo, que foram transplantadas para vasos com substrato comercial, composto por farinha de ossos, cal, esterco de galinha, casca de pinus e arroz carbonizado. As plantas foram conduzidas até a polinização, sendo cada genótipo cruzado manualmente, por um período aproximado de 60 dias (Figura 2 A-D).

Durante todo o período experimental, a casa de vegetação recebeu iluminação artificial com o objetivo de estimular e manter o florescimento das plantas. O sistema de iluminação foi realizado com lâmpadas halógenas brancas de 150 W de potência, que permaneciam ligadas das 6 às 22 horas.

Os legumes produzidos de cada genótipo foram colhidos e acondicionados em sacos de papel, os quais foram levados à estufa de ventilação forçada, com temperatura entre 28 e 30°C, por um período de 96 horas. Após a secagem, os legumes foram trilhados e as sementes foram submetidas a um processo de limpeza em peneiras manuais e passadas por soprador visando à eliminação de sementes chochas. A produção de sementes

foi determinada, e as mesmas separadas por genótipo e acondicionadas em sacos de papel, sendo mantidas em refrigerador (4°C) até a sua utilização.



FIGURA 2. Polinização de *Lotus corniculatus* L. (A) inflorescência; (B) retirada da quilha; (C) polinização; (D) formação das vagens. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007-2008.

As sementes obtidas através dos cruzamentos realizados nas populações originais constituíram as populações Draco F1 (DR-F1), São Gabriel F1 (SG-F1) e UFRGS F1 (UF-F1), as quais passaram pelo segundo ciclo de seleção, através da mesma metodologia utilizada anteriormente, visando aumentar a tolerância ao alumínio. As sementes obtidas do novo ciclo formaram as populações Draco F2 (DR-F2), São Gabriel F2 (SG-F2) e UFRGS F2 (UF-F2).

Eventualmente, as plantas mantidas nos vasos receberam tratamento contra fungos e insetos, com Difenoconazol (25% m/v) e Deltametrina (25% m/v), respectivamente.

3.1.1 Avaliação da tolerância ao alumínio

Após a coleta das sementes das populações F2, as populações selecionadas (F1 e F2) foram testadas em relação ao progresso alcançado, tendo as mesmas sido comparadas com as populações originais em diferentes concentrações de alumínio.

O ensaio foi realizado no período de 29 de dezembro de 2008 a 19 de janeiro de 2009, em casa de vegetação, no DPFA da faculdade de agronomia da UFRGS, localizada no município de porto alegre - RS.

Utilizaram-se cerca de 0,10 g de sementes de cada genótipo de *L. corniculatus* (DR, SG, UF; DR-F1, SG-F1, UF-F1; DR-F2, SG-F2 e UF-F2) além de 0,20 g de sementes de alfafa crioula, utilizada como testemunha por ser considerada uma espécie sensível ao alumínio. As sementes foram tratadas com hipoclorito de sódio a 1%, escarificadas manualmente com lixa nº 100 e semeadas em caixas plásticas sobre papel filtro, onde foram umedecidas com água bidestilada até o transplante para as bandejas.

Sete dias após a semeadura, as plântulas foram transplantadas para telas plásticas com malha de 1,5 mm de diâmetro colocadas sob lâminas de isopor de um cm de espessura. Foram preparadas quatro soluções nutritivas, novamente baseadas em Santos et al. (2007), contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e quatro concentrações de alumínio: 0, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio (AlCl_3), sendo o nível zero considerado como controle. A solução foi aerada constantemente com compressores para aquário e o pH foi ajustado diariamente para uma faixa de 4,1 – 4,3 com HCl.

Ao todo, utilizaram-se oito bandejas plásticas contendo cinco litros

de solução, sendo utilizadas duas para cada nível de alumínio e seis plântulas de cada genótipo por bandeja, totalizando 12 plântulas de cada genótipo por tratamento. As plântulas foram conduzidas nas bandejas por um período de 14 dias, sendo que a solução nutritiva era trocada a cada três dias e o pH era verificado diariamente e ajustado quando necessário.

Avaliou-se o comprimento radicular inicial (CI, sete dias após a germinação) e final (CF, 14 dias após o transplante das plântulas para as bandejas) e o crescimento radicular (CR, comprimento final – comprimento inicial).

Os dados foram submetidos à análise estatística com o auxílio do software SAS, versão 8.0, pelo procedimento “Factorial ANOVA”, constituindo-se em uma análise de variância fatorial (genótipos x doses de alumínio) para CI, CF e CR, tendo suas médias comparadas pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade, quando houve significância para o teste F.

3.2 Análise molecular

A extração do DNA genômico e a análise molecular foram realizadas no Laboratório de Análise Genética do DPFA da Faculdade de Agronomia da UFRGS, no período de 15 de janeiro a 20 de fevereiro de 2009.

A caracterização molecular foi feita nas populações selecionadas (DR-F2, SG-F2 e UF-F2), bem como nas populações originais (DR, SG e UF) de *L. corniculatus*, com o auxílio de marcadores microssatélites (SSR).

A extração do DNA foi realizada segundo a metodologia descrita por Ferreira & Grattapaglia (1998), com modificações. Cada amostra foi constituída

pela mistura (*bulk*) de uma folha jovem e sadia de 20 plantas de cada população. Logo após a coleta do material, o mesmo foi depositado em tubos *ependorf* de 1,5 mL e macerado em nitrogênio líquido. Ao material macerado, foi adicionado 650 μ L de tampão de extração CTAB (2% de CTAB, 1,4 mol de NaCl, 20 mmol EDTA e 10 mmol de Tris base pH 8,0) previamente aquecido a 65° C, 14 μ L de β -mercaptoetanol, 10 μ L de proteinase K e 1% de PVP. O material macerado foi suspenso no tampão de extração com o auxílio do aparelho vortex. As amostras permaneceram em banho-maria a 65° C por 30 minutos, sendo levemente agitadas a cada 10 minutos. Após a retirada do banho, as amostras foram resfriadas no agitador por 30 minutos. Logo depois, foram adicionados 650 μ L de clorofórmio isoamílico (24 clorofórmio:1 álcool isoamílico), sendo as amostras agitadas por 30 minutos. A suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 13.000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo *ependorf*, sendo adicionado ao mesmo volume de DNA o volume de isopropanol gelado. Os tubos foram invertidos gentilmente a fim de observar a precipitação do DNA. A solução foi mantida a 4° C durante uma noite. No dia seguinte, os tubos foram retirados da geladeira e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos, sendo descartado o sobrenadante. Feito isso, foram acrescentados 500 μ L da solução de lavagem (76% de etanol e 10 mmol de acetato de amônio) por 10 minutos, sendo posteriormente centrifugado por cinco minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos até a secagem do *pellet*. Os *pellets* de DNA foram ressuspensos em 100 μ L de TE pH 7,4 (10 mmol de Tris base pH 8,0 e 1 mmol de EDTA), sendo as amostras

mantidas em banho-maria a 65° C por cinco minutos. Após a retirada do banho, o DNA foi reprecipitado com 50 µL de 7,5 mol de acetato de amônio e 375 µL de etanol absoluto. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos invertidos até a completa secagem do *pellet*. Posteriormente o DNA foi ressuspenso em 50 µL de TE pH 7,4. Os tubos foram mantidos por 24 horas a 4° C e depois armazenados a -18° C.

O DNA das amostras foi quantificado através de eletroforese (100 V por uma hora) em gel de agarose 1% corado com 0,04 µL/mL de brometo de etídio (10 mg/mL) para visualização das bandas e comparação com os padrões de concentração conhecida (100, 500 e 1000 ng de DNA) e submerso em tampão TBE 0,5X. Posteriormente, uma alíquota de cada amostra foi diluída em TE pH 7,4 a uma concentração de 20 ng/µL.

As reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em um volume final de 10 µL por reação, compostos por 3 µL da solução de trabalho de DNA (20 ng/µL), 1 µL de tampão PCR 10X, 0,3 µL de MgCl₂ (50 mmol), 0,2 µL de dNTP mix (10 mmol) contendo 2,5 mmol de cada um dos quatro nucleotídeos, 0,6 µL do *primer forward* (10 µmol), 0,6 µL do *primer reverse* (10 µmol), 0,1 µL de *Taq* DNA Polimerase Qiagen (5 U/µL) e água MiliQ esterilizada para completar o volume. Utilizaram-se 14 *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Lotus japonicus* (Regel) Larsen e cinco *primers* de microssatélites desenvolvidos para *Trifolium Repens* L. (Tabela 1).

TABELA 1. *Primers* de microssatélites utilizados na amplificação de seis genótipos de *Lotus corniculatus* L. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

| <i>Primer</i> | Sequência F (5' – 3') Sequência R (3' – 5') | Motivo/ classe |
|---------------|---|---------------------------------|
| *TM0021 | GGTCATCTTTGTGATAGTAAGTAA CTGTTGTATCAAGCCACAAG | (CT) ₁₆ Perfeito |
| *TM0029 | CCTATATAACCTTATTCAAATTGG ACGAAAACAAAACCCTGCTG | (CT) ₁₅ Perfeito |
| *TM0046 | ATCTAACCAAAACGTGCTTC TTCTTGCCCTTTCTCTGTGG | (CT) ₁₆ Perfeito |
| *TM0072 | TTATGGTGCTGTATGAGTATG CTTATGAACTTAAGCCCTG | (AT) ₉ Perfeito |
| *TM0080 | AACAAAATACTAAACTATAGCAAAG CGTCCCACAACCTCTTTTAC | (AT) ₁₄ Perfeito |
| *TM0133 | CTTTGAAATAACTCATCAAAC TACTGACACATTCCCCTTGC | (CT) ₂₄ Perfeito |
| *TM0151 | CTATCTAATCAAATATGGTGGC ACGCTTAAACTTGTAAGGC | (AT) ₂₅ Perfeito |
| *TM0208 | TGGCTAGGAATGATGTTGTG TACAATCATGTTTATAAATGTGG | (AAT) ₁₅ Perfeito |
| *TM0212 | CTTCCTTCCTCACCCTTAG TAAACGAAAATGAAGCAGAG | (CT) ₁₃ Perfeito |
| *TM0256 | GAAATTCTTTCCATTCATTG AGAGAGATAGGGTTGCTCAC | (AAAT) ₇ Perfeito |
| *TM0314 | TGTGATTAGTGATTAGAAAGTGAG TTTGACCAAACCTTCCTTCAC | (CT) ₁₄ Perfeito |
| *TM0756 | GCACCTACCAAATAAACAGC CTCCCATGAACGCCTTGAC | (AAG) ₆ Perfeito |
| *TM0817 | TTGCTCATGTGAGAAAGAAC GCTTTAAAATGACGTCCTAATC | (AAT) ₁₉ Perfeito |
| *TM1491 | TCAAAGTCTGATTTGGAGG TTGTAAGTGAAAGCAATGG | (AAG) ₆ Perfeito |
| **ATS070 | GTCATTGGTGATGGTGTCT TTTCGTCAGTGGCGGTGCTC | (CA) _N Perfeito |
| **ATS226 | CATCTACTCACCACCACCTA CAGCAGCAGCAGCAGCGATA | (ATG) _N Perfeito |
| **PRS582 | CCGGTTCGATTCAACAAGTT CTGCAGATCCAGTAATGATTTCC | (TTC) _N Perfeito |
| **PRS612 | TTGAACTAGTCGTTGGATGGG GAGAGGGTTTCAGGAACATACG | (ATG) _N Perfeito |
| **TRSSRAXX31 | TCTGTTTTGTTGGCCATGC TTGCAAAGTGTTTGAAGGA | (GT) ₇ Perfeito |

* *primer* desenvolvido para *Lotus japonicus* (Regel) Larsen.;

** *primer* desenvolvido para *Trifolium repens* L.

As condições de amplificação de SSR foram baseadas em Bortolini (2008), com modificações, as quais consistiam de uma desnaturação inicial de 94° C por 5 minutos, seguidos por sete ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 61° C, 1 minuto a 72° C, com uma redução na temperatura de anelamento de 1° C por ciclo, seguido de 25 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 55° C e 1 minuto a 72° C e, seis ciclos de 45 segundos a 94° C, 45 segundos a 54° C e 45 segundos a 72° C, e por fim, extensão a 72° C por 8 minutos e estoque a 7° C. Após a amplificação foram acrescentados 4 µL de tampão de amostra (4g/mL de sacarose, 2,5 mg/mL de azul de bromofenol e TE pH 7,4) em cada amostra.

Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose de alta resolução (Agarose 1000) 4% corado com 0,08 µL/mL de brometo de etídio (10 mg/mL), submerso em tampão TBE 1X, a uma corrente de 100 V por duas horas (Figura 3). Após a eletroforese, o gel era visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (comprimento de onda de 260 nm) e fotografado, para que os fragmentos das amostras fossem determinados por comparação a um padrão de 100 pares de bases (pb), através do programa Kodak EDAS 290 (*Electrophoresis Documentation and Analysis System*).

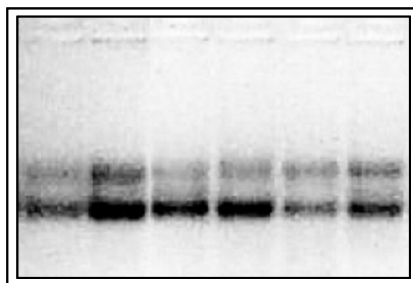


FIGURA 3. Gel de agarose com bandas de DNA das populações de *Lotus corniculatus* L. em análise do *primer* de microssatélite TM0817. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Por fim, foi construída uma matriz binária dos dados, onde foi atribuído o valor um para a presença e zero para a ausência de bandas. A partir dessa matriz, com o auxílio do programa “*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*” NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 2000) e utilizando o coeficiente de Jaccard, foi gerada uma matriz de similaridade comparando todos os genótipos.

Uma análise de agrupamento foi realizada utilizando o módulo SAHN do NTSYS e o método da média das distâncias (UPGMA, *Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) e assim, construído um dendrograma de similaridade genética entre os genótipos.

Foi calculado o número total de alelos por loco (A), as frequências genotípicas e alélicas e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) para cada loco ($PIC = 1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência do alelo i). O PIC fornece uma estimativa do poder discriminativo do marcador, variando de zero, para perfis monomórficos, até um, para perfis altamente polimórficos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da tolerância ao alumínio

Os comprimentos radiculares iniciais (CI) das plântulas apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação aos genótipos no momento da implantação do experimento. Por outro lado, não houve variação significativa ($P > 0,05$) entre o CI e às concentrações de alumínio (Tabela 2).

Os maiores comprimentos radiculares foram observados em alfafa (ALF), UF-F1 e UF-F2 e, o menor, em DR. A alfafa apresentou um crescimento médio 13% superior ao dos genótipos das populações originais de cornichão (DR, SG e UF), e 7% maior em relação às populações melhoradas. Houve uma tendência das populações selecionadas de *L. corniculatus* apresentarem maior CI do que as populações originais.

O tamanho das sementes pode estar associado ao CI observado, visto que a existência de plântulas vigorosas está positivamente relacionada às sementes maiores (Leishman et al., 2000). As sementes de cornichão são pequenas quando comparadas às demais espécies de forrageiras leguminosas (Blumenthal & McGraw, 1999), principalmente quando confrontadas com as de alfafa. Por exemplo, um grama de sementes de alfafa corresponde a 500 sementes, enquanto no cornichão, esse valor equivale a 815 (Brasil, 1992). Além disso, o baixo vigor das plântulas de *L. corniculatus*, na maioria das

vezes, está associado ao tamanho reduzido de suas sementes (Blumenthal & McGraw, 1999).

TABELA 2. Comprimento radicular inicial (cm) dos genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) e alfafa crioula (*Medicago sativa* L.) utilizados na implantação do experimento de avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

| Genótipos | Concentrações de alumínio ($\mu\text{mol/L}$) | | | | Média |
|-----------|---|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | |
| ALF | 2,38 | 2,34 | 2,38 | 2,28 | 2,35 ^{A*} |
| DR | 1,99 | 1,89 | 2,08 | 2,12 | 2,02 ^C |
| DR-F1 | 2,04 | 2,13 | 2,17 | 2,12 | 2,11 ^{BC} |
| DR-F2 | 2,05 | 2,22 | 2,15 | 2,14 | 2,14 ^{BC} |
| SG | 2,11 | 1,98 | 2,13 | 2,19 | 2,10 ^{BC} |
| SG-F1 | 2,15 | 2,14 | 2,21 | 2,22 | 2,18 ^B |
| SG-F2 | 2,11 | 2,28 | 2,25 | 2,16 | 2,20 ^B |
| UF | 2,15 | 2,12 | 2,09 | 2,13 | 2,12 ^{BC} |
| UF-F1 | 2,30 | 2,32 | 2,37 | 2,38 | 2,34 ^A |
| UF-F2 | 2,28 | 2,36 | 2,38 | 2,33 | 2,33 ^A |
| Média | 2,16 ^{a**} | 2,18 ^a | 2,22 ^a | 2,20 ^a | |

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

**Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

Por outro lado, a seleção parece ter contribuído para o aumento do vigor das sementes de cornichão, tendo como consequência um maior comprimento radicular nas populações melhoradas. O peso de mil sementes das populações selecionadas foi, em média, de 1,5 g, representando um aumento médio de 23% em relação ao das populações originais (1,2 g). Caetano (1998), do mesmo modo, verificou um aumento no comprimento radicular nos materiais selecionados em relação aos originais, quando selecionou plântulas de alfafa para solos ácidos.

Até o momento do transplante para as bandejas, todos os genótipos

foram tratados apenas com água bidestilada, não havendo a interferência do alumínio neste estágio. Somente após o transplante, as plântulas de cada um dos genótipos foram submetidas a quatro diferentes concentrações de Al^{3+} . Isso pode explicar a semelhança entre as médias dos comprimentos radiculares iniciais, nos diferentes tratamentos.

A análise de variância, do comprimento radicular final (CF), não apresentou interação significativa ($P>0,05$) entre os genótipos e as concentrações de alumínio. A significância ($P<0,05$) foi observada apenas nos efeitos principais (Tabela 3).

TABELA 3. Comprimento radicular final (cm) dos genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) e alfafa crioula (*Medicago sativa* L.) aos 14 dias em solução nutritiva contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em quatro concentrações de alumínio (0, 50, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

| Genótipos | Concentrações de alumínio ($\mu\text{mol/L}$) | | | | Média |
|-----------|---|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| | 0 | 50 | 100 | 150 | |
| ALF | 2,88 | 2,55 | 2,54 | 2,39 | 2,59 ^{AB*} |
| DR | 2,29 | 2,11 | 2,27 | 2,24 | 2,23 ^D |
| DR-F1 | 2,33 | 2,38 | 2,38 | 2,24 | 2,33 ^{CD} |
| DR-F2 | 2,33 | 2,47 | 2,36 | 2,28 | 2,36 ^{CD} |
| SG | 2,43 | 2,28 | 2,33 | 2,34 | 2,34 ^{CD} |
| SG-F1 | 2,47 | 2,46 | 2,48 | 2,38 | 2,45 ^{BC} |
| SG-F2 | 2,45 | 2,59 | 2,53 | 2,34 | 2,48 ^{ABC} |
| UF | 2,50 | 2,41 | 2,33 | 2,28 | 2,38 ^{CD} |
| UF-F1 | 2,62 | 2,62 | 2,65 | 2,54 | 2,61 ^{AB} |
| UF-F2 | 2,63 | 2,70 | 2,67 | 2,53 | 2,63 ^A |
| Média | 2,49 ^{a**} | 2,46 ^{ab} | 2,45 ^{ab} | 2,36 ^b | |

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

**Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

Os menores comprimentos radiculares finais foram vistos em todas as populações originais (DR, SG e UF) e nas melhoradas DR-F1 e DR-F2,

diferenciando-se significativamente ($P < 0,05$) dos demais materiais analisados. Por outro lado, destacou-se ($P < 0,05$) a população UF-F2, possuindo o maior CF. Numericamente, todas as populações selecionadas apresentaram CF superior ao das populações originais, mantendo a tendência observada no CI.

O vigor inicial das sementes pode ter influenciado o comportamento das plântulas em relação ao CF. A alfafa, considerada uma das espécies de leguminosas forrageiras de maior vigor (Formoso, 2000), teve um dos maiores CF, assim como as plântulas das populações melhoradas de SG e UF.

O comportamento do genótipo DR, frente a diferentes concentrações de alumínio, foi avaliado por Santos et al. (2007). Os autores observaram a sensibilidade deste material a partir de doses elevadas de alumínio ($100 \mu\text{mol/L}$), corroborando os resultados obtidos neste experimento.

Quanto às diferenças existentes entre as concentrações de alumínio, estas foram significativas ($P < 0,05$) apenas entre os níveis zero e $150 \mu\text{mol/L}$. Estes resultados poderiam sugerir que todos os materiais analisados são tolerantes a concentrações elevadas de Al^{3+} , entretanto, trabalhos anteriores demonstraram a sensibilidade de alguns genótipos de *Lotus* (Santos et al., 2008c) e de alfafa crioula (Santos et al., 2008b) em relação ao alumínio. Dessa maneira, o CF não é uma forma adequada para diferenciar genótipos de cornichão em relação à tolerância ao alumínio.

Entre as avaliações realizadas neste trabalho, o crescimento radicular (CR) foi o que melhor caracterizou a tolerância ao alumínio. A avaliação permitiu que as diferenças existentes entre as radículas das plântulas, na implantação do experimento, fossem suprimidas, considerando-se

apenas o crescimento radicular líquido (CF – CI). A análise de variância, referente ao CR, indicou uma interação significativa ($P < 0,05$) entre os genótipos testados e as concentrações de alumínio utilizadas (Tabela 4).

TABELA 4. Crescimento radicular (cm) dos genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) e alfafa crioula (*Medicago sativa* L.) após 14 dias em solução nutritiva contendo 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em quatro concentrações de alumínio (0, 50, 100, 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

| Genótipos | Concentrações de alumínio ($\mu\text{mol/L}$) | | | |
|-----------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 0 | 50 | 100 | 150 |
| ALF | 0,50 ^{A a**} | 0,21 ^{C b} | 0,16 ^{D bc} | 0,11 ^{C c} |
| DR | 0,30 ^{B a} | 0,22 ^{C b} | 0,19 ^{DC b} | 0,12 ^{C c} |
| DR-F1 | 0,29 ^{B a} | 0,25 ^{BC ab} | 0,21 ^{BCD b} | 0,12 ^{C c} |
| DR-F2 | 0,28 ^{B a} | 0,25 ^{BC ab} | 0,21 ^{BCD b} | 0,14 ^{BC c} |
| SG | 0,32 ^{B a} | 0,29 ^{AB a} | 0,20 ^{BCD b} | 0,15 ^{ABC b} |
| SG-F1 | 0,32 ^{B a} | 0,32 ^{AB a} | 0,27 ^{AB a} | 0,16 ^{ABC b} |
| SG-F2 | 0,34 ^{B a} | 0,31 ^{AB ab} | 0,28 ^{AB b} | 0,18 ^{AB c} |
| UF | 0,35 ^{B a} | 0,29 ^{AB ab} | 0,24 ^{ABC b} | 0,15 ^{ABC c} |
| UF-F1 | 0,32 ^{B a} | 0,30 ^{AB a} | 0,28 ^{A a} | 0,16 ^{ABC b} |
| UF-F2 | 0,35 ^{B a} | 0,34 ^{A a} | 0,29 ^{A a} | 0,20 ^{A b} |

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

**Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha, não diferem pelo teste de Duncan a 5%.

No tratamento zero, todos os genótipos de cornichão tiveram o CR semelhante, porém inferiores ao da alfafa. Entretanto, o inverso ocorreu nos tratamentos com alumínio, havendo uma redução acentuada no CR da alfafa, desde a concentração 50 $\mu\text{mol/L}$, indicando maior sensibilidade ao Al^{3+} nesta espécie.

Entre os genótipos de cornichão, o CR foi semelhante entre as doses zero e 50 $\mu\text{mol/L}$, com exceção do DR, o qual apresentou maior redução quando comparado as demais populações de *L. corniculatus*, e comportamento parecido com o da alfafa.

Nas concentrações elevadas de alumínio, as populações melhoradas de SG e UF destacaram-se das originais, sendo que os materiais UF-F1 e UF-F2 mantiveram seus CR satisfatórios até a concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$. No nível 150 $\mu\text{mol/L}$, os materiais SG-F2 e UF-F2 apresentaram, numericamente, os maiores CR. Em contrapartida, os menores CR foram vistos em ALF e DR.

O comportamento exibido pelos materiais de *L. corniculatus*, nos diferentes níveis de alumínio, permitiu caracterizar o genótipo DR como um material sensível ao Al^{3+} , enquanto SG e UF mostraram-se mais tolerantes. Santos et al. (2007) já haviam caracterizado DR e UF em relação à resposta ao Al, indicando que os mesmos são sensíveis e tolerantes, respectivamente.

As diferenças encontradas entre os genótipos, referentes à tolerância ao Al^{3+} , podem ser explicadas pela grande variabilidade genética existente no germoplasma de *L. corniculatus* (Steiner, 1999). Essa variabilidade deve ser explorada em programas de melhoramento, visando à obtenção de materiais que possam ser utilizados como parentais, de acordo com as características desejáveis.

A alfafa mostrou-se sensível ao alumínio, sofrendo uma inibição média, no CR, de 68% nas diferentes concentrações de Al^{3+} testadas. Por outro lado, os genótipos de cornichão demonstraram maior tolerância, sendo que as populações originais apresentaram uma redução média no CR de 36%, enquanto que nas populações melhoradas (F2) essa diminuição foi de 24% (Figura 4). A utilização das populações melhoradas de cornichão, nas áreas de pastagem que possuam solos ácidos, acarretaria em uma redução na

quantidade de calcário a ser utilizada, bem como uma diminuição nos custos de implantação e manutenção da pastagem, sem prejuízos na produção e na persistência.

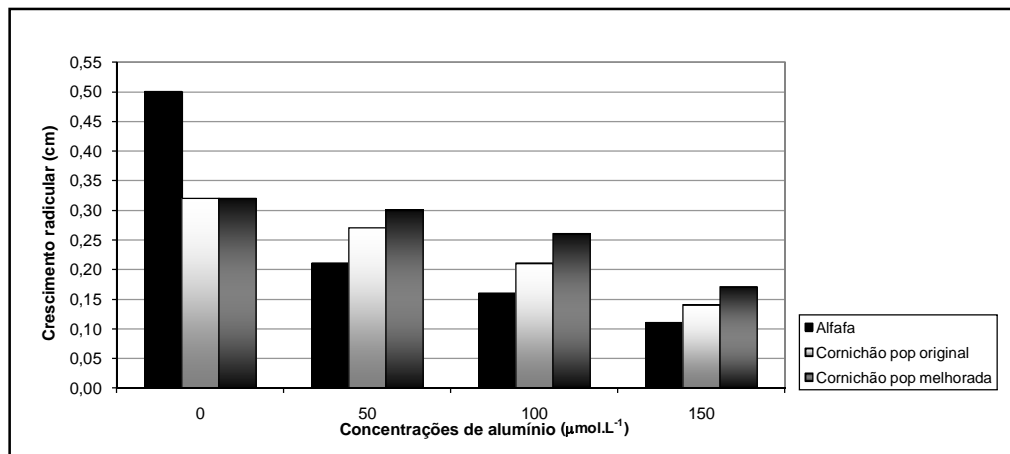


FIGURA 4. Crescimento radicular médio (cm) de alfafa crioula (*Medicago sativa* L.) e de três populações originais e melhoradas de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) após 14 dias em solução nutritiva contendo 200 µmol/L de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em quatro concentrações de alumínio (0, 50, 100 e 150 µmol/L) (AlCl_3). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Ao contrário da alfafa, que teve seu CR acentuadamente reduzido quando exposta às diferentes concentrações de alumínio, as populações melhoradas de cornichão mantiveram certa estabilidade até mesmo em níveis elevados (100 µmol/L), apresentando uma diminuição média de 6% entre os níveis zero e 50 µmol/L e 19% entre zero e 100 µmol/L.

Os efeitos da toxidez (Figura 5) foram percebidos de maneira proporcional ao aumento das concentrações de Al^{3+} , ocorrendo uma diminuição considerável no CR dos genótipos estudados, nas doses elevadas. Estes resultados estão de acordo com trabalhos previamente publicados, os quais

afirmam ser a inibição do crescimento radicular, o sintoma primário de toxidez por alumínio nas plantas (Foy et al., 1978; Delhaize & Ryan, 1995; Kochian, 1995).



FIGURA 5. Efeitos da toxidez por alumínio em plântulas de *Lotus corniculatus* L. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

A avaliação do CR mostrou que a concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ foi eficiente na discriminação dos genótipos estudados em relação à sensibilidade ao Al^{3+} , confirmando o resultado obtido por Santos et al. (2007).

Nos ensaios realizados, as populações melhoradas apresentaram maior CR em relação às populações originais, indicando que a seleção para tolerância ao alumínio, em solução nutritiva simples, contendo 100 $\mu\text{mol/L}$ de Al^{3+} e 200 $\mu\text{mol/L}$ de Ca, foi eficiente nos materiais estudados (Figura 6).

Após o primeiro ciclo de seleção, os aumentos percentuais médios relativos ao CR nas populações F1 foram de 5, 10 e 5% e, após o segundo ciclo, foram de 6, 14 e 16% referentes às populações originais DR, SG e UF, respectivamente. A redução nos ganhos percentuais relacionados ao CR, observados após o primeiro ciclo de seleção nas populações melhoradas de

DR e SG, pode ser explicada pela maior variabilidade existente nas populações originais (Carvalho et al., 2008). Ao longo das etapas de seleção, a variabilidade vai sendo reduzida e, dessa maneira, tornando-se mais difícil de ser explorada.

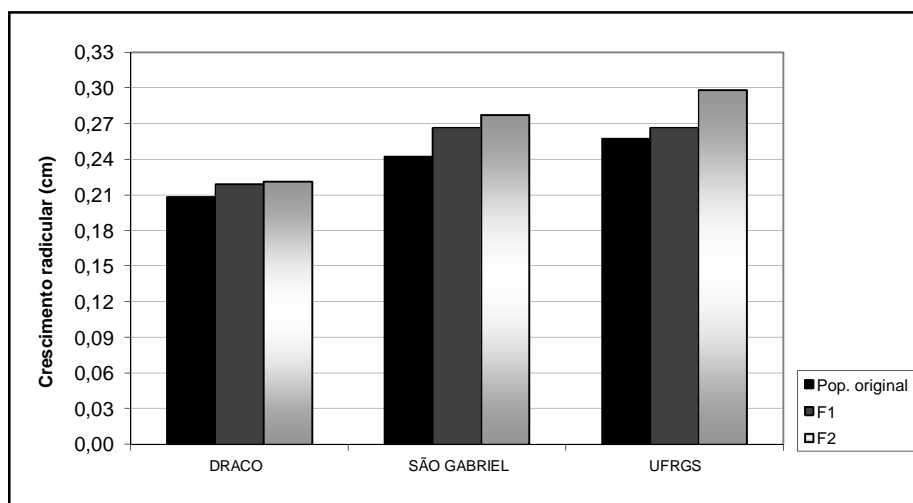


FIGURA 6. Avaliação da tolerância ao alumínio de nove populações de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) em relação ao crescimento radicular médio das plântulas submetidas a diferentes concentrações de alumínio (0, 50, 100 e 150 $\mu\text{mol/L}$) (AlCl_3). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Entretanto, pelo fato da espécie *L. corniculatus* ser tetraplóide, alógama e por ter sido realizado somente dois ciclos de seleção, existe ainda variabilidade genética para a tolerância ao Al^{3+} , dentro e entre as populações selecionadas. Além do mais, esta variabilidade permite a obtenção de maiores ganhos para esta característica, podendo ser fixada em uma população futura, bem como combinada com outros atributos relevantes para a espécie.

A tolerância ao alumínio é uma característica herdável, apresentando diferenças entre as espécies em relação ao seu controle,

podendo a mesma ser regulada por um ou mais genes dominantes ou por vários genes de efeitos aditivos atuantes em diferentes rotas bioquímicas (Kochian, 1995). Ainda não foram divulgados trabalhos capazes de revelar como ocorre o controle genético dessa característica no cornichão, apenas em relação ao mecanismo de tolerância (Santos et al., 2008a), o que auxiliaria na escolha do método mais apropriado para a seleção. Assim mesmo, a seleção recorrente empregada neste trabalho mostrou-se eficiente na escolha de plântulas tolerantes ao alumínio.

A variabilidade genética existente em *L. corniculatus*, bem como a capacidade natural de adaptação a solos pobres e relativamente ácidos (Blumenthal & McGraw, 1999), deve ser explorada em programas de melhoramento. A busca por materiais tolerantes ao alumínio ocorre em outras culturas de importante valor agrônomo, como por exemplo, na alfafa (Caetano, 1998), no sorgo (Caniato et al., 2007), no trevo branco (Voigt & Staley, 2004) e na soja (Menosso, 2000).

A utilização de cultivares capazes de se desenvolverem e se manterem em solos ácidos, com um mínimo necessário de calcário, apresenta-se como uma alternativa ambientalmente e economicamente sustentável. O maior comprimento radicular manifestado nas plantas tolerantes ao alumínio permite a possibilidade de absorção dos nutrientes além da camada arável e, também, o acesso à água nas camadas mais profundas, durante períodos de déficit hídrico. Ainda torna possível a redução dos gastos relacionados à correção do solo, durante a implantação e/ou manutenção da pastagem.

Entretanto, os materiais selecionados ainda devem ser testados sob

condições de campo, visando um conhecimento mais aprofundado do comportamento das populações tolerantes em condições reais de utilização.

4.2. Análise molecular

Na análise molecular, testaram-se 19 pares de *primers* de SSR, dos quais 14 foram desenvolvidos para *L. japonicus* e, cinco, para *T. repens*. Todos os primers testados foram utilizados nas análises, com exceção de um (prs582), desenvolvido para *T. repens*, por não ter produzido bandas evidentes e ter apresentado falhas na amplificação dos genótipos.

Os 18 marcadores analisados detectaram ao todo 51 alelos nos seis genótipos de *L. corniculatus* estudados (DR, UF, SG, DR-F2, SG-F2 e UF-F2). O número de alelos por loco variou de um (TM0212 e TM1491) a cinco (TM0133), com uma média de 2,8 alelos por loco. Os tamanhos alélicos variaram de 112 a 460 pares de bases (pb) (Tabela 5).

Sardaro et al. (2008) analisando onze populações selvagens de cornichão, com o auxílio de cinco marcadores SSR, detectaram a presença, em média, de 13,6 alelos por loco. A grande variação observada entre o número de alelos existentes em populações selvagens e cultivares, deve-se principalmente à estreita base genética utilizada em programas de melhoramento (Tanksley & McCouch, 1997).

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de zero a 0,75, com uma média de 0,52. Dez pares de *primers* foram polimórficos (TM0021, TM0029, TM0072, TM0133, TM0151, TM0208, TM0314, TM0756, prs612 e TRSSRAXX31) e oito foram monomórficos (TM0046, TM0080,

TM0212, TM0256, TM0817 e TM1491, ats070, ats226). Os locos monomórficos apresentaram os menores valores de PIC, enquanto que, valores elevados foram encontrados nos locos com maior número de alelos. Todos os locos foram capazes de detectar pelo menos um alelo em cada um dos genótipos de cornichão analisados. Esse fato pode estar relacionado à heterozigose dos materiais, visto que o modo de reprodução dos mesmos é o de fecundação cruzada.

TABELA 5. Tamanho alélico (pb), número de alelos (A) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), de cada um dos 18 marcadores de microssatélites analisados na caracterização de seis genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.). UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

| <i>Primer</i> | Tamanho alélico (pb) | A | PIC |
|---------------|----------------------|-------|----------|
| *TM0021 | 160 – 189 | 4 | 0,63 |
| *TM0029 | 153 – 170 | 3 | 0,58 |
| *TM0046 | 148 – 162 | 2 | 0,50 |
| *TM0072 | 135 – 172 | 4 | 0,73 |
| *TM0080 | 129 – 167 | 2 | 0,50 |
| *TM0133 | 160 – 195 | 5 | 0,71 |
| *TM0151 | 112 – 128 | 3 | 0,57 |
| *TM0208 | 143 – 246 | 3 | 0,64 |
| *TM0212 | 160 | 1 | 0 |
| *TM0256 | 169 – 183 | 2 | 0,50 |
| *TM0314 | 148 – 160 | 2 | 0,48 |
| *TM0756 | 134 – 168 | 3 | 0,58 |
| *TM0817 | 124 – 162 | 2 | 0,50 |
| *TM1491 | 148 | 1 | 0 |
| **ats070 | 193 – 455 | 4 | 0,75 |
| **ats226 | 142 – 372 | 4 | 0,75 |
| **prs612 | 130 – 266 | 3 | 0,62 |
| **TRSSRAXX31 | 317 – 460 | 3 | 0,41 |
| Total | | 51 | |
| Média | | 2,8 | 0,52 |
| Min – Max | 112 – 460 | 1 - 5 | 0 – 0,75 |

**primer* desenvolvido para *Lotus japonicus* (Regel) Larsen;

***primer* desenvolvido para *Trifolium repens* L.

A partir da matriz de similaridade genética (Tabela 6), obtida pelo

índice de Jaccard, foi gerado um dendrograma (Figura 7), o qual apresentou um coeficiente de correlação cofenético elevado ($r = 0,93$), indicando a representatividade do mesmo em relação à matriz de similaridade genética. A similaridade média entre os genótipos analisados foi alta (0,79), variando de 0,73 a 0,92. A utilização da similaridade média como ponto de corte permitiu a formação de três grupos. Um grupo maior, composto por quatro genótipos; e dois grupos, com apenas um genótipo cada.

TABELA 6. Matriz de similaridade genética de seis genótipos de *Lotus corniculatus* L. analisados através da técnica de microssatélites. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

| | DR | SG | UF | DR-F2 | SG-F2 | UF-F2 |
|-------|------|------|------|-------|-------|-------|
| DR | --- | | | | | |
| SG | 0,80 | --- | | | | |
| UF | 0,79 | 0,84 | --- | | | |
| DR-F2 | 0,78 | 0,83 | 0,79 | --- | | |
| SG-F2 | 0,76 | 0,83 | 0,92 | 0,81 | --- | |
| UF-F2 | 0,78 | 0,74 | 0,73 | 0,78 | 0,75 | --- |

A elevada similaridade existente entre os genótipos estudados pode ser o resultado da base genética semelhante utilizada no desenvolvimento de novas cultivares, principalmente quando o programa de melhoramento é desenvolvido a partir de cultivares previamente lançadas através de seleção massal ou recorrente. As espécies de *Lotus* apresentam uma grande variabilidade genética, tanto intra quanto interespecífica, que deve ser melhor compreendida e utilizada em programas de melhoramento, na tentativa de evitar os gargalos genéticos (Steiner, 1999).

O maior índice de similaridade observado em relação aos materiais analisados foi de 0,92 entre SG-F2 e UF. Os menores índices foram de 0,73 e

0,74 entre UF e UF-F2 e, SG e UF-F2, respectivamente. A maior e a menor similaridade encontradas entre as populações SG e UF podem ter ocorrido em decorrência do genótipo UF ter sido originado do SG a partir de um programa de melhoramento anterior (Perez, 2003). Após o genótipo UF ter sofrido dois ciclos de seleção, passando a ser chamado de UF-F2, ocorreu um maior distanciamento do seu ancestral SG. Ao contrário, quando o SG foi melhorado, (SG-F2), este se assemelhou a sua progênie melhorada, o genótipo UF.

Foram percebidas alterações discretas na similaridade entre os genótipos após o melhoramento. Antes da seleção, DR apresentava-se 80 e 79% similar aos genótipos SG e UF, respectivamente. Após dois ciclos, estes valores passaram a ser de 76% entre SG-F2 e, 78% entre UF-F2. Por outro lado, a similaridade inicial entre UF e SG era de 84%, passando a ser de 92% entre UF e SG-F2. Essas mudanças indicam a ocorrência de alterações a nível gênico nas populações, ao longo do programa de melhoramento.

A similaridade entre os genótipos das populações originais e melhoradas foi de 0,78 entre DR e DR-F2; 0,83 entre SG e SG-F2; e 0,73 entre UF e UF-F2. Não foram observadas diferenças em relação ao número de alelos entre as populações originais e melhoradas.

O acompanhamento do número e da frequência alélica dos indivíduos que fazem parte de um programa de melhoramento, pode ser realizado com o auxílio de marcadores moleculares, através da comparação genética com os seus progenitores. Dessa maneira, pode-se determinar se houve um aumento ou uma diminuição, ou até mesmo o desaparecimento de um alelo na população. Através da análise desses dados, o melhorista pode

decidir o momento mais adequado para a introdução de novas fontes de variabilidade à população (Brondani et al., 2004).

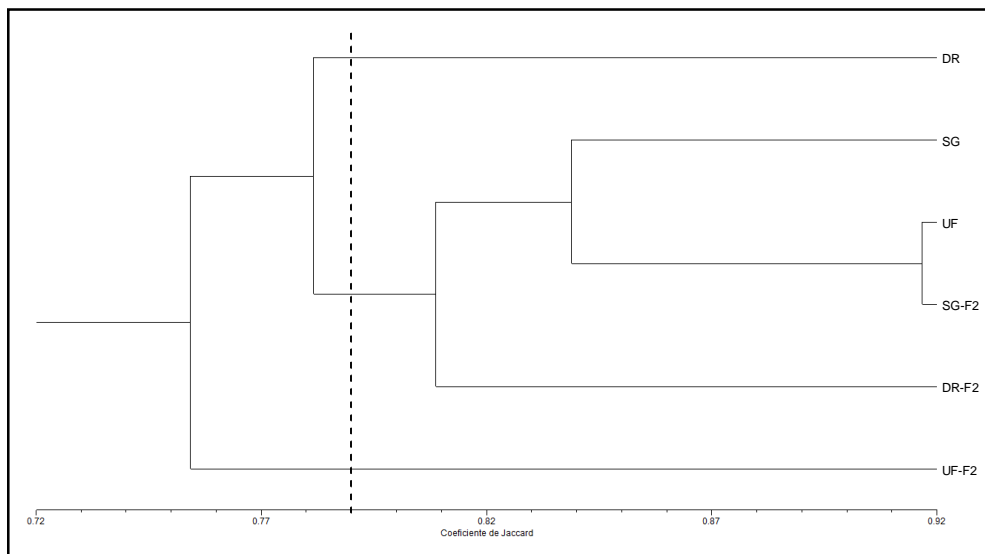


FIGURA 7. Dendrograma obtido com base na similaridade genética de seis genótipos de *Lotus corniculatus* L., utilizando-se 18 marcadores microssatélites. A linha tracejada indica a distância média e o ponto de corte no dendrograma. UFRGS, Porto Alegre, RS, 2009.

Os agrupamentos podem ter sido gerados em decorrência do programa de melhoramento para solos ácidos, no qual os genótipos haviam sido previamente submetidos. Através da análise dos resultados obtidos do experimento anterior, o material DR apresentou-se como o mais sensível ao alumínio entre os demais. Por outro lado, o material UF-F2 destacou-se como o mais tolerante. Ambos formaram grupos únicos, a partir do corte realizado no dendrograma. Os genótipos que constituíram o grupo maior (SG, UF, DR-F2 e SG-F2) apresentaram um nível de tolerância intermediário, exceto o SG-F2. Provavelmente, este material permaneceu neste grupo pelo fato do genótipo UF ter sido originado do SG, como visto anteriormente.

Os marcadores utilizados neste trabalho foram desenhados para outras espécies, e mesmo assim mostraram-se eficientes na diferenciação dos genótipos de *L. corniculatus* analisados, corroborando os demais trabalhos que também utilizaram *primers* heterólogos. Sawasato et al. (2008) analisaram a diversidade genética entre 64 acessos de *Paspalum urvillei* Steudel utilizando marcadores desenvolvidos para *Lolium multiflorum* L. e *Trifolium repens* L. Sardaro et al. (2008) acessaram a variabilidade genética existente entre 11 populações selvagens de *L. corniculatus* com o auxílio de cinco pares de *primers* desenvolvidos para *L. japonicus*.

A maior limitação na utilização dos SSR está no elevado custo requerido para o desenvolvimento de *primers* específicos, quando os mesmos não estão disponíveis para a espécie a ser estudada. Entretanto, nas situações onde ocorre a conservação de sítios de microssatélites entre as espécies relacionadas, a transferência dos marcadores é possível utilizando-se *primers* heterólogos (Faleiro, 2007).

Diversos trabalhos relacionados ao estudo da diversidade genética em populações naturais já foram realizados com a técnica de microssatélites. Contudo, existem poucos trabalhos referentes a diferenças genéticas entre cultivares ou populações. Em alfafa, Flajoulout et al. (2005) investigaram satisfatoriamente o nível de diferenciação entre sete cultivares originadas de um programa de melhoramento, e entre estas cultivares e o material que lhes originaram, com oito marcadores SSR desenvolvidos para *Medicago truncatula* L. Sete cultivares de *Lolium perenne* L. apresentaram diferenças inter- e intraespecíficas através de 22 marcadores SSR (Kubik et al., 2001).

O sucesso no desenvolvimento de novas cultivares depende da escolha dos genitores e do planejamento dos cruzamentos que devem ser realizados ao longo do programa (Borém, 2005). Os marcadores moleculares atuam como uma ferramenta eficiente na análise da variabilidade genética dos potenciais genitores, identificando diferenças entre os materiais em nível de DNA. As técnicas moleculares fornecem aos pesquisadores uma nova fonte de informações, que utilizadas em conjunto com os dados morfológicos e agronômicos acabam contribuindo para o aumento da eficácia do programa (Faleiro, 2007).

5. CONCLUSÕES

1. A seleção de plântulas de *Lotus corniculatus* L. em solução nutritiva contendo 100 $\mu\text{mol/L}$ de alumínio e 200 $\mu\text{mol/L}$ de cálcio, mostra-se eficiente na obtenção de materiais com maior tolerância ao alumínio.
2. O crescimento radicular líquido é o parâmetro que avalia com maior precisão os materiais analisados em relação à tolerância ao alumínio.
3. Os genótipos analisados de cornichão mostram-se mais tolerantes ao alumínio do que a alfafa crioula, principalmente o material UF-F2.
4. Os marcadores moleculares microssatélites são capazes de diferenciar geneticamente os genótipos de *L. corniculatus* analisados.
5. Os *primers* desenvolvidos para *Lotus japonicus* (Regel) Larsen e *Trifolium repens* L. conseguem acessar os locos SSR existentes nos genótipos de cornichão estudados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTIER, N.A.; EHLKE, N.J.; REBUFFO, M. Divergent selection for resistance to fusarium root rot in birdsfoot trefoil. **Crop Science**, Madison, v.40, p.670 - 675, 2000.

ANIOL, A. Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.123, p.223 – 227, 1990.

ARAUJO, J.C.; JACQUES, A.V.A. Características morfológicas e produção de matéria seca de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) colhido em diferentes estádios de crescimento e a duas alturas de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.3, n.2, p.138 – 147, 1974.

BARAIBAR, A.; FRIONI, L.; GUEDES, M.E. et al. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguai. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.1011 – 1017, 1999.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.48, n.1, p.75 – 92, 2002.

BARRETT, B.; GRIFFITHS, A.; SCHREIBER, M. et al. A microsatellite map of white clover. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.109, p.596 – 608, 2004.

BARRY, T.N.; McNABB, W.C. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, v.81, p.263 – 272, 1999.

BEUSELINCK, P. R. **Trefoil: The science and technology of the Lotus**. 28.ed. Madison: CSSA, 1999. 241p.

BEUSELINCK, P.R.; PETERS, E.J.; MCGRAW, R.L. Cultivar and management effects on stand persistence of birdsfoot trefoil. **Agronomy Journal**, Madison, v.76, n.2, p.490 – 492, 1984.

BEUSELINCK, P.R.; STEINER, J.J., Registration of “ARS-2620” birdsfoot trefoil. **Crop Science**, Madison, v. 36, p.1414, 1996.

BLUMENTHAL, M.J.; MCGRAW, R.L. Lotus adaptation, use and management. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.) **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: CSSA, 1999. p.97 – 119. (Special publication, 28).

BOHNEN, H.; MEURER, E.J.; BISSANI, C.A. Solos ácidos e solos afetados por sais. In: MEURER, E.J. (Ed.) **Fundamentos de Química do solo**. 3.ed. Porto Alegre: Genesis, 2006. p.163 – 180.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. 4.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 525p.

BORTOLINI, F. **Análise da diversidade genética e avaliação de características morfofisiológicas associadas à tolerância à seca em diferentes genótipos de trevo branco (*Trifolium repens* L.)**. 2008. 198f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BOSWORTH, S.C.; STRINGER, W.C.; HALL, M.H. et al. **Cutting management of alfafa, red clover, and birdsfoot trefoil**. Disponível em: <<http://cropsoil.psu.edu/extension/facts/agfact7.pdf>>. Acesso em: 10. jan. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

BROCKWELL, J.; PILKA, A.; HOLLIDAY, R.A. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soil of New South Wales. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v.31, n.2, p.211 – 219, 1991.

BRONDANI, C.; BRONDANI, R.P.V.; BORBA, T.C.O. et al. **Utilização de marcadores microssatélites no melhoramento populacional do arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. 32p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos 169)

BROSE, E. Avaliação de rizóbio em cornichão em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.9, p.1237 – 1242, 1992.

CAETANO, J.H.S. **Seleção de alfafa para solos ácidos**. 1998. 121f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

CAMARGO, C.E.O.; OLIVEIRA, O.F. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. **Bragantia**, Campinas, v.40, p.21 – 31, 1981.

CANIATO, F.F.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R.E.; et al. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**,

Berlim, v.114, n.5, p.863 – 876, 2007.

CARVALHO, F.I.F.; LORENCETTI, C.; MARCHIORO, V.S. et al. **Condução de populações no melhoramento genético de plantas**. 2.ed. Pelotas, RS: UFPel Editora Universitária, 2008. 288p.

ČIAMPOROVÁ, M. Morphological and structural responses of plant roots to aluminium at organ, tissue, and cellular levels. **Biologia Plantarum**, Czech Republic. v.45, n.2, p.161 – 171, 2002.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P.B.; HOWELL, S.H.; et al. Aluminum resistance in the arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, n.1, p.19 – 27, 1998.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, n.2, p.315 – 321, 1995.

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; RANDALL, P.J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). II. Aluminum-stimulated excretion of malic acid from root apices. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, n.3, p.695 – 702, 1993.

DIAS, P.M.B.; JULIER, B.; SAMPOUX, J.P. et al. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pretense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. **Euphytica**, Wageningen, v.160, pg.189 – 205, 2008.

ECHART, C.L.; BARBOSA-NETO, J.F.; GARVIN, D.F. et al. Aluminum tolerance in barley: Methods for screening and genetic analysis. **Euphytica**, Wageningen, v.126, p.309 – 313, 2002.

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

ENGLISH, J.T. Diseases of *Lotus*. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.) **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: CSSA, 1999. p.121 – 132. (Special publication, 28).

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília, DF: Embrapa Cenargem, 1998. 220p.

FJELLSTROM, R.G.; BEUSELINCK, P.R.; STEINER, J.J. RFLP marker analysis supports tetrasomic inheritance in *Lotus corniculatus* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, n.5, p.718 – 725, 2001.

FLAJOULOT, S.; RONFORT, J.; BAUDOUIN, P. et al. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.111, p.1420 – 1429, 2005.

FLARESSO, J.A.; SAIBRO, J.C. Influência de regimes de corte e adubação no rendimento de matéria seca, reservas de glicídios não-estruturais e ressemeadura natural de *Lotus corniculatus* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.1, p.181 – 188, 1992.

FORMOSO, F. Manejo de alfalfa para producción de forraje. In: REBUFFO, M.; RISSO, D.F.; RESTAINO, E. (Ed.) **Tecnología en alfalfa**. Montevideo, Uruguay: INIA, 2000. p.53 – 74 (INIA. Boletín de Divulgación, 69).

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, Rockville, v.29, n.1, p.511 – 566, 1978.

FREIRE, J.R.J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E.J.B.N; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.121 – 140.

GALLEGO, F.J.; CALLES, B.; BENITO, C. Molecular markers linked to the aluminium tolerance gene *Alt1* in rye. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.97, p.1104 – 1109, 1998.

GARCIA DE LOS SANTOS, G.; STEINER, J.J.; BEUSELINCK, P.R. Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. genotypes: II. Crossing Ability. **Crop Science**, Madison, v.41, p.564 - 570, 2001.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A.C.; CARVALHO, F.I.F. et al. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.2, p.219 – 228, 2007.

HAUG, A.; FOY, C.F. Molecular aspects of aluminum toxicity. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.1, n.4, p.345 – 373, 1984.

HOEKENGA, O.A.; VISION, T.J.; SHAFF, J.E.; et al. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A Physiologically Simple But Genetically Complex Trait. **Plant Physiology**, Rockville, v.132, n.2, p.936 – 948, 2003.

IZAGUIRRE, P.; BEYHAUT, R. **Las Leguminosas em Uruguay**. Montevideo, Uruguai: Agropecuaria Hemisferio Sur S. R. L., 1998. 549p. (Parte 1 *Papilionoideae*).

JO, J.; YOSHIDA, S.; KAYAMA, R. Growth and nitrogen fixation of some

leguminous forage grown under the acidic soil conditions. **Journal Japan Grassland Science**, v.25, n.4, p.326 – 334, 1980.

JOHNSON, A.C.; WOOD, M. DNA, a possible site of action of aluminum in *Rhizobium* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.12, p.3629 – 3633, 1990.

JONES, D.A.; TURKINGTON, R. Biological flora of the British isles. **The Journal of Ecology**, London, v.74, n.4, p.1185 – 1212, 1986.

KIDD, P.S.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C. et al. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, London, v.52, n.359, p.1339 – 1352, 2001.

KIRKBRIDE JUNIOR, J.H. *Lotus* systematics and distribution. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.) **Trefoil: the science and technology of Lotus**. Madison: CSSA, 1999. p.1 – 20. (Special publication, 28).

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

KOCHIAN, L.V.; PIÑEROS, M.; HOEKENGA, O.A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.274, p.175 – 195, 2005.

KUBIK, C.; SAWKINS, M.; MEYER, W.A. et al. Genetic diversity in seven perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars based on SSR markers. **Crop Science**, Madison, v.41, p.1565 – 1572, 2001.

LARSEN, P.B.; DEGENHARDT, J.; TAI, C.Y. et al. Aluminum-resistant arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.117, p.9 – 18, 1998.

LEISHMAN, M.R.; WRIGHT, I.J.; MOLES, A.T. et al. The evolutionary ecology of seed size. In: FENNER, M. **Seeds: the ecology of regeneration in plant communities**. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000. p.31 – 57.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, p.2453 – 2465, 2002.

MA, F.J.; FURUKAWA, J. Recent progress in the research of external Al detoxification in higher plants: a minireview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.97, p. 46 – 51, 2003.

MA, H.X.; BAI, G.H.; CARVER, B.F. et al. Molecular mapping of a quantitative

trait locus for aluminum tolerance in wheat cultivar Atlas 66. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.112, p.51 – 57, 2005.

MA, J.F.; HIRADATE, S.; NOMOTO, K. et al. Internal detoxification mechanism of Al in Hydrangea. Identification of Al form in the Leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.113, n.4, p.1033 – 1039, 1997a.

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

MA, J.F.; ZHENG, S.J.; LI, X.F. et al. A rapid hydroponic screening for aluminium tolerance in barley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.191, p.133 – 137, 1997b.

MAGALHAES, J.V.; GARVIN, D.F.; WANG, Y. et al. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Austin, v.167, p.1905 – 1914, 2004.

MAGALHÃES, J.V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C.T. et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature genetics**, New York, v.39, n.9, p.1156 – 1161, 2007.

MARTINS, C.E.; ROCHA, W.S.D.; SOUZA SOBRINHO, F. et al. Avaliação de genótipos de alfafa quanto à tolerância ao alumínio em solução. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 31., 2007. Gramado. **Anais...** Porto Alegre: SBCS, 2007. 1 CD-ROM.

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

MENOSSO, O.G.; COSTA, J.A.; ANGHINONI, I. et al. Tolerância de genótipos de soja ao alumínio em solução. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2157 – 2166, 2000.

METZGAR, D.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Research**, New York, v.10, p.72 – 80, 2000.

MILLACH, S.C.K. Marcadores moleculares nos recursos genéticos e no melhoramento de plantas. In: QUEIROZ, M.A.; GOEDERT, C.O.; RAMOS, S.R.R. (Ed.) **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. Brasília: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia, 1999. Disponível em: <<http://www.cpatosa.embrapa.br>>. Acesso em: 20. nov. 2008.

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

MISTRO, J.C.; CAMARGO, C.E.O.; PETTINELLI JÚNIOR, A. Avaliação de genótipos de trigo, de diferentes origens, em relação à toxicidade de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v.60, n.3, p.177 – 184, 2001.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, Gainesville, v.3, n.1, p.175 – 182, 1993.

PAIM, N.R. Research on *Lotus* spp. in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Lotus Newsletter**, Columbia, v.19, p. 37 – 43, 1988.

PAPA, M.F.D.; BALAGUÉ, L.J.; SOWINSKI, S.C. et al. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of Central Argentina and Uruguay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v.65, n. 4, p.1420 – 1427, 1999.

PAPERNIK, L.A.; BETHEA, A.S.; SINGLETON, T.E. Physiological basis of reduced Al tolerance in ditelosomic lines of Chinese Spring wheat. **Planta**, Berlin, v.212, p.829 – 834, 2001.

PARKER, D.R., BERTSCH, P.M. Formation of the “Al13” tridecameric polycation under diverse synthesis conditions. **Environmental Science Technology**, Easton, v.26, p.914 – 921, 1992.

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.

PATERSON, J.A.; BELYEA, R.L.; BOWMAN, J.P. et al. The impact of forage quality and supplementation regimen on ruminant animal intake and performance. In: FAHEY JUNIOR, G.C. (Ed.). **Forage quality, evaluation, and utilization**. Madison: ASA, 1994. p.59-114.

PEREZ, N.B. **Melhoramento genético de leguminosas de clima temperado – alfafa (*Medicago sativa* L) e cornichão (*Lotus corniculatus* L.) – para aptidão ao pastejo**. 2003. 175f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

PRESTES, N. E. **Sobressemeadura do cornichão (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel em pastagem natural: diferimento e adubação**. 1995. 118f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

RAMAN, H.; MORONI, J.S.; SATO, K. et al. Identification of AFLP and microsatellite markers linked with an aluminium tolerance gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.105, p.458 – 464, 2002.

RHEINHEIMER, D.S.; GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J. et al. 2001. **Situação da fertilidade dos solos no Estado do Rio Grande do Sul**. Santa Maria: Departamento de Solos da UFSM, 2001. 41p. (Boletim técnico, 2).

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.

ROCHA, M.G.; QUADROS, F.L.F.; GLIENKE, C.L. et al. Avaliação de espécies forrageiras de inverno na depressão central do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.6, p.1990 – 1999, 2007b.

ROCHA, W.S.D.; MARTINS, C.E.; SOUZA SOBRINHO, F. et al. Tolerância de genótipos de alfafa ao alumínio em solução. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 31., 2007, Gramado. **Anais...** Porto Alegre: SBCS, 2007a. 1 CD-ROM.

RÖDER, M.S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K. et al. A Microsatellite map of wheat. **Genetics**, Pittsburgh, v.149, p.2007 – 2023, 1998.

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

ROHLF, F.J. **NT-SYS pc**. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. New York : Exter Software, 2000.

ROSS, M.D.; JONES, W.T. The origin of *Lotus corniculatus* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.71, p.284 – 288, 1985.

SAMAC, D.A.; TESHAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils – a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v.75, p.189 – 207, 2003.

SANTOS, A.M.; DALL'AGNOL, M.; JANKE, A.; et al. Caracterização de 180 linhas endogâmicas recombinantes do gênero *Lotus* em resposta a presença de alumínio em solução nutritiva. In: REUNIÃO DEL GRUPO TÉCNICO EM FORRAJERAS DEL CONO SUR, 22., 2008, Minas, Uruguai. **Memorias...** Montevideo: Tradinco, 2008c. 1 CD-ROM.

SANTOS, A.M.; DALL'AGNOL, M.; JANKE, A.; et al. Uso de metodologia de curto prazo para avaliação de tolerância ao alumínio tóxico em alfafa. In: REUNIÃO DEL GRUPO TÉCNICO EM FORRAJERAS DEL CONO SUR, 22., 2008, Minas, Uruguai. **Memorias...** Montevideo: Tradinco, 2008b. 1 CD-ROM.

SANTOS, A.M.; DALL'AGNOL, M.; RAMOS, G.P.; et al. Aumento da exudação radicular de ácido oxálico em *Lotus corniculatus* em resposta a presença de alumínio em solução nutritiva. In: REUNIÓN DEL GRUPO TÉCNICO EM FORRAJERAS DEL CONO SUR, 22., 2008, Minas, Uruguai. **Memorias...** Montevideo: Tradinco , 2008a. 1 CD-ROM.

SANTOS, A.M.; DALL'AGNOL, M.; SAWASATO, J.T.; et al. Genótipos de cornichão respondem diferentemente à toxidez por alumínio em solução nutritiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 31., 2007. Gramado. **Anais...** Porto Alegre: SBCS, 2007. 1 CD-ROM.

SARDARO, M.L.S.; ATALLAH, M.; TAKAVOL, E. et al. Diversity for AFLP and SSR in natural populations of *Lotus corniculatus* L. from Italy. **Crop Science**, Madison, v. 48, p.1080 - 1089, 2008.

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

SAWASATO, J.T.; DALL'AGNOL, M.; CONCEIÇÃO, D.P. et al. Utilização de microssatélites e RAPD na caracterização molecular de acessos de *Paspalum urvillei* Steudel. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n.8, p.1366 – 1374, 2008.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; JACQUES, A.V.A.; DALL'AGNOL, M. et al. Disponibilidade e valor nutritivo de forragem de leguminosas nativas (*Adesmia* DC.) e exóticas (*Lotus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.30, n.3, p.975 – 982, 2001 (Suplemento 1).

SCHEFFER-BASSO, S.M.; JACQUES, A.V.A.; DALL'AGNOL, M. Alocação da biomassa e correlações morfofisiológicas em leguminosas forrageiras com hábitos de crescimento contrastantes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.59, n.4, p.629 – 634, 2002.

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

SIVAGURU, M.; HORST, W.J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of maize. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, p.155 – 163, 1998.

SOKOLOFF, D.D.; LOCK, J.M. Loteae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.) **Legumes of the World**. United Kingdom: BATH Press, 2005. p.455 – 466.

SOSTER, M.T.B.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; DALL'AGNOL, M. et al. Caracterização agrônômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.).

Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.33, n.6, p.1662 – 1671, 2004 (Suplemento 1).

SOUSA, D.M.G.; MIRANDA, L.N.; OLIVEIRA, S.A. Acidez do solo e sua correção. In: FERTILIDADE do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.205-274.

SOUZA, L.A.C. Reação de genótipos de soja ao alumínio em hidroponia e no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.10, p.1255 – 1260, 2001.

STEINER, J.J. Birdsfoot trefoil origins and germplasm diversity. In: BEUSELINCK, P.R. (Ed.) **Trefoil: the science and technology of *Lotus***. Madison: CSSA, 1999. p.81 – 96. (Special publication, 28).

STEINER, J.J.; GARCIA DE LOS SANTOS, G. Adaptive ecology of *Lotus corniculatus* L. genotypes: I. Plant morphology and RAPD marker characterizations. **Crop Science**, Madison, v. 41, p.552 - 563, 2001.

TANKSLEY, S.D.; McCOUCH, S.R. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. **Science**, Washington, v.277, p. 1063 – 1066, 1997.

TEDESCO, M.J.; BISSANI, C.A. Acidez do solo e seus efeitos nas plantas. In: BISSANI, C.A. et al (Ed.) **Fertilidade dos solos e manejo da adubação de culturas**. Porto Alegre: Genesis, 2004. p.75-92.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, New York, v.10, n.7, p. 967 – 981, 2000.

VOIGT, P.W.; MORRIS, D.R.; GODWIN, H.W. A soil-on-agar method to evaluate acid-soil resistance in white clover. **Crop Science**, Madison, v. 37, p.1493 - 1496, 1997.

VOIGT, P.W.; MOSJIDIS, J.A. Acid-soil resistance of forage legumes as assessed by a soil-on-agar method. **Crop Science**, Madison, v. 42, p.1631 - 1639, 2002.

VOIGT, P.W.; STALEY, T.E. Selection for aluminum and acid-soil resistance in white clover. **Crop Science**, Madison, v. 44, p.38 - 48, 2004.

VON UEXKULL, H.R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. **Plant and Soil**, Netherlands, v.171, p.1 - 15, 1995.

WAGHORN, G.C.; SHELTON, I.D.; Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on the nutritive value of pasture for sheep. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.128, p.365 – 372, 1997.

WANG, M.L.; CHEN, Z.B.; BARKLEY, N.A. et al. Characterization of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz) germplasm by transferred SSRs from wheat, maize and sorghum. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.53, p.779 – 791, 2006.

WATKIN, E.L.J.; O'HARA, G.W.; HOWIESON, J.G. et al. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.32, p.1393 – 1403, 2000.

WENZL. P.; ARANGO, A.; CHAVES, A.C. et al. A greenhouse method to screen brachiariagrass genotypes for aluminum resistance and root vigor. **Crop Science**, Madison, v. 46, p.968 - 973, 2006.

WIETHÖLTER, S. **Calagem no Brasil**. 1.ed. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 104p. (Embrapa Trigo. Documentos 22).

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**, Rockville, v.117, n.3, p.745 – 751, 1998.

7. APÊNDICES

Apêndice 1. Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| ALF | 0 | 1 | 2,2 | 2,7 | 0,5 |
| ALF | 0 | 2 | 2,4 | 2,9 | 0,5 |
| ALF | 0 | 3 | 2,2 | 2,6 | 0,4 |
| ALF | 0 | 4 | | | |
| ALF | 0 | 5 | 3 | 3,5 | 0,5 |
| ALF | 0 | 6 | 2 | 2,4 | 0,4 |
| ALF | 0 | 7 | 2,4 | 3 | 0,6 |
| ALF | 0 | 8 | 2,5 | 3 | 0,5 |
| ALF | 0 | 9 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| ALF | 0 | 10 | 3 | 3,5 | 0,5 |
| ALF | 0 | 11 | 2,3 | 2,9 | 0,6 |
| ALF | 0 | 12 | 2,1 | 2,7 | 0,6 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 3,2 | 3,5 | 0,3 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,4 | 2,6 | 0,2 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 1,9 | 2 | 0,1 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 3 | 3,3 | 0,3 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,7 | 3 | 0,3 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 1,7 | 1,8 | 0,1 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| ALF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | | | |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | | | |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,1 | 2,2 | 0,1 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,7 | 2,9 | 0,2 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|-----------------|---|------------|-----------|-----------|-----------|
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 3,4 | 3,6 | 0,2 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,4 | 2,5 | 0,1 |
| ALF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,8 | 3 | 0,2 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | | | |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,1 | 2,2 | 0,1 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,4 | 2,5 | 0,1 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,3 | 2,4 | 0,1 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,3 | 2,4 | 0,1 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | | | |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,1 | 2,2 | 0,1 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| ALF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,7 | 2,8 | 0,1 |
| DR | 0 | 1 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| DR | 0 | 2 | 2 | 2,4 | 0,4 |
| DR | 0 | 3 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| DR | 0 | 4 | 1,9 | 2,2 | 0,3 |
| DR | 0 | 5 | | | |
| DR | 0 | 6 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| DR | 0 | 7 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| DR | 0 | 8 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| DR | 0 | 9 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR | 0 | 10 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| DR | 0 | 11 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| DR | 0 | 12 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,8 | 2 | 0,2 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 1,9 | 2,2 | 0,3 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 1,3 | 1,5 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,7 | 2,9 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| DR | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 1,7 | 1,8 | 0,1 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,4 | 2,6 | 0,2 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,4 | 2,5 | 0,1 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,3 | 2,4 | 0,1 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 1,9 | 2 | 0,1 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| DR | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,1 | 2,2 | 0,1 |
| DR-F1 | 0 | 1 | 2,4 | 2,8 | 0,4 |
| DR-F1 | 0 | 2 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| DR-F1 | 0 | 3 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR-F1 | 0 | 4 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| DR-F1 | 0 | 5 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| DR-F1 | 0 | 6 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| DR-F1 | 0 | 7 | 1,9 | 2,2 | 0,3 |
| DR-F1 | 0 | 8 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| DR-F1 | 0 | 9 | 1,9 | 2,2 | 0,3 |
| DR-F1 | 0 | 10 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR-F1 | 0 | 11 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| DR-F1 | 0 | 12 | 1,7 | 2 | 0,3 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 1,9 | 2,2 | 0,3 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 1,4 | 1,5 | 0,1 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 3,1 | 3,5 | 0,4 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| DR-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 1,9 | 2 | 0,1 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | | | |
| DR-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 3 | 3,3 | 0,3 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,7 | 1,8 | 0,1 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 1,9 | 2 | 0,1 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,3 | 2,4 | 0,1 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,4 | 2,6 | 0,2 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,5 | 2,6 | 0,1 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| DR-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR-F2 | 0 | 1 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR-F2 | 0 | 2 | 2,8 | 3,2 | 0,4 |
| DR-F2 | 0 | 3 | 2,5 | 2,9 | 0,4 |
| DR-F2 | 0 | 4 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F2 | 0 | 5 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F2 | 0 | 6 | 1,6 | 1,8 | 0,2 |
| DR-F2 | 0 | 7 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR-F2 | 0 | 8 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| DR-F2 | 0 | 9 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| DR-F2 | 0 | 10 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| DR-F2 | 0 | 11 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| DR-F2 | 0 | 12 | 2 | 2,3 | 0,3 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|-----------------|---|------------|-----------|-----------|-----------|
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 3 | 3,2 | 0,2 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,4 | 2,8 | 0,4 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| DR-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | | | |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,7 | 2,9 | 0,2 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| DR-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,6 | 2,9 | 0,3 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 1,7 | 1,8 | 0,1 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,4 | 2,6 | 0,2 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,4 | 2,5 | 0,1 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 3 | 3,2 | 0,2 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,3 | 2,4 | 0,1 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| DR-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| SG | 0 | 1 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| SG | 0 | 2 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| SG | 0 | 3 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| SG | 0 | 4 | 1,9 | 2,2 | 0,3 |
| SG | 0 | 5 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| SG | 0 | 6 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| SG | 0 | 7 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| SG | 0 | 8 | 2,4 | 2,8 | 0,4 |
| SG | 0 | 9 | 2,6 | 3 | 0,4 |
| SG | 0 | 10 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| SG | 0 | 11 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| SG | 0 | 12 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,6 | 2,9 | 0,3 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 1,3 | 1,5 | 0,2 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 1,9 | 2,4 | 0,5 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 1,9 | 2,3 | 0,4 |
| SG | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2 | 2,2 | 0,2 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 1,6 | 1,7 | 0,1 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 1,9 | 2 | 0,1 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,7 | 2,9 | 0,2 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,7 | 3 | 0,3 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| SG | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,4 | 2,5 | 0,1 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | | | |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,1 | 2,2 | 0,1 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 1,9 | 2 | 0,1 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,4 | 2,6 | 0,2 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,3 | 2,4 | 0,1 |
| SG | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| SG-F1 | 0 | 1 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG-F1 | 0 | 2 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG-F1 | 0 | 3 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| SG-F1 | 0 | 4 | 2,5 | 3 | 0,5 |
| SG-F1 | 0 | 5 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| SG-F1 | 0 | 6 | 1,7 | 1,8 | 0,1 |
| SG-F1 | 0 | 7 | 2,7 | 3,1 | 0,4 |
| SG-F1 | 0 | 8 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| SG-F1 | 0 | 9 | 2 | 2,4 | 0,4 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| SG-F1 | 0 | 10 | 2,4 | 2,9 | 0,5 |
| SG-F1 | 0 | 11 | 2 | 2,4 | 0,4 |
| SG-F1 | 0 | 12 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2 | 2,4 | 0,4 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,2 | 2,6 | 0,4 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 1,7 | 2 | 0,3 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| SG-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,5 | 2,8 | 0,3 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,4 | 2,8 | 0,4 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,6 | 2,9 | 0,3 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,7 | 3,1 | 0,4 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,5 | 2,8 | 0,3 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,4 | 2,5 | 0,1 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,3 | 2,4 | 0,1 |
| SG-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,4 | 2,6 | 0,2 |
| SG-F2 | 0 | 1 | 1,5 | 1,7 | 0,2 |
| SG-F2 | 0 | 2 | 2,6 | 3 | 0,4 |
| SG-F2 | 0 | 3 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| SG-F2 | 0 | 4 | 1,7 | 2 | 0,3 |
| SG-F2 | 0 | 5 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| SG-F2 | 0 | 6 | 1,5 | 1,8 | 0,3 |
| SG-F2 | 0 | 7 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| SG-F2 | 0 | 8 | 3 | 3,4 | 0,4 |
| SG-F2 | 0 | 9 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| SG-F2 | 0 | 10 | 2,8 | 3,2 | 0,4 |
| SG-F2 | 0 | 11 | 1,6 | 2 | 0,4 |
| SG-F2 | 0 | 12 | 2,5 | 3 | 0,5 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,4 | 2,8 | 0,4 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,9 | 3,2 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,7 | 3 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| SG-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,5 | 2,9 | 0,4 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,8 | 3,2 | 0,4 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,7 | 3 | 0,3 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| SG-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,6 | 2,9 | 0,3 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| SG-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| UF | 0 | 1 | 2,2 | 2,6 | 0,4 |
| UF | 0 | 2 | | | |
| UF | 0 | 3 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| UF | 0 | 4 | 2,5 | 3,1 | 0,6 |
| UF | 0 | 5 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| UF | 0 | 6 | 2,2 | 2,6 | 0,4 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| UF | 0 | 7 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| UF | 0 | 8 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| UF | 0 | 9 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| UF | 0 | 10 | 2,2 | 2,6 | 0,4 |
| UF | 0 | 11 | 2,4 | 2,8 | 0,4 |
| UF | 0 | 12 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,6 | 3 | 0,4 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,6 | 2,9 | 0,3 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,6 | 3 | 0,4 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 1,8 | 2,1 | 0,3 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 1,6 | 1,8 | 0,2 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 1,9 | 2,2 | 0,3 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| UF | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 1,9 | 2,1 | 0,2 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| UF | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 1,9 | 2 | 0,1 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,3 | 2,4 | 0,1 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,4 | 2,7 | 0,3 |
| UF | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| UF-F1 | 0 | 1 | 2 | 2,4 | 0,4 |
| UF-F1 | 0 | 2 | 2,4 | 2,8 | 0,4 |
| UF-F1 | 0 | 3 | 2,6 | 3 | 0,4 |
| UF-F1 | 0 | 4 | 3,1 | 3,6 | 0,5 |
| UF-F1 | 0 | 5 | 2,9 | 3,2 | 0,3 |
| UF-F1 | 0 | 6 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| UF-F1 | 0 | 7 | 2,8 | 3,3 | 0,5 |
| UF-F1 | 0 | 8 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| UF-F1 | 0 | 9 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| UF-F1 | 0 | 10 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| UF-F1 | 0 | 11 | 1,6 | 1,8 | 0,2 |
| UF-F1 | 0 | 12 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,2 | 2,7 | 0,5 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,8 | 3,1 | 0,3 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,7 | 3 | 0,3 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,4 | 2,9 | 0,5 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,6 | 3 | 0,4 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,4 | 2,8 | 0,4 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,7 | 2,9 | 0,2 |
| UF-F1 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 1,7 | 1,9 | 0,2 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,7 | 2,9 | 0,2 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,5 | 3 | 0,5 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 3 | 3,3 | 0,3 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,7 | 3 | 0,3 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 3,1 | 3,5 | 0,4 |
| UF-F1 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,2 | 2,3 | 0,1 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,6 | 2,8 | 0,2 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,6 | 2,7 | 0,1 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,8 | 3 | 0,2 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,7 | 2,9 | 0,2 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,8 | 3,1 | 0,3 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,6 | 2,8 | 0,2 |
| UF-F1 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 1,8 | 1,9 | 0,1 |
| UF-F2 | 0 | 1 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| UF-F2 | 0 | 2 | 1,6 | 1,9 | 0,3 |
| UF-F2 | 0 | 3 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|----------|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| UF-F2 | 0 | 4 | 1,8 | 2 | 0,2 |
| UF-F2 | 0 | 5 | 2,7 | 3,3 | 0,6 |
| UF-F2 | 0 | 6 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| UF-F2 | 0 | 7 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| UF-F2 | 0 | 8 | 2,8 | 3,2 | 0,4 |
| UF-F2 | 0 | 9 | 2,5 | 2,9 | 0,4 |
| UF-F2 | 0 | 10 | 2,3 | 2,7 | 0,4 |
| UF-F2 | 0 | 11 | 1,7 | 2 | 0,3 |
| UF-F2 | 0 | 12 | 3 | 3,4 | 0,4 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,3 | 2,6 | 0,3 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,9 | 3,2 | 0,3 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,7 | 3,1 | 0,4 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2,9 | 3,4 | 0,5 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,9 | 3,2 | 0,3 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,1 | 2,4 | 0,3 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| UF-F2 | 50 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,1 | 2,5 | 0,4 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,1 | 2,3 | 0,2 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,4 | 2,6 | 0,2 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2,5 | 2,9 | 0,4 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 1,9 | 2,2 | 0,3 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,7 | 3 | 0,3 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 2 | 2,3 | 0,3 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,7 | 3 | 0,3 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,8 | 3,3 | 0,5 |

Apêndice 1. Continuação... Valores obtidos nas variáveis observadas durante a avaliação da tolerância ao alumínio dos genótipos de cornichão (Janeiro/2009).

| GENÓTIPO | TRAT ($\mu\text{mol/L AlCl}_3$) | REP | CI | CF | CR |
|-----------------|---|------------|-----------|-----------|-----------|
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| UF-F2 | 100 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2,6 | 2,9 | 0,3 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 1 | 2,2 | 2,5 | 0,3 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 2 | 2,2 | 2,4 | 0,2 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 3 | 2 | 2,2 | 0,2 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 4 | 2,1 | 2,2 | 0,1 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 5 | 2,6 | 2,9 | 0,3 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 6 | 1,9 | 2 | 0,1 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 7 | 3,3 | 3,6 | 0,3 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 8 | 2 | 2,1 | 0,1 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 9 | 2,8 | 3 | 0,2 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 10 | 2,5 | 2,7 | 0,2 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 11 | 2,3 | 2,5 | 0,2 |
| UF-F2 | 150 $\mu\text{mol/L}$ | 12 | 2 | 2,2 | 0,2 |

Apêndice 2. Resumo da análise de variância referente ao comprimento radicular inicial dos genótipos de cornichão.

Variável dependente: comprimento radicular inicial (CI)

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|-----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 39 | 6.87232495 | 0.17621346 | 1.66 | 0.0091 |
| Error | 430 | 45.63790909 | 0.10613467 | | |
| Corrected Total | 469 | 52.51023404 | | | |

| | | | |
|----------|-----------|----------|----------|
| R-Square | Coeff Var | Root MSE | CI Mean |
| 0.130876 | 14.88462 | 0.325783 | 2.188723 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----------|-------------------|-------------------|-------------|---------------------|
| Genótipo | 9 | 5.44166167 | 0.60462907 | 5.70 | <.0001 ** |
| Nível | 3 | 0.28424715 | 0.09474905 | 0.89 | 0.4448 |
| Genótipo*Nível | 27 | 1.09595526 | 0.04059094 | 0.38 | 0.9982 |

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for Genótipo*Nível as an Error Term

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Genótipo | 9 | 5.44166167 | 0.60462907 | 14.90 | <.0001 |
| Nível | 3 | 0.28424715 | 0.09474905 | 2.33 | 0.0963 |

Duncan's Multiple Range Test for CI
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 430
 Error Mean Square 0.106135
 Harmonic Mean of Cell Sizes 46.9545

| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Critical Range | .1322 | .1391 | .1438 | .1472 | .1499 | .1521 | .1539 | .1555 | .1569 |

| Duncan Grouping | Mean | N | Genótipo |
|-----------------|---------|----|----------|
| A | 2.34651 | 43 | ALF |
| A | 2.33958 | 48 | UF-F1 |
| A | 2.33333 | 48 | UF-F2 |
| B | 2.20000 | 48 | SG-F2 |
| B | 2.17917 | 48 | SG-F1 |
| C B | 2.14043 | 47 | DR-F2 |
| C B | 2.12340 | 47 | UF |
| C B | 2.11277 | 47 | DR-F1 |
| C B | 2.10000 | 47 | SG |
| C | 2.01915 | 47 | DR |

Duncan's Multiple Range Test for CI
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 430
 Error Mean Square 0.106135
 Harmonic Mean of Cell Sizes 117.4811

| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|--------|--------|--------|
| Critical Range | .08355 | .08796 | .09090 |

| Duncan Grouping | Mean | N | Nível |
|-----------------|---------|-----|-------|
| A | 2.21810 | 116 | 100 |
| A | 2.20427 | 117 | 150 |
| A | 2.17750 | 120 | 50 |
| A | 2.15556 | 117 | 0 |

Apêndice 3. Resumo da análise de variância referente ao comprimento radicular final dos genótipos de cornichão.

Variável dependente: comprimento radicular final (CF)

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|-----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 39 | 10.99024790 | 0.28180123 | 2.04 | 0.0004 |
| Error | 430 | 59.45156061 | 0.13825944 | | |
| Corrected Total | 469 | 70.44180851 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | CF Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.156019 | 15.24303 | 0.371833 | 2.439362 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|----------|-------------------|-------------------|-------------|--------------------|
| Genótipo | 9 | 7.66423664 | 0.85158185 | 6.16 | <.0001** |
| Nível | 3 | 1.19519929 | 0.39839976 | 2.88 | 0.0356* |
| Genótipo*Nível | 27 | 2.05876557 | 0.07625058 | 0.55 | 0.9686 |

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for Genótipo*Nível as an Error Term

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Genótipo | 9 | 7.66423664 | 0.85158185 | 11.17 | <.0001 |
| Nível | 3 | 1.19519929 | 0.39839976 | 5.22 | 0.0056 |

Duncan's Multiple Range Test for CF
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 430
 Error Mean Square 0.138259
 Harmonic Mean of Cell Sizes 46.9545

| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Critical Range | .1508 | .1588 | .1641 | .1680 | .1711 | .1736 | .1757 | .1775 | .1790 |

| Duncan Grouping | Mean | N | Genótipo |
|-----------------|---------|----|----------|
| A | 2.63125 | 48 | UF-F2 |
| B A | 2.60625 | 48 | UF-F1 |
| B A | 2.59535 | 43 | ALF |
| B A C | 2.47708 | 48 | SG-F2 |
| B C | 2.44583 | 48 | SG-F1 |
| D C | 2.37872 | 47 | UF |
| D C | 2.36170 | 47 | DR-F2 |
| D C | 2.34468 | 47 | SG |
| D C | 2.33191 | 47 | DR-F1 |
| D | 2.22553 | 47 | DR |

Duncan's Multiple Range Test for CF
 Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 430
 Error Mean Square 0.138259
 Harmonic Mean of Cell Sizes 117.4811

| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Critical Range | .0954 | .1004 | .1038 |

| Duncan Grouping | Mean | N | Nível |
|-----------------|---------|-----|-------|
| A | 2.49231 | 117 | 0 |
| B A | 2.45500 | 120 | 50 |
| B A | 2.45345 | 116 | 100 |
| B | 2.35641 | 117 | 150 |

Apêndice 4. Resumo da análise de variância referente ao crescimento radicular dos genótipos de cornichão.

Variável dependente: crescimento radicular (CR)

| Source | DF | Sum of Squares | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------|-----|----------------|-------------|---------|--------|
| Model | 39 | 2.96234598 | 0.07595759 | 12.15 | <.0001 |
| Error | 431 | 2.69489394 | 0.00625265 | | |
| Corrected Total | 470 | 5.65723992 | | | |

| R-Square | Coeff Var | Root MSE | CR Mean |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0.523638 | 31.53575 | 0.079074 | 0.250743 |

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|-----------------------|----------|-------------------|-------------------|-------------|--------------------|
| Genótipo | 9 | 0.36163594 | 0.04018177 | 6.43 | <.0001 |
| Nível | 3 | 2.13175313 | 0.71058438 | 113.65 | <.0001 |
| Genótipo*Nível | 7 | 0.48273229 | 0.01787897 | 2.86 | <.0001** |

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for Genótipo*Nível as an Error Term

| Source | DF | Type III SS | Mean Square | F Value | Pr > F |
|----------|----|-------------|-------------|---------|--------|
| Genótipo | 9 | 0.36163594 | 0.04018177 | 2.25 | 0.0502 |
| Nível | 3 | 2.13175313 | 0.71058438 | 39.74 | <.0001 |

Duncan's Multiple Range Test for CR

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 431 |
| Error Mean Square | 0.006253 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 47.07132 |

| Number of Means | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Critical Range | .03204 | .03373 | .03486 | .03569 | .03634 | .03688 | .03732 | .03770 | .03803 |

| Duncan Grouping | Mean | N | Genotipo |
|-----------------|---------|----|----------|
| A | 0.29792 | 48 | UF-F2 |
| B A | 0.27708 | 48 | SG-F2 |
| B A | 0.26667 | 48 | UF-F1 |
| B A | 0.26667 | 48 | SG-F1 |
| B C | 0.25532 | 47 | UF |
| B C | 0.25455 | 44 | ALF |
| B C D | 0.24468 | 47 | SG |
| E C D | 0.22128 | 47 | DR-F2 |
| E D | 0.21915 | 47 | DR-F1 |
| E | 0.20213 | 47 | DR |

Duncan's Multiple Range Test for DC

| | |
|-----------------------------|----------|
| Alpha | 0.05 |
| Error Degrees of Freedom | 431 |
| Error Mean Square | 0.006253 |
| Harmonic Mean of Cell Sizes | 117.7315 |

| Number of Means | 2 | 3 | 4 |
|-----------------|--------|--------|--------|
| Critical Range | .02026 | .02133 | .02204 |

Means with the same letter are not significantly different.

| Duncan Grouping | Mean | N | Nível |
|-----------------|---------|-----|-------|
| A | 0.33644 | 118 | 0 |
| B | 0.27750 | 120 | 50 |
| C | 0.23534 | 116 | 100 |
| D | 0.15214 | 117 | 150 |

8. VITA

Aline Janke, filha de Rubert Janke e Nair Janke, nasceu em dois de abril de 1982 no município de Esteio – RS. Concluiu o ensino fundamental na Escola Municipal Arthur Pereira de Vargas e o ensino médio no Centro Educacional La Salle, ambos em Canoas – RS.

Ingressou na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2001, graduando-se como Engenheira Agrônoma em 2006. Neste período, atuou como bolsista de iniciação científica nas áreas de fitotecnia, agrometeorologia e produção e tecnologia de sementes.

Em março de 2007, iniciou o Mestrado em Zootecnia, Área de Concentração Plantas Forrageiras, no Programa de Pós-graduação da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.