

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

VARIABILIDADE GENÉTICA DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM CEVADA
(*Hordeum vulgare* L.)

Jéssica Rosset Ferreira
Bióloga/UPF

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Ferreira, Jéssica Rosset
Variabilidade genética da tolerância ao alumínio em
cevada (*Hordeum vulgare* L.) / Jéssica Rosset
Ferreira. -- 2015.
x, 106 f.

Orientadora: Carla Andréa Delatorre.
Coorientador: Jorge Fernando Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2015.

1. HvAACT1. 2. fenotipagem em hidroponia. 3.
fenotipagem em solo. 4. marcadores microssatélites.
5. diversidade genética. I. Delatorre, Carla Andréa,
orient. II. Pereira, Jorge Fernando, coorient. III.
Título.

JÉSSICA ROSSET FERREIRA

Bióloga - UPF

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 24.02.2015
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 23.04.2015
Por

CARLA ANDRÉA DELATORRE
Orientadora - PPG Fitotecnia

GILMAR ARDUINO BETTIO MARODIN
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

JORGE FERNANDO PEREIRA
Coorientador - EMBRAPA Trigo

ITAMAR CRISTIANO NAVA
PPG Fitotecnia

RAFAEL AUGUSTO ARENHART
Pós-doutorando - Departamento
de Genética/UFRGS

EUCLYDES MINELLA
EMBRAPA Trigo
Passo Fundo/RS

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

Dedico

Aos meus pais e meu irmão que não mediram esforços para tornar meus sonhos em realidade.

Aos meus primos, Cristiano e Luana (*in memoriam*), por me ensinarem a valorizar cada conquista.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós Graduação em Fitotecnia pela oportunidade de realizar o mestrado e aos funcionários que fizeram parte dessa trajetória.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos. À Ambev, Agrária e CNPT/Embrapa que possibilitaram a realização desta pesquisa.

A minha orientadora, Carla Andréa Delatorre, que tem muitos méritos nesta conquista. Agradeço de forma especial pela confiança, orientação, troca de experiências e principalmente pela amizade e cuidado maternal.

Ao meu coorientador, Jorge Fernando Pereira, que acreditou no meu potencial e confiou a mim o desenvolvimento deste projeto, agradeço pelo apoio, conselhos, ajuda e pela amizade que levarei sempre comigo.

Ao pesquisador Euclides Minella, pelas contribuições, ensinamentos, profissionalismo e por permitir que eu fizesse parte na história da coleção nuclear de cevada do CNPT/Embrapa.

Ao Luciano Consoli, que me apresentou o apaixonante mundo da biologia molecular, agradeço por todos os ensinamentos, amizade e discussões.

Aos professores do Departamento de Plantas de Lavoura, em especial ao Itamar C. Nava e ao Marcelo Pacheco, pelos ensinamentos e contribuições.

Ao Luís Fernando Revers e a Vanessa Buffon, por realizarem parte das análises de sequenciamento.

Aos colegas do Departamento de Plantas de Lavoura pela troca de conhecimento. Em especial minhas amigas Carolina, Nicole, Sibila, Gabriele e Ana Paula e ao amigo Francisco, por compartilhar as alegrias, conquistas e também o azar e desesperos.

As queridas Andriele e Yohanna, que sempre foram muito especiais, agradeço pela amizade, risadas, companheirismo e por me dar abrigo.

A Barbara Bremm, Helen Lazzari Estima e ao Guilherme Fraga pelo auxílio na execução e coleta dos dados da hidroponia.

A Monique, irmã que o destino me deu, por não só dividir o apartamento e as contas, mas também as risadas, conquistas e dificuldades. Agradeço principalmente por ser a minha fonte de força em Porto Alegre.

A Cristiane, pela amizade, conselhos e momentos de descontração.

Aos amigos que sempre se fizeram presentes. Em especial ao Grégori, a Márcia e a Sammara, aos quais a distância não foi um obstáculo, agradeço pelo apoio e por escutarem durante horas as minhas aflições, reclamações e alegrias.

Ao querido Leonardo, que sempre me incentivou a continuar a jornada acadêmica e é um dos meus exemplos de dedicação e de profissionalismo. Agradeço pelo companheirismo, pelo carinho e por tornar esta caminhada muito mais doce e leve.

Aos meus familiares, em especial ao meu avô Genésio e minhas avós Florinda e Zule, por compreenderem que a distância foi necessária para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Dalmir e Geneci, que são meus alicerces, por todo amor, educação, esforço e incentivo que foram fundamentais na conclusão de mais esta etapa. Ao meu irmão Henrique, que sempre demonstrou seu amor de uma forma muito especial, agradeço pela ajuda, pela companhia nas madrugadas de estudo e por tornar meus dias mais alegres.

A Deus, luz, força e guia desta caminhada.

VARIABILIDADE GENÉTICA DA TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM CEVADA (*Hordeum vulgare* L.)¹

Autora: Jéssica Rosset Ferreira
Orientadora: Carla Andréa Delatorre
Coorientador: Jorge Fernando Pereira

RESUMO

O Brasil é um importante importador de cevada sendo este cereal um dos mais sensíveis ao alumínio tóxico (Al^{3+}) dentre as gramíneas. O Al^{3+} inibe o crescimento radicular levando à redução na absorção de água e nutrientes. O gene *HvAACT1* codifica um transportador de citrato responsável pela tolerância em cevada. Existe pouca informação sobre a diversidade genética de cevada brasileira e sobre sua variabilidade quanto a tolerância ao Al^{3+} . Assim, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a variabilidade genotípica e fenotípica da tolerância ao Al^{3+} em genótipos de cevada cultivada e silvestre, analisar a região transcrita do gene *HvAACT1* e a diversidade genética de cevada brasileira. Em hidroponia foram fenotipados 65 genótipos (59 de cevada cultivada e seis de silvestre). Com base nestes dados, 22 genótipos foram selecionados para fenotipagem de curta duração em solo. Os genótipos cultivados no Brasil, Antártica 01 e MN 6021, foram utilizados como controles de tolerância e sensibilidade, respectivamente. Tolerância superior a Antártica 01 foi encontrada em seis genótipos, e apenas um foi inferior a MN 6021. O genótipo Golden Promise, reconhecido como sensível, foi classificado como tolerante em hidroponia e intermediário em solo. Dentre os genótipos avaliados em solo, Dayton e Murasakimochi superaram Antártica 01, e a linhagem transgênica L5 apresentou o melhor desempenho. Foi observada correlação de 52% entre as avaliações de hidroponia e solo. O sequenciamento do gene *HvAACT1* nos genótipos Antártica-01 e FM404, tolerantes, e MN 6021 e Paraí-I, sensíveis, revelou alta similaridade da região transcrita. O marcador 21-indel não apresentou associação com a tolerância em hidroponia, entretanto, em solo houve associação. Uma inserção de 1 kb no promotor de *HvAACT1*, associada à tolerância, foi observada apenas nos genótipos Dayton e Murasakimochi, que foram mais tolerantes que Antártica-01 em solo e hidroponia. A tolerância ao Al^{3+} nos genótipos brasileiros não está associada a nenhum dos marcadores analisados. Em relação à variabilidade genética, o conteúdo de informação polimórfica dos materiais brasileiros foi menor quando comparados aos materiais estrangeiros e aos genótipos silvestres. Em geral, a menor diversidade dos materiais brasileiros pode ser explicada pelo uso de ancestrais comuns. O cromossomo 4H, onde reside o gene *HvAACT1*, apresentou o menor polimorfismo juntamente com o cromossomo 6. A incorporação do alelo contendo a inserção de 1 kb no promotor do gene *HvAACT1*, bem como a utilização da linhagem transgênica L5, podem ser alternativas para melhorar o desempenho de cevada brasileira em solo ácido. Os programas de melhoramento de cevada no Brasil devem considerar o uso de materiais mais diversos no sentido de aumentar a tolerância de cevada e, eventualmente, rendimento.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (107p.) Fevereiro, 2015.

GENETIC VARIABILITY OF ALUMINUM TOLERANCE IN BARLEY (*Hordeum vulgare* L.)²

Author: Jéssica Rosset Ferreira
Adviser: Carla Andréa Delatorre
Co-adviser: Jorge Fernando Pereira

ABSTRACT

Brazil is an important barley importer being that cereal one of the most sensitives to toxic aluminium (Al^{3+}) among grasses. The Al^{3+} inhibits root growth, which can lead to reduced uptake of water and nutrients. The *HvAACT1* gene encodes a citrate transporter responsible for Al^{3+} tolerance in barley. There is little information about the genetic diversity in Brazilian barley and about its variability regarding Al^{3+} tolerance. In this context, the objectives of this study were to characterize the Al^{3+} tolerance and the genetic variability of cultivated and wild genotypes from the Embrapa Wheat barley core collection, to analyze the transcribed region of the *HvAACT1* gene and genetic diversity in Brazilian barley. Phenotyping was performed in hydroponics for 65 genotypes (59 cultivated and six wild genotypes). Based on the hydroponics data, 22 genotypes were selected for short-term soil experiment. The genotypes grown in Brazil, Antarctica 01 and MN 6021, were used as tolerant and sensitive controls, respectively. Tolerance higher than Antarctica 01 was found in six genotypes and only one showed higher sensitivity than MN 6021. The genotype Golden Promise, worldwide recognized as sensitive, was classified as tolerant in hydroponics and intermediate in soil. In soil, Dayton and Murasakimochi surpassed Antarctica 01, and the transgenic line, L5, presented the best performance. A 52% correlation was obtained between the hydroponics and soil data. The structural region of the *HvAACT1* gene was highly similar between the genotypes Antarctica 01 and FM404, tolerant, and MN 6021 e Paraí-I, sensitive. The 21-indel marker could not be associated with tolerance based on the hydroponics data, however, in soil, a correlation was detected. The 1 kb insertion in the *HvAACT1* promoter region, which is associated with tolerance, was identified only in Dayton and Murasakimochi, which performed better than Antarctica01 in soil and hydroponics. The variability in Al^{3+} tolerance among Brazilian genotypes is not associated with the analyzed markers. About the genetic variability, the polymorphic information content among Brazilian genotypes was lower in comparison to the foreign and wild accessions. In general, the lower diversity in Brazilian barley can be explained by the use of common ancestors. Chromosome 4, where the *HvAACT1* gene is located, presented the lowest polymorphism together with chromosome 6. The incorporation of the allele containing the 1 kb insertion in the *HvAACT1* promoter region as well as the utilization of the transgenic line L5 could be alternatives to improve the performance of Brazilian barley in acidic soil. The barley breeding programs in Brazil should consider the use of more diverse materials in order to increase the barley tolerance to stresses and, eventually yield.

² Master of Science in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (107p.) February, 2015.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hipótese.....	3
1.2 Objetivo geral.....	3
1.3 Objetivos específicos.....	3
2 CAPÍTULO I.....	4
O cultivo da cevada.....	5
Solos ácidos e o alumínio tóxico.....	8
Efeitos do alumínio tóxico e mecanismos de tolerância.....	10
Genética da tolerância ao alumínio em cevada.....	12
Marcadores moleculares.....	14
Referências.....	16
3 CAPÍTULO II.....	21
Resumo.....	22
Introdução.....	24
Resultados.....	37
Discussão.....	48
Material Suplementar.....	56
Referências.....	69
4 CAPÍTULO III.....	73
Introduction.....	76
Materials and methods.....	78
Results.....	85
Discussion.....	93
Supplementary Material.....	99
References.....	101
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	105
6 VITA.....	106

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
3.1. Classificação quanto à tolerância ao alumínio e origem dos genótipos de cevada avaliados.....	28
3.2 Média e amplitude do comprimento da maior raiz dos genótipos de cevada avaliados.....	41
4.1 Barley genotypes used in this study.....	79
4.2 Groups of genotypes separated accordingly to institution, country and barley type.....	83
4.3 Repeated motif, number of alleles, allele size range and polymorphism information content (PIC) of the 34 SSR markers used in this study.....	87
S4.1 Characteristics of the SSR markers used in this study.....	99
S4.2 Private alleles detected represented accordingly to institution, country, barley type and marker.....	100

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
3.1. Crescimento relativo da raiz em genótipos de cevada submetidos ao alumínio em hidroponia.....	39
3.2. Crescimento relativo da raiz de genótipos de cevada submetidos ao alumínio em experimento de curta duração em solo.....	44
3.3. Produtos de amplificação dos marcadores moleculares ligados ao gene <i>HvAACT1</i>	45
S3.1 Laudo da análise química dos solos utilizados neste estudo.....	56
S3.2 Imagens das plantas avaliadas no teste de curta duração em solo.....	58
S3.3 Estratégia de sequenciamento do gene <i>HvAACT1</i>	59
4.1 Total number of alleles and PIC values of the genotypes developed in Brazil in the last four decades	88
4.2 Principal Coordinate Analysis (PCoA) carried out with the 59 barley accessions and 34 microsatellite markers.....	90
4.3 UPGMA tree of 59 individuals barley accessions constructed based on the matrix of shared microsatellite alleles.....	92
4.4 Estimated proportion of membership in the corresponding clusters (K=2) as calculated using STRUCTURE software.....	93

1 INTRODUÇÃO

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) foi uma das primeiras espécies vegetais domesticadas para alimentação humana e, desde então, vem sendo cultivada nos mais diversos sistemas de produção e condições ambientais. Os grãos são usados tanto na alimentação animal quanto para o consumo humano.

O Brasil produz cevada em resposta à demanda da indústria de malte cervejeiro, com concentração da área de cultivo nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo uma opção de inverno para o sistema produtivo agropecuário do Brasil. A cevada pode ser cultivada em condições baixas de disponibilidade de água, porém, está em desvantagem em relação a outras espécies cultivadas devido à maior sensibilidade à acidez e/ou alumínio tóxico do solo (Al^{3+}) e a umidade e calor excessivo.

Os solos do Brasil são caracterizados por apresentar pH baixo e, apesar da correção da acidez na camada superficial, a não incorporação do calcário na região subsuperficial associada à falta de água é considerada um problema para a produção agrícola. Nesses solos, o alumínio é solubilizado para sua forma tóxica, causando a inibição do crescimento do sistema radicular, que pode ter como consequência menor captação de água e nutrientes e a sensibilidade a outros estresses abióticos ou estresses bióticos. Métodos de cultivo das plantas em hidroponia ou em solo, que avaliam o crescimento radicular na presença e ausência do estresse, são utilizados na avaliação

da tolerância ao Al^{3+} e possibilitam estudos genéticos e caracterização de germoplasma.

Apesar do Al^{3+} apresentar efeito tóxico para as plantas, estas desenvolveram mecanismos de resposta, sendo que o mais estudado é a exsudação de ácidos orgânicos na rizosfera. Há diferença nos tipos de ácidos orgânicos exsudados (malato, oxalato e citrato), no padrão de exsudação, na dose de resposta ao alumínio, entre outras características. Entre as gramíneas, a cevada é considerada uma das espécies mais sensíveis ao Al^{3+} e libera citrato em resposta a esse estresse. Nesta espécie foi identificado o loco gênico *Alp* para a tolerância, localizado no cromossomo 4H. O gene *HvAACT1*, que está localizado neste loco, foi identificado como responsável pela exsudação de citrato ativada na presença de Al^{3+} .

Muitos projetos de pesquisa estão envolvidos na caracterização e no melhoramento (clássico ou molecular) da cevada para que esta apresente melhor desenvolvimento em condições de solos contendo Al^{3+} . A pesquisa envolvendo a interação de mecanismos fisiológicos com a genética da tolerância é importante para relacionar a resposta das plantas com possíveis modificações na região transcrita de genes ou nos seus níveis de expressão.

1.1 Hipótese

A coleção nuclear de cevada do Centro Nacional de Pesquisa em Trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPT/Embrapa) apresenta variabilidade genética para o caráter tolerância ao alumínio e as respostas fisiológicas de diferentes genótipos a este estresse estão correlacionadas com variações alélicas do gene *HvAACT1*.

1.2 Objetivo geral

Caracterizar a variabilidade genotípica e fenotípica da tolerância ao Al^{3+} em genótipos de cevada cultivada e silvestre, pertencentes à coleção nuclear de cevada do CNPT/Embrapa, e analisar a região transcrita do gene *HvAACT1*.

1.3 Objetivos específicos

- Fenotipar genótipos da coleção nuclear de cevada da CNPT/Embrapa quanto à tolerância ao Al^{3+} em solução hidropônica e em solo;
- Comparar a tolerância dos genótipos da coleção nuclear de cevada com a de genótipos exóticos;
- Estimar a associação de dois marcadores moleculares ligados ao gene *HvAACT1* com os dados de fenotipagem em hidroponia e solo;
- Sequenciar o gene *HvAACT1* em genótipos contrastantes para a tolerância ao Al^{3+} e avaliar possíveis mutações;
- Avaliar a diversidade genética da coleção nuclear de cevada da CNPT/Embrapa usando marcadores microssatélites distribuídos no genoma da espécie.

2 CAPÍTULO I

Genética da tolerância ao alumínio em cevada

Genética da tolerância ao alumínio em cevada

O cultivo da cevada

A cevada, *Hordeum vulgare* L., pertence ao gênero *Hordeum*, família Poaceae, tribo Triticeae. *Hordeum*, como a maioria dos outros gêneros em Triticeae, é encontrada em áreas temperadas, tanto no hemisfério norte quanto no sul (Bothmer *et al.*, 1995). A maior concentração de espécies deste gênero ocorre no sudoeste asiático e no sul da América do Sul (Bothmer *et al.*, 1995; Minella, 2005). *Hordeum vulgare* L., a única espécie cultivada do gênero, é diploide com $2n = 2x = 14$ cromossomos, monóica, anual e autógama (Minella, 2005).

Apenas uma espécie de cevada foi classificada segundo o sistema de Lineu, a *Hordeum vulgare*, e dentro dessa há tanto as formas selvagens quanto as cultivadas (Baldanzi *et al.*, 1988). Esta espécie é constituída por duas subespécies: *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L., que engloba todas as formas cultivadas, e *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* L., composta pelas cevadas silvestres (Baldanzi *et al.*, 1988; Minella, 2005).

A região do Crescente Fértil, no Oriente Médio, é reconhecida como único centro de origem, sendo que no processo de dispersão formaram-se centros de diversidade distintos na Etiópia e da China (Harlan, 1979). A cevada, juntamente com o trigo, era estocada na forma de grãos, possibilitando a fundação da agricultura no Oriente Médio e a sua disseminação bem sucedida em todo o mundo (Feuillet *et al.*,

2007). *H. vulgare ssp. spontaneum* é reconhecida como a ancestral imediata de todas as cevadas cultivadas. Foi uma das primeiras plantas domesticadas, a partir da seleção de espigas com ráquis rígida propiciando a colheita na maturação (Ladizinsky, 1998). O processo de domesticação da cevada ocorreu durante a fixação do homem na terra, no início da agricultura, em aproximadamente 7000 a.C. (Baldanzi *et al.*, 1988), acontecendo de forma independente em vários locais na área de ocorrência natural de *H. vulgare ssp. spontaneum*, ao leste do mediterrâneo (Harlan, 1979).

Desde a domesticação, a cevada é cultivada nos mais diversos ambientes e sistemas de produção, sendo vários os usos do grão (Minella, 2005). Os principais usos da cevada são na alimentação animal e no consumo humano. No primeiro, pode ser utilizada como forragem verde, feno, silagem, grãos e na fabricação de rações, que se constitui no maior uso mundial da cevada. No consumo humano, é utilizada na forma de malte para a fabricação de bebidas (cerveja e destilados), alimentos e medicamentos, farinhas ou flocos destinados à composição de produtos de alimentação infantil, panificação, dietéticos e sucedâneos de café (de Mori & Minella, 2012).

No Brasil, em 1930 iniciou-se a produção de cevada em escala comercial (Minella, 1999). A produção está concentrada nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina e é dependente da demanda da indústria de malte cervejeiro (Minella, 2001a; Minella, 2005). Mesmo sendo uma excelente opção de inverno para o sistema produtivo agropecuário do Sul do Brasil, a maior parte da cevada é produzida, em termos mundiais, em regiões de clima considerado marginal para produção de outros grãos, como milho, arroz e trigo.

A cevada apresenta ciclo precoce e tolerância a baixas temperaturas, que permite a semeadura e colheita antes de outros cereais de inverno, facilitando a instalação das culturas de verão em época adequada (Arias, 1999; Minella, 1999).

Além disso, a cevada é menos exigente em disponibilidade de água do que outros cereais, podendo ser cultivada em regiões de clima árido ou semi-árido (Minella, 2005). Entretanto, a cultura da cevada tem limitada a distribuição e produção nas regiões tropicais, devido a maior sensibilidade à acidez e/ou alumínio tóxico do solo e a umidade e calor excessivo, sendo estas as principais desvantagens em relação a outras espécies (Minella, 1999). Por mais que as perdas por estiagem e/ou toxidez de alumínio estejam sendo amenizadas pela prática do plantio direto, avanços genéticos na tolerância da espécie a esses estresses continuam sendo necessários para manutenção da competitividade desta cultura (Minella, 2005).

No Brasil, em grande parte das áreas destinadas ao cultivo da cevada predominam solos ácidos, sendo assim um dos principais desafios do melhoramento genético de cevada é melhorar a sua adaptação a estas condições de solo (Minella, 2001b; Minella & Sorrells, 2002). Avanços no melhoramento da tolerância a solos ácidos são de grande importância porque mesmo que o solo seja corrigido para acidez na camada superficial, a não incorporação do calcário na região subsuperficial, associada à falta de água e à acidez, podem ser considerados como problema para a produção.

A exploração da ampla variabilidade, por meio do melhoramento genético, tem proporcionado maiores níveis de resistência a doenças e pragas e tolerância a estresse ambiental, que resulta em redução de perdas, aumento no potencial produtivo e melhoria na qualidade (Minella, 2005). Porém, a solução via genética dos problemas associados à instabilidade das safras de cevada somente com empregos de métodos tradicionais é remota, sendo que a busca de soluções de forma integrada com outras áreas do conhecimento, permite ao melhoramento alcançar maior grau de progresso (Minella, 2005). Devido a isso, caracterização de genótipos quanto à resposta ao

alumínio tóxico e a exploração da variabilidade genética nas espécies cultivadas e afins, via métodos biotecnológicos como marcadores moleculares ou transgenia, são de fundamental importância para o desenvolvimento de cultivares mais estáveis.

O programa de melhoramento de cevada do Centro Nacional de Pesquisa em Trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPT/Embrapa) objetiva o desenvolvimento de germoplasma e cultivares competitivas principalmente para produção comercial de cevada cervejeira no Brasil. Com a finalidade de estudar a diversidade genética empregada/desenvolvida neste programa e acumular informações que descrevam os genótipos, permitindo a utilização mais eficiente dos mesmos, foi criada, pelo pesquisador Euclides Minella, a coleção nuclear de cevada do CNPT/Embrapa, que é composta por 50 genótipos, representando uma amostra da diversidade contida no Banco Ativo de Germoplasma desta instituição (E. Minella, comunicação pessoal).

Solos ácidos e o alumínio tóxico

Solos ácidos, com pH igual ou inferior a 5,5, estão presentes em mais de 30% da área terrestre mundial, sendo que 50% dessas terras são potencialmente aráveis (Kochian *et al.*, 2004; Brunner & Sperisen, 2013). Solos com pH baixo são um dos fatores mais importantes que limitam a produção agrícola mundial (Ryan *et al.*, 2011) e, por si só, já são capazes de diminuir o crescimento das plantas. Porém é a solubilização de metais tóxicos, particularmente o alumínio trivalente (Al^{3+}), a principal limitação para a produção agrícola em solos ácidos (Ryan & Delhaize, 2010), por inibir o crescimento do sistema radicular. A suspeita de que o Al^{3+} é prejudicial ao crescimento das plantas foi relatada há mais de 100 anos (Ryan & Delhaize, 2010). A maior parte do Al^{3+} em solos é incorporada via aluminossilicatos e outras formas

precipitadas que são inofensivas às plantas, mas, sob condições de solos ácidos, estes minerais solubilizam e o íon tóxico Al^{3+} é liberado para a solução do solo (Kinraide, 1997).

Os íons de Al^{3+} inibem o crescimento das raízes em concentrações micromolares, sendo a redução do crescimento radicular o sintoma primário de sua toxidez (Kochian *et al.*, 2004). A diminuição do sistema radicular pode ter como consequência menor captação de água e nutrientes, tornando as plantas mais sensíveis à deficiência hídrica, mudanças de temperatura e doenças, e, conseqüentemente, resultando em redução da produtividade de culturas sob solos ácidos (Minella & Sorrells, 1997; Sivaguru & Horst, 1998; Furukawa *et al.*, 2007).

O alumínio tóxico é um importante tópico de pesquisa, pois as plantas cultivadas são sensíveis a solos ácidos, sendo seu crescimento e rendimento limitados em condições de disponibilidade de Al^{3+} (Brunner & Sperisen, 2013). Em gramíneas, a tolerância ao Al^{3+} foi encontrada na ordem arroz = centeio > trigo > cevada, sendo que existem variações dentro de cada espécie (Foy, 1983). Assim, a cevada é uma das espécies mais sensíveis ao Al^{3+} , tornando importante a busca por soluções para este problema.

Para determinar a restrição radicular causada pelo alumínio são utilizadas metodologias de cultivo das plantas em solo ácido ou em hidroponia, sendo observada elevada correlação dos resultados entre esses métodos (Camargo & Oliveira, 1981; Souza, 2001; Spehar & Souza, 2006). Estudos em hidroponia são mais rápidos e práticos e objetivam determinar o efeito exclusivo do Al^{3+} , sobre a divisão celular e o alongamento da raiz, possibilitando estudos genéticos e caracterização de germoplasma especificamente para tolerância a este estresse (Voss *et al.*, 2006). A metodologia de cultivo em solo ácido evidencia a interação da planta com outros

elementos do solo, além do alumínio, e reflete a ação contínua do elemento sobre a parte aérea, raízes e absorção de nutrientes (Spehar & Souza, 2006).

Efeitos do alumínio tóxico e mecanismos de tolerância

O Al^{3+} causa diversos tipos de danos para as plantas que podem ser detectados a curto e longo prazo. Os efeitos da toxidez podem ser classificados como morfológicos, referindo-se aos sintomas em diferentes partes das plantas, e fisiológicos, relacionados com o efeito da ligação do alumínio com os locais das células, como parede ou membrana celular (Bian *et al.*, 2013b).

O mais significativo dano morfológico e também considerado principal efeito do Al^{3+} é a redução do crescimento radicular, que é causado pelo rompimento das células metabolicamente ativas no ápice radicular e injúrias na parede celular, superfície da membrana plasmática, citoesqueleto e núcleo (Hartwig *et al.*, 2007). Este dano torna a raiz frágil e atrofiada, diminuindo também o desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares (Panda *et al.*, 2009). O pobre desenvolvimento do sistema radicular resulta, a longo prazo, em menor absorção de água, deficiência de nutrientes e eventualmente redução da produção de grãos. Em folhas, os sintomas da toxidez do Al^{3+} são mais difíceis de serem observados e se assemelham à deficiência de fósforo, como nanismo, maturidade tardia, folhas escuras e pequenas, amarelecimento e morte das pontas das folhas, entre outros (Rout *et al.*, 2001).

Alguns dos efeitos fisiológicos causados pela alta concentração de Al^{3+} são o dano ao DNA, a degradação do núcleo e a morte celular (Achary *et al.*, 2012). Também é possível observar mudança na composição de proteínas da parede celular (Tamás *et al.*, 2003), na estrutura do citoesqueleto e interação com microtúbulos e filamentos de actina (Kochian *et al.*, 2004).

As plantas produzem continuamente espécies reativas de oxigênio (EROs), como bioprodutos do metabolismo aeróbico, que são rapidamente detoxificadas por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, porém quando há estresses bióticos e abióticos, como é o caso da toxidez do Al^{3+} , há aumento da formação dessas EROs (Apel & Hirt, 2004). Superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila são tipos de EROS produzidos quando plantas estão submetidas a estresse por alumínio (Castilhos *et al.*, 2011).

Apesar do Al^{3+} apresentar efeito tóxico para as plantas, estas desenvolveram mecanismos de resposta a este estresse. Estes podem ser classificados em mecanismos internos, decorrentes da imobilização ou neutralização do alumínio dentro da célula; e mecanismos externos, referindo-se à estrutura externa da raiz que impede o alumínio de penetrar na célula, como a parede celular, membrana celular ou secreção de ácidos orgânicos na rizosfera (Samac & Tesfaye, 2003; Bian *et al.*, 2013b).

Nos mecanismos de tolerância interna, ao entrar na célula, o Al^{3+} é complexado com ácidos orgânicos (Delhaize *et al.*, 2012), podendo ser sequestrado para o vacúolo, ou ser mantido inativo no citoplasma, prevenindo efeitos negativos nos diversos processos celulares. Estes mecanismos de tolerância intracelular ainda não são bem entendidos, já que plantas tolerantes e sensíveis apresentam acúmulo de alumínio quando cultivadas em condições de alta disponibilidade desse elemento (Guimarães *et al.*, 2011).

Os mecanismos de exclusão do alumínio são os mais estudados e validados com base em estudos genéticos, fisiológicos e moleculares. Citrato, malato e oxalato já foram identificados como os ácidos orgânicos secretados pelas células da raiz em resposta ao alumínio, quelando o mesmo na rizosfera e impedindo sua interação com

a raiz (Furukawa *et al.*, 2007; Bian *et al.*, 2013b). Citrato apresenta maior capacidade de quelar o Al^{3+} , seguido por oxalato e malato (Zheng *et al.*, 1998).

Em resposta ao Al^{3+} , as espécies diferem, não apenas no tipo de ácido orgânico, mas também no padrão de secreção, na sensibilidade à temperatura e na dose de resposta (Yang *et al.*, 2013). O primeiro relato da existência do mecanismo de exclusão foi publicado por Miyasaka *et al.* (1991), os quais demonstraram a secreção de citrato por plantas de feijão tolerantes ao Al^{3+} . A partir deste, diferentes trabalhos têm relatado a existência de uma especificidade do ácido orgânico que desempenha a resposta de tolerância ao Al^{3+} entre as diferentes espécies, sendo que, em cereais, há secreção de malato e citrato em trigo (Rincón & Gonzales, 1992; Ryan *et al.*, 2009), centeio (Li *et al.*, 2000) e aveia (Zheng *et al.*, 1998), e de citrato em cevada (Zhao *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2004), milho (Maron *et al.*, 2010) e sorgo (Magalhães *et al.*, 2007), entre outros.

Genética da tolerância ao alumínio em cevada

Muitos trabalhos estão sendo realizados com o intuito de identificar fatores genéticos envolvidos na tolerância ao Al^{3+} em espécies cultivadas. Para a cevada foi observado um único gene de tolerância ao Al^{3+} , com múltiplos alelos, baseado em teste de hematoxilina com 37 genótipos e seus cruzamentos (Minella & Sorrells, 1992). A tolerância ao Al^{3+} em cevada é condicionada pelo loco gênico *Alp*, no braço longo do cromossomo 4H (Minella & Sorrells, 1997; Wang *et al.*, 2007). No loco *Alp*, Furukawa *et al.* (2007) identificaram o gene *HvAACT1* (*Aluminum-Activated Citrate Transporter*), também identificado como *HvMATE1* por Wang *et al.* (2007), que codifica uma proteína que atua no transporte de citrato pelas raízes. O gene *HvAACT1* pertence à família de transportadores *MATE* (*multi-drug and toxin extrusion*), primeiramente caracterizada por sua capacidade de conferir resistência a drogas em

micro-organismos por meio de um mecanismo de secreção (Magalhães, 2010). Estes transportadores são ativos secundários, que utilizam gradiente eletroquímico de outros íons para o movimento transmembrana do substrato (Weston *et al.*, 2012).

Os dados da sequência de nucleotídeos do gene *HvAACT1*, obtida a partir da cultivar Haruna Nijo, revelam que este gene é composto por 3.884 pb e está depositado no GenBank, do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI), com número de acesso AB331641. A região codificante possui 1.668 pb, contendo 13 éxons e 12 introns, codificando uma proteína com 555 aminoácidos, que localiza-se na membrana plasmática de células epidérmicas do ápice da raiz e contém sete domínios transmembrana (Furukawa *et al.*, 2007). Homologia ao gene *HvAACT1* foi localizada no cromossomo três de arroz, com 85% de identidade, e 59% de identidade com o gene *FRD3* (*Ferric Reductase Defective 3*) de *Arabidopsis* (Furukawa *et al.*, 2007; Magalhães, 2010). O gene *HvAACT1* é expresso constitutivamente na raiz, porém a secreção de citrato pelo transportador é induzida na presença de Al^{3+} (Furukawa *et al.*, 2007), sendo assim, cultivares de cevada secretam citrato imediatamente em resposta ao estresse (Zhao *et al.*, 2003). A tolerância ao alumínio é significativamente correlacionada com a secreção de citrato e com a expressão relativa de *HvAACT1* (Zhao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007).

Além do gene *HvAACT1*, observou-se que o gene *HvALMT1* de cevada possui similaridade na sequência de nucleotídeos com gene de tolerância ao alumínio, *TaALMT1*, de trigo (Gruber *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2015). Porém, plantas crescidas em hidroponia, contendo ou não alumínio, apresentaram baixa expressão desse gene (Gruber *et al.*, 2010). No mesmo estudo, o gene *HvALMT1* foi expresso em oócitos de *Xenopus laevis*, e facilitou a secreção de malato e outros ácidos orgânicos sem requerer Al^{3+} para sua ativação. Em estudos de expressão relativa, constatou-se que o gene

HvALMT1 é altamente expresso em células guarda e em tecidos das raízes contendo células em expansão (Gruber *et al.*, 2010). Desta forma, o gene *HvALMT1* não está primariamente relacionado com a tolerância ao Al^{3+} em cevada. A função de *HvALMT1* está relacionada com as células guarda onde atua na liberação de malato nestas promovendo o fechamento de estômatos (Gruber *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2015). Também há evidências do gene *HvALMT1* possuir papel na germinação e no desenvolvimeto do grão (Xu *et al.*, 2015).

Marcadores moleculares

Os programas de melhoramento genético de plantas têm tido impacto significativo na produção agrícola, porém, ganhos genéticos adicionais podem ser obtidos por meio de aplicação de tecnologias moleculares (Caixeta *et al.*, 2013). Baseado nisso, marcadores moleculares ligados a diferentes características de importância econômica já foram desenvolvidos e se mostraram úteis no melhoramento de plantas e no conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos nas características de interesse agrônômico (Bian *et al.*, 2013b; Caixeta *et al.*, 2006; Caixeta *et al.*, 2013). Entre os tipos de marcadores moleculares utilizados estão os que se caracterizam por fragmentos de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos, são herdados geneticamente e permitem acessar e selecionar a variabilidade existente em nível de DNA (Varshney *et al.*, 2005).

O uso de marcadores moleculares em estudos de tolerância ao Al^{3+} está envolvido na identificação de genes ou locos gênicos de tolerância, o mapeamento molecular e/ou a seleção assistida (Bian *et al.*, 2013b). Um marcador molecular que pode ser utilizado na seleção assistida de genótipos para tolerância ao Al^{3+} em cevada é a inserção de 1 kb na região promotora do gene *HvAACT1*, que ocorre somente em

genótipos tolerantes (Fujii *et al.*, 2012). Por meio desse estudo identificou-se que além de ser expresso na raiz e atuar no transporte de citrato para a rizosfera, esse gene tem a função de liberar citrato próximo ao xilema. Este processo faz com que ions de ferro fiquem quelados com este ácido orgânico, podendo então ser transportado no xilema, prevenindo a precipitação do ferro e a sua toxidez. A função da inserção de 1 kb é aumentar a expressão de *HvAACT1* em toda a raiz, e, além disso, alterar espacialmente seu padrão de expressão, aumentando significativamente a expressão no ápice radicular de cultivares tolerantes ao Al^{3+} . Além deste marcador, uma inserção-deleção de 21 pb identificada na região 3' não traduzida do gene *HvAACT1* também pode ser utilizada para a seleção de genótipos tolerantes ao Al^{3+} . Este marcador, denominado 21-indel, explicou 66,9% da variação da tolerância para solos ácidos entre cultivares de cevada analisadas por Bian *et al.* (2013a).

Referências

- ACHARY, V. M. M.; PARINANDI, N. L.; PANDA, B. B. Aluminum induces oxidative burst, cell wall NADH peroxidase activity, and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 53, n. 7, p. 550-560, 2012.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ARIAS, G. N. **Cevada, uma alternativa de inverno**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 3 p. (Comunicado Técnico Online, 11). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co11.htm>. Acesso em: 13 jan. 2015.
- BALDANZI, G. Cevada. In: BALDANZI, G. et al. (Coord.). **As lavouras de inverno - 2: cevada, tremoço, linho, lentilha**. Rio de Janeiro: Ed. Globo, 1988. p. 11-67.
- BIAN, M. et al. Development of gene-specific markers for acid soil/aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 32, n. 1, p. 155-164, 2013a.
- BIAN, M. et al. Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. **The Crop Journal**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 91-104, 2013b.
- BOTHMER, R. von et al. **An ecogeographical study of the genus *Hordeum***. 2nd edition. Rome: International Board of Plant Genetic Resources, 1995. 129 p. (Systematic and ecogeographical studies on crop gene pools, 7).
- BRUNNER, I.; SPERISEN, C. Aluminum exclusion and aluminum tolerance in woody plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 172, p. 1-12, 2013.
- CAIXETA, E. T. et al. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 9-78.
- CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotecnologia aplicada ao melhoramento de plantas**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2013. p. 31-68
- 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, n. 1, p. 21-31, 1981.
- CASTILHOS, G. et al. Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 74, p. 114-121, 2011.

DELHAIZE, E.; MA, J. F.; RYAN, P. R. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. **Trends in Plant Science**, London, v. 17, n. 6, p. 341-348, 2012.

De MORI, C.; MINELLA, E. **Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2012. 28 p. (Documentos Online, 139). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do139.htm>. Acesso em: 13 jan. 2015.

FEUILLET, C.; LANGRIDGE, P.; WAUGH, R. Cereal breeding takes a walk on the wild side. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 25-32, 2007.

FOY, C. D. The physiology of plant adaptation to mineral stress. **Iowa State Journal of Research**, Ames, v. 57, n. 4, p. 355-391, 1983.

FUJII, M. et al. Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. **Nature Communications**, London, v. 3, p. 1-9, 2012.

FURUKAWA, J. et al. An aluminum-activated citrate transporter in barley. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 48, n. 8, p. 1081-1091, 2007.

GRUBER, B. D. et al. Characterisation of *HvALMT1* function in transgenic barley plants. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 38, n. 2, p. 163-175, 2011.

GRUBER, B. D. et al. *HvALMT1* from barley is involved in the transport of organic anions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 1455-1467, 2010.

GUIMARÃES, L. J. M. et al. Melhoramento para tolerância ao alumínio. In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresses abióticos**. Visconde do Rio Brando: Suprema, 2011. p. 177-197.

HARLAN, J. R. On the origin of barley. In: **Barley: Origin, Botany, Culture, Winter Hardiness, Genetics, Utilization, Pests**. [S.l.]: U.S. Department of Agriculture, 1979. p. 10-36. (Agriculture Handbook No. 338).

HARTWIG, I. et al. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina: ciência agrária**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, 2007

KINRAIDE, T. B. Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 310, p. 1115-1124, 1997.

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

LADIZINSKY, G. How many tough-rachis mutants gave rise to domesticated barley?. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 45, n. 5, p. 411-414, 1998.

LI, X. F.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, n. 4, p. 1537-1544, 2000.

MA, J. F. et al. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 401, p. 1335-1341, 2004.

MAGALHÃES, J. V. How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. **Annals of Botany**, London, v. 106, n. 1, p. 199-203, 2010.

MAGALHÃES, J. V. et al. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, London, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.

MARON, L. G. et al. Two functionally distinct members of the MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) family of transporters potentially underlie two major aluminum tolerance QTLs in maize. **The Plant Journal**, Oxford, v. 61, n. 5, p. 728-740, 2010.

MINELLA, E. **Cevada brasileira: situação e perspectivas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 4 p. (Comunicado Técnico Online, 23). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co23.htm>. Acesso em: 13 jan. 2015

MINELLA, E. **Cevada cervejeira: características e desempenho agrônomo das cultivares indicadas para a região sul**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001a. 8 p. (Circular técnica online, 4). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_ci04.htm>. Acesso em: 13 jan. 2015

MINELLA, E. Desafios e potencialidades do melhoramento genético de cevada no Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA, 21, 2001, Guarapuava. **Anais...** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001b. p. 31-40

MINELLA, E. Melhoramento de Cevada. In: BOREM, A. (Org.). **Melhoramento de Espécies Cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 275-299

MINELLA, E.; SORRELLS, M. E. Aluminum tolerance in barley: genetic relationships among genotypes of diverse origin. **Crop Science**, Madison, v. 32, n. 3, p. 593-598, 1992.

MINELLA, E.; SORRELLS, M. E. Genetic analysis of aluminum tolerance in Brazilian barleys. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1099-1103, 2002.

MINELLA, E.; SORRELLS, M. E. Inheritance and chromosome location of Alp, a gene controlling aluminium tolerance in 'Dayton' barley. **Plant Breeding**, Berlin, v. 116, n. 5, p. 465-469, 1997.

- MIYASAKA, S. C. et al. Mechanism of aluminum tolerance in snapbeans. Root exudation of citric acid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 96, n. 3, p. 737-743, 1991.
- PANDA, S. K.; BALUŠKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 7, p. 592-597, 2009.
- RINCÓN, M.; GONZALES, R. A. Aluminum partitioning in intact roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 3, p. 1021-1028, 1992.
- ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants: a review. **Agronomie**, v. 21, n. 1, p. 3-21, 2001.
- RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 37, n. 4, p. 275-284, 2010.
- RYAN, P. R. et al. A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, n. 1, p. 340-351, 2009.
- RYAN, P. R. et al. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 9-20, 2011.
- SAMAC, D. A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils-a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 75, n. 3, p. 189-207, 2003.
- SIVAGURU, M.; HORST, W. J. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of *Zea mays* L. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 1, p. 155-163, 1998.
- 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.
- SPEHAR, C. R.; SOUZA, L. A. C. Selection for aluminum tolerance in tropical soybeans. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v. 36, n. 1, p. 1-06, 2006.
- TAMÁS, L. et al. Changes in the composition of cell wall proteins in barley roots during germination and growth in aluminium presence. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 49, n. 7, p. 327-331, 2003.
- VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; SORRELLS, M. E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, Barking, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.
- VOSS, M. et al. **Método de avaliação de tolerância à toxidez de alumínio em trigo, em condições de hidroponia, na Embrapa Trigo**. Passo Fundo: Embrapa

- Trigo, 2006. 16 p. (Documentos Online, 67). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do67.htm>. Acesso em: 13 jan. 2015.
- WANG, J. et al. High-resolution mapping of the *Alp* locus and identification of a candidate gene *HvMATE* controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 115, n. 2, p. 265-276, 2007.
- WESTON, L. A.; RYAN, P. R.; WATT, M. Mechanisms for cellular transport and release of allelochemicals from plant roots into the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p. 1-10, 2012.
- XU, M. et al. The barley anion channel, *HvALMT1*, has multiple roles in guard cell physiology and grain metabolism. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 153, n. 1, p. 183-193, 2015.
- YANG, L. T. et al. Roles of organic acid anion secretion in aluminium tolerance of higher plants. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-16, 2013.
- ZHAO, Z. et al. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta**, New York, v. 217, n. 5, p. 794-800, 2003.
- ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminum resistance during relatively long-term exposure to aluminum stress. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 209-214, 1998.

3 CAPÍTULO II

**Avaliação da tolerância ao alumínio revela a necessidade de nova combinação
alélica em cevadas brasileiras**

Avaliação da tolerância ao alumínio revela a necessidade de nova combinação alélica em cevadas brasileiras

Resumo

Maior tolerância ao alumínio (Al^{3+}) é um caráter desejado em genótipos de cevada desenvolvidos para o Brasil. Neste estudo, foi caracterizada a tolerância ao Al^{3+} e a variabilidade genética da coleção nuclear do CNPT/Embrapa, e comparada com genótipos balizadores externos e de cevada silvestre. Em hidroponia, seis genótipos foram mais tolerantes que o controle tolerante brasileiro, Antartica 01. Porém em experimento de curta duração em solo apenas os genótipos balizadores foram superiores ao controle tolerante. Uma linhagem transgênica superexpressando o gene *TaALMT1* apresentou o melhor desempenho, com crescimento relativo de raiz 62% superior ao melhor material convencional. O genótipo balizador Golden Promise, reconhecido como sensível, não diferiu significativamente do controle tolerante Antartica 01 em hidroponia, sugerindo baixa tolerância na coleção nuclear. A sequência do gene *HvAACT1* foi altamente similar em genótipos contrastantes quanto à tolerância ao Al^{3+} . O marcador relacionado à inserção de 1 kb no promotor deste gene foi identificado nos genótipos Dayton e Murasakimochi, que apresentaram as melhores performances na fenotipagem. A tolerância ao Al^{3+} nos genótipos da coleção nuclear não está associada a nenhum dos marcadores analisados. Sugere-se a incorporação em genótipos brasileiros do alelo do gene *HvAACT1* contendo a inserção de 1 kb, ou de genes de outras espécies, tais como *TaALMT1*.

Palavras-chave: citrato, coleção nuclear, hidroponia, *HvAACT1*, solo ácido.

**Evaluation of the aluminium tolerance reveals the necessity for new
allelic combinations in Brazilian barley**

Abstract

Higher tolerance to aluminum (Al^{3+}) is a desirable trait in barley genotypes developed to be used in Brazil. In this study, the Al^{3+} tolerance was characterized for the barley core collection from Embrapa Wheat and compared to exotic genotypes and to wild barley. Moreover, the Al^{3+} tolerance was correlated with two molecular markers and the *HvAACT1* transcribed sequence. In hydroponics, six genotypes showed higher tolerance than the Brazilian tolerant control, Antarctica 01. However, in a short-term soil test only the exotic genotypes were superior to Antarctica 01. A transgenic line over-expressing the gene *TaALMT1* had the best performance showing relative root growth 62% higher than the best conventional genotype. Golden Promise, known as sensitive to Al^{3+} , did not differ from Antarctica 01, suggesting low tolerance in the core collection. The sequence of the gene *HvAACT1* was highly similar among Al^{3+} tolerance contrasting genotypes. The marker associated to the 1 kb insertion in this gene was found only in Dayton and Murasakimochi, which showed the best performances. The Al^{3+} tolerance in core collection is not associated to any of the analyzed markers. The incorporation, in the Brazilian genotypes, of the *HvAACT1* allele containing the 1 kb insertion and of genes from other species, such as *TaALMT1*, is suggested.

Keywords: acid soil, citrate, core collection, *HvAACT1*, hydroponics.

Introdução

O estabelecimento de coleções nucleares tem sido essencial para o gerenciamento da diversidade genética de uma espécie, permitindo a conservação e utilização dos recursos genéticos pelos programas de melhoramento (Brown, 1989; Leroy et al., 2014; Liang et al., 2014). Estas coleções caracterizam-se pelo reduzido número de acessos, que representam uma fração significativa da diversidade genética de uma espécie e seus parentes silvestres (Frankel, 1984). No ano 2000, foi estabelecida pelo Centro Nacional de Pesquisa em Trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPT/Embrapa), Brasil, uma coleção nuclear de cevada com 50 genótipos. Esta coleção está sendo avaliada quanto à diversidade para as principais características de interesse agrônomo na cultura para a produção no Brasil e maior competitividade de mercado. Entre estas características encontram-se, resistência a doenças, qualidade cervejeira, tolerância a estresses abióticos, em especial, ao alumínio.

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre (Fujii et al., 2012; Ma et al., 2014; Panda et al., 2009) e está presente no solo na forma de aluminossilicatos e outros precipitados que não causam danos às plantas. Em solos ácidos ($\text{pH} < 5,5$) o alumínio é solubilizado e o íon tóxico Al^{3+} é liberado para a solução do solo (Kinraide, 1997), sendo o principal limitante para produção de plantas nestes solos (Ryan e Delhaize, 2010). Os íons Al^{3+} podem inibir o crescimento de raízes em concentrações micromolares, sendo a redução do crescimento radicular o sintoma primário de sua toxidez (Kochian et al., 2004). A diminuição do sistema radicular tem como consequência menor captação de água e nutrientes, tornando as plantas mais sensíveis à deficiência hídrica, mudanças de temperatura e doenças, podendo resultar em

significante redução da produção de culturas sob solos ácidos (Furukawa et al., 2007; Minella e Sorrells, 1997; Sivaguru e Horst, 1998).

Entre as gramíneas, a cevada é a espécie mais sensível ao alumínio (Foy, 1983). Isso associado a comum ocorrência de solos ácidos no Brasil explica a necessidade de obtenção de genótipos com tolerância para permitir o sucesso da cultura no país. A tolerância ao alumínio em cevada é condicionada pelo loco gênico *Alp*, no braço longo do cromossomo 4H (Minella e Sorrells, 1997). Neste loco, foi identificado o gene *HvAACT1* (*Aluminum-Activated Citrate Transporter*) (Furukawa et al., 2007), também conhecido por *HvMATE* (Wang et al., 2007), que codifica uma proteína que atua no transporte de citrato pelas raízes (Wang et al., 2007). O gene *HvAACT1* é expresso constitutivamente na raiz, porém a secreção de citrato pelo transportador é induzida por Al^{3+} (Furukawa et al., 2007; Zhao et al., 2003). A tolerância ao alumínio é significativamente correlacionada com a secreção de citrato e com expressão relativa de *HvAACT1* (Zhao et al., 2003; Wang et al., 2007).

Para determinar a restrição radicular causada pelo alumínio, são utilizadas metodologias de cultivo das plantas em solo ácido ou em hidroponia, sendo observada elevada correlação dos resultados entre esses métodos (Camargo e Oliveira, 1981; Souza, 2001; Spehar e Souza, 2006; Nava et al., 2015). Estudos em hidroponia são rápidos e práticos e permitem determinar o efeito exclusivo do Al^{3+} , sobre a divisão celular e o alongamento da raiz, possibilitando estudos genéticos e caracterização de germoplasma especificamente para tolerância a este estresse (Voss et al., 2006). A metodologia de cultivo em solo ácido evidencia a interação da planta com outros elementos do solo, além do alumínio, e reflete a ação contínua do elemento sobre a parte aérea, raízes e absorção de nutrientes (Spehar e Souza, 2006).

Marcadores moleculares relacionados com a tolerância ao Al^{3+} estão sendo desenvolvidos e mostraram-se úteis para auxiliar no melhoramento de plantas e no conhecimento dos mecanismos genéticos envolvidos nas características de interesse agrônômico (Bian et al., 2013b). Em cevada, um marcador molecular que pode ser utilizado na seleção assistida de genótipos está associado a uma inserção de 1 kb na região promotora do gene *HvAACT1*, que ocorre somente em genótipos tolerantes de cevada, sendo que essa inserção promove o aumento da secreção de citrato no ápice radicular (Fujii et al., 2012). Além deste marcador, uma inserção-deleção de 21 pb identificada na região 3' não traduzida do gene *HvAACT1* também pode ser utilizada para a seleção de genótipos tolerantes ao Al^{3+} . Este marcador, denominado 21-indel, explicou 66,9% da variação da tolerância para solos ácidos entre cultivares de cevada analisadas por Bian et al. (2013a).

Os objetivos desse trabalho foram caracterizar a variabilidade fenotípica da tolerância ao Al^{3+} em genótipos de cevada cultivada, pertencentes à coleção nuclear de cevada do CNPT/Embrapa, além de compará-los com genótipos exóticos. Também foi analisado dois marcadores moleculares ligados ao gene *HvAACT1* e a sequência da região transcrita deste gene em genótipos contrastantes. Análises também foram feitas em genótipos de cevada silvestre, buscando fontes alternativas de tolerância a esse estresse para fins de melhoramento.

Material e métodos

Material vegetal

Neste estudo foram utilizados 59 genótipos de cevada cultivada (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) e seis genótipos de cevada silvestre (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) (Tabela 3.1). Destes, 49 fazem parte da coleção nuclear do

CNPT/Embrapa. Para as fenotipagens em hidroponia e em solo, os genótipos cultivados no Brasil Antarctica 01 e MN 6021, que apresentaram previamente em ensaios de campo, tolerância e sensibilidade ao Al^{3+} , respectivamente, foram utilizadas como controles. Como controles externos foram utilizados os genótipos exóticos Dayton e Murasakimochi, desenvolvidos nos EUA e Japão, respectivamente, por serem considerados tolerantes ao Al^{3+} , e o genótipo Golden Promise, desenvolvido na Inglaterra, por ser considerado sensível ao Al^{3+} . Também foi avaliada a linhagem transgênica L5, a qual possui o gene *TaALMT1* sob controle da transcrição do promotor da ubiquitina de milho. O material vegetal foi cedido pelo Banco Ativo de Germoplasma do CNPT/Embrapa.

Preparo das sementes

Sementes uniformes em tamanho e com adequado enchimento do grão foram esterilizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,33% durante cinco minutos e pré-germinadas, no escuro por 24 horas a 24°C. Após o período de pré-germinação, aquelas que apresentavam radícula entre 5 e 10 mm de comprimento foram utilizadas nos experimentos de fenotipagem.

Tabela 3.1. Classificação quanto à tolerância ao alumínio e origem dos genótipos de cevada avaliados.

Genótipo	País	Ano	Cruzamento	Ensaio (hidroponia)	Classificação* (hidroponia)	Classificação* (solo)
Antarctica 01	Brasil	Anos 60	Seleção de Breun Volla	Controle +	T	T
MN 6021	Argentina	2012	Dominique/Quilmes Ayelen	Controle -	S	S
Embrapa 129	Brasil	1999	LM 844/MN610//Cevada BR 2	1	T	
FM 404	Brasil	Anos 70	Seleção em cruzamento provavelmente envolvendo Alpha	1	T	I
PFC 84148	Brasil	1984	Volla*3/Wpgm 626-46-25//MAGNIF 131	1	T	
FM 437	Brasil	1985	Alpha 1959/2*Mansholt Twerijge Zomergerst	2	T	
MN 684	Brasil	2001	Antarctica 05/MN 577	2	T	
Pará-I	Brasil	-	Desconhecido	2	S	I
Embrapa 43	Brasil	1999	IPB 194//C 2146/TR 208	3	I	
MN 743	Brasil	2004	MN 681/Gimpel	3	I	
PFC 88210	Brasil	1988	Seleção de FM 71	3	I	
FM 519	Brasil	1985	Kr 1/Union//Volla/3/Kr 2/Volla//Wisa/4/Alpha	4	I	
IPB 1219	Brasil	1980	Vada/Zephyr	4	I	
PFC 8601	Brasil	1986	Seleção em TR 207 em solo corrigido (1/8 SMP)	4	I	
BRS Elis	Brasil	2008	BRS 195/Scarlett	5	I	
MN 698	Brasil	2001	MN 599/MN 635	5	I	
PFC 88211	Brasil	1988	Seleção de FM 80	5	T	
BRS 224	Brasil	2002	Embrapa 43/PFC 9114	6	T	
Embrapa 128	Brasil	1999	LM 844/PFC 84148//BR2	6	S	
PFC 86125	Brasil	1986	PFC 8153/IPB 194	6	S	
BRS 180	Brasil	1999	73Ab2199/Karla	7	I	
Cevada BR1	Brasil	1987	Seleção de W 5586 =Binder/Opal//Balder/kenia/3/Alpha	7	I	
PFC 8115	Brasil	1981	Volla*3/Wpgm 626-46-25	7	I	
Antarctica 04	Brasil	1999	Alpha1959/Union	8	S	I
BRS Marciana	Brasil	2005	PFC 9240/PFC 9211	8	I	
MN656	Brasil	1993	SG 4279/FM 404//Bacco/Union/3/FM 434	8	I	

Tabela 3.1. Continuação.

Genótipo	País	Ano	Cruzamento	Ensaio (hidroponia)	Classificação* (hidroponia)	Classificação* (solo)
BRS 225	Brasil	2002	PFC 9103/Defra	9	I	
BRS Suábia	Brasil	2006	BRS 195/MN 698	9	I	
PFC 7802	Brasil	1978	Binder/Opal//Balder/Kenya	9	I	
BRS Cauê	Brasil	2008	BRS Borema/BRS 195	10	I	
FM 424	Brasil	Anos 70	Quinn/Malteria Heda//W 5746	10	I	
PFC 8610	Brasil	1986	PFC 8144/Park	10	T	
Antarctica 05	Brasil	1999	Desconhecido	11	I	I
Cevada BR2	Brasil	1989	FM 424/TR 206	11	I	
PFC 8153	Brasil	1981	FM 424*2//Volla/Wpgm 626-46-25	11	T	I
BRS Brau	Brasil	2009	MN 698/3/BRS 195//Schooner/Embrapa 129	12	T	
BRS Lagoa	Brasil	2005	PFC 9215/PFC 9288	12	I	
IPB 194	Brasil	1980	Mazurka/Nackta	12	T	
BRS Sampa	Brasil	2008	BRS 195//PFC 8590/PFC 9205	13	T	
MN 599	Brasil	1990	Ariana/Volla//FM 462	13	T	I
Quest	EUA	-	MN Brite/Zhedar 1	13	T	
BRS 195	Brasil	2001	Defra/BR 2	14	I	
Embrapa 127	Brasil	2000	BR2/Alexis	14	I	
PFC 8280	Brasil	1982	Volla/C 2146	14	I	
BRS Greta	Brasil	2006	Krona/PFC 9219//PFC 9204	15	I	
IAC 74310	Brasil	1974	Desconhecido	15	I	
PFC 88212	Brasil	1988	Seleção de FM 80	15	T	I
BRS Mariana	Brasil	2005	PFC 88137/PFC 8905//PFC 9205	16	T	T
PFC 88209	Brasil	1988	Seleção de FM 70	16	T	I
Quench	Inglaterra	-	Sebastian/Drum	16	T	I

Tabela 3.1. Continuação.

Genótipo	País	Ano	Cruzamento	Ensaio (hidroponia)	Classificação* (hidroponia)	Classificação* (solo)
PFC2010123	-	-	-	17	S	
Hspo PI 466338	Israel	-	Silvestre		S	
Hspo PI 466396	-	-	Silvestre	17	S	
Hspo 584	-	-	Silvestre	18	T	I
HspoPI 466381	Israel	-	Silvestre	18	T	I
Hspo PI 282590	Israel	-	Silvestre	18	T	
Hspo PI 466394	Israel	-	Silvestre	19	S	
FM 434	Brasil	Anos 70	Quinn/Malteria Heda//FM 424	19	T	
PFC 8644	Brasil	1986	Antarctica 05*3/Park	20	T	I
Vacaria	Brasil	-	-	20	T	I
Alpha	EUA		'Manchuria'/'Champion of Vermont'	21	T	
BRS Itanema	Brasil	2013	BRS 195//PFC 8590/PFC9205	21	T	I
Murasakimochi	Japão	-	-	21	T	T
Dayton	EUA	1955	Composite Cross X (CI 6625) Selection	22	T	T
Golden Promise	Inglaterra	1966	Maythorpe Gamma-Ray Mutant	22	T	I
Linhagem L5			Linhagem transgênica L5 foi obtida através da transformação da cultivar Golden Promise.			T

*T - tolerante; I - intermediário; S - sensível ao alumínio.

Fenotipagem quanto à tolerância ao alumínio em hidroponia

As sementes pré-germinadas foram cultivadas em baldes de 3,5 L contendo solução nutritiva sem alumínio (controle) ou solução nutritiva contendo alumínio (tratamento). A solução nutritiva constituiu-se de 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mM KNO_3 , 0,435 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,3 μM CuSO_4 , 0,8 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 μM NaCl , 0,10 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 μM H_3BO_3 e 0,009 mM Fe-EDTA. O pH foi mantido em 4,0, conforme indicação de estudos preliminares. Para a solução tratamento foram utilizados os mesmos reagentes e concentrações da solução controle com a adição de 20 μM AlCl_3 , concentração esta considerada mais adequada para diferenciar os genótipos controle em estudos preliminares. O software Visual MINTEQ 3.0 (Gustafsson, 2010) foi utilizado para estimar a concentração e atividade de Al^{3+} na solução.

As soluções hidropônicas foram constantemente aeradas, sendo mantidas em sala de crescimento com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h:8h (luz:escuro). Decorrido o período de quatro dias, o crescimento da raiz mais longa de cada plântula foi medido. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado, com três repetições, contendo 20 plântulas por repetição. O crescimento relativo da raiz (CRR) foi calculado pela proporção do crescimento radicular na presença de alumínio em relação ao crescimento na ausência de alumínio. Para tanto, foi utilizado o seguinte cálculo: $\text{CRR} = (\text{média do comprimento radicular em solução tratamento} / \text{média do comprimento radicular em solução controle}) \times 100$. Os genótipos foram distribuídos aleatoriamente em 22 ensaios (Tabela 3.1), cada um contendo os genótipos controle (Antarctica 01 e MN 6021) e três genótipos para a avaliação da tolerância/sensibilidade ao Al^{3+} , a exceção dos ensaios 18, 19 e 22 que continham apenas dois genótipos. A análise estatística foi realizada com o programa

SAS Enterprise Guide 6.1. Os genótipos foram classificados, dentro de cada ensaio, em tolerante, intermediário ou sensível através do Teste de Dunnett ($p < 0,05$) utilizando como referência a média do CRR dos controles positivo e negativo, Antartica 01 e MN 6021, respectivamente. Foram considerados tolerantes os genótipos iguais ou superiores ao controle positivo, intermediários os que diferiram significativamente tanto do controle positivo quanto do negativo, e sensíveis os que foram iguais ou inferiores ao controle negativo.

Fenotipagem quanto à tolerância ao alumínio em solo

Com base nos resultados da fenotipagem em hidroponia, foram selecionados 19 genótipos para a análise do comprimento radicular em teste de curta duração em solo. Os critérios de seleção foram: genótipos com tolerância superior ao controle positivo (6), genótipos com tolerância semelhante ao controle positivo (8), um genótipo intermediário, um genótipo com sensibilidade semelhante ao controle negativo, um genótipo mais sensível do que o controle negativo e dois genótipos silvestres com tolerância semelhante ao controle positivo. Os genótipos controle também foram utilizados neste experimento. Além destes 21 genótipos, também foi analisada a linhagem experimental transgênica L5, obtida por Delhaize et al. (2004), que possui o gene *TaALMT1* de trigo sob controle do promotor do gene da ubiquitina de milho.

O solo utilizado no experimento (Latossolo Vermelho Distrófico húmico de textura argilosa / Haplorthox) foi coletado da área experimental do CNPT/Embrapa, no município de Passo Fundo, RS, Brasil (28,216979S, 52,408428W), na profundidade de 0 a 20 cm. O pH do solo em água foi de 4,2 e o teor de alumínio trocável era 273,8 mmolc/dm³ correspondendo a 78,9% de saturação da capacidade

de troca de cátions (CTC) efetiva. O pH deste solo foi corrigido com calcário (Filler) utilizando-se duas quantidades distintas: 50 e 500 g para 70 kg de solo. Após misturado, o solo contendo o calcário foi mantido úmido por quatro semanas. A adição de 50 g de calcário elevou o pH do solo para 4,4 contendo 194,0 mmol_c/dm³ de alumínio trocável correspondendo a 63,8% de saturação da CTC efetiva enquanto a adição de 500 g elevou o pH para 6,2 sendo que não foi detectado alumínio no solo (Material suplementar 3.1). Os solos com pH 4,4 e 6,2 foram utilizados no experimento de crescimento radicular como solo ácido e corrigido, respectivamente. O solo foi acondicionado em recipientes feitos de canos de PVC de 25 cm de altura e 5 cm de diâmetro. Em cada recipiente foram adicionados 450 g de solo e água destilada para 90% da capacidade de campo.

Dez sementes pré-germinadas de cada genótipo, contendo radículas entre 5 e 10 mm, foram transferidas para os recipientes contendo solo ácido e corrigido e mantidas em câmara de crescimento programada para 14°C:18°C (noite:dia) e 16h:8h (luz:escuro) por seis dias. A cada dois dias, o volume de água para alcançar 90% da capacidade de campo foi repostado com água destilada. O experimento foi conduzido em delineamento completamente casualizado e cada planta foi considerada uma repetição. Ao término dos seis dias as raízes foram cuidadosamente retiradas do solo, sendo mensurado o comprimento da raiz mais longa (Material Suplementar 3.2). O CRR de cada genótipo foi calculado como descrito anteriormente. Os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste de comparação de médias por Duncan ($p < 0,05$) através do programa SAS Enterprise Guide 6.1. Os genótipos foram classificados conforme o descrito para a fenotipagem em hidroponia. Foi utilizada a correlação de Pearson, calculada pelo programa SPSS v18 Windows (Statistical Package for the Social

Sciences), para calcular a correlação entre os resultados obtidos na fenotipagem em hidroponia e solo.

Extração de DNA

Dez sementes de cada genótipo foram esterelizadas superficialmente com hipoclorito de sódio 0,33% durante cinco minutos, transferidas para papel germinador e mantidas no escuro a 24°C por seis dias. As folhas das plântulas foram cortadas e transferidas para um microtubo de 2 mL contendo três esferas de aço inoxidável (2,3 mm de diâmetro) e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. O tecido vegetal foi macerado mecanicamente em uma plataforma Mini-Beadbeater™ (Biospec Products) durante 2 min. O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). As amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8%.

Amplificação de marcadores ligados ao gene *HvAACT1*

Dois marcadores moleculares do tipo indel, denominados 21-indel (Bian et al., 2013a) e 1-kb insertion (Fujii et al., 2012), já descritos na literatura como marcadores ligados ao gene *HvAACT1*, foram utilizados para a caracterização dos 65 genótipos utilizados neste trabalho. Para o marcador 21-indel a reação de amplificação foi composta de 1 x PCR master mix (Promega), 10 µM de cada oligonucleotídeo (GCTAGGGCTTGAAAAGTGTGTTG e GACGAACTGTACGATGATGATGC) e 100 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram 94°C por 3 minutos seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos além de uma amplificação final de 72°C por 5 minutos. O DNA amplificado com o marcador 21-indel foi analisado em gel de agarose 2%.

Para o marcador 1-kb insertion, a reação de amplificação foi composta de 1 x tampão de reação, 1 x Q solution, 10 µM de cada oligonucleotídeo (GGTCCAACACTCTACCCTTCCTT e GGTGCGAGTTGCCCTAGCTATTACAGA), 0,25 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 U de Taq DNA polimerase (Qiagen) e 150 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram 94°C por 3 minutos seguida de 45 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos além de uma amplificação final de 72°C por 5 minutos. O DNA amplificado com o marcador 1-kb insertion foi analisado em gel de agarose 1%.

Sequenciamento e análise das seqüências

Dois genótipos classificados como tolerantes, Antarctica01 e FM404, e dois genótipos considerados sensíveis, MN6021 e Parai-I, foram selecionados para o sequenciamento da região transcrita do gene *HvAACT1*. O DNA total destes genótipos foi amplificado com diferentes pares de oligonucleotídeos para obtenção de três fragmentos do gene *HvAACT1* (Material Suplementar 3.3). Estes três fragmentos correspondem a 1.254 pb da parte inicial (fragmento 1), 1.222 pb da parte intermediária (fragmento 2) e 1.242 pb da parte final (fragmento 3) do gene *HvAACT1*, sendo que cada um destes fragmentos possui sobreposições nas extremidades que permitem a junção dos fragmentos.

O fragmento 1 foi obtido pela amplificação com os oligonucleotídeos CTCTCATCCCTCCTCTCAG e TTCTCAAGGTCTTGGCTGCT (seqüências na orientação 5'-3'), o fragmento 2 com os oligonucleotídeos TCTGTATCTACCCGCTTGTTAGC e GACGCCAGAGTGACACAGAA, e o fragmento 3 com os oligonucleotídeos TGGCTCTGAAAATGCTCTGTT e

TCACTTCCGGAGGAAAACCCA. Cada um destes fragmentos foi amplificado nos quatro genótipos. A reação de amplificação constituiu-se de 1 x tampão de reação, 1 x Q solution, 10 μ M de cada oligonucleotídeo, 0,25 mM de cada deoxinucleotídeo, 1 U de Taq DNA polimerase (Qiagen) e 150 ng de DNA total. As condições de termociclagem foram 94°C por 3 minutos seguida de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos além de uma amplificação final de 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram precipitados, quantificados em gel de agarose 0,8% e clonados no vetor pGEM-T Easy (Promega). Após o crescimento das bactérias em meio de cultura LB contendo ampicilina (100 μ g/ml), foi realizada a extração dos plasmídeos pelo uso do kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), conforme recomendações do fabricante. A quantificação dos fragmentos de DNA clonados foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop, Thermo Scientific).

Os fragmentos foram sequenciados com os iniciadores T7 (TAATACGACTCACTATAGGG), SP6 (ATTTAGGTGACTATAG) além dos oligonucleotídeos HvMATE3 (GGTTGGATGGTCGTGAGATT), HvMATE5 (GATCCCCTGGCTTCCTTG), HvMATE6 (TGTCAGCAAAGGTGAAAATTC) e HvMATE7 (GTATCGGTCGCTTGATTTGG) para o fragmento inicial, HvMATE10 (ATGTTTCACACCCATGATGC), HvMATE11 (CTAGTTCAGGCCGTGTTCCCT), HvMATE12 (CCATGTGGCAGACAAACATC) e HvMATE13 (CCTTACAATTTCTTTTGCAGTGG) para o fragmento intermediário, e HvMATE16 (GCAAAGAGAAAGAGGTCACCA), HvMATE17 (TCTCGTGTCTGCAGGTTTG), HvMATE18 (CTCGGGACAAGTTTCAGAGC) e HvMATE19 (CATCAACTTCGGAGCACAAG) para o fragmento final. A reação de sequenciamento constituiu-se de 200 a 500 ng do produto de amplificação, 3,2 μ M

do oligonucleotídeo, tampão de sequenciamento e Big Dye Terminator versão 3.1. As condições de termociclagem foram 96°C durante 1 min, seguido de 35 ciclos a 96°C por 20 segundos, 56°C por 20 segundos, 60°C por 2 minutos e 45 segundos. Após a amplificação, as reações foram precipitadas, ressuspendidas em formamida Hi-Di, desnaturadas e separadas em eletroforese capilar na plataforma ABI3130 Sequence Analyzer. O programa Sequencing Analysis versão 5.1.1 foi utilizado para analisar as sequências. O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa ClustalW (Thompson et al., 1994), utilizando as sequências obtidas e a sequência do gene *HvAACT1* originada da cultivar Haruna Nijo e obtida no GenBank (número de acesso AB331641) (Material Suplementar 3.4 e 3.5).

Resultados

Fenotipagem quanto à tolerância ao alumínio em hidroponia

Nas condições da solução nutritiva tratamento utilizada neste trabalho, dos 20µM de AlCl₃ adicionados, 21,7% encontravam-se na forma tóxica Al³⁺ sendo a atividade equivalente 1,23 µM.

Dentre os 65 genótipos analisados somente Dayton, Murasakimochi, PFC 8644, PFC 88209, Quest e Vacaria apresentaram tolerância ao alumínio superior ao controle positivo (Antarctica 01), dentre estes, PFC 8644, PFC 88209 e Vacaria são brasileiros (Figura 3.1). O genótipo Paraí-I foi o único que apresentou maior sensibilidade que o controle negativo (MN 6021). Dentre os genótipos de cevada silvestre, Hspo 584, Hspo PI 282590 e Hspo PI 466381 foram tolerantes ao Al³⁺, enquanto que Hspo PI 466338, Hspo PI 466394, Hspo PI 466396 foram sensíveis. O genótipo Golden Promise, internacionalmente reconhecido como sensível ao Al³⁺, apresentou CRR semelhante ao controle positivo. Dos genótipos restantes, 19

demonstraram tolerância semelhante ao controle positivo, 26 foram classificados como intermetiários e quatro classificados como sensíveis.

Observou-se variação na resposta ao Al^{3+} dentro do mesmo genótipo tanto em hidroponia quanto em solo (Tabela 3.2). Por exemplo, na fenotipagem em solo, quando o genótipo controle Antarctica 01 foi crescido em solo corrigido, a amplitude variou de 218 a 273 mm, enquanto que em solo ácido a variação da amplitude foi de 41 a 123 mm.

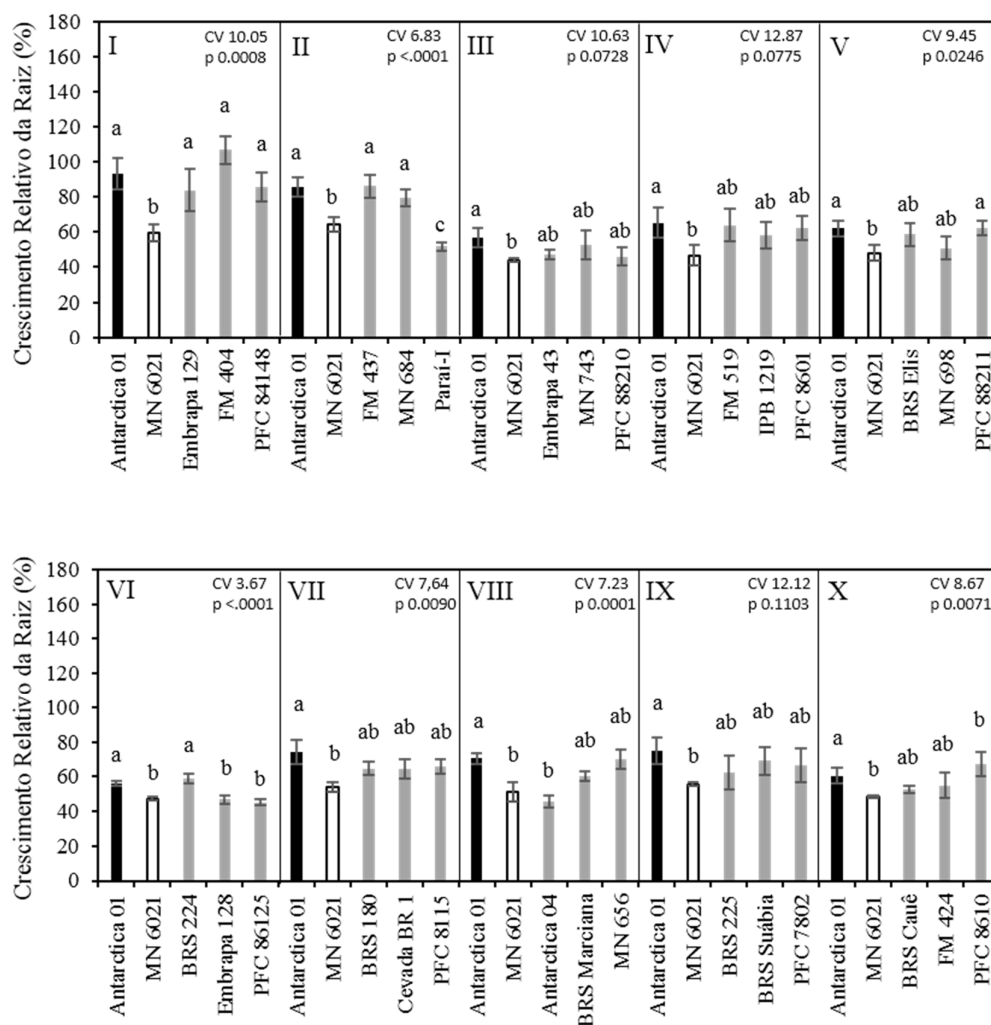
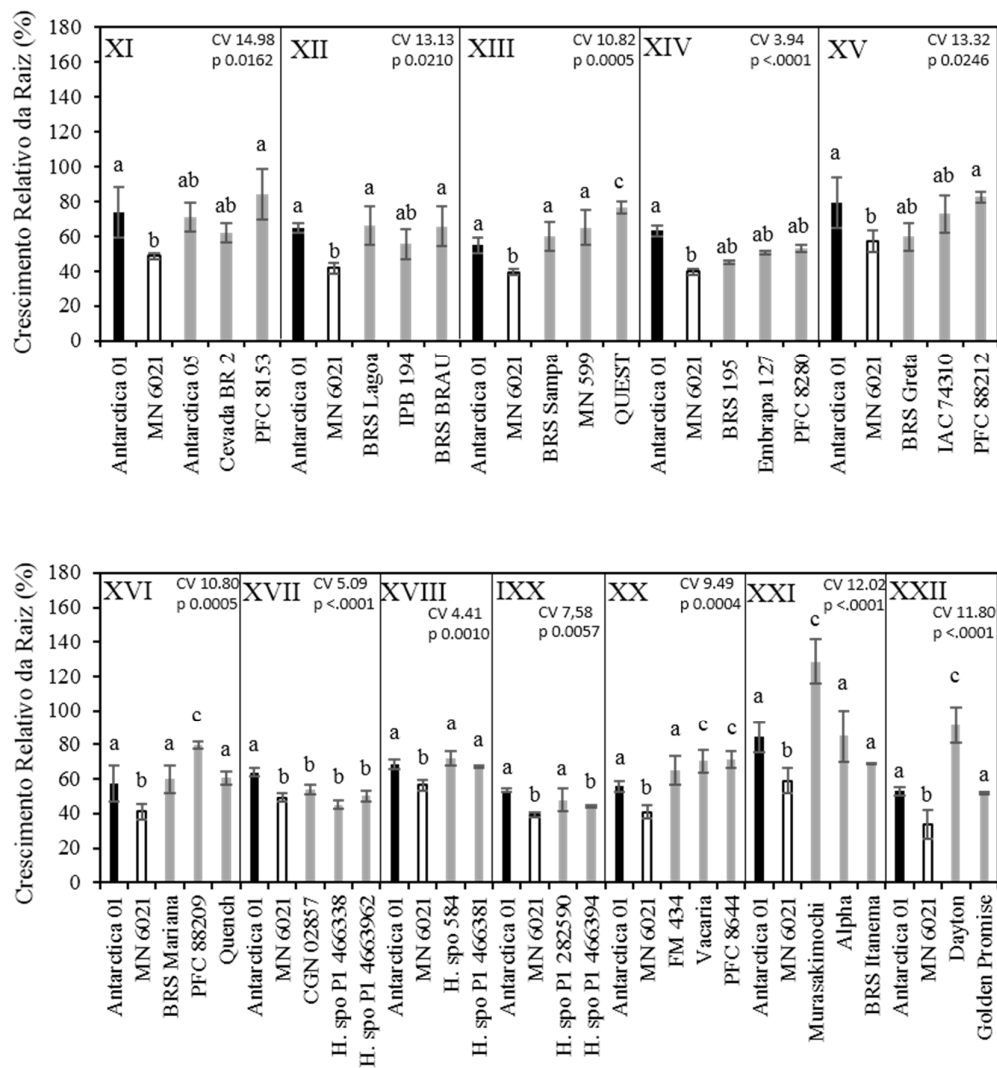


Figura 3.1. Crescimento relativo da raiz de genótipos de cevada submetidos ao alumínio em hidroponia. Números romanos na borda superior dos gráficos indicam o ensaio. Barras pretas representam o genótipo controle positivo, barras brancas o controle negativo e barras cinzas os genótipos avaliados em cada ensaio. Barras identificadas pela mesma letra não diferiram significativamente dentro de cada ensaio, de acordo com o Teste de Dunnett ($p < 0,05$), $n=20$



Continuação Figura 3.1. Crescimento relativo da raiz de genótipos de cevada submetidos ao alumínio em hidroponia. Números romanos na borda superior dos gráficos indicam o ensaio. Barras pretas representam o genótipo controle positivo, barras brancas o controle negativo e barras cinzas os genótipos avaliados em cada ensaio. Barras identificadas pela mesma letra não diferiram significativamente dentro de cada ensaio, de acordo com o Teste de Dunnett ($p < 0,05$), $n=20$.

Tabela 3.2. Média e amplitude do comprimento da maior raiz dos genótipos de cevada avaliados (mm).

Genótipo	Ensaio	Fenotipagem em hidroponia				Fenotipagem em solo			
		Sem Al ³⁺		Com Al ³⁺		Sem Al ³⁺		Com Al ³⁺	
		Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude
Antarctica 01	1	52,81	71,75 - 22,48	49,38	70,56 - 26,17	246,50	273 - 218	82,67	123 - 41
MN 6021	1	56,64	75,51 - 27,51	33,86	42,95 - 23,33	244,38	265 - 203	17,13	26 - 10
Embrapa 129	1	56,17	68,83 - 38,92	47,13	66,91 - 18,71				
PFC 84148	1	59,94	72,87 - 32,44	51,47	81,39 - 30,52				
FM 404	1	61,02	78,09 - 31,18	65,15	85,05 - 35,16	234,50	260 - 178	49,90	91 - 29
Antarctica 01	2	56,37	74,34 - 37,26	48,26	65,11 - 32,35				
MN 6021	2	59,62	73,98 - 37,85	38,42	57,94 - 23,56				
Parai-I	2	74,07	87,39 - 38,92	38,38	45,26 - 31,23	251,80	270 - 236	37,80	55 - 29
MN 684	2	59,97	72,99 - 42,57	47,65	58,04 - 30,72				
FM 437	2	58,97	75,28 - 34,76	50,77	64,41 - 34,69				
Antarctica 01	3	83,13	109,81 - 64,2	47,18	63,67 - 17,76				
MN 6021	3	87,57	107,51 - 57,33	38,50	50,67 - 23,75				
Embrapa 43	3	85,79	119,92 - 46,95	40,51	60,27 - 21,67				
MN 743	3	91,83	119,05 - 55,81	48,41	84,73 - 30,57				
PFC 88210	3	84,01	104,4 - 55,21	38,78	52,69 - 29,58				
Antarctica 01	4	89,96	96,81 - 81,83	58,75	67,67 - 47,94				
MN 6021	4	95,24	106,3 - 86,71	44,55	49,15 - 30,35				
IPB 1219	4	83,30	95,88 - 60,27	48,46	61,27 - 39,28				
FM 519	4	101,54	117,75 - 75,55	64,95	79,34 - 48,09				
PFC 8601	4	93,98	108,17 - 78,85	58,81	73,8 - 45,13				
Antarctica 01	5	67,89	86,13 - 42,9	42,16	54,55 - 22,9				
MN 6021	5	76,14	92,32 - 39,47	36,65	46,65 - 36,26				
BRS Elis	5	67,33	86,69 - 25,73	39,60	49,43 - 25,71				
MN 698	5	72,06	94,47 - 40,02	36,73	54,38 - 19,23				
PFC 88211	5	55,52	82,86 - 33,85	34,59	50,47 - 20,47				
Antarctica 01	6	74,58	103,84 - 55,4	41,78	51,31 - 23,57				
MN 6021	6	81,96	104,29 - 58,8	38,82	48,97 - 22,24				
BRS 224	6	78,44	99,38 - 25,21	46,20	62,02 - 29,61				
Embrapa 128	6	77,10	104,5 - 47,72	36,10	53,43 - 19,02				
PFC 86125	6	78,21	100,06 - 42,75	35,39	44,22 - 20,95				
Antarctica 01	7	57,73	77,5 - 43,49	42,85	53,64 - 30,75				
MN 6021	7	68,86	89,8 - 20,85	37,34	49,86 - 16,72				
BRS 180	7	44,96	81,84 - 19,39	29,02	41,19 - 17,22				
Cevada BR 1	7	70,19	88,2 - 36,94	45,27	55,71 - 30,45				
PFC 8115	7	55,94	78,88 - 23,57	36,75	47,7 - 27,23				
Antarctica 01	8	67,29	95,8 - 37,76	47,43	55,46 - 38,37				
MN 6021	8	68,73	90,41 - 42,75	35,37	45,81 - 16,94				
Antarctica 04	8	76,67	100,09 - 37,08	35,09	47,81 - 20,21	247,10	274 - 231	69,00	82 - 46
BRS Marciana	8	56,55	88,03 - 10,76	34,21	44,0 - 24,65				
MN 656	8	54,09	86,51 - 20,21	37,93	48,87 - 24,88				
Antarctica 01	9	57,78	74,49 - 20,31	43,29	54,34 - 31,02				
MN 6021	9	63,00	86,85 - 40,38	35,02	42,25 - 16,67				
BRS 225	9	49,85	74,61 - 24,17	31,12	50,02 - 20,78				
BRS Suabia	9	61,69	79,3 - 28,64	42,66	57,26 - 30,47				
PFC 7802	9	49,14	71,58 - 28,34	32,71	48,45 - 20,11				
Antarctica 01	10	73,64	81,93 - 51,79	44,67	55,34 - 37,81				
MN 6021	10	72,45	83,21 - 56,02	35,15	41,22 - 22,88				
BRS Caue	10	75,57	93,79 - 48,53	39,71	48,71 - 31,75				
FM 424	10	60,71	89,09 - 27,27	33,32	40,5 - 23,26				
PFC 8610	10	58,89	88,74 - 28,61	39,62	55,97 - 28				
Antarctica 01	11	44,80	57,94 - 27,25	33,13	47,97 - 23,03				
MN 6021	11	55,93	67,47 - 42,02	27,20	31,4 - 21,14				
Antarctica 05	11	40,62	55,33 - 26,94	28,84	42,39 - 19,63	252,44	269 - 241	42,22	75 - 17
Cevada BR2	11	47,02	61,03 - 33,62	29,26	41,83 - 19,82				
PFC 8153	11	37,43	62,97 - 20,51	31,51	46,31 - 20,21	214,30	237 - 164	55,20	87 - 21
Antarctica 01	12	51,99	68,39 - 26,66	33,80	45,95 - 25,6				
MN 6021	12	62,07	71,86 - 53,12	25,97	32,56 - 17,7				
BRS Lagoa	12	43,64	64,1 - 20,43	28,93	41,1 - 18,57				
IPB 194	12	60,37	80,35 - 26,3	33,63	47,9 - 19,56				
BRS Brau	12	39,79	54,79 - 23,84	26,09	34,96 - 17,46				
Antarctica 01	13	66,08	73,54 - 49,58	36,25	49,63 - 29,74				
MN 6021	13	72,67	82,18 - 66,1	28,74	32,8 - 21,35				
BRS Sampa	13	53,47	70,99 - 25,78	32,02	48,36 - 25,16				
MN 599	13	54,57	75,8 - 23,76	35,47	46,31 - 26,29	238,40	266 - 209	64,30	100 - 35
Quest	13	35,90	61,74 - 23,69	27,51	36,7 - 21,39	221,44	266 - 183	30,44	43 - 21
Antarctica 01	14	49,59	64,9 - 34,7	31,30	54,2 - 24,26				
MN 6021	14	58,07	75,56 - 42,15	23,03	29,33 - 13,11				
BRS 195	14	54,26	75,43 - 25,06	24,56	37,04 - 18,72				
Embrapa 127	14	48,51	84,53 - 20,47	24,62	40,55 - 17,46				

Tabela 3. 2. Continuação.

Genótipo	Ensaio	Fenotipagem em hidroponia				Fenotipagem em solo			
		Sem A13+		Com A13+		Sem A13+		Com A13+	
		Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude	Média	Amplitude
PFC 8280	14	46,21	73,49 - 24,69	24,53	36,2 - 19,35				
Antarctica 01	15	33,13	41,7 - 18,49	26,24	43,78 - 19,41				
MN 6021	15	39,75	52,9 - 30,08	22,65	27,88 - 17,89				
BRS Greta	15	48,62	81,21 - 21,1	29,03	40,43 - 21,2				
IAC 74310	15	35,91	56,45 - 21,75	26,16	38,21 - 14,58				
						234,5			
PFC 88212	15	23,35	29,59 - 19,35	19,28	28,3 - 14,09	0	285 - 95	36,50	58 - 26
Antarctica 01	16	47,00	61,21 - 31,38	26,92	40,34 - 21,15				
MN 6021	16	54,63	65,6 - 46,83	22,53	29,81 - 15,92				
						262,2			
BRS Mariana	16	43,48	72,54 - 27,19	26,04	34,02 - 19,25	0	302 - 132	80,50	127 - 60
						218,4			
PFC 88209	16	31,11	48,26 - 22,45	24,73	32,38 - 18,09	4	247 - 187	41,00	55 - 28
						213,1			
Quench	16	46,05	78,92 - 25,68	27,85	36,42 - 20,16	1	244 - 190	25,78	30 - 17
Antarctica 01	17	63,67	80,8 - 26,35	40,69	46,56 - 33,23				
MN 6021	17	69,48	90,63 - 32,14	34,17	39,65 - 25,38				
CGN 02857	17	57,72	77,5 - 20,1	31,13	41,63 - 20,86				
Hspo PI 466338	17	74,34	97,88 - 29,36	33,55	51,81 - 20,61				
Hspo PI 466396	17	70,63	102,61 - 31,36	35,37	49,05 - 20,26				
Antarctica 01	18	55,03	77,88 - 20,38	37,60	49,06 - 30,06				
MN 6021	18	57,97	68,41 - 46,07	32,66	40,49 - 23,38				
						246,0			
Hspo 584	18	45,49	62,89 - 33,44	32,72	40,26 - 26,95	0	269 - 211	36,20	50 - 28
						251,2			
Hspo PI 466381	18	48,61	80,57 - 20,92	32,64	49,71 - 13,7	0	287 - 200	49,10	80 - 31
Antarctica 01	19	67,14	96,71 - 32,71	35,91	45,35 - 21,45				
MN 6021	19	74,31	96,87 - 42,29	29,00	35,92 - 17,78				
Hspo PI 282590	19	52,21	102,93 - 25,34	24,98	36 - 14,76				
Hspo PI 466394	19	81,47	114,63 - 27,05	35,85	50,26 - 16,23				
Antarctica 01	20	52,99	62,96 - 34,54	29,48	49,96 - 20,01				
MN 6021	20	59,35	68,83 - 51,38	24,26	29,87 - 18,15				
FM 434	20	54,65	72,7 - 31,24	35,45	59,23 - 20,49				
						232,1			
Vacaria	20	37,34	59,23 - 20,49	26,27	50,96 - 17,38	1	253 - 200	42,89	72 - 23
						222,4			
PFC 8644	20	37,32	52,11 - 25,61	26,65	41,55 - 18,86	4	289 - 152	56,78	99 - 37
Antarctica 01	21	49,01	86,7 - 7,13	41,34	65,35 - 24,55				
MN 6021	21	55,90	81,59 - 34,19	32,98	39,82 - 26,04				
						199,4			
Murasakimochi	21	70,29	99,27 - 47,56	90,37	121,67 - 55,54	0	291 - 91	87,90	140 - 44
						264,0			
BRS Itanema	21	53,53	81,63 - 24,56	36,92	47,4 - 28,05	0	274 - 249	57,11	83 - 34
Alpha	21	54,94	87,41 - 36,75	46,62	62,92 - 34,3				
Antarctica 01	22	67,14	96,71 - 32,71	35,48	45,35 - 21,45				
MN 6021	22	72,97	96,87 - 38,13	24,70	35,92 - 7,45				
						237,6			
Dayton	22	76,22	91,96 - 52,27	69,93	87,93 - 49,97	3	272 - 195	98,75	120 - 72
						248,2			
Golden Promise	22	78,45	96,29 - 59,21	40,65	46,68 - 33,03	0	279 - 205	43,70	59 - 31
						231,8			
L5						0	258 - 154	167,50	178 - 151

Fenotipagem quanto à tolerância ao alumínio em solo

Com base nos resultados da hidroponia, foram selecionados os seguintes genótipos para a fenotipagem em solo: Dayton, Murasakimochi, PFC 8644, PFC 88209, Quest e Vacaria, com tolerância superior ao controle positivo; BRS Mariana, FM 404, Golden Promise, BRS Itanema, MN 599, PFC 8153, PFC 88212 e Quench, com tolerância similar ao controle positivo; Antartica 05, classificado como intermediário; Antartica 04, com sensibilidade igual ao controle negativo; Paraí-I, mais sensível do que o controle negativo e os genótipos silvestres Hspo 584 e Hspo PI 466381, classificados como tolerantes. Além destes genótipos convencionais, também foi analisada a linhagem transgênica L5. Esta linhagem, que expressa o gene *TaALMT1* de trigo de maneira constitutiva (Delhaize et al., 2004), apresentou maior crescimento relativo do que todos os outros genótipos. O CRR desta linhagem transgênica foi 62% maior em comparação ao melhor genótipo convencional.

Dentre os genótipos convencionais, o genótipo Murasakimochi obteve o maior crescimento relativo, seguido do genótipo Dayton, sendo que os dois não tiveram diferenças significativas (Figura 3.2). Antartica 01 apresentou o quarto maior CRR no geral e primeiro dos genótipos da coleção nuclear avaliados em solo. Os genótipos Antartica 01, BRS Mariana e MN6021, mantiveram a mesma classificação tanto em nas análises de solo quanto em hidroponia. Para os demais observou-se troca de classes entre os dois tipos de fenotipagem. O controle negativo apresentou menor CRR. O teste de correlação Pearson, entre os dados da hidroponia e solo, foi de 52%. Salienta-se que, enquanto a raiz da linhagem transgênica cresceu cerca de 75% em alumínio, os genótipos da coleção nuclear não alcançaram 40% de crescimento.

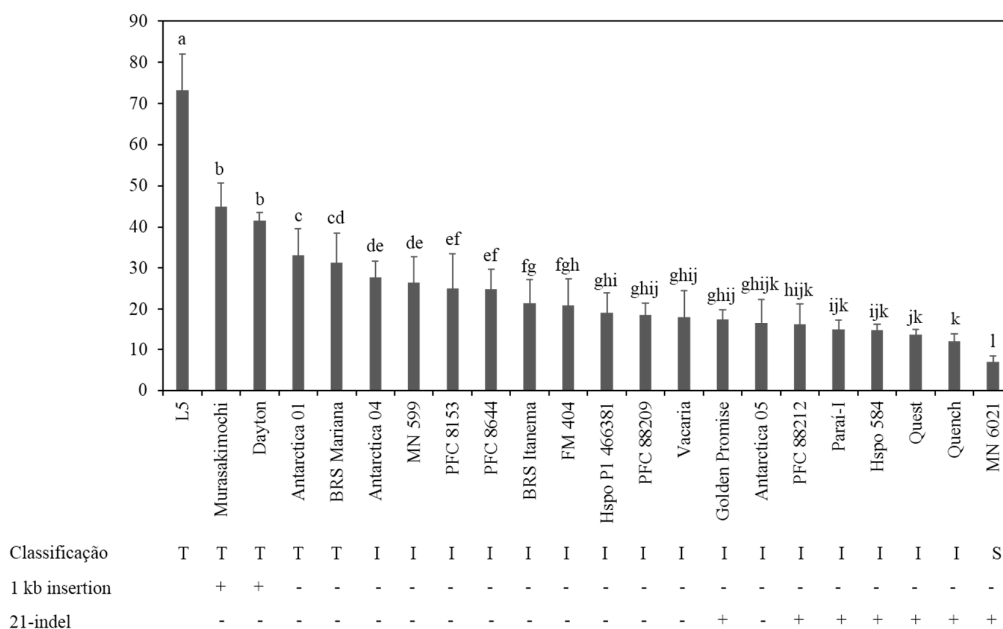


Figura 3.2. Crescimento relativo da raiz de genótipos de cevada submetidos ao alumínio em experimento de curta duração em solo. Barras identificadas pela mesma letra não diferiram significativamente, de acordo com o Teste de Duncan ($p < 0,05$). T - tolerante; I - intermediário; S – sensível; inserção de 1 kb, “+”: presença; “-”: ausência; e tamanho do fragmento do marcador 21 indel (“+”: fragmento 518 pb; “-”: fragmento 497 pb).

Amplificação de marcadores ligados ao gene *HvAACT1*

Dentre os 65 genótipos, somente Dayton e Murasakimochi apresentaram a inserção de 1 kb referente ao marcador molecular 1-kb insertion (Figura 3.3a). Isto indica que apenas estes genótipos apresentam uma inserção de 1 kb na região promotora do gene *HvAACT1* que está ligada a tolerância ao Al^{3+} . Conforme descrito anteriormente, estes dois genótipos exóticos apresentaram os melhores crescimentos radiculares tanto em solo como em hidroponia.

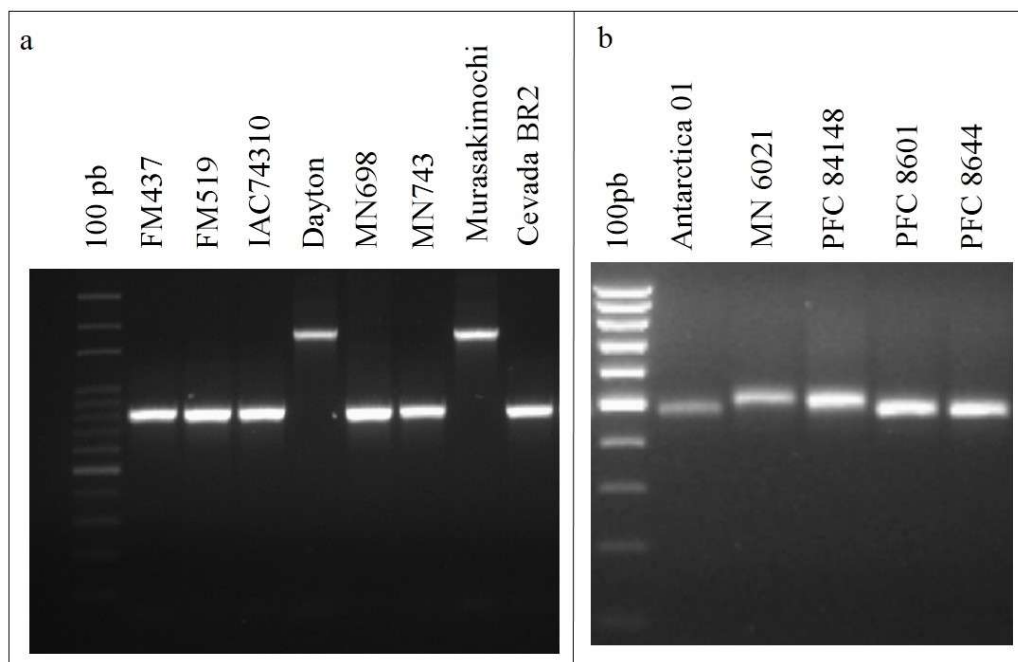


Figura 3.3. Produtos de amplificação dos marcadores moleculares ligados ao gene *HvAACT1*. A-) Marcador 1-kb insertion B-) Marcador 21-indel.

Quanto ao marcador molecular 21-indel, produtos de amplificação com tamanhos de 497 pb ou 518 pb foram produzidos entre os genótipos (Figura 3.3b). Dentre os genótipos analisados, 52 genótipos amplificaram o fragmento de 497 pb, sendo que desses, 24 foram classificados como tolerantes, 24 como intermediários e quatro como sensíveis, quando fenotipados em hidroponia. Ou seja, este fragmento de 497 pb do marcador 21-indel foi detectado em 46% dos genótipos tolerantes em hidroponia como também em 46% dos genótipos intermediários. Nos 13 genótipos restantes, o fragmento de 518 pb foi detectado. Dentre estes, cinco foram classificados como sensíveis, dois como intermediários e seis como tolerantes, pela fenotipagem em cultivo hidropônico. Desta forma, nenhum dos alelos do marcador 21-indel pôde ser associado com a tolerância ou com a sensibilidade ao Al^{3+} em hidroponia.

Entretanto, nas análises do crescimento radicular em solo, uma associação do marcador 21-indel pôde ser estabelecida. Os genótipos Parai-I, Hspo 584, Quest,

Quench, e MN 6021 amplificaram o alelo de 518 pb e apresentaram os menores desempenhos nas análises em solo, sendo classificados como sensíveis. Por outro lado, todos os genótipos classificados como tolerantes amplificaram o alelo de 497 pb. Assim, baseados nas análises de solo, os genótipos contendo tanto a inserção de 1 kb no promotor do gene *HvAACT1* como o alelo de 497 pb do marcador 21-indel apresentaram os melhores desempenhos (Figura 3.3).

Sequenciamento e análise das sequências

Foi realizado o sequenciamento da região transcrita do gene *HvAACT1* nos genótipos Antártica 01 e FM 404, classificados como tolerantes, e MN 6021 e Parai-I, classificados como sensíveis (Material Suplementar 3.3). O gene *HvAACT1* nestes genótipos possui 3.447 nucleotídeos, o mesmo número encontrado na sequência do genótipo Haruna Nijo, depositado no GenBank. Quando realizado o alinhamento das sequências (Material Suplementar 3.4), observou-se diferenças em 12 posições, sendo uma posição nos éxons 2, 3, 4 e 11, três posições nos éxons 8 e 10 e duas posições no intron 10. As trocas mais frequentes foram entre citosina e timina (6 posições), guanina e adenina (4 posições) seguida de timina e guanina (1 posição) e timina e adenina (1 posição).

Em 11 vezes, quatro dos cinco genótipos apresentaram as mesmas bases sendo a diferença detectada em apenas um genótipo. Em somente uma ocasião (éxon 3), três sequências apresentaram a mesma base (timina) enquanto as duas sequências apresentaram outra base (guanina). As mutações observadas nos éxons 4, 8 (segunda substituição), 8 (terceira substituição) e 11 foram classificadas como silenciosas, uma vez que não resultaram em troca de aminoácidos.

Das 10 substituições detectadas em éxons, seis resultaram em troca de aminoácidos na proteína. No éxon 2, o nucleotídeo citosina, presente nos genótipos Antartica 01, MN 6021, Paraí-I e Haruna Nijo, foi alterado para timina no genótipo FM 404, resultando na substituição do aminoácido arginina por uma cisteína. No éxon 3, a troca do nucleotídeo timina, presente nos genótipos MN 6021, Paraí-I e Haruna Nijo, para guanina em Antartica 01 e FM 404, resultou na substituição do aminoácido leucina por valina. Nos éxons 8 (primeira substituição) e 10 (terceira substituição) as modificações dos nucleotídeos timina e adenina, presentes nos genótipos Antartica 01, FM 404, Paraí-I e Haruna Nijo, para adenina e guanina, respectivamente, no genótipo MN 6021 resultaram na troca dos aminoácidos valina por ácido glutâmico no éxon 8 (primeira substituição) e asparagina para ácido aspártico no éxon 10 (terceira substituição). No éxon 10 (primeira substituição) a base adenina, observada nos genótipos Antartica 01, MN 6021, Paraí-I e Haruna Nijo, modificada para guanina em FM 404, resultou na troca do aminoácido isoleucina por valina. Por fim, no éxon 10 (segunda substituição) a base timina, observada nos genótipos FM 404, MN 6021, Paraí-I e Haruna Nijo, substituída para citosina em Antartica 01, resultou na troca do aminoácido fenilalanina por serina.

Dentre as modificações citadas, duas ocorreram por aminoácidos relacionados (leucina por valina e isoleucina por valina). Os aminoácidos leucina, valina e isoleucina são apolares e hidrófobos. Por outro lado, a substituição de arginina por cisteína (éxon 2) representa a troca de um aminoácido básico e hidrófilo por outro neutro com tendência a formação de ligações de hidrogênio. No éxon 8 (primeira substituição) ocorreu a troca da valina, que é apolar, para ácido glutâmico, que é polar; no éxon 10 (segunda substituição), a troca de fenilalanina, que é apolar, por serina, que é polar neutro, foi observada; enquanto, no éxon 10 (terceira substituição), houve troca de

asparagina para ácido aspártico, ou seja, troca de um aminoácido não carregado para um carregado negativamente. Considerando que a única alteração similar entre tolerantes que diferiu dos genótipos sensíveis (leucina por valina) não acarreta grandes modificações na estrutura proteica, não houve evidências que estas substituições de bases ou aminoácidos tenham causado alterações significativas na proteína que possam explicar as diferenças fenotípicas quanto a tolerância ao alumínio.

Discussão

Neste trabalho foi observada baixa variação fenotípica para tolerância ao Al^{3+} na coleção nuclear de cevada CNPT/Embrapa. A tolerância encontrada nos genótipos desta coleção foi inferior encontrada em genótipos tolerantes exóticos. Observou-se troca de nucleotídeos nas sequências do gene *HvAACT1* entre os genótipos contrastantes, porém não houve relação clara com a tolerância ao Al^{3+} . Entretanto, os melhores desempenhos dos genótipos convencionais, tanto em hidroponia quanto em solo, puderam ser associados com uma inserção de 1 kb na região promotora do gene *HvAACT1*, a qual não foi identificada em genótipos brasileiros. A maior tolerância em solo foi observada na linhagem transgênica superexpressando o gene *TaALMT1* de trigo.

A baixa variabilidade observada em genótipos da coleção nuclear juntamente com o desempenho superior da linhagem transgênica detectados neste trabalho, evidenciam a necessidade de explorar as possibilidades da transgenia, já que ganhos significativos para a tolerância ao Al^{3+} em cevada, através de métodos clássicos de melhoramento, são pouco prováveis (Minella, 2001). Esta linhagem transgênica também apresentou maior eficiência na assimilação de fósforo em solo ácido quando comparada a uma cultivar convencional (Delhaize et al., 2009). A relação entre

tolerância ao Al^{3+} e uso de fósforo baseia-se no fato que o ácido orgânico liberado pode solubilizar fósforo que, no solo, encontra-se associado a outros elementos. De fato, a deficiência de fósforo, que também é um fator limitante em solos ácidos, é um estresse que pode induzir a secreção de ácidos orgânicos (Kochian et al., 2004). Isto indica que, além de um maior crescimento radicular em solo ácido (Figura 3.2), tanto a linhagem transgênica como cultivares convencionais com maior secreção de ácidos orgânicos também podem ser mais eficientes no uso do fósforo em campo.

Além da cevada transgênica contendo o gene *TaALMT1* de trigo, outros genes de tolerância ao alumínio já foram testados e se mostraram eficientes no aumento do nível de tolerância, como é o caso da superexpressão do próprio gene *HvAACT1* em cevada (Zhou et al., 2013) e de cevada transformada com o gene *SbMATE* de sorgo ou o gene *FRD3* de *Arabidopsis* (Zhou et al., 2014) que demonstraram eficiência na tolerância ao alumínio tanto em hidroponia quanto em solo. Entretanto, dentre os eventos citados, nenhum foi superior a cevada transformada com o gene *TaALMT1* (Zhou et al., 2014).

Dentre os genótipos convencionais analisados, o genótipo Golden Promise, conhecido internacionalmente como sensível ao Al^{3+} (Delhaize et al., 2004), não diferenciou de Antarctica 01 em hidroponia (Figura 3.1) indicando a baixa tolerância encontrada nos genótipos brasileiros. Assim, novas fontes de tolerância são necessárias para aumentar o progresso genético deste caráter pelos programas de melhoramento de cevada no Brasil. O controle tolerante Antarctica 01, tanto em hidroponia (Figura 3.1) quanto em solo (Figura 3.2), foi estatisticamente inferior aos balizadores exóticos de tolerância Dayton e Murasakimochi, internacionalmente reconhecidos como fontes de tolerância ao Al^{3+} (Tang et al., 2000; Ma et al., 2004; Furukawa et al., 2007; Wang et al., 2007; Fujii et al., 2012). É interessante que

controles com maior tolerância ao Al^{3+} sejam utilizados a fim de aumentar a pressão de seleção para esse carácter.

Dayton e Murasakimochi foram os únicos genótipos que possuem a inserção de 1 kb no promotor do gene *HvAACT1*. Esta inserção aumenta a expressão de *HvAACT1* em toda a raiz, além disso, altera espacialmente seu padrão de expressão, aumentando significativamente a expressão nas pontas das raízes de cultivares tolerantes ao Al^{3+} (Fujii et al., 2012). Uma vez que o ápice da raiz é o alvo mais sensível da toxidez do Al^{3+} , aumento da expressão de *HvAACT1* nesta região resulta no aumento da secreção de citrato para a rizosfera promovendo maior proteção das plantas. Além da inserção de 1 kb no promotor do gene *HvAACT1*, outro marcador, denominado 21-indel, desenvolvido por Bian et al. (2013a), foi analisado neste estudo. O alelo com maior número de nucleotídeos amplificado por este marcador (518 pb) já foi observado ser característico de genótipos sensíveis, enquanto o de menor tamanho (497 pb) foi relacionado à tolerância, sendo que este marcador explicou 66,9% da variação da tolerância para solos ácidos (Bian et al., 2013a). Na fenotipagem em solo (Figura 3.2), todos os genótipos com a média CRR igual ou superior ao controle positivo Antartica 01 (Murasakimochi, Dayton, BRS Mariana) amplificaram o alelo de 497 pb, enquanto que o controle negativo MN6021, possui o alelo de 518 pb. Assim, estes dados estão de acordo com os publicados por Bian et al. (2013a). Dentre os genótipos restantes dez apresentaram o alelo de 497 pb e seis o de 518 pb. Considerando as análises em hidroponia, não foi observada associação entre o marcador 21-indel e a tolerância ao Al^{3+} , visto que, dos 52 genótipos que apresentaram o alelo de 497 pb, 24 foram classificados como tolerantes, 24 como intermediários e 4 como sensíveis; e dentre os 13 genótipos com o alelo de 512 pb, seis foram classificados como tolerantes, 2 como intermediários e 5 como sensíveis, 6 tolerantes.

Quando analisados separadamente, a variabilidade da tolerância ao Al^{3+} nos genótipos da coleção nuclear não pôde ser relacionada a nenhum dos marcadores moleculares aqui avaliados. Mesmo assim, é evidente que há uma variação na tolerância ao Al^{3+} onde alguns genótipos brasileiros, Antarctica 01 e BRS Mariana, se comportam relativamente bem em solo enquanto outros, Antarctica 05 e PFC88212, apresentam baixa performance (Figura 3.2). A avaliação de exsudação de citrato poderia elucidar se esta diferença na performance de genótipos brasileiros deve-se a maior exsudação deste ácido orgânico, ou se está associada a outro mecanismo. Outros mecanismos de tolerância, que não o gene *HvAACT1*, podem explicar essa variabilidade, como é o caso da detoxificação de espécies reativas de oxigênio. Este mecanismo já foi reportado em aveia (*Avena sativa*) e batata (*Solanum tuberosum*), dentre outras espécies, onde os genótipos tolerantes ao alumínio apresentaram maior atividade do sistema antioxidante, sendo capazes de administrar eficientemente o estresse oxidativo, diminuindo o dano à membrana, assim auxiliando na manutenção da tolerância (Castilhos et al., 2011; Tabaldi et al., 2007).

Sugere-se que genótipos contendo a inserção de 1 kb no promotor façam parte do bloco de cruzamentos quando o objetivo for incrementar a tolerância ao alumínio em cevada. Estes marcadores moleculares relacionados à tolerância ao Al^{3+} poderiam então ser utilizados para seleção de genótipos de cevada brasileira que apresentem melhor desempenho em solo ácido. As possíveis melhorias no crescimento do sistema radicular, que podem ser selecionadas pelo uso destes marcadores, podem levar à melhor adaptação não apenas em relação a toxicidade ao Al^{3+} mas a ambientes com baixa precipitação (estresse hídrico) uma vez que um sistema radicular mais profundo pode absorver mais água. De fato, os genótipos de trigo mais produtivos sob condições de sequeiro e solo ácido no Estado de São Paulo também foram classificados como

tolerantes ao Al^{3+} (Camargo et al., 2003). Além disso, um alelo do gene *TaALMT1* normalmente relacionado à tolerância ao Al^{3+} também mostrou-se vantajoso em regiões de baixa precipitação na Austrália (Eagles et al., 2014).

Genótipos de cevada silvestre são ricas fontes de genes para adaptação tanto a estresses abióticos quanto estresses bióticos (Nevo et al., 2012), sendo assim, seis genótipos silvestres foram avaliados neste estudo. Estes genótipos silvestres apresentaram variabilidade quanto à tolerância ao Al^{3+} , já que Hspo PI 466338, Hspo PI 466394, Hspo PI 466396 foram considerados sensíveis em hidroponia, e Hspo PI 282590, Hspo 584 e Hspo PI 466381 foram classificados como tolerante. Porém nenhum desses genótipos apresentou desempenho superior ao controle positivo. Isso pode ser explicado pelo fato dos genótipos silvestres analisados terem sido coletados na região de Israel, onde os solos ácidos não são predominantes. Assim, para a tolerância ao Al^{3+} seria interessante avaliar genótipos provenientes de lugares onde o solo é ácido como, por exemplo, a Turquia. Observou-se também que os genótipos Hspo 584 e Hspo PI 466381, classificados como tolerantes em hidroponia, quando avaliados em solo, diferiram significativamente tanto do controle positivo quanto do negativo, evidenciando troca de classes quando comparados os dados de fenotipagem.

Esta mudança de classes, não ocorreu para Antartica 01, BRS Mariana, Dayton, Murasakimochi (tolerantes) e MN 6021 (sensível). Em relação às duas técnicas de fenotipagem aqui utilizadas, foi observada correlação de 52%. Entretanto, dados oriundos de diferentes métodos de fenotipagem nem sempre são positivamente correlacionados. Por exemplo, para *Medicago trunculata*, três métodos de *screening* para a tolerância ao Al^{3+} (hidroponia, solo e coloração de raiz) foram diferentes apresentando alterações nos rankings dos genótipos em cada método (Narasimhamoorthy et al., 2007). Da mesma forma, os resultados de hidroponia e meio

de cultura adicionado de areia foram diferentes para a determinação da tolerância ao Al^{3+} em soja (Villagarcia et al., 2001). Por outro lado, média e alta correlação para a avaliação da tolerância ao Al^{3+} em hidroponia e solo já foi relatada para aveia (Nava et al., 2015) e trigo (Baier et al., 1995), respectivamente.

A variação na resposta ao Al^{3+} dentro dos genótipos pode estar relacionada ao desempenho planta-planta como, por exemplo, o vigor da semente e, no caso da hidroponia, com a melhor adaptação ao meio. Esta variação também foi relatada para outras culturas, como a aveia, sendo que foi sugerido que a causa da variação poderia estar relacionada com a expressividade do gene de tolerância ao Al^{3+} , interações entre os mecanismos fisiológicos de exclusão ou detoxificação ao Al^{3+} e flutuações ambientais intrínsecas da própria metodologia (Hervé et al, 2013).

É importante salientar que, em hidroponia, normalmente a presença de Al^{3+} é o único fator estressante enquanto, em solo, ocorre uma combinação de diferentes estresses. O solo utilizado neste trabalho (Material suplementar 3.1) estava quimicamente pobre contendo baixos níveis de fósforo, potássio e matéria orgânica e uma alta concentração de alumínio (63,8% dos cátions). Além disso, na condição sem alumínio em solo, o pH estava próximo a neutralidade, portanto a tolerância a acidez também estava sendo avaliada. Enquanto em hidroponia, ambas as condições possuíam pH 4,0, sendo a variável apenas a presença do alumínio. Claramente as plantas lidaram com diferentes níveis de estresse entre a hidroponia e o solo. Assim, uma combinação de diferentes métodos de discriminação, como a utilizada neste trabalho, pode melhor representar a performance da planta.

O alinhamento da sequência da região transcrita do gene *HvAACT1* nos genótipos Antartica 01 e FM 404 (tolerantes) e MN 6021 e Paraí-I (sensíveis) com o genótipo Haruna Nijo (Material Suplementar 3.4 e 3.5) detectou 12 SNPs, sendo que

dois foram em regiões de introns, não interferindo na formação da proteína. Quatro destes SNPs não resultaram em alteração de aminoácido enquanto que alterações foram observadas nos outros seis. Destas, três foram substituições por aminoácidos da mesma classe enquanto que, nas restantes, a classe dos aminoácidos foi diferente (Material Suplementar 3.5). Ainda não há dados para esclarecer se estes SNPs causam algum prejuízo para a ação da proteína *HvAACT1*, sendo que apenas uma alteração de leucina para valina foi diferencial entre os genótipos tolerantes e sensíveis. Entretanto, sabe-se que a alta similaridade da região codificadora do gene *HvAACT1* parece ser comum (Furuwaka et al., 2007). Estes autores encontraram apenas quatro substituições de bases na região codificadora do gene *HvAACT1* de 10 diferentes genótipos de cevada. Quando comparados somente os genótipos Murasakimochi (tolerante) e Morex (sensível), apenas duas bases e um aminoácido foram diferentes (Furukawa et al., 2007). Alta similaridade na região codificadora de outros genes que codificam transportadores de ácidos orgânicos também já foi relatada como, por exemplo, para os genes *TaALMT1* (Sasaki et al., 2004) e *TaMATE1B* (Tovkach et al., 2013). Nestes casos, como em cevada, as evidências sugerem que a tolerância ao Al^{3+} está ligada a quantidade e local de expressão do gene e não a variação de sua região estrutural (Delhaize et al., 2012). Genótipos tolerantes apresentam expressão significativamente mais alta quando comparada a genótipos sensíveis (Delhaize et al., 2012), portanto avaliações de expressão podem ser adequadas na diferenciação de genótipos.

Em conclusão, diferentes estratégias, originadas dos dados obtidos aqui, podem ser consideradas por programas de melhoramento de cevada para aumentar a tolerância ao Al^{3+} . Controles de tolerância ao Al^{3+} que contenham a inserção de 1 kb na região promotora do gene *HvAACT1* devem ser considerados. É interessante avaliar a

incorporação desta inserção em genótipos brasileiros de cevada, uma vez que nenhum dos genótipos apresentou este alelo. Outra abordagem para estudos futuros seria avaliar os mecanismos de detoxificação de espécies reativas de oxigênio quando expostas ao alumínio. A linhagem transgênica L5 ou novas transgenias são alternativas a serem consideradas para que genótipos de cevada apresentem melhor desempenho em solo ácido uma vez que seu desempenho foi significativamente melhor que o melhor genótipo convencional. A utilização da transgenia pode evitar os problemas de perda de blocos gênicos que conferem adaptabilidade às condições ambientais do Brasil, já estabelecidos nos atuais genótipos, quando cruzados com genótipos distantes, o que afetaria a estabilidade e o rendimento. Por outro lado, a aceitação de transgênicos em produtos alimentícios continua limitada. Futuros estudos devem avaliar se a possível melhora na tolerância ao Al^{3+} em cevada brasileira também é acompanhada de uma maior assimilação de fósforo e tolerância ao estresse hídrico.

Agradecimentos

Agradecemos a Ambev (Companhia de Bebidas das Américas), Agrária e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro. Também somos gratos ao CNPT/Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Centro Nacional de Pesquisa de Trigo) e à UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) pelo suporte técnico. Somos gratos aos Drs. Peter Ryan e Emmanuel Delhaize por cederem sementes da linhagem transgênica L5, ao Dr. Luiz Fernando Revers e Vanessa Buffon por algumas análises de sequenciamento e a Bárbara Bremm, Helen Lazzari Estima e Guilherme Fraga pelo auxílio na coleta de alguns dados.

Material Suplementar

Materia Suplementar 3.1. Laudo da análise química dos solos utilizados neste estudo.

```

=====
EMPRESA-CNPJ:                                LAUDO DE ANÁLISE QUÍMICA DE SOLOS                                05/09/14 07:46:25
LABORATORIO DE SOLOS - Vinculado a PAVAS                                           V.0004
RUDOVIA BR-285, KM-294 - CAIXA POSTAL 451                                          FOLHA:001
99001-970 PASSO FUNDO, RS - FONE: 54-3316-5896
=====
PROJETO: 02.S011.991      --> CRIAÇÃO E DESENV DE CULT DE CERVADA CERVEJEIRA P/ DIFERENTES REG. PROD DO BRASIL
SUBPROJETO: 04          --> TOLERANCIA AO AL EM CERVADA: SECREÇÃO DE CITRATO E VAR ALELICO DO GENE HYAECT1
EXPERIMENTO: 001        --> CRESCIMENTO RELATIVO DA RAIZ DE CERVADA EM SOLO
DESCRIÇÃO AMOSTRAS: 002 --> CASA DE VEGETAÇÃO - COLETA:22/9/14
PESQ. RESP. EXPERIMENTO: --> JORGE F PEREIRA
DATA ENTRADA: 22/08/14   DATA ANÁLISE: 02/09/14
=====
REG      IDENTIFICACAO      Arg      Text      pH      Ind      P      K      NO      Al      Ca      Mg
      g/dm³
02974/14 SOLO ACIDO          500      2         4.2      4.4      5.0 B      16 B      26 B      58.5      9.7 B      4.8 B
02975/14 SOLO MEIO CORRIGIDO 400      2         4.4      4.7      3.9 B      16 B      25 MB     46.9      15.4 B     10.3 B
02976/14 SOLO CORRIGIDO     430      2         6.2      6.3      3.4 B      42 M      22 MB     0.0      39.3 A     47.6 A
=====
Interpretacao: MB = muito baixo; B = baixo; M = medio; A = alto; MA = muito alto; EA = excessivamente alto.
P em funcao de argila e K em funcao da CTC.
Metodos: Argila = densimetro; P e K = Mehlich-1; NO = combustao unida; Al, Ca e Mg = trocaval ao KCl 1 mol/L.

```


 Sérgio Wisthalter
 Resp. Tec., CREA 22146

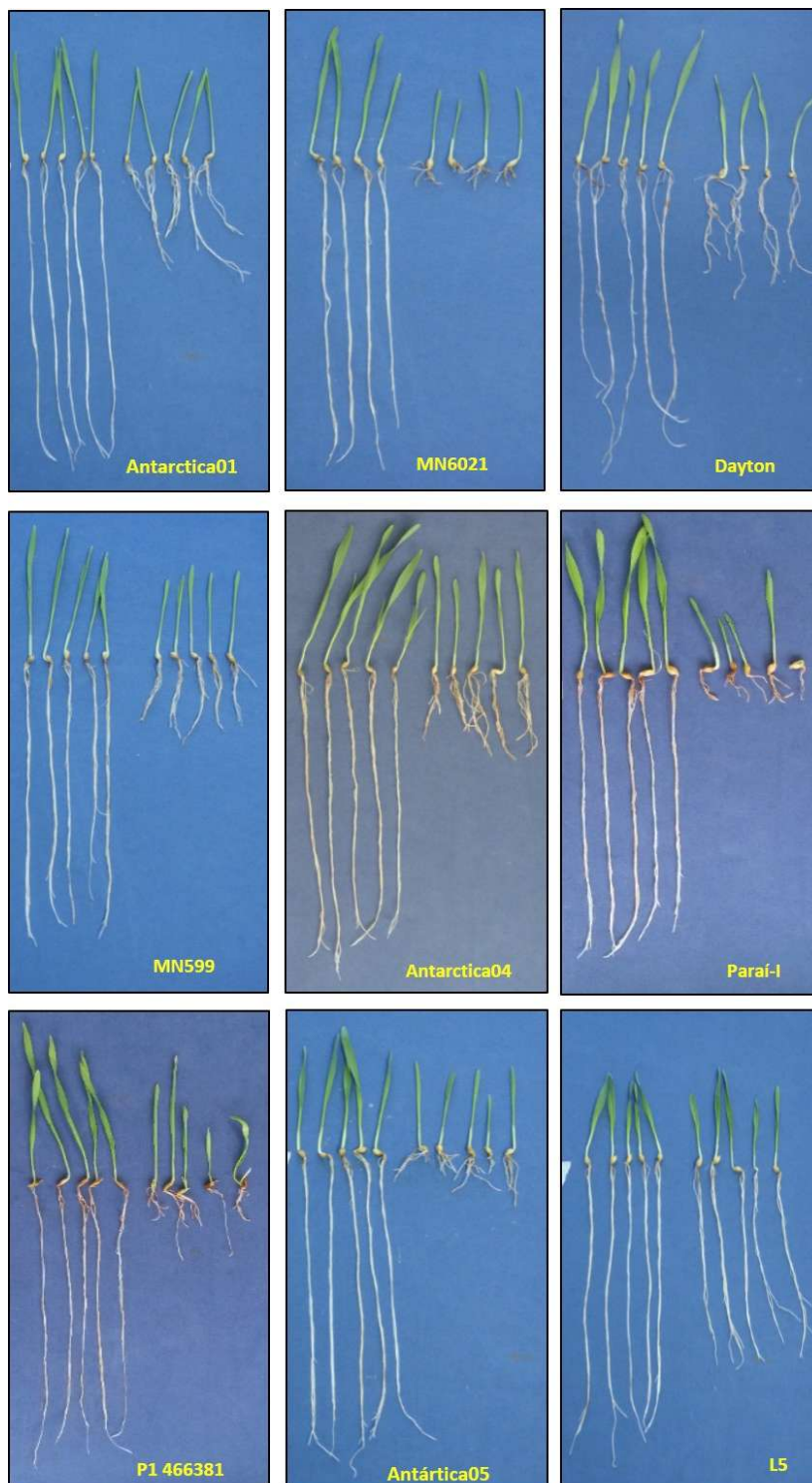
Continuação Materia Suplementar 3.1. Laudo da análise química dos solos utilizados neste estudo.

```

=====
ENBRAPA-CMPT                                LAUDO DE ANALISE QUIMICA DE SOLO                                05/09/14 09:46:40
LABORATORIO DE SOLOS - Viamalado e ROLAS                                           V.2004
RDOVIA BR-285, KM-294 - CAIXA POSTAL 451                                           FOLHA:002
99001-970 PASSO FUMADO, RS - FONE: 54-3316-5896
=====
PROJETO: 02.2011.991      ----> CRIACAO E DESENV DE CULT DE CEVADA CERVEJEIRA P/ DIFERENTES REG PROD DO BRASIL
SUBPROJETO: 04          ----> TOLERANCIA AD AL EM CEVADA: SECRECAO DE CITRATO E VAR ALELICA DO GENE HVAAC1
EXPERIMENTO: 001       ----> CRESCIMENTO RELATIVO DA BAIZ DE CEVADA EM SOLO
DESCRICAO AMOSTRAS: 002 ----> CASA DE VEGETACAO - COLETA:22/8/14
PESQ. RESP. EXPERIMENTO: ----> JORGE F PEREIRA
DATA ENTRADA: 22/08/14   DATA ANALISE: 02/09/14
=====
REG      IDENTIFICACAO      H+Al      CTC      CTCe      S      V      Ca      Mg      K      H+Al      Al
-----anoic/dm³-----      %      -----% de saturacao da CTC-----      %
02974/14 SOLO ACIDO      273.8      289.5      74.2      15.7      5.4      3.4      1.7      0.4      94.6      78.9
02975/14 SOLO MEIO CORRIGIDO 194.0      220.6      73.5      26.6      12.1      7.0      4.7      0.4      97.9      63.8
02976/14 SOLO CORRIGIDO  30.9      138.9      108.0      108.0      77.8      42.7      34.3      0.8      22.2      0.0
=====
H+Al = acidez total a pH 7, calculado com base no indice SMP.
CTC = CTC efetiva, no pH natural do solo.
S = soma de bases.
V = saturacao por bases.
Al = saturacao em relacao a CTCe.

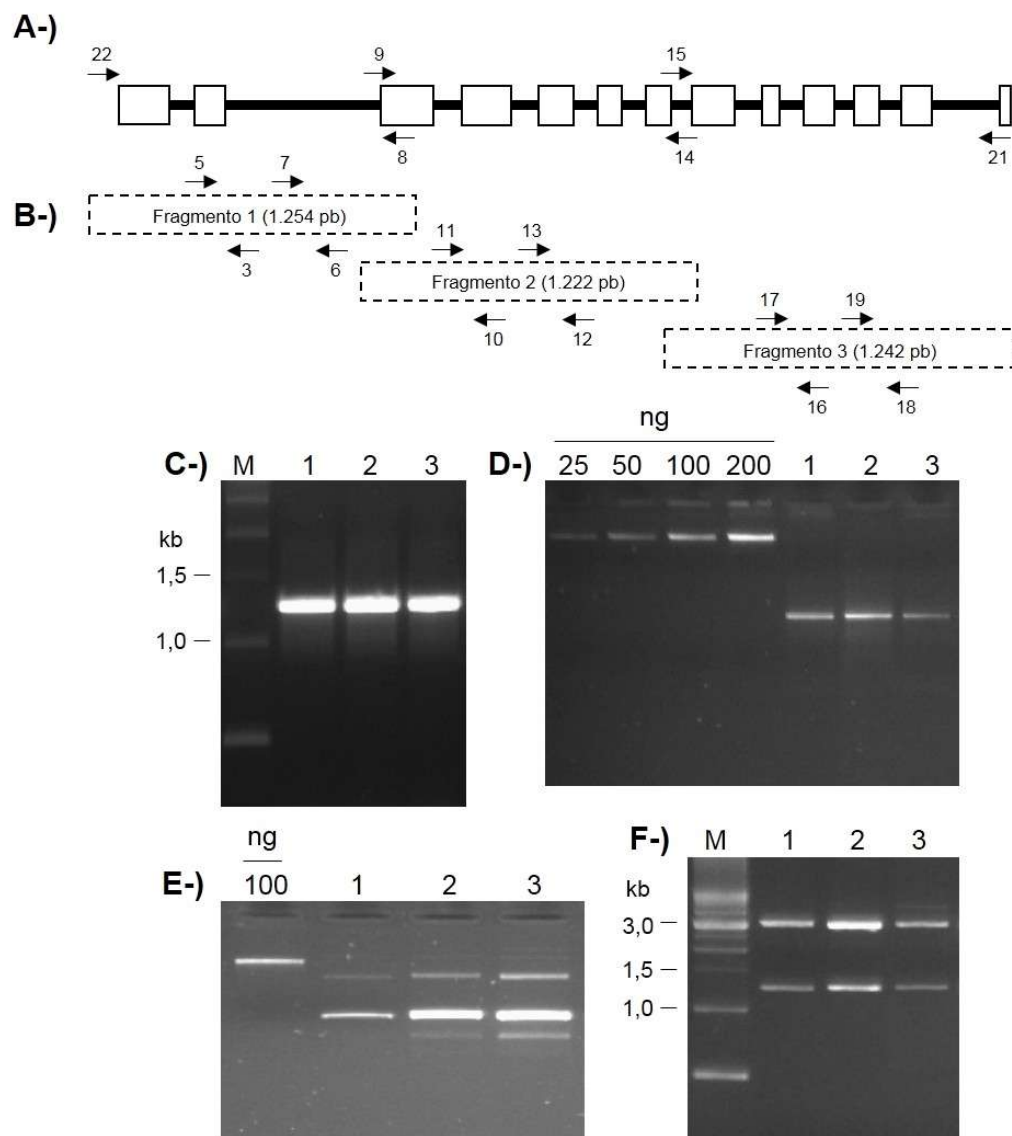
```

Material Suplementar 3.2. Imagens das plantas avaliadas no teste de curta duração em solo. Pelo menos um representante de cada classe (tolerante, intermediário e sensível) foi selecionado. Em cada imagem, as plantas à esquerda foram cultivadas em solo corrigido e aquelas à direita foram cultivadas em solo ácido.



Material Suplementar 3.3. Estratégia de sequenciamento do gene *HvAACT1*.

A-) Esquema do gene *HvAACT1*. Os blocos indicam éxons e as linhas representam introns. Setas acima representam os primers *foward* e setas abaixo representam os primers *reverse*. B-) O fragmento 1 foi obtido pela amplificação com os primers 22 e 8; o fragmento 2 com os primers 9 e 14, e o fragmento 3 com os primers 15 e 21. O fragmento 1 foi sequenciado com os primers 5 e 7 (*foward*) e 3 e 6 (*reverse*); o fragmento 2 foi sequenciado com os primers 11 e 13 (*foward*) e 10 e 12 (*reverse*); e o fragmento 3 foi sequenciado com os primers 17 e 19 (*foward*) e 16 e 18 (*reverse*). C-) Produto de PCR visualizado em gel de agarose 2%, indicando a presença dos três fragmentos representados em B. D-) Quantificação do produto precipitado. E-) Quantificação dos plasmídeos extraídos. F-) Clivagem dos plasmídeos com a enzima de restrição *EcoRI* para confirmação da clonagem. M- Marcador. 1, 2 e 3 indicam os fragmentos 1, 2 e 3.



Material Suplementar 3.4. Alinhamento da sequência do gene *HvAACT1* originada dos genótipos Antartica 01 e FM 404, tolerantes, MN 6021 e Paraí-I, sensíveis e Haruna Nijo. Bases destacadas em cinza representam SNPs. Letras maiúsculas representam os 13 éxons e letras minúsculas e em *itálico* representam os 12 introns. Asteriscos indicam nucleotídeos idênticos entre as sequências dos diferentes genótipos.

```

MN6021          ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGATGACCGGGGACAAGAAGTGGGTGGCCGTCGTC
Paraí-I         ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGATGACCGGGGACAAGAAGTGGGTGGCCGTCGTC
Haruna Nijo    ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGATGACCGGGGACAAGAAGTGGGTGGCCGTCGTC
FM404         ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGATGACCGGGGACAAGAAGTGGGTGGCCGTCGTC
Antarctica01  ATGGAGGAGGGCGCGGCCGCGAGCATGATGACCGGGGACAAGAAGTGGGTGGCCGTCGTC
*****

MN6021          GACGTCCCCGCAGACGCAGACGCTGCAACGGCGGCGAACGGACACGGCCCGGAGGAGAAG
Paraí-I         GACGTCCCCGCAGACGCAGACGCTGCAACGGCGGCGAACGGACACGGCCCGGAGGAGAAG
Haruna Nijo    GACGTCCCCGCAGACGCAGACGCTGCAACGGCGGCGAACGGACACGGCCCGGAGGAGAAG
FM404         GACGTCCCCGCAGACGCAGACGCTGCAACGGCGGCGAACGGACACGGCCCGGAGGAGAAG
Antarctica01  GACGTCCCCGCAGACGCAGACGCTGCAACGGCGGCGAACGGACACGGCCCGGAGGAGAAG
*****

MN6021          GCCGCGGAGGATCTGCCGGCGGCATTGTCCGGCTGCCCCAGGACGACGGGGCTCTACCTC
Paraí-I         GCCGCGGAGGATCTGCCGGCGGCATTGTCCGGCTGCCCCAGGACGACGGGGCTCTACCTC
Haruna Nijo    GCCGCGGAGGATCTGCCGGCGGCATTGTCCGGCTGCCCCAGGACGACGGGGCTCTACCTC
FM404         GCCGCGGAGGATCTGCCGGCGGCATTGTCCGGCTGCCCCAGGACGACGGGGCTCTACCTC
Antarctica01  GCCGCGGAGGATCTGCCGGCGGCATTGTCCGGCTGCCCCAGGACGACGGGGCTCTACCTC
*****

MN6021          TTTGTCATGAACATCAGgttcgttgatttcctttcacatactgtacgtcttacgagtgct
Paraí-I         TTTGTCATGAACATCAGgttcgttgatttcctttcacatactgtacgtcttacgagtgct
Haruna Nijo    TTTGTCATGAACATCAGgttcgttgatttcctttcacatactgtacgtcttacgagtgct
FM404         TTTGTCATGAACATCAGgttcgttgatttcctttcacatactgtacgtcttacgagtgct
Antarctica01  TTTGTCATGAACATCAGgttcgttgatttcctttcacatactgtacgtcttacgagtgct
*****

MN6021          ctcgtgttcgtcacgtctgatgtggtgaaactgtaccttgtcgcagGAGCGTCTTCAAGCT
Paraí-I         ctcgtgttcgtcacgtctgatgtggtgaaactgtaccttgtcgcagGAGCGTCTTCAAGCT
Haruna Nijo    ctcgtgttcgtcacgtctgatgtggtgaaactgtaccttgtcgcagGAGCGTCTTCAAGCT
FM404         ctcgtgttcgtcacgtctgatgtggtgaaactgtaccttgtcgcagGAGCGTCTTCAAGCT
Antarctica01  ctcgtgttcgtcacgtctgatgtggtgaaactgtaccttgtcgcagGAGCGTCTTCAAGCT
*****

MN6021          CGACGAGCTCGGGTCGGAGGTGCTGCGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCCCTGGCCGC
Paraí-I         CGACGAGCTCGGGTCGGAGGTGCTGCGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCCCTGGCCGC
Haruna Nijo    CGACGAGCTCGGGTCGGAGGTGCTGCGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCCCTGGCCGC
FM404         CGACGAGCTCGGGTCGGAGGTGCTGCGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCCCTGGCCGC
Antarctica01  CGACGAGCTCGGGTCGGAGGTGCTGCGCATTGCGGTGCCGGCGTCGCTTGCCCTGGCCGC
*****

MN6021          CGATCCCCTGGCTTCCTTGGTGGACACAGCATTTCATCGGCCGTCTAGgtaatctcacgac
Paraí-I         CGATCCCCTGGCTTCCTTGGTGGACACAGCATTTCATCGGCCGTCTAGgtaatctcacgac
Haruna Nijo    CGATCCCCTGGCTTCCTTGGTGGACACAGCATTTCATCGGCCGTCTAGgtaatctcacgac
FM404         CGATCCCCTGGCTTCCTTGGTGGACACAGCATTTCATCGGCCGTCTAGgtaatctcacgac
Antarctica01  CGATCCCCTGGCTTCCTTGGTGGACACAGCATTTCATCGGCCGTCTAGgtaatctcacgac
*****

MN6021          catccaaccaacatatctactatctgtttatgcaatgatgaagaagaacatctatgccca
Paraí-I         catccaaccaacatatctactatctgtttatgcaatgatgaagaagaacatctatgccca
Haruna Nijo    catccaaccaacatatctactatctgtttatgcaatgatgaagaagaacatctatgccca
FM404         catccaaccaacatatctactatctgtttatgcaatgatgaagaagaacatctatgccca
Antarctica01  catccaaccaacatatctactatctgtttatgcaatgatgaagaagaacatctatgccca
*****

```


MN6021 GCTGTTGGTGTTCCTATTGCCATATTTAACCAAGTCTCCAAAGTCTGTATCTACCCGCTT
 Parai-I GCTGTTGGTGTTCCTATTGCCATATTTAACCAAGTCTCCAAAGTCTGTATCTACCCGCTT
 Haruna Nijo GCTGTTGGTGTTCCTATTGCCATATTTAACCAAGTCTCCAAAGTCTGTATCTACCCGCTT
 FM404 GCTGTTGGTGTTCCTATTGCCATATTTAACCAAGTCTCCAAAGTCTGTATCTACCCGCTT
 Antarctica01 GCTGTTGGTGTTCCTATTGCCATATTTAACCAAGTCTCCAAAGTCTGTATCTACCCGCTT

MN6021 GTTAGCGTAACAACATCATTTCGTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAATACCTAGAA
 Parai-I GTTAGCGTAACAACATCATTTCGTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAATACCTAGAA
 Haruna Nijo GTTAGCGTAACAACATCATTTCGTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAATACCTAGAA
 FM404 GTTAGCGTAACAACATCATTTCGTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAATACCTAGAA
 Antarctica01 GTTAGCGTAACAACATCATTTCGTCGCTGAAGAAGATGCCATCATTAGCAAATACCTAGAA

MN6021 GAAAATAGCAGCCAAGACCTTGAGAAAGCCTCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATTTG
 Parai-I GAAAATAGCAGCCAAGACCTTGAGAAAGCCTCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATTTG
 Haruna Nijo GAAAATAGCAGCCAAGACCTTGAGAAAGCCTCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATTTG
 FM404 GAAAATAGCAGCCAAGACCTTGAGAAAGCCTCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATTTG
 Antarctica01 GAAAATAGCAGCCAAGACCTTGAGAAAGCCTCTCATGTGCATTAGATGCCTGCAATTTG

MN6021 CCCGCATCTGgtaccgagctcttgaatatacctggtttcaaatttccaatagtaattt
 Parai-I CCCGCATCTGgtaccgagctcttgaatatacctggtttcaaatttccaatagtaattt
 Haruna Nijo CCCGCATCTGgtaccgagctcttgaatatacctggtttcaaatttccaatagtaattt
 FM404 CCCGCATCTGgtaccgagctcttgaatatacctggtttcaaatttccaatagtaattt
 Antarctica01 CCCGCATCTGgtaccgagctcttgaatatacctggtttcaaatttccaatagtaattt

MN6021 gatttcacccaggactgaagcattctgcatgaatctctatgtggaactctgttttacag
 Parai-I gatttcacccaggactgaagcattctgcatgaatctctatgtggaactctgttttacag
 Haruna Nijo gatttcacccaggactgaagcattctgcatgaatctctatgtggaactctgttttacag
 FM404 gatttcacccaggactgaagcattctgcatgaatctctatgtggaactctgttttacag
 Antarctica01 gatttcacccaggactgaagcattctgcatgaatctctatgtggaactctgttttacag

MN6021 GTCCTGATACGCCAGTGTGTGCTAATTCTGCATACCCACAGAGTGTACTGATCTCTCAA
 Parai-I GTCCTGATACGCCAGTGTGTGCTAATTCTGCATACCCACAGAGTGTACTGATCTCTCAA
 Haruna Nijo GTCCTGATACGCCAGTGTGTGCTAATTCTGCATACCCACAGAGTGTACTGATCTCTCAA
 FM404 GTCCTGATACGCCAGTGTGTGCTAATTCTGCATACCCACAGAGTGTACTGATCTCTCAA
 Antarctica01 GTCCTGATACGCCAGTGTGTGCTAATTCTGCATACCCACAGAGTGTACTGATCTCTCAA

MN6021 ATCAAGGGTGCAAGAAAAGGTACATACCTTCCGTGACATCTGCTCTAATCGTTGGCTCAT
 Parai-I ATCAAGGGTGCAAGAAAAGGTACATACCTTCCGTGACATCTGCTCTAATCGTTGGCTCAT
 Haruna Nijo ATCAAGGGTGCAAGAAAAGGTACATACCTTCCGTGACATCTGCTCTAATCGTTGGCTCAT
 FM404 ATCAAGGGTGCAAGAAAAGGTACATACCTTCCGTGACATCTGCTCTAATCGTTGGCTCAT
 Antarctica01 ATCAAGGGTGCAAGAAAAGGTACATACCTTCCGTGACATCTGCTCTAATCGTTGGCTCAT

MN6021 TTCTCGGGCTAGTTCAGGCCGTGTTCCCTGATCTTTTCGGCGAAATTCGTAAGTGGCATCA
 Parai-I TTCTCGGGCTAGTTCAGGCCGTGTTCCCTGATCTTTTCGGCGAAATTCGTAAGTGGCATCA
 Haruna Nijo TTCTCGGGCTAGTTCAGGCCGTGTTCCCTGATCTTTTCGGCGAAATTCGTAAGTGGCATCA
 FM404 TTCTCGGGCTAGTTCAGGCCGTGTTCCCTGATCTTTTCGGCGAAATTCGTAAGTGGCATCA
 Antarctica01 TTCTCGGGCTAGTTCAGGCCGTGTTCCCTGATCTTTTCGGCGAAATTCGTAAGTGGCATCA

MN6021 TGGGTGTGAAACATgtagggtgttattaccttttgtatatgtccaagattatthttacttct
 Parai-I TGGGTGTGAAACATgtagggtgttattaccttttgtatatgtccaagattatthttacttct
 Haruna Nijo TGGGTGTGAAACATgtagggtgttattaccttttgtatatgtccaagattatthttacttct
 FM404 TGGGTGTGAAACATgtagggtgttattaccttttgtatatgtccaagattatthttacttct
 Antarctica01 TGGGTGTGAAACATgtagggtgttattaccttttgtatatgtccaagattatthttacttct

MN6021 *ctagtttcttgctatccatgatgctaattcatattttcatctacatcacactattccagG*
 Parai-I *ctagtttcttgctatccatgatgctaattcatattttcatctacatcacactattccagG*
 Haruna Nijo *ctagtttcttgctatccatgatgctaattcatattttcatctacatcacactattccagG*
 FM404 *ctagtttcttgctatccatgatgctaattcatattttcatctacatcacactattccagG*
 Antarctica01 *ctagtttcttgctatccatgatgctaattcatattttcatctacatcacactattccagG*

MN6021 ACTCACCAGATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACGATCAGATCACTGGGCGCTCCTG
 Parai-I ACTCACCAGATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACGATCAGATCACTGGGCGCTCCTG
 Haruna Nijo ACTCACCAGATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACGATCAGATCACTGGGCGCTCCTG
 FM404 ACTCACCAGATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACGATCAGATCACTGGGCGCTCCTG
 Antarctica01 ACTCACCAGATGCTAGAACCCGCGGTTTCGATACCTAACGATCAGATCACTGGGCGCTCCTG

MN6021 CTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGCGTTTTCCGGGGCTTCAAAGATACAAAGACAC
 Parai-I CTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGCGTTTTCCGGGGCTTCAAAGATACAAAGACAC
 Haruna Nijo CTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGCGTTTTCCGGGGCTTCAAAGATACAAAGACAC
 FM404 CTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGCGTTTTCCGGGGCTTCAAAGATACAAAGACAC
 Antarctica01 CTGTTCTCCTGTCTTTGGCAATGCAGGGCGTTTTCCGGGGCTTCAAAGATACAAAGACAC

MN6021 CGTTGTATGCTACTGgtaagaatatctggtgatgtcctatataggtttctgttttagga
 Parai-I CGTTGTATGCTACTGgtaagaatatctggtgatgtcctatataggtttctgttttagga
 Haruna Nijo CGTTGTATGCTACTGgtaagaatatctggtgatgtcctatataggtttctgttttagga
 FM404 CGTTGTATGCTACTGgtaagaatatctggtgatgtcctatataggtttctgttttagga
 Antarctica01 CGTTGTATGCTACTGgtaagaatatctggtgatgtcctatataggtttctgttttagga

MN6021 *agaggataattgaagagaagcatcactgacatttccttacaatttcttttgagTG*
 Parai-I *agaggataattgaagagaagcatcactgacatttccttacaatttcttttgagTG*
 Haruna Nijo *agaggataattgaagagaagcatcactgacatttccttacaatttcttttgagTG*
 FM404 *agaggataattgaagagaagcatcactgacatttccttacaatttcttttgagTG*
 Antarctica01 *agaggataattgaagagaagcatcactgacatttccttacaatttcttttgagTG*

MN6021 GGGATGCAACAAATATCATCCTAGATCCAATTTGATGTTTGTCTGCCACATGGGTGTCA
 Parai-I GGGATGCAACAAATATCATCCTAGATCCAATTTGATGTTTGTCTGCCACATGGGTGTCA
 Haruna Nijo GGGATGCAACAAATATCATCCTAGATCCAATTTGATGTTTGTCTGCCACATGGGTGTCA
 FM404 GGGATGCAACAAATATCATCCTAGATCCAATTTGATGTTTGTCTGCCACATGGGTGTCA
 Antarctica01 GGGATGCAACAAATATCATCCTAGATCCAATTTGATGTTTGTCTGCCACATGGGTGTCA

MN6021 CTGGTGCAGCAGTTGCTCATGTCATTTCCCAgtaggttttaccgctacaattagcatctg
 Parai-I CTGGTGCAGCAGTTGCTCATGTCATTTCCCAgtaggttttaccgctacaattagcatctg
 Haruna Nijo CTGGTGCAGCAGTTGCTCATGTCATTTCCCAgtaggttttaccgctacaattagcatctg
 FM404 CTGGTGCAGCAGTTGCTCATGTCATTTCCCAgtaggttttaccgctacaattagcatctg
 Antarctica01 CTGGTGCAGCAGTTGCTCATGTCATTTCCCAgtaggttttaccgctacaattagcatctg

MN6021 *cagcctatgtgtttcagtgatcagtcctgtcctaacaacgctccattccatctttgcctt*
 Parai-I *cagcctatgtgtttcagtgatcagtcctgtcctaacaacgctccattccatctttgcctt*
 Haruna Nijo *cagcctatgtgtttcagtgatcagtcctgtcctaacaacgctccattccatctttgcctt*
 FM404 *cagcctatgtgtttcagtgatcagtcctgtcctaacaacgctccattccatctttgcctt*
 Antarctica01 *cagcctatgtgtttcagtgatcagtcctgtcctaacaacgctccattccatctttgcctt*

MN6021 *cagGTACCTGATAACTATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCC*
 Parai-I *cagGTACCTGATAACTATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCC*
 Haruna Nijo *cagGTACCTGATAACTATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCC*
 FM404 *cagGTACCTGATAACTATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCC*
 Antarctica01 *CAGGTACCTGATAACTATGATCTTGATATGTCGGCTCGTCCAGCAAGTTGATGTTATCCC*

MN6021 ACCGAGCCTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGTTGTGgtgagatactgttggg
 Parai-I ACCGAGCCTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGTTGTGgtgagatactgttggg
 Haruna Nijo ACCGAGCCTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGTTGTGgtgagatactgttggg
 FM404 ACCGAGCCTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGTTGTGgtgagatactgttggg
 Antarctica01 ACCGAGCCTTAAATCCCTGAAATTTGGGCGGTTTCTTGGTTGTGgtgagatactgttggg

MN6021 atcctgaaactggataaacatctctcactgggtcccctggaaatggctctgaaaatgctctg
 Parai-I atcctgaaactggataaacatctctcactgggtcccctggaaatggctctgaaaatgctctg
 Haruna Nijo atcctgaaactggataaacatctctcactgggtcccctggaaatggctctgaaaatgctctg
 FM404 atcctgaaactggataaacatctctcactgggtcccctggaaatggctctgaaaatgctctg
 Antarctica01 atcctgaaactggataaacatctctcactgggtcccctggaaatggctctgaaaatgctctg

MN6021 ttttcttcagGATTCCTGCTGCTCGCAAGGGTGGTAGCGGTGACGTTCTGTGTCACTCTG
 Parai-I ttttcttcagGATTCCTGCTGCTCGCAAGGGTGGTAGCGGTGACGTTCTGTGTCACTCTG
 Haruna Nijo ttttcttcagGATTCCTGCTGCTCGCAAGGGTGGTAGCGGTGACGTTCTGTGTCACTCTG
 FM404 ttttcttcagGATTCCTGCTGCTCGCAAGGGTGGTAGCGGTGACGTTCTGTGTCACTCTG
 Antarctica01 ttttcttcagGATTCCTGCTGCTCGCAAGGGTGGTAGCGGTGACGTTCTGTGTCACTCTG

MN6021 GCGTCGTCGCTGGCTGCCCGCAGCGACCTACCATCATGGCGCCTTCCAGATCTGCTGC
 Parai-I GCGTCGTCGCTGGCTGCCCGCAGCGACCTACCATCATGGCGCCTTCCAGATCTGCTGC
 Haruna Nijo GCGTCGTCGCTGGCTGCCCGCAGCGACCTACCATCATGGCGCCTTCCAGATCTGCTGC
 FM404 GCGTCGTCGCTGGCTGCCCGCAGCGACCTACCATCATGGCGCCTTCCAGATCTGCTGC
 Antarctica01 GCGTCGTCGCTGGCTGCCCGCAGCGACCTACCATCATGGCGCCTTCCAGATCTGCTGC
 * * *****

MN6021 CAGCTCTGGCTCGCGACGTCACTTCTCGCCGATGGATTGGCCGTTGCTGGACAGgtcaga
 Parai-I CAGCTCTGGCTCGCGACGTCACTTCTCGCCGATGGATTGGCCGTTGCTGGACAGgtcaga
 Haruna Nijo CAGCTCTGGCTCGCGACGTCACTTCTCGCCGATGGATTGGCCGTTGCTGGACAGgtcaga
 FM404 CAGCTCTGGCTCGCGACGTCACTTCTCGCCGATGGATTGGCCGTTGCTGGACAGgtcaga
 Antarctica01 CAGCTCTGGCTCGCGACGTCACTTCTCGCCGATGGATTGGCCGTTGCTGGACAGgtcaga

MN6021 ccgccaatcatattcccataatatttattggtccatgaggaaacagcttcagttgagacta
 Parai-I ccgccaatcatattcccataatatttattggtccatgaggaaacagcttcagttgagacta
 Haruna Nijo ccgccaatcatattcccataatatttattggtccatgaggaaacagcttcagttgagacta
 FM404 ccgccaatcatattcccataatatttattggtccatgaggaaacagcttcagttgagacta
 Antarctica01 ccgccaatcatattcccataatatttattggtccatgaggaaacagcttcagttgagacta

MN6021 gagagtgtgctgaactgggggtgtgttcgagGACAGTCTCGCAAGCG
 Parai-I gagagtgtgctgaactgggggtgtgttcgagGACAGTCTCGCAAGCG
 Haruna Nijo gagagtgtgctgaactgggggtgtgttcgagGACAGTCTCGCAAGCG
 FM404 gagagtgtgctgaactgggggtgtgttcgagGACAGTCTCGCAAGCG
 Antarctica01 gagagtgtgctgaactgggggtgtgttcgagGACAGTCTCGCAAGCG

MN6021 CGTTCGCCAAGAACGATCACAGAAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTCTGCAGgttt
 Parai-I CGTTCGCCAAGAACGATCACAGAAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTCTGCAGgttt
 Haruna Nijo CGTTCGCCAAGAACGATCACAGAAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTCTGCAGgttt
 FM404 CGTTCGCCAAGAACGATCACAGAAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTCTGCAGgttt
 Antarctica01 CGTTCGCCAAGAACGATCACAGAAGGTGATTGCCGCGACCTCTCGTGTCTGCAGgttt

MN6021 gtgaccgttgattccttgccactctccatataatattttcccagagtttcaattcattgaga
 Parai-I gtgaccgttgattccttgccactctccatataatattttcccagagtttcaattcattgaga
 Haruna Nijo gtgaccgttgattccttgccactctccatataatattttcccagagtttcaattcattgaga
 FM404 gtgaccgttgattccttgccactctccatataatattttcccagagtttcaattcattgaga
 Antarctica01 gtgaccgttgattccttgccactctccatataatattttcccagagtttcaattcattgaga

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
agagttaatggtgacctctttctctttgcagCTGAGCATCGTTCTGGGGATGGGCCTGAC
agagttaatggtgacctctttctctttgcagCTGAGCATCGTTCTGGGGATGGGCCTGAC
agagttaatggtgacctctttctctttgcagCTGAGCATCGTTCTGGGGATGGGCCTGAC
agagttaatggtgacctctttctctttgcagCTGAGCATCGTTCTGGGGATGGGCCTGAC

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
 GGTGGTGCCTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCTGGCGTTTTACAGAGGGACGCAGACGT
 GGTGGTGCCTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCTGGCGTTTTACAGAGGGACGCAGACGT
 GGTGGTGCCTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCTGGCGTTTTACAGAGGGACGCAGACGT
 GGTGGTGCCTGGTCTCTTCATGAAGTTCGGCGCTGGCGTTTTACAGAGGGACGCAGACGT

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
 GATCAACGTCATCCACAAAGGCATCCCgtaagaaacctggctgtacaaaacatgagaa
 GATCAACGTCATCCACAAAGGCATCCCgtaagaaacctggctgtacaaaacatgagaa
 GATCAACGTCATCCACAAAGGCATCCCgtaagaaacctggctgtacaaaacatgagaa
 GATCAACGTCATCCACAAAGGCATCCCgtaagaaacctggctgtacaaaacatgagaa
 **** *****

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
 tgccatacagagattcagacactgaaaatagctctgtttgggggtgttcagTTTGTCGCC
 tgccatacagagattcagacactgaaaatagctctgtttgggggtgttcagTTTGTCGCC
 tgccatacagagattcagacactgaaaatagctctgtttgggggtgttcagTTTGTCGCC
 tgccatacagagattcagacactgaaaatagctctgtttgggggtgttcagTTTGTCGCC

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
 GGCACGCAGACGATAAACGCCCTCGCGTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAA
 GGCACGCAGACGATAAACGCCCTCGCGTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAA
 GGCACGCAGACGATAAACGCCCTCGCGTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAA
 GGCACGCAGACGATAAACGCCCTCGCGTTCGTGTTTCGACGGCATCAACTTCGGAGCACAA

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
 GACTACCTACTCTGCATACTCCATGgtaccgtagaccctttcacagcagcatcaatat
 GACTACCTACTCTGCATACTCCATGgtaccgtagaccctttcacagcagcatcaatat
 GACTACCTACTCTGCATACTCCATGgtaccgtagaccctttcacagcagcatcaatat
 GACTACCTACTCTGCATACTCCATGgtaccgtagaccctttcacagcagcatcaatat

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
 ttagctctgaaacttgtcccagagactgaaattggatcccatggaaaccttcagGTTGGG
 ttagctctgaaacttgtcccagagactgaaattggatcccatggaaaccttcagGTTGGG
 ttagctctgaaacttgtcccagagactgaaattggatcccatggaaaccttcagGTTGGG
 ttagctctgaaacttgtcccagagactgaaattggatcccatggaaaccttcagGTTGGG

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
 GTGGCGTCCATATCGATAACCGTGCCTGGTGTACCTCTCGGCGCACAAAGGGATTATCGGC
 GTGGCGTCCATATCGATAACCGTGCCTGGTGTACCTCTCGGCGCACAAAGGGATTATCGGC
 GTGGCGTCCATATCGATAACCGTGCCTGGTGTACCTCTCGGCGCACAAAGGGATTATCGGC
 GTGGCGTCCATATCGATAACCGTGCCTGGTGTACCTCTCGGCGCACAAAGGGATTATCGGC

MN6021
 Parai-I
 Haruna Nijo
 FM404
 Antarctica01
 ATATGGGTCGCATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCGTAGCTAGCACCTGGAGgtat
 ATATGGGTCGCATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCGTAGCTAGCACCTGGAGgtat
 ATATGGGTCGCATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCGTAGCTAGCACCTGGAGgtat
 ATATGGGTCGCATTGACCATCTACATGAGCCTCAGGACCGTAGCTAGCACCTGGAGgtat

MN6021 *gaacgatactatgctcctccaccctacccccacccccctcctcatcacttcatcagtacc*
 Paraí-I *gaacgatactatgctcctccaccctacccccacccccctcctcatcacttcatcagtacc*
 Haruna Nijo *gaacgatactatgctcctccaccctacccccacccccctcctcatcacttcatcagtacc*
 FM404 *gaacgatactatgctcctccaccctacccccacccccctcctcatcacttcatcagtacc*
 Antartica01 *gaacgatactatgctcctccaccctacccccacccccctcctcatcacttcatcagtacc*

MN6021 *tccatttcttcggtagccccgaccctttttagtagcgcgctgacaggaggaatgttttca*
 Paraí-I *tccatttcttcggtagccccgaccctttttagtagcgcgctgacaggaggaatgttttca*
 Haruna Nijo *tccatttcttcggtagccccgaccctttttagtagcgcgctgacaggaggaatgttttca*
 FM404 *tccatttcttcggtagccccgaccctttttagtagcgcgctgacaggaggaatgttttca*
 Antartica01 *tccatttcttcggtagccccgaccctttttagtagcgcgctgacaggaggaatgttttca*

MN6021 *aatcctgctgaaattgaactgttctatgtgaaacccttgcaaaatatgtgttctataatc*
 Paraí-I *aatcctgctgaaattgaactgttctatgtgaaacccttgcaaaatatgtgttctataatc*
 Haruna Nijo *aatcctgctgaaattgaactgttctatgtgaaacccttgcaaaatatgtgttctataatc*
 FM404 *aatcctgctgaaattgaactgttctatgtgaaacccttgcaaaatatgtgttctataatc*
 Antartica01 *aatcctgctgaaattgaactgttctatgtgaaacccttgcaaaatatgtgttctataatc*

MN6021 *ttcaattggggctcatcaaggtttttagtactctggtgtctgcagGATGGGGCTGCGAGA*
 Paraí-I *ttcaattggggctcatcaaggtttttagtactctggtgtctgcagGATGGGGCTGCGAGA*
 Haruna Nijo *ttcaattggggctcatcaaggtttttagtactctggtgtctgcagGATGGGGCTGCGAGA*
 FM404 *ttcaattggggctcatcaaggtttttagtactctggtgtctgcagGATGGGGCTGCGAGA*
 Antartica01 *ttcaattggggctcatcaaggtttttagtactctggtgtctgcagGATGGGGCTGCGAGA*

MN6021 GGGCCATGGGTTTTCTCCGGAAGTGA
 Paraí-I GGGCCATGGGTTTTCTCCGGAAGTGA
 Haruna Nijo GGGCCATGGGTTTTCTCCGGAAGTGA
 FM404 GGGCCATGGGTTTTCTCCGGAAGTGA
 Antartica01 GGGCCATGGGTTTTCTCCGGAAGTGA

Material Suplementar 3.5. Alinhamento da sequência da proteína HvAACT1 originada dos genótipos Antartica 01 e FM 404, tolerantes, MN 6021 e Paraí-I, sensíveis e Haruna Nijo. Os aminoácidos destacados em cinza representam as diferenças entre os genótipos. Asteriscos indicam aminoácidos idênticos entre as sequências dos diferentes genótipos. Dois pontos representam aminoácidos do mesmo grupo.

```

MN6021      MEEGAAASMMTGDKKWVAVVDVPADADAATAANGHGPEEKAAEDLPAALSGCPRTTGLYL
Paraí-I     MEEGAAASMMTGDKKWVAVVDVPADADAATAANGHGPEEKAAEDLPAALSGCPRTTGLYL
Haruna nijo MEEGAAASMMTGDKKWVAVVDVPADADAATAANGHGPEEKAAEDLPAALSGCPRTTGLYL
Antarctica01 MEEGAAASMMTGDKKWVAVVDVPADADAATAANGHGPEEKAAEDLPAALSGCPRTTGLYL
FM404      MEEGAAASMMTGDKKWVAVVDVPADADAATAANGHGPEEKAAEDLPAALSGCPRTTGLYL
*****

MN6021      FVMNIRSVFKLDELGSEVLRIAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIAI
Paraí-I     FVMNIRSVFKLDELGSEVLRIAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIAI
Haruna nijo FVMNIRSVFKLDELGSEVLRIAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIAI
Antarctica01 FVMNIRSVFKLDELGSEVLRIAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIAI
FM404      FVMNIRSVFKLDELGSEVLRIAVPASLALAADPLASLVDTAFIGRLGSVEIAAVGVSTIAI
*****

MN6021      FNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENSSQDLEKASHVHSDACNLPASGPDTP
Paraí-I     FNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENSSQDLEKASHVHSDACNLPASGPDTP
Haruna nijo FNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENSSQDLEKASHVHSDACNLPASGPDTP
Antarctica01 FNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENSSQDLEKASHVHSDACNLPASGPDTP
FM404      FNQVSKVCIYPLVSVTTSFVAEEDAIISKYLEENSSQDLEKASHVHSDACNLPASGPDTP
*****

MN6021      VCANSCIPTECTDLSNQGCKKRYIPSVTSALIVGSFGLGLVQAVFLIFSAKFVLGIMGVKH
Paraí-I     VCANSCIPTECTDLSNQGCKKRYIPSVTSALIVGSFGLGLVQAVFLIFSAKFVLGIMGVKH
Haruna nijo VCANSCIPTECTDLSNQGCKKRYIPSVTSALIVGSFGLGLVQAVFLIFSAKFVLGIMGVKH
Antarctica01 VCANSCIPTECTDLSNQGCKKRYIPSVTSALIVGSFGLGLVQAVFLIFSAKFVLGIMGVKH
FM404      VCANSCIPTECTDLSNQGCKKRYIPSVTSALIVGSFGLGLVQAVFLIFSAKFVLGIMGVKH
*****

MN6021      DSPMLEPAVRYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTKTPLYATVVGDATNIIIDPILM
Paraí-I     DSPMLEPAVRYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTKTPLYATVVGDATNIIIDPILM
Haruna nijo DSPMLEPAVRYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTKTPLYATVVGDATNIIIDPILM
Antarctica01 DSPMLEPAVRYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTKTPLYATVVGDATNIIIDPILM
FM404      DSPMLEPAVRYLTIIRSLGAPAVLLSLAMQGVFRGFKDTKTPLYATVVGDATNIIIDPILM
*****

MN6021      FVCHMGVTGA AVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPP SLKSLKFGREFLGCGFLLLARVE
Paraí-I     FVCHMGVTGA AVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPP SLKSLKFGREFLGCGFLLLARVV
Haruna nijo FVCHMGVTGA AVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPP SLKSLKFGREFLGCGFLLLARVV
Antarctica01 FVCHMGVTGA AVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPP SLKSLKFGREFLGCGFLLLARVV
FM404      FVCHMGVTGA AVAHVISQYLITMILICRLVQQVDVIPP SLKSLKFGREFLGCGFLLLARVV
*****

MN6021      AVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQQLWLATSLADGLAVAGQAVLASAFKNDHKK
Paraí-I     AVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQQLWLATSLADGLAVAGQAVLASAFKNDHKK
Haruna nijo AVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQQLWLATSLADGLAVAGQAVLASAFKNDHKK
Antarctica01 AVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQQLWLATSLADGLAVAGQAVLASAFKNDHKK
FM404      AVTFCVTLASSLAARDGPTIMAAFQICQQLWLATSLADGLAVAGQAVLASAFKNDHKK
*****

MN6021      VIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGGLFMKFGAGVFTRDADVINV IHKGI PFVAGTQTINAL
Paraí-I     VIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGGLFMKFGAGVFTRDADVINV IHKGI PFVAGTQTINAL
Haruna nijo VIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGGLFMKFGAGVFTRDADVINV IHKGI PFVAGTQTINAL
Antarctica01 VIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGGLFMKFGAGVFTRDADVINV IHKGI PFVAGTQTINAL
FM404      VIAATSRVLQLSIVLGMGLTVVLGGLFMKFGAGVFTRDADVINV IHKGI PFVAGTQTINAL
*****

```

```
MN6021      AFVFDGINFGAQDYTYSAYSMVGVASISIPCLVYLSAHKGFIGIWVALTIYMSLRTVAST
Paraí-I     AFVFDGINFGAQDYTYSAYSMVGVASISIPCLVYLSAHKGFIGIWVALTIYMSLRTVAST
Haruna nijo AFVFDGINFGAQDYTYSAYSMVGVASISIPCLVYLSAHKGFIGIWVALTIYMSLRTVAST
Antarctica01 AFVFDGINFGAQDYTYSAYSMVGVASISIPCLVYLSAHKGFIGIWVALTIYMSLRTVAST
FM404       AFVFDGINFGAQDYTYSAYSMVGVASISIPCLVYLSAHKGFIGIWVALTIYMSLRTVAST
*****
```

```
MN6021      WRMGAARGPWVFLRK
Paraí-I     WRMGAARGPWVFLRK
Haruna nijo WRMGAARGPWVFLRK
Antarctica01 WRMGAARGPWVFLRK
FM404       WRMGAARGPWVFLRK
*****
```

Referências

- Baier, A.C., Somers, D.J., Gusiufson, J.P., 1995. Aluminium tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. *Plant Breeding* 114, 291-296.
- Bian, M., Waters, I., Broughton, S., Zhang, X. Q., Zhou, M., Lance, R., Sun, D., Li, C., 2013a. Development of gene-specific markers for acid soil/aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol. Breed.* 32, 155-164.
- Bian, M., Zhou, M., Sun, D., Li, C, 2013b. Molecular approaches unravel the mechanism of acid soil tolerance in plants. *Crop. J.* 1, 91-104,
- Brown, A.H.D., 1989. Core collections: a practical approach to genetic resources management. *Genome* 31, 818-824.
- Camargo, C.D.O., Oliveira, O.D., 1981. Tolerância de cultivares de trigo a diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva e no solo. *Bragantia* 40, 21-31.
- Camargo, C.D.O., Ferreira-Filho, A.W.P., Ramos, L.D.S., Pettinelli-Júnior, A., Castro, J.D., Felício, J.C., Salomon, M.V., Mistro, J.C., 2003. Comportamento de linhagens diaplóides de trigo em dois locais do Estado de São Paulo. *Bragantia* 62, 217-226.
- Castilhos, G., Farias, J.G., Schneider, A.B., Oliveira, P.H., Nicoloso, F.T., Schetinger, M.R.C., Delatorre, C.A., 2011. Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 74, 114-121.
- Delhaize, E., Ryan, P.R., Hebb, D.M., Yamamoto, Y., Sasaki, T., Matsumoto, H., 2004. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15249-15254.
- Delhaize, E., Taylor, P., Hocking, P.J., Simpson, R.J., Ryan, P.R., Richardson, A.E., 2009. Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) expressing the wheat aluminium resistance gene (*TaALMT1*) shows enhanced phosphorus nutrition and grain production when grown on an acid soil. *Plant Biotechnol. J.* 7, 391-400.
- Delhaize, E., Ma, J.F., Ryan, P.R., 2012. Transcriptional regulation of aluminium tolerance genes. *Trends Plant Sci.* 17, 341-348.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.
- Eagles, H.A., Cane, K., Trevaskis, B., Vallance, N., Eastwood, R.F., Gororo, N.N., Kuchel, H., Martin, P.J., 2014. *Ppd1*, *Vrn1*, *ALMT1* and *Rht* genes and their effects on grain yield in lower rainfall environments in southern Australia. *Crop Pasture Sci.* 65, 159-170.
- Foy, C.D., 1983. The physiology of plant adaptation to mineral stress. *Iowa State J. Res.* 57, 355-391.

Frankel, O.H., 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: Arber, W., Llimensee, K., Peacock, W.J., Starlinger, P. Genetic Manipulation (Eds), Impact on Man and Society. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.161-170.

Fujii, M., Yokosho, K., Yamaji, N., Saisho, D., Yamane, M., Takahashi, H., Sato, K., Nakazono, M., Ma, J.F., 2012. Acquisition of aluminium tolerance by modification of a single gene in barley. *Nat. Commun.* 3, 1-9.

Furukawa, J., Yamaji, N., Wang, H., Mitani, N., Murata, Y., Sato, K., Katsuhara, M., Takeda K., Ma, J. F., 2007. An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.* 48, 1081-1091.

Gustafsson, J.P., 2010. Visual MINTEQ, version 3.0: a window version of MINTEQA2, version 4.0. Disponível em: <<http://www.lwr.kth.se/english/OurSoftware/Vminteq>. 2010.> Acesso em: 13 jan. 2015

Hervé, C.B., Calai, F.A., Nava, I.C., Delatorre, C.A., 2013. Tolerância ao alumínio tóxico em germoplasma brasileiro elite de aveia. *Ciênc.Rural* 43, 1364-1370.

Kinraide, T.B., 1997. Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminium. *J. Exp. Bot.* 48, 1115-1124.

Kochian, L.V, Hoekenga, O.A., Piñeros, M.A., 2004. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 459-493.

Leroy, T., Bellis, F., Legnate, H., Musoli, P., Kalonji, A., Solórzano, R. G.L., Cubry, P., 2014. Developing core collections to optimize the management and the exploitation of diversity of the coffee *Coffea canephora*. *Genetica* 142, 185-199.

Liang, W., Dondini, L., De Franceschi, P., Paris, R., Sansavini, S., & Tartarini, S., 2014. Genetic diversity, population structure and construction of a core collection of apple cultivars from Italian germplasm. *Plant Mol Biol Rep.* 33, 458-473.

Liu K., Muse S.V., 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21, 2128-2129.

Ma, J.F., Nagao, S., Sato, K., Ito, H., Furukawa, J., Takeda, K., 2004. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. *J. Exp. Bot.* 55, 1335-1341.

Ma, J.F., Chen, Z. C., Shen, R. F., 2014. Molecular mechanisms of Al tolerance in gramineous plants. *Plant Soil* 381, 1-12.

Minella, E., 2001. Desafios e potencialidades do melhoramento genético de cevada no Brasil. In: Reunião Anual de Pesquisa de Cevada, 21. 2001. Guarapuava. Anais e Atas. Embrapa Trigo, Passo Fundo, BR, pp. 31-40

- Minella, E., Sorrells, M.E., 1997. Inheritance and chromosome location of Alp, a gene controlling aluminium tolerance in 'Dayton' barley. *Plant Breeding* 116, 465-469.
- Narasimhamoorthy, B., Blancaflor, E.B., Bouton, J.H., Payton, M.E., Sledge, M.K., 2007. A comparison of hydroponics, soil, and root staining methods for evaluation of aluminum tolerance in *Medicago truncatula* (Barrel Medic) germplasm. *Crop Sci.* 47, 321-328.
- Nava, I.C., Delatorre, C.A., Pacheco, M.T., Scheeren, P.L., Federizzi, L.C., 2015. Aluminium tolerance of oat cultivars under hydroponic and acid soil conditions. *Experimental Agriculture*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S0014479715000046>
- Nevo, E., Fu, Y.B., Pavlicek, T., Khalifa, S., Tavasi, M., Beiles, A., 2012. Evolution of wild cereals during 28 years of global warming in Israel. *P. Natl Acad. Sci USA* 109, 3412-3415.
- Panda, S. K., Baluška, F., Matsumoto, H., 2009. Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 592-597.
- Ryan, P.R., Delhaize, E., 2010. The convergent evolution of aluminium resistance in plants exploits a convenient currency. *Funct. Plant Biol.* 37, 275-284.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S. J., Ryan, P. R., Delhaize, E., Matsumoto, H., 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* 37, 645-653.
- Sivaguru, M., Horst, W.J., 1998. The distal part of the transition zone is the most aluminum-sensitive apical root zone of *Zea mays* L. *Plant Phys.* 116, 155-163.
- Souza, L.A.C., 2001. Reação de genótipos de soja ao alumínio em hidroponia e no solo. *Pesqui. Agropecu Bras.* 36, 1255-1260.
- Spehar, C.R., Souza, L.A.C., 2006. Selection for aluminum tolerance in tropical soybeans. *Pesq. Agropec. Trop.* 36, 1-06.
- Tabaldi, L.A., Nicoloso, F.T., Castro, G.Y., Cargnelutti, D., Gonçalves, J.F., Rauber, R., Skrebsky, E.C., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Bisognin, D.A., 2007. Physiological and oxidative stress responses of four potato clones to aluminum in nutrient solution. *Braz. J. Plant Physiol.* 19, 211-222.
- Tang, Y., Sorrells, M. E., Kochian, L. V., & Garvin, D. F., 2000. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene. *Crop Sci.* 40, 778-782.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tovkach, A., Ryan, P.R., Richardson, A.E., Lewis, D.C., Rathjen, T.M., Ramesh, S., Tyerman, S.D., Delhaize, E. 2013. Transposon-mediated alteration of *TaMATE1B*

expression in wheat confers constitutive citrate efflux from root apices. *Plant Physiol.* 161, 880-892.

Villagarcia, M.R., Carter, T.E., Rufty, T.W., Niewoehner, A.S., Jennette, M.W., Arrellano, C. 2001. Genotypic rankings for aluminum tolerance of soybean roots grown in hydroponics and sand culture. *Crop Sci.* 41, 1499-1507.

Voss, M., Sousa, C.N.A., Baier, A.C., Nascimento-Junior, A., Boff, T. 2006. Método de avaliação de tolerância à toxidez de alumínio em trigo, em condições de hidroponia, na Embrapa Trigo. Passo Fundo: Embrapa Trigo. 16 p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 67). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do67.htm>. Acesso em: 13 jan. 2015.

Wang, J., Raman, H., Zhou, M., Ryan, P. R., Delhaize, E., Hebb, D. M., Coombes, N., Mendham, N. 2007. High-resolution mapping of the *Alp* locus and identification of a candidate gene *HvMATE* controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 115, 265-276.

Zhao, Z., Ma, J.F., Sato, K., & Takeda, K. 2003. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 217, 794-800.

Zhou, G., Pereira, J.F., Delhaize, E., Zhou, M., Magalhaes, J.V., Ryan, P.R. 2014. Enhancing the aluminium tolerance of barley by expressing the citrate transporter genes *SbMATE* and *FRD3*. *J Exp Bot.* 65, 2381-2390.

Zhou, G., Delhaize, E., Zhou, M., & Ryan, P. R. 2013. The barley MATE gene, *HvAACT1*, increases citrate efflux and Al^{3+} tolerance when expressed in wheat and barley. *Ann. Bot.* 112, 603-612.

4 CAPÍTULO III

**Molecular characterization of wild and cultivated barley accessed in a
Brazilian collection by SSR markers**

Title: Molecular characterization of wild and cultivated barley accessed in a Brazilian collection by SSR markers

Authors: Jéssica Rosset Ferreira • Jorge Fernando Pereira • Caroline Turchetto • Euclides Minella • Luciano Consoli • Carla Andrea Delatorre

Affiliation of the authors:

Jéssica Rosset Ferreira • Carla Andrea Delatorre (✉)

Department of Crop Science, Agronomy School, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 7712, CEP 90001-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: cadtorre@ufrgs.br, Phone: +55(51) 3308-6005, Fax: +55(51) 3308-6572

Jorge Fernando Pereira • Caroline Turchetto • Euclides Minella • Luciano Consoli
Embrapa Trigo, Rodovia BR 285 km 294, CEP 99001-970, Passo Fundo, RS, Brazil.

Abstract

Genetic diversity is a key component in breeding programs. Here we analyze the genetic diversity of 64 barley accessions using 34 microsatellite markers. The accessions were composed by wild and domesticated barley representing breeding lines and cultivars from six countries and three breeding programs in Brazil. A total of 280 alleles were detected, averaging 8.23 alleles per locus, 36 of them unique to Brazilian barley. The marker Bmag120 on chromosome 7 showed the greatest polymorphism information content (PIC) although the highest mean value was to chromosome 3 (0.78) and the lowest was to chromosomes 4 and 6 (0.44). The wild accessions presented the highest diversity followed by the foreign and Brazilian genotypes respectively. Genetic structure of accessions was performed using Principal Coordinates Analysis, a dendrogram derived from the UPGMA clustering, and Bayesian clustering analysis implemented in Structure. All results obtained by the different methods were in agreement. In general, the close relationship of Brazilian accessions could be explained by the existence of common ancestors. Loss of genetic diversity has occurred since most of the cultivars released in Brazil in the last decades showed lower number of alleles and lower PIC, with most of them clustering in separate subgroups from the older cultivars.

Keywords Domesticated barley • genetic diversity • *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* • *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* • microsatellite markers

Introduction

Barley (*Hordeum vulgare*) was one of the first cereal species domesticated by humans and, since then, is cultivated in several environments (Feuillet et al. 2007; Ladizinsky 1998). It is considered one of the best adapted cereals due to its tolerance to salinity and low temperatures and lower water demand (Baik and Ullrich 2008; Goyal and Ahmed 2012) although, it is highly sensitive to aluminum (Bian et al. 2013). A broad range of end use, such as human consumption, malt in brewing and distilling industry and animal feeding, makes barley one of the most important cereal crops in the world ranking as the fourth most produced cereal after wheat, maize, and rice.

The cultivated barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) and its wild progenitor (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) belong to the barley primary gene pool (Minella 2005). Greater allelic diversity has been detected in wild than in cultivated barley (Saghai Marrof et al. 1994; Ledovskoy et al. 2010). The wild progenitor is of great interest for crop breeding because it carries a rich source of genes, enabling the adaptation to different biotic and abiotic stresses (Nevo et al. 2012). Moreover, these species preserved their intercrossing ability. The genetic diversity found in cultivated barley varies among different studies, some of them reported high genetic diversity (Baik and Ullrich 2008; Yahiaoui et al. 2008; Khodayari et al. 2012). Previous studies also showed different levels of genetic diversity from accession of different geographic origins. Genotypes from Europe presenting lower genetic diversity compared to those of other continents (Malysheva-Otto et al. 2006).

In the last years in Brazil, around 350 thousand tons have been imported yearly to supply the domestic needs, 75% of the barley has been destined to malt in brewing (de Mori and Minella 2012). Area expansion would require the development

of cultivars adapted to the diverse Brazilian environments. Better knowledge about the allelic composition of materials may facilitate the parental selection for breeding to specific environments. However, up to now few genetic variability studies have been conducted for Brazilian barley. SDS-PAGE analysis was employed to analyze the hordein polypeptide patterns and revealed a surprisingly extensive intravarietal polymorphism for Brazilian barley varieties (Echart-Almeida and Cavalli-Molina 2000). The intravarietal variability was also detected by RAPD and isoenzymes, although in lower frequency (Maris 1992; Selbach and Cavalli-Molina 2000). However, a great genetic similarity was found among cultivars (Maris 1992; Echart-Almeida and Cavalli-Molina 2000; Kroth et al. 2005). Besides that, other molecular markers can be used to germplasm characterization. For instance, microsatellite markers (SSR) possess high level of polymorphism, are multiallelic and spread throughout the genome becoming a good option for cultivar characterization and genetic mapping (Gupta et al. 1996; Oliveira et al. 2006). Although SSR markers have been used to characterize barley from different countries (Saghai Marrofi et al. 1994; Karakousis et al. 2003; Baik and Ullrich 2008; Yahiaoui et al. 2008; Khodayari et al. 2012; Ledovskoy et al. 2010), no studies evaluating the molecular diversity of Brazilian barley using this kind of markers have been conducted.

The objectives of the present study were to describe the molecular diversity of Brazilian barley as well as to compare that diversity with the one found for foreign and wild genotypes. This is performed in order to detect new genetic variability and thus to assist the breeding programs in the development of new cultivars.

Materials and methods

Plant material and genomic DNA isolation

Seeds of 64 barley accessions, provided by the Active Germplasm Bank of the CNPT-Embrapa, Brazil, were cultivated under controlled conditions. These accessions represent 2- and 6-row materials including six wild (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) genotypes, 35 cultivars and 16 breeding lines developed by different breeding programs in Brazil, and seven cultivars from other countries (see Table 4.1 for details). The Brazilian materials are representatives of the germplasm cultivated in Brazil in the last four decades. Young leaves of the seedlings were collected, transferred to 2 mL Eppendorf tube containing three stainless steel beads (2.3 mm diameter) and immediately frozen in liquid nitrogen. Tissue was powdered using a Mini-Beadbeater™ (Biospec Products) platform and total genomic DNA was extracted by CTAB protocol (Doyle and Doyle 1987). The DNA quality and quantity was estimated on 0.8% agarose gel. DNA was stored at -20° C for further analyses.

Table 4.1 Barley genotypes used in this study.

Genotype	Row	Institution	Country	Year	Pedigree
Alpha	2	Foreign	USA	-	'Manchuria'/'Champion of Vermont'
Antarctica 01	2	Cervejaria Antarctica Paulista	Brazil	1960's	Selection of Breun Volla
Antarctica 04	2	Cervejaria Antarctica Paulista	Brazil	1999	Alpha1959/Union
Antarctica 05	2	Cervejaria Antarctica Paulista	Brazil	1999	Unkown
BRS 180	6	CNPT/Embrapa	Brazil	1999	73Ab2199/Karla
BRS 195	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2001	Defra/BR 2
BRS 224	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2002	Embrapa 43/PFC 9114
BRS 225	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2002	PFC 9103/Defra
BRS Brau	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2009	MN 698/3/BRS 195//Schooner/Embrapa 129
BRS Cauê	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2008	BRS Borema/BRS 195
BRS Elis	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2008	BRS 195/Scarlett
BRS Greta	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2006	Krona/PFC 9219//PFC 9204
BRS Itanema	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2013	BRS 195//PFC8590/PFC9205
BRS Lagoa	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2005	PFC 9215/PFC 9288
BRS Marciana	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2005	PFC 9240/PFC 9211
BRS Mariana	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2005	PFC 88137/PFC 8905//PFC 9205
BRS Sampa	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2008	BRS 195//PFC 8590/PFC 9205
BRS Suábia	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2006	BRS 195/MN 698
Cevada BR1	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1987	Selection of W 5586 =Binder/Opal//Balder/kenia/3/Alpha
Cevada BR2	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1989	FM 424/TR 206
Dayton	2	Foreign	USA	1955	Composite cross X (CI 6625) selection
Embrapa 127	2	CNPT/Embrapa	Brazil	2000	BR2/Alexis
Embrapa 128	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1999	LM 844/PFC 84148//BR2
Embrapa 129	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1999	LM 844/MN610//Cevada BR 2
Embrapa 43	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1999	IPB 194//C 2146/TR 208
FM 404	2	Maltaria Navegantes (Filial Maltaria)	Brazil	1970's	Selection from a cross probably involving Alpha
FM 424	2	Maltaria Navegantes (Filial Maltaria)	Brazil	1970's	Quinn/Malteria Heda//W 5746
FM 434	2	Maltaria Navegantes (Filial Maltaria)	Brazil	1970's	Quinn/Malteria Heda//FM 424
FM 437	2	Maltaria Navegantes (Filial Maltaria)	Brazil	1985	Alpha 1959/2*Mansholt Twerijge Zomergerst
FM 519	2	Maltaria Navegantes (Filial Maltaria)	Brazil	1985	Kr 1/Union//Volla/3/Kr 2/Volla//Wisa/4/Alpha
Golden Promise	2	Foreign	England	1966	Maythorpe Gamma-Ray Mutant
Hspo 584	2	-	-	-	-
Hspo PI 282590	2	-	Israel	-	-

Table 4.1 continued

Genotype	Row	Institution	Country	Year	Pedigree
Hspo PI 466338	2	-	Israel	-	-
Hspo PI 466394	2	-	Israel	-	-
Hspo PI 466396	2	-	-	-	-
Hspo PI 466381	2	-	Israel	-	-
IAC 74310	2	Instituto Agronômico de Campinas	Brazil	1974	Unkown
IPB 1219	2	International Plant Breeders	Brazil	1980	Vada/Zephyr
IPB 194	2	International Plant Breeders	Brazil	1980	Mazurka/Nackta
MN 599	2	Maltaria Navegantes	Brazil	1990	Ariana/Volla//FM 462
MN 6021	2	Maltaria Navegantes	Argentina	2012	Dominique/Quilmes Ayelen
MN 656	2	Maltaria Navegantes	Brazil	1993	SG 4279/FM 404//Bacco/Union/3/ FM 434
MN 684	2	Maltaria Navegantes	Brazil	2001	Antarctica 05/MN 577
MN 698	2	Maltaria Navegantes	Brazil	2001	MN 599/MN 635
MN 743	2	Maltaria Navegantes	Brazil	2004	MN 681/Gimpel
Murasakimochi	6	Foreign	Japan	-	-
Pará-I	6	CNPT/Embrapa	Brazil	-	Unkown
PFC 7802	2	CNPT/Embrapa	Brazil	7802	Binder/Opal//Balder/Kenya
PFC 8115	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1981	Volla*3/Wpgm 626-46-25
PFC 8153	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1981	FM 424*2//Volla/Wpgm 626-46-25
PFC 8280	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1982	Volla/C 2146
PFC 84148	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1984	Volla*3/Wpgm 626-46-25//MAGNIF 131
PFC 8601	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1986	Seleção em TR 207 em solo corrigido (1/8 SMP)
PFC 8610	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1986	PFC 8144/Park
PFC 86125	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1986	PFC 8153/IPB 194
PFC 8644	2	CNPT/Embrapa	Brazil	1986	Antarctica 05*3/Park
PFC 88209	6	CNPT/Embrapa	Brazil	1988	Selection of FM 70
PFC 88210	6	CNPT/Embrapa	Brazil	1988	Selection of FM 71
PFC 88211	6	CNPT/Embrapa	Brazil	1988	Selection of FM 80
PFC 88212	6	CNPT/Embrapa	Brazil	1988	Selection of FM 80
Quench	2	Foreign	England	-	Sebastian/Drum
Quest	6	Foreign	USA	-	MN Brite/Zhedar 1
Vacaria	6	CNPT/Embrapa	Brazil	-	Unkown

Microsatellites (SSR) amplification

The genomic DNA was amplified using 34 SSR markers previously described (Liu et al. 1996; Ramsay et al. 2000; Röder et al. 1998; Varshney et al. 2007; Soto-Cerda et al. 2013) that are scattered throughout the barley genome. The details of the 34 SSR primers are available at Table S1.

PCR was conducted based on a three primer system, as described by Schuelke (2000), where one of the forward or reverse primer is merged with a non-labeled M13-tail (TGTAACGACGGCCAGT), and a M13 primer labeled with one fluorescent dye (FAM, NED, PET or VIC). The reaction mixture was prepared for a final volume of 15 μ L containing 1 \times buffer (RBC Bioscience), 0.2 μ M primer, 0.02 μ M primer plus the M13 tail and 0.2 μ M labeled M13 primer. Other reagents were optimized for each primer and added as mixA, 1.5 mM MgCl₂ (RBC Bioscience), 0.2 mM of each dNTP (Thermo Scientific), 0.5 U of *Taq* polymerase (RBC Bioscience); mix C, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.75 U of *Taq* polymerase; or mixD 2.5 mM MgCl₂, 0.35 mM of each dNTP, 0.75 U of *Taq* polymerase. Amplification was performed in a GenAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems) with two programs: TD60-50 (94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, followed by ten cycles at decreasing annealing temperatures of 1°C per cycle and then 30 cycles at 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec, 72°C for 30 sec), or TD60-55 (94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, followed by five cycles at decreasing annealing temperatures of 1°C per cycle and then 35 cycles at 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 30 sec). After amplification, the reactions from up to four primers combinations containing different fluorescent dyes were multiplexed, diluted, mixed with Hi-Di formamide and GeneScan 500 LIZ size standard (Applied Biosystems), denatured and run on

ABI 3130xL Genetic Analyzer containing a 36 cm capillary array with POP7 polymer. The program GeneMapper v3.5 was used to determine the allele's size.

We were also interested in evaluating the genetic variability among the different Brazilian breeding programs (development institution), the wild and domesticated accessions, the breeding lines and cultivars, and among the Brazilian and foreign genotypes. Thus, we grouped the 64 barley accessions in seven sets according to development institution, country, and type as detailed in Table 4.2.

Table 4.2 Groups of genotypes separated accordingly to institution, country and barley type.

	CNPT/Embrapa	Cervejaria Antarctica Paulista	Maltaria Navegantes	Lineages from other institutions	Lineages from CNPT/Embrapa	Foreign genotypes	Wild barley
Number of genotypes	22	3	10	3	13	7	6
Total of alleles	146	61	105	63	130	123	145
Alleles per locus	4.29	1.79	3.09	1.85	3.82	3.62	4.26
PIC	0.46	0.27	0.43	0.32	0.52	0.57	0.63

Data analysis

The FSTAT 2.9.3.2 software (Goudet 2002) was used to evaluate the summary statistics such as the number of alleles per locus (A), number of private alleles (E) for each locus and groups of accessions. We estimated the polymorphic information content (PIC) using CERVUS 3.0.3 software (Marshall et al. 1998; Kalinowski et al. 2007) according to Anderson et al. (1993): $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$, where P_{ij} is the frequency of the j th allele (marker), to evaluate the diversity level of each SSR marker. In addition, we implemented analyses of molecular variance (AMOVA; Excoffier et al. 1992) using ARLEQUIN 3.5.1.2 software (Excoffier and Lischer 2010) among seven groups of accessions. The groups of the accessions were established according to the institution that developed the cultivars or breeding lines (Table 4.1). The genetic diversity among Brazilian genotypes developed in different decades was estimated based in the allele number and PIC value.

To investigate the genetic similarity between accessions, we carried out a Principal Coordinates Analysis in GENALEX 6.4 software (Peakall and Smouse 2006; Peakall and Smouse 2012). We used a matrix of distance based on shared alleles among accessions to depict relationships among all accessions; the original data were bootstrapped 10,000 times using PowerMarker software (Liu and Muse 2005). In addition, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean tree (UPGMA) was constructed based on the matrix of shared microsatellite alleles among the 64 accessions calculated from 34 SSRs, using the PowerMarker software (Liu and Muse 2005). A Bayesian clustering analysis as implemented in STRUCTURE 2.3 software (Pritchard et al. 2000) was performed to compare to UPGMA and PCoA results. This approach uses a Bayesian clustering analysis to assign individuals to clusters (K) without prior knowledge of their population

affinities. The parameters were correlated allele frequencies (Falush et al. 2003) and no prior accessions information was used. The number of groups (K) was evaluated from 1 to 20, with 10 independent runs per K value, to determine the maximum value of the posterior likelihood [$\ln P(D)$] and the best value of K. Each run was performed using 2.5×10^5 burn-in periods and 10^6 Markov chain Monte Carlo (MCMC) repetitions after burn-in, and the convergence was checked. The optimal value of K was calculated using the maximum value of ΔK (Evanno et al. 2005) implemented in STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (Earl and von Holdt 2012). We used the CLUMPP 1.1.2 software to summarize the results of the optimal K value on the basis of the average pairwise similarity of individual assignments across runs using Greedy's method and the G' statistic (Jakobsson and Rosenberg 2007). We used DISTRUCT 1.1 software (Rosenberg 2004) to visualize the STRUCTURE results after processing with the CLUMPP software.

Results

Genetic variation

We have evaluated 34 SSRs loci in 64 accessions of barley representatives from 2- or 6-row genotypes and wild and domesticated barley. Eleven genotypes from six countries are among the ones studied here but the accessions mainly represent Brazilian materials. The 34 markers were spread through the barley genome with at least four markers for each chromosome. We detected 280 alleles with an average of 8.23 alleles per locus. The number of allele per locus varied from one for markers XGWM6, HvLOX and Bmac0251 (monomorphic loci) to 18 for the marker Bmag0032 (Table 4.3). Sixteen markers detected at least 10 alleles and only eight amplified less than five alleles. For only one marker (Bmac0167), null allele was

observed. An association between higher number of motif repeats and higher number of alleles could be established. On average, loci containing 15 or more motif repeats generated 9.8 alleles per marker while the ones with less than 15 motif repeats showed 4.9 alleles per marker. Among the monomorphic loci, two contained less than 15 motif repeats while one (XGWM6) possessed the highest number (40 repeats) among the evaluated markers.

Table 4.3 Repeated motif, number of alleles, allele size range and polymorphism information content (PIC) of the 34 SSR markers used.

Marker	Repeat motif	Number of alleles	Allele size range	PIC
Bmac0090	(AC)20	10	207-247	0.75
Bmag0032	(AC)7T(CA)15(AT)9	6	193-207	0.78
Bmag211	(CT)16	18	211-319	0.54
HVM20	(GA)19	6	150-172	0.66
Bmag0125	(AG)19	10	136-162	0.77
Bmag0378	(AG)14	8	150-170	0.26
Bmag0749	(AG)11	4	180-186	0.62
HVM36	(GA)13	6	124-166	0.65
HVM54	(GA)14	7	166-182	0.58
Bmac0067	(AC)18	9	180-250	0.72
Bmag0013	(CT)21	12	147-183	0.81
Bmag225	(AG)26	10	155-185	0.81
HVM60	(AG)11(GA)14	10	101-133	0.77
Bmac0030	(AC)22	11	150-180	0.83
Bmac0310	(CT)11(AC)20	11	159-199	0.76
Bmag0353	(AG)21	11	105-145	0.69
EBmac0669	(AC)8	2	236-238	0.07
EBmag0781	(CT)21	4	162-182	0.26
HVM68	(GA)22	12	196-240	0.77
HvML03	(CTT)6	3	251-266	0.33
wms165	(GA)20	8	215-263	0.23
XGWM6	(GA)40	1	196	0.00
Bmac0113	(AT)7(AC)18	10	208-236	0.81
Bmac096	(AT)6(AC)16	11	180-212	0.77
Bmag0387	(AG)16	8	119-161	0.53
HvLOX	(AG)9	1	170	0.00
Bmac0316	(AC)19	14	142-200	0.66
Bmac251	(AC)12A(AC)13	1	161	0.00
Bmag0173	(CT)29	8	156-180	0.79
HVM65	(GA)10	3	139-143	0.30
Bmac0031	AC(28)	10	172-211	0.53
Bmac0167	AC(20)	10 ¹	180-212	0.76
Bmag0120	(AG)15	17	230-290	0.86
Bmag0135	(AG)10GG(AG)12	8	133-179	0.79

¹ Null allele was observed for marker Bmac0167

The highest number of alleles was found in the 22 cultivars developed by CNPT-Embrapa (146 alleles averaging 4.3 allele per locus) and in the six wild accessions (145 alleles averaging 4.3 allele per locus). However, considering the number of accession within each set, the foreign genotypes also generated a high number of alleles (Table 4.2).

Private alleles were detected in all sets except from Companhia Antarctica Paulista (Table S4.2). In the wild accessions, 69 private alleles were detected in 28 different loci (Table S4.2). Among the foreign genotypes and the cultivars developed by CNPT-Embrapa, we found 23 and 21 private alleles, respectively. Only one private allele was visualized in the breeding lines developed by other institutions. The Bmag0032 marker was the loci with the highest number of alleles and presented the highest number of private alleles (Table S4.2)

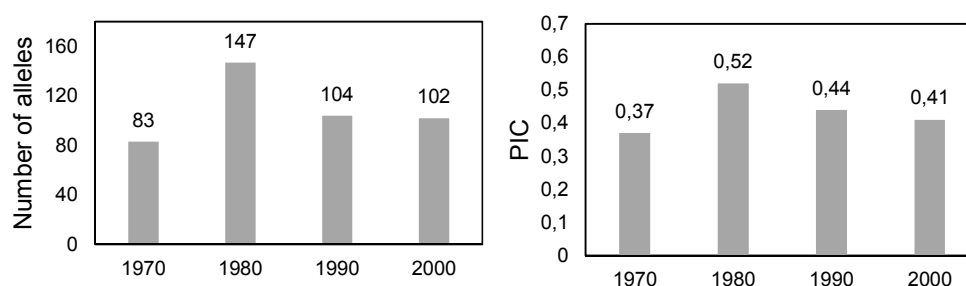


Fig. 4.1 Total number of alleles and PIC values of the genotypes developed in Brazil in the last four decades. Number of genotypes per decade are 1970, 5; 1980, 18; 1990, 8; and 2000, 16.

Furthermore, indicators of locus diversity (polymorphic information content - PIC) were calculated (Table 4.3). Large variation was observed among the polymorphic loci, PIC values ranged from 0.07 (EBmac0669) to 0.86 (Bmag120) with an average of 0.57. Among the different sets, the highest PIC value was observed for wild barley (0.63) evidencing higher genetic diversity in these accessions. The second highest PIC value was found in the foreign genotypes (0.57) while PIC values varied from 0.27 (Cervejaria Antarctica Paulista) to 0.46 (CNPT-Embrapa) among the cultivars developed by the different breeding programs in Brazil. The PIC value considering all Brazilian genotypes (cultivars and breeding lines) was 0.51. It indicates a lower genetic diversity compared with foreign (0.56)

and wild (0.63) accessions. Besides that, the PIC value was lower among Brazilian genotypes developed in the last decade in comparison to older materials (Fig. 4.1). Not considering the monomorphic loci, only five markers originated PIC values below 0.50, therefore the majority of the markers were moderate to highly informative, according to criteria proposed by Botstein et al. (1980). Among the five loci with $PIC < 0.50$, three were located at the chromosome 4. The chromosomes 4 and 6 showed the lowest mean PIC value (0.43) among all chromosomes. Genetic diversity in Brazilian barley decreased along the decades, i.e. the number of alleles was lower among the genotypes from the last decade in comparison to older materials (Fig. 1).

Genetic similarity

In order to assess the clustering of barley accessions based on the SSR polymorphism, we conducted a Principal Coordinates Analysis (PCoA). The scatter plots based on the two axes showed that accessions formed two principal groups (Fig. 4.2). The first group was further sub divided in two. One sub-group contained all wild accessions, two CNPT-Embrapa cultivars (Paraí and BRS180), and three foreign cultivars (Dayton, Quest and Murasakimochi), while the other sub-group includes three CNPT-Embrapa breeding lines (PFC88209, PFC88210, and PFC88211), and one CNPT-Embrapa cultivar (Vacaria). The second group was composed of other all accessions and showed higher variation. Inside this second group, the CNPT-Embrapa cultivars were scattered over a large area being most of them located in a separate region.

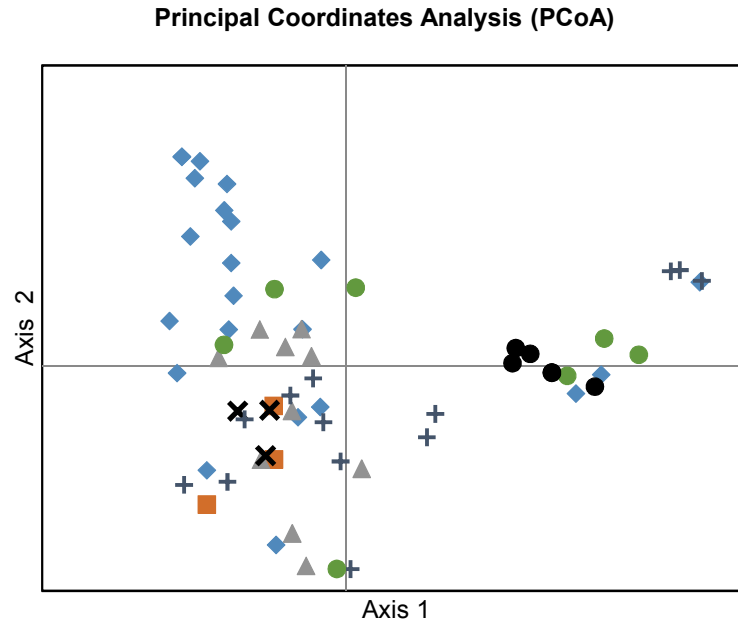


Fig. 4.2 Principal Coordinate Analysis (PCoA) carried out with the 59 barley accessions and 34 microsatellite markers. The symbols represent: ◆ CNPT-Embrapa cultivars; ■ Cervejaria Antarctica Paulista cultivars; ▲ Maltaria Navegantes (Filial Maltaria) cultivars; × Other institutions lineages; + CNPT-Embrapa lineages; ● Foreign cultivars; and ● Wild accessions.

We were also interested in calculate the population differentiation based on the detected polymorphism. To do this, the SSR alleles were used to calculate the molecular variance, AMOVA). The AMOVA analysis revealed that 15.23% of the genetic variation ($P < 0.001$) was distributed among the seven sets, representing the different breeding programs, countries and type of accession (wild/domesticated and breeding lines/cultivars), whereas 84.77% ($P < 0.001$) was within the sets. When we consider only accessions developed in Brazil, the AMOVA showed 12.05% of the genetic variation among sets, and 87.95% ($P < 0.001$) within sets ($P < 0.001$). These results indicated that the genetic variation within the sets contributed to most of the genetic diversity detected.

The UPGMA cluster analysis resulted in three main groups (named as Groups A, B and C) (Fig. 4.3). Group A consisted of all wild accessions except Hspo 584, which was clustered in the Group C. Besides Hspo584, the Group C also contained other 10 accessions represented by breeding lines and cultivars developed by CNPT-Embrapa and foreign genotypes. When comparing the accessions presented in the Groups A and C with the ones belonging to the first group detected by the PCoA analysis, only the line PFC88212 was different between them revealing agreement patterns across analyses. The Group B in the dendrogram was the major consisting of 48 accessions representing four foreign materials and 44 Brazilian genotypes. This means that 86.27% of the Brazilian genotypes were clustered inside the same group.

The Group B was further substructured into five subgroups. The subgroup 1 consisted of three CNPT-Embrapa breeding lines and one cultivar developed by Maltaria Navegantes. Subgroup 2 contained breeding lines developed by CNPT-Embrapa and Instituto Agronômico de Campinas (IAC), cultivars released by CNPT-Embrapa, Companhia Antarctica Paulista and Maltaria Navegantes, and one foreign genotype (Alpha). The subgroup 3 consisted of cultivars developed by the three breeding programs in Brazil while subgroup 4 was represented by cultivars and breeding lines developed by CNPT-Embrapa and two foreign genotypes (MN6021 and Quench). Finally, the subgroup 5 included twelve CNPT-Embrapa cultivars, two cultivars developed by Maltaria Navegantes and one foreign genotype (Quench). Interestingly, Golden Promise formed a separate group in this Group B. When considering the different breeding programs in Brazil, the genotypes developed by CNPT-Embrapa were the only ones distributed across more than one group and across all the subgroups within Group B.

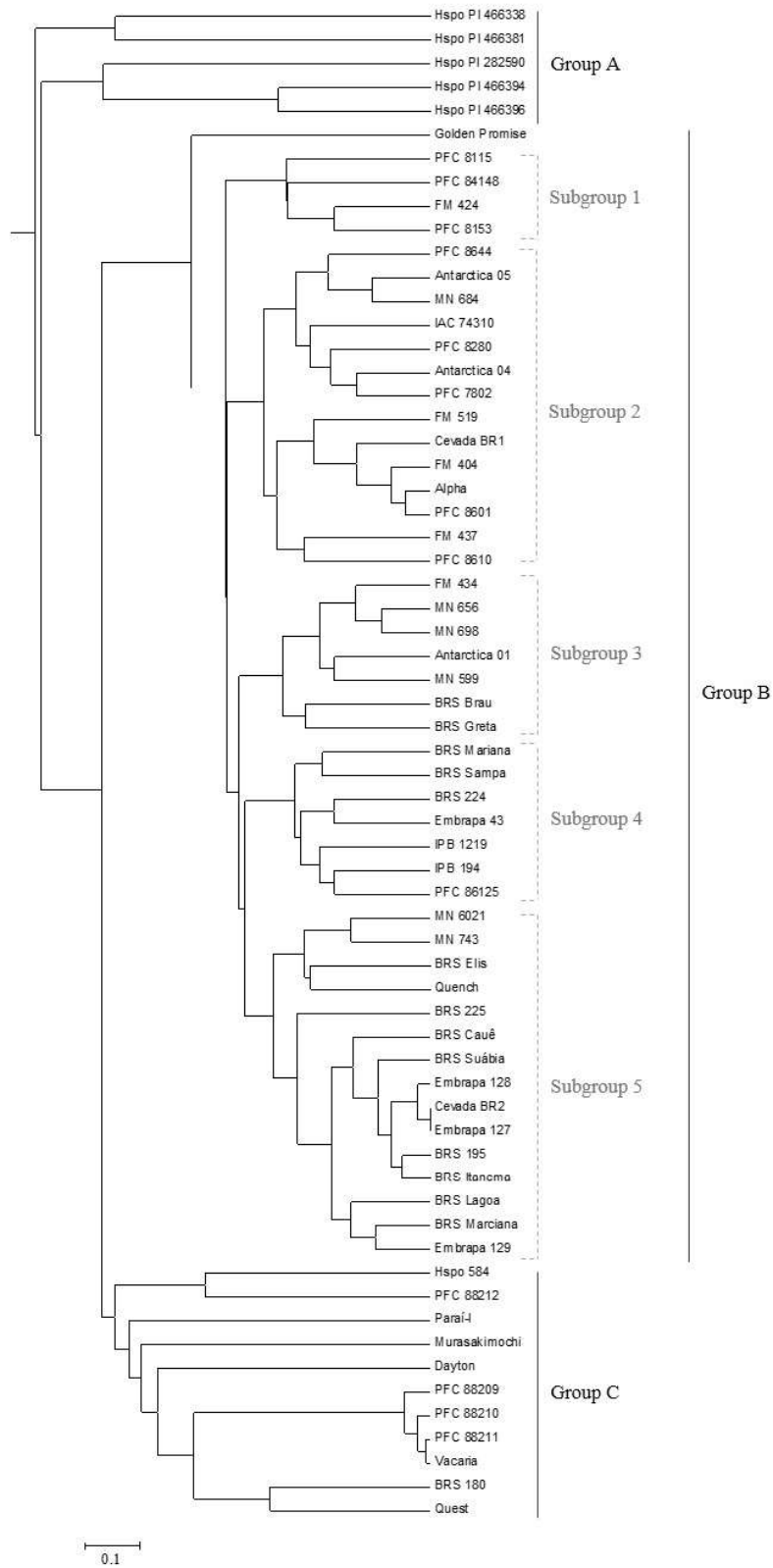


Fig. 4.3 UPGMA tree of 59 individuals barley accessions constructed based on the matrix of shared microsatellite alleles.

The Bayesian clustering results, implemented in STRUCTURE software, were in agreement to PCoA and UPGMA results. In this analysis we observed that the best inferred number of clusters was $K = 2$ obtained by the Evanno's method (Fig. 4.4). The majority of accessions of each group were grouped preferentially in one or another cluster. Some breeding lines developed by CNPT-Embrapa appeared with dual ancestry.

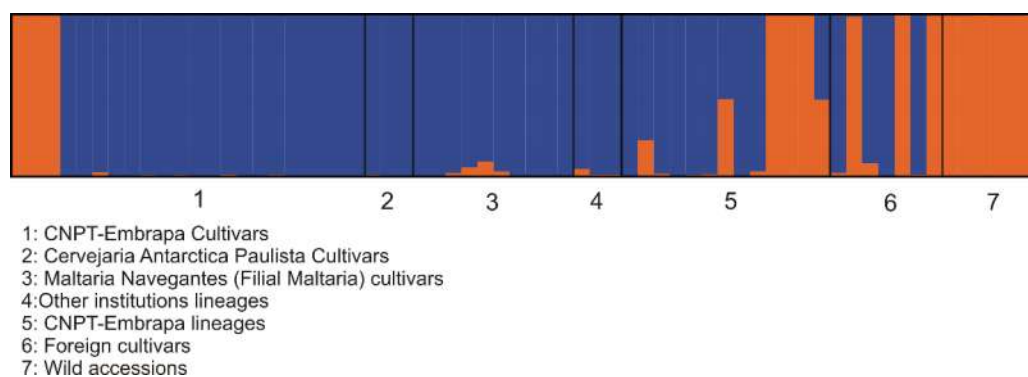


Fig. 4.4 Estimated proportion of membership in the corresponding clusters ($K=2$) as calculated using STRUCTURE software.

Discussion

In the third position in countries with the highest beer production in the world but producing around 300 thousand tons of barley per year, Brazil is among the countries with the largest barley import needs (de Mori and Minella 2012). Therefore, increments in barley production are essential. The demand for higher yielding and better-adapted crop varieties has increased the necessity to exploit the genetic variation of genebank collections (Keilwagen et al. 2014). Evaluation of the genetic diversity of barley accessions can be an important source of information in order to discover and exploit novel alleles to be used in crop breeding programs. Here, is the first time SSR variability for barley Brazilian genotypes was reported. Although

other groups have published the molecular analysis of Brazilian barley accessions (Maris 1992; Echart-Almeida and Cavalli-Molina 2000; Kroth et al. 2005), the number of genotypes evaluated here is higher and the SSR markers are advantageous when compared to RAPD and isoenzymes used previously. SSR markers have proven to be a choice for marker-assisted selection in breeding and genetic diversity studies (Varshney et al. 2007) largely because they are highly informative and abundant in genomes, co-dominantly inherited and multi-allelic (Gupta et al. 1996; Oliveira et al. 2006).

We successfully amplified 34 SSRs barley loci obtaining an average of 8.23 alleles for each locus. It was also similar to the one reported by Iranian barley landraces (Khodayari et al. 2012) higher than the one reported for Indian barley (Jaiswal et al. 2010) and lower than the ones published by others (Saghai Marrof et al. 1994; Malysheva-Otto et al. 2006; Yahiaoui et al. 2008). Here we obtained a mean PIC value of 0.57, however, when considering just the Brazilian genotypes the diversity index was lower than foreign and wild accessions illustrating the lowest diversity in the Brazilian accessions. Another interesting aspect is that, in the UPGMA results (Fig. 4.3), clusters inside the Group B showed a correlation regarding the cultivar release date. Most of the accessions (77%) in the subgroups 1 and 2 are older genotypes developed between 1970 and 1988, while 79% of the genotypes in the other subgroups were developed between 1989 and 2013. Only one material developed after the year 2000 (MN 684) was clustered outside the subgroups 3, 4 and 5 and, among the 13 Brazilian genotypes in the subgroup 5, only three were developed before the year 2000. That means the cultivars released in the last years are more correlated indicating a decrease in the genetic diversity. Another evidence for decrease in genetic diversity is the lower number of alleles and PIC

value obtained from Brazilian genotypes developed in different decades (Fig. 4.1). The observation that Brazilian barleys are closely related is in agreement with other studies (Selbach and Cavalli-Molina 2000; Kroth et al. 2005). In fact, crop breeding programs have drastically narrowed the genetic diversity in cultivated plants reducing tolerance to environmental stresses (Nevo 2007). An evidence of the use of common materials for obtaining the cultivars can be visualized by the analysis of the Group B in the dendrogram (Fig. 4.3). The genotypes Volla and Wpgm 626-46-25 are present in the genealogy of three accessions in the subgroup 1 (Table 4.1). Alpha is an ancestor of the Antarctica 04, FM 519, Cevada BR1, FM 404, and FM 437, which clustered in subgroup 2 (Table 4.1). In the subgroup 4, most of the accessions were developed by CNPT- Embrapa. The genotypes BRS Mariana and BRS Sampa, which were closely related, share PFC 9205 in their genealogy. The genotype IPB 194 was used in the cross that generated Embrapa 43, which was used to obtain BRS 224 (Table 4.1). Most of the genotypes grouped in the subgroup 5 shows BRS 195 and Cevada BR2 in their genealogy (Table 4.1). In this way, the different barley breeding programs in Brazil should consider the use of a more diverse set of materials in the crossings.

The highest average PIC was found for chromosome 3, the same one where the highest diversity parameters were detected by Malysheva-Otto et al. (2006). The chromosome 4 was the one where the highest number of markers was evaluated, however it showed the lower PIC values. Among this loci, one was monomorphic and the others had PIC value lower than 0.50. In chromosome 4 the *Alp* locus is located (Minella and Sorrels 1997) corresponding to the *HvAACT1* gene responsible for the aluminum tolerance in barley (Furukawa et al. 2007; Wang et al. 2007). Aluminum is an important constraint in the Southern Brazil (Echart and Cavalli-

Molina 2001) where almost all Brazilian barley is produced. It has been proposed that the low variability for the aluminum resistance in Brazilian barley indicates that significant increments through the conventional breeding are unlikely (Minella 2001). Different genes have been proved to transgenically increase the aluminum resistance in barley (Delhaize et al. 2004; Zhou et al. 2013; Zhou et al. 2014) and there are other examples that overcame the limitations of conventional breeding (Mrízová et al. 2014). That strategy could be considered to surpass the low variability for some traits in barley allowing the increase in stress tolerance and, ultimately, yield.

The UPGMA results (Fig. 4.3) agrees with PCoA ones (Fig. 4.2) and STRUCTURE analysis (Fig. 4.4). The three groups detected in the UPGMA showed a pattern correlated to the number of rows of grains on the ear and to the barley type (wild or domesticated). For instance, all genotypes in Group C, excepting for Hspo584, were representatives of 6-row barley. Group A was exclusive formed by wild accessions (two-row genotypes) with only one (Hspo584) grouping in Group C. That suggests that Hspo584 possibly has a different geographical origin than the other wild accessions. Wild barley (*H.vulgare* ssp. *spontaneum*), the progenitor of cultivated barley, is a selfing annual grass distributed in wide ecological range that differs in water availability, temperature, soil type, altitude and vegetation, generating a high potential for adaptive genetic diversity against abiotic and biotic stresses. It has been reported that wild barley has developed unique mechanisms for surviving harsh environments, mainly through developing new genetic variations and alleles (Nevo and Chen 2010). Here we detected a greater diversity in wild barley accessions when compared to domesticated ones. A higher number in SSR alleles and in diversity levels of individual loci was also found for wild genotypes in

comparison to cultivated barley previously (Saghai Marrof et al. 1994). Interestingly, the cultivars Vacaria, Paraí and BRS180 and the breeding lines PFC88209, PFC88210 and PFC88211 developed by CNPT-Embrapa, as well as three foreign cultivars (Dayton, Quest and Murasakimochi) grouped together with one wild accession (Hspo 584) in all analysis performed here. The genetic diversity shared by these accessions and wild barley indicates the potential of these accessions as a source of alleles for breeding purposes.

When considering the domesticated barley accessions, the geographical origin was not clearly associated with the groups. Although only seven of the 43 Brazilian genotypes were clustered outside Group B, the seven foreign genotypes were spread over Groups B and C. Previous study showed that SSR markers can differentiate barleys according to their origin region (Malysheva-Otto et al. 2006). However, other associations can be done based on the similarity of the genotypes. For instance, the Group C consisted of six accessions showing forage habit (Paraí-I, PFC 88209, PFC 88210, PFC 88211, PFC 88212 and Vacaria) and all accessions within the group B are malting barley.

In conclusion, we have detected a lower PIC value among barley accessions from Brazil when comparing with foreign and wild genotypes. A decrease in genetic diversity of Brazilian barley is occurring with modern materials showing lower PIC than older cultivars. That could be partially explained by the used of common ancestors that possess important traits. The use of a more diverse material could be interesting in order to exploit novel alleles to be used in crop breeding programs without losing quality. Some of the genotypes used here, as the ones present in the Group C of the dendrogram, should be considered. Private alleles owned by Brazilian genotypes are important to be future evaluated for cultivar identification.

Acknowledgements

This work was financially supported by Agrária and Ambev (Companhia de Bebidas das Américas). CAD and JRF received fellowships from the Brazilian national Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Supplementary Material

Supplementary Table S4.1 Characteristics of the SSR markers used. Forward or reverse primer contains a M13 sequence at the 5' end. See Materials and Methods for details about the PCR program and reaction mix.

Marker	Forward sequence	Reverse sequence	Chromosome	Dye	PCR Program ²	Mix
Bmac0090	ACATCAACCCTCCTGCTC	CCGCACATAGTGGTTACATC	1H	PET	TD60-55	D
Bmag0032	CCATCAAAGTCCGGCTAG	GTCGGGCCTCATACTGAC	1H	NED	TD60-55	A
Bmag211	ATTCATCGATCTTGTATTAGTCC	ACATCATGTCGATCAAAGC	1H	VIC	TD60-55	A
HVM20	CTCCACGAATCTCTGCACAA	CACCGCCTCTCTTTCAC	1H	FAM	TD60-55	C
Bmag0125	AATTAGCGAGAACAAAAATCAC	AGATAACGATGCACCACC	2H	PET	TD60-55	D
Bmag0378	CTTTTGTTTCCGTAGCATCTA	ATCCAACATATAGTAGCAAAGCC	2H	VIC	TD60-55	C
Bmag0749	CGGATTCTTGAGTAGTCTCTG	GATCTGTTTTTGTAGAACATGC	2H	FAM	TD60-55	C
HVM36	TCCAGCCGACAATTCTTG	AGTACTCCGACACCACGTCC	2H	PET	TD60-50	A
HVM54	AACCCAGTAACACCTGTCTCTG	AGTCCCTGACCCGATGTC	2H	PET	TD60-55	C
Bmac0067	AACGTACGAGCTCTTTTTCTA	ATGCCAACTGCTTGTTTAG	3H	VIC	TD60-55	A
Bmag0013	AAGGGGAATCAAAATGGGAG	TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA	3H	FAM	TD60-55	D
Bmag225	AACACACCAAAAATATTACATCA	CGAGTAGTTCCCATGTGAC	3H	VIC	TD60-50	C
HVM60	CAATGATCGGGTGAACTTTG	CCTCGGATCTATGGGTCCTT	3H	FAM	TD60-50	C
Bmac0030	CCCAATCGGAGTTACAGATG	GCCTCTCTGAGAATGGATC	4H	NED	TD60-55	C
Bmac0310 ¹	CTACCTCTGAGATATCATGCC	ATCTAGTGTGTGTGTTGCTTCT	4H	NED	TD60-55	A
Bmag0353 ¹	ACTAGTACCCACTATGCACGA	ACGTTCAATAAAATCACAACCTG	4H	FAM	TD60-55	C
EBmac0669	TCTACACTACACATGTTATCTTGC	GTGTTGATCTTCTCCTAGTG	4H	NED	TD60-50	D
EBmag0781	CTATTTTCTAATGCTTGGACC	TGTCTAGTTCATCATCATTGC	4H	NED	TD60-55	C
HVM68 ¹	AGGACCGGATGTTCCATAACG	CAAATCTCCAGCGAGGCT	4H	PET	TD60-55	D
HvML03	CTTCCATGTACCTACAG	CGAACTGGTATTCCAAGG	4H	VIC	TD60-50	C
wms165	TGCAGTGGTCAGATGTTTC	CTTTTCTTTCAGATTGCGCC	4H	NED	TD60-55	D
XGWM6	CGTATCACCTCCTAGCTAAACTAG	AGCCTTATCATGACCCCTACCTT	4H	FAM	TD60-55	C
Bmac0113	TCAAAAAGCCGGTCTAATGCT	GTGCAAAGAAAATGCACAGATAG	5H	PET	TD60-55	D
Bmac096	GCTATGGCGTACTATGTATGGTTG	TCACGATGAGGTATGATCAAAGA	5H	NED	TD60-55	A
Bmag0387	CGATGACCATTGTATTGAAG	CTCATGTTGATGTGTGGTTAG	5H	VIC	TD60-55	C
HvLOX	CAGCATATCCATCTGATCTG	CACCCTTATTATTGCCTTAA	5H	VIC	TD60-55	D
Bmac0316	ATGGTAGAGGTCCCAACTG	ATCACTGCTGTGCCTAGC	6H	NED	TD60-55	A
Bmac251	CAGATCTCAACAAACACACC	ATTCATATAAAGATATGGGTCC	6H	PET	TD60-50	D
Bmag0173	CATTTTGTGGTGACGG	ATAATGGCGGGAGAGACA	6H	PET	TD60-55	C
HVM65	AGACATCCAAAAAATGAACCA	TGGTAACTTGTCCCCCAAAG	6H	FAM	TD60-55	D
Bmac0031 ¹	AGAGAAAGAGAAATGTCACCA	ATACATCCATGTGAGGGC	7H	NED	TD60-55	A
Bmac0167 ¹	CATTTCCACTTCAAAAATATCC	CCAAAGTTTGTAGTGCAGAC	7H	PET	TD60-55	C
Bmag0120	ATTTTCATCCCAAAGGAGAC	GTCACATAGACAGTTGTCTTCC	7H	NED	TD60-55	D
Bmag0135	ACGAAAGAGTTACAACGGATA	GTTTACCACAGATCTACAGGTG	7H	FAM	TD60-55	A

¹ Reverse primer contains a M13 sequence (TGTAACGACGCGCCAGT) at the 5' end.

² The PCR program contains a touchdown step (see Materials and Methods).

Supplementary Table S4.2 Private alleles detected represented accordingly to institution, country, barley type and marker.

	CNPT/Embrapa	Cervejaria Antarctica Paulista	Maltaria Navegantes	Lineages from other institutions	Lineages from CNPT/Embrapa	Foreign genotypes	Wild barley
Bmac0090	0	0	0	0	0	0	2
Bmag0211	0	0	0	0	0	1	2
Bmag0032	3	0	1	0	1	2	5
HVM20	0	0	0	0	0	0	2
Bmag0125	0	0	0	0	1	1	1
Bmag0378	0	0	0	0	0	1	4
Bmag0749	0	0	0	0	0	0	1
HVM36	0	0	0	0	0	1	1
HVM54	0	0	1	0	0	2	1
Bmac0067	0	0	0	0	0	1	2
Bmag0013	0	0	1	0	0	1	4
Bmag0225	1	0	1	0	0	0	1
HVM60	1	0	0	0	0	1	3
Bmac0030	1	0	0	0	0	1	2
Bmac0310	1	0	0	0	0	2	2
Bmag0353	0	0	0	0	0	1	5
EBmac0669	0	0	0	0	0	0	0
EBmag0781	0	0	0	0	0	0	1
HVM68	1	0	0	0	0	2	3
HvML03	0	0	0	0	1	2	2
wms165	0	0	0	0	1	2	2
XGWM6	0	0	0	0	0	0	0
Bmac0113	1	0	0	0	0	1	2
Bmac0096	0	0	0	0	0	0	4
Bmag0387	2	0	0	0	0	0	1
HvLOX	0	0	0	0	0	0	0
Bmac0316	3	0	0	1	1	0	6
Bmac0251	0	0	0	0	0	0	0
Bmag0173	0	0	0	0	1	0	1
HVM65	0	0	0	0	0	0	0
Bmac0031	1	0	0	0	0	1	6
Bmac0167	4	0	0	0	0	0	1
Bmag0120	1	0	1	0	2	0	2
Bmag0135	1	0	0	0	1	0	0
Total	21	0	5	1	9	23	69

References

- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186
- Baik BK, Ullrich, SE (2008) Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *J Cereal Sci* 48:233-242
- Bian M, Waters I, Broughton S, Zhang XQ, Zhou M, Lance R, Sun D, Li C (2013) Development of gene-specific markers for acid soil/aluminium tolerance in barley *Hordeum vulgare* L. *Mol Breed* 32:55-164
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331
- de Mori C, Minella E (2012) Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da cevada. Passo Fundo: Embrapa Trigo, Documentos online 139, 28 p
- Delhaize E, Ryan PR, Hebb DM, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H (2004) Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15249-15254
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material. *Phytochem Bull* 19:11-15
- Earl EA, von Holdt BM (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4:359-361
- Echart CL, Cavalli-Molina S (2001) Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. *Cienc Rural* 31:531-541
- Echart-Almeida C, Cavalli-Molina S (2000) Hordein variation in Brazilian barley varieties *Hordeum vulgare* L. and wild barley *H. euclaston* Steud. and *H. stenostachys* Godr. *Genet Mol Biol* 23:425-433
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10:564-567
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491

- Furukawa J, Yamaji N, Wang H, Mitani N, Murata Y, Sato K, Katsuhara M, Takeda K, Ma JF (2007) An aluminum-activated citrate transporter in barley. *Plant Cell Physiol.* 48:1081-1091
- Falush D, Tephens MS, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567-1587
- Feuillet C, Langridge P, Waugh R (2007) Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends Genet* 24:25-32
- Goudet J (2002) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Accessed 20th March 2015
- Goyal A, Ahmed M (2012) Barley: Production, Improvement, and Uses. *Crop Sci* 52:2852-2854
- Gupta PK, Balyan HS, Sharma PC, Ramesh B (1996) Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. *Curr Sci* 45:45-54
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23:1801-1806
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 16:1099-1106
- Karakousis A, Barr AR, Chalmers KJ, Ablett GA, Holton TA, Henry RJ, Lim P, Langridge P (2003) Potential of SSR markers for plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm. *Crop Pasture Sci* 54:1197-1210
- Keilwagen J, Kilian B, Ozkan H, et al (2014) Separating the wheat from the chaff - a strategy to utilize plant genetic resources from ex-situ genebanks. *Sci Rep* 4:5231
- Khodayari H, Saeidi H, Roofigar AA, Rahiminejad MR, Pourkheirandish M, Komatsuda T (2012) Genetic Diversity of Cultivated Barley Landraces in Iran Measured Using Microsatellites. *Int J Biosci Biochem Bioinforma* 2:278-290
- Kroth MA, Ramella MS, Tagliari C, Francisco AD, Arisi ACM (2005) Genetic similarity of Brazilian hull-less and malting barley varieties evaluated by RAPD markers. *Sci Agric* 62:36-39
- Ladizinsky G (1998) How many tough-rachis mutants gave rise to domesticated barley? *Genet Resour Crop Evol* 45:411-414
- Ledovskoy Y, Abugalieva S, Turuspekoy Y (2010) Comparative assessment of the genetic variation in wild and cultivated barley based on SSR markers. *Asian Australas J Plant Sci Biotechnol* 4:21-26

- Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21:2128-2129
- Liu ZW, Biyashev RM, Maroof MS (1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor Appl Genet* 93:869-876
- Malysheva-Otto LV, Ganai MW, Röder MS (2006) Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm *Hordeum vulgare* L. *BMC Genet* 7:6
- Maris AF (1992) Caracterização isoenzimática de cultivares brasileiras de cevada (*Hordeum vulgare* L.). Bachelor's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol* 7:653-655
- Minella E (2001) Desafios e potencialidades do melhoramento genético de cevada no Brasil. In: Reunião Anual de Pesquisa de Cevada, Guarapuava. Passo Fundo: Embrapa Trigo 1:31-40
- Minella E (2005) Melhoramento de Cevada. In: Borém A (ed) Melhoramento de Espécies Cultivadas, 2nd ed. Editora UFV, Viçosa, pp 275-299
- Minella E, Sorrells ME (1997) Inheritance and chromosome location of *Alp*, a gene controlling aluminium tolerance in 'Dayton' barley. *Plant Breeding* 116:465-469
- Mrízová K, Holasková E, Öz MT, Jiskrová E, Frébort I, Galuszka P (2014) Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnol Adv* 32:137-157
- Nevo E (2007) Evolution of wild wheat and barley and crop improvement: Studies at the Institute of Evolution. *Isr J Plant Sci* 55:251-262
- Nevo E, Chen G (2010) Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant Cell Environ* 33:670-685
- Nevo E, Fu YB, Pavlicek T, Khalifa S, Tavasi M, Beiles A (2012) Evolution of wild cereals during 28 years of global warming in Israel. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:3412-3415
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet Mol Biol* 29:294-307
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-295
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539

- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959
- Ramsay L, Macaulay M, degli Ivanissevich S, et al (2000) A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156:1997-2005
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023
- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes* 4:137-138
- Saghai Marrof M, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q, Allard RW (1994) Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5466-5470
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18:233-234
- Selbach A, Cavalli-Molina S (2000) RAPD characterization of Brazilian barley *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* varieties. *Euphytica* 111:127-135
- Soto-Cerda BJ, Peñaloza EH, Montenegro AB, Rupayan AR, Gallardo MH, Salvo-Garrido H (2013) An efficient marker-assisted backcrossing strategy for enhancing barley *Hordeum vulgare* L. production under acidity and aluminium toxicity. *Mol Breeding* 31:855-866
- Varshney RK, Marcel TC, Ramsay L, Russell J, Röder MS, Stein N, Waugh R, Langridge P, Nix RE, Graner A (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor Appl Genet* 114:1091-1103
- Wang J, Raman H, Zhou M, Ryan PR, Delhaize E, Hebb DM, Coombes N, Mendham N (2007) High-resolution mapping of the *Alp* locus and identification of a candidate gene *HvMATE* controlling aluminium tolerance in barley *Hordeum vulgare* L. *Theor Appl Genet* 115:265-276
- Usubaliev B, Brantestam AK, Salomon B, Garkava-Gustavson L, von Bothmer R (2013) Genetic diversity in farmer grown spring barley material from Kyrgyzstan. *Genet Resour Crop Evol* 60:1843-1858
- Yahiaoui S, Igartua E, Moralejo M, Ramsay L, Molina-Cano JL, Lasa JM, Gracia MP, Casas AM (2008) Patterns of genetic and eco-geographical diversity in Spanish barleys. *Theor Appl Genet* 116:271-282
- Zhou G, Delhaize E, Zhou M, Ryan PR (2013) The barley MATE gene, *HvAACT1*, increases citrate efflux and Al³⁺ tolerance when expressed in wheat and barley. *Ann Bot* 112:603-612
- Zhou G, Pereira JF, Delhaize E, Zhou M, Magalhaes JV, Ryan PR (2014) Enhancing the aluminium tolerance of barley by expressing the citrate transporter genes *SbMATE* and *FRD3*. *J Exp Bot* 65:2381-2390

5 CONCLUSÕES GERAIS

Genótipos brasileiros de cevada apresentam diversidade menor que os materiais internacionais e silvestres aqui avaliados. Uma menor variabilidade foi observada em cultivares lançados nos últimos 25 anos, evidenciando uma diminuição da diversidade genética. Os programas de melhoramento devem considerar o uso de materiais mais diversos nos cruzamentos.

Quanto a resposta ao alumínio, genótipos brasileiros apresentam variabilidade porém possuem baixa tolerância em comparação com genótipos conhecidos internacionalmente por serem tolerantes. A diferença da tolerância nos genótipos brasileiros pode-se dever a outros fatores que não sejam o gene *HvAACT1*.

Métodos de biologia molecular, como marcadores moleculares e transgenia, podem contribuir significativamente para a melhoria da tolerância ao Al^{3+} em cevada. Para tanto, é interessante avaliar a incorporação do alelo contendo a inserção de 1 kb na região promotora do gene *HvAACT1* em genótipos brasileiros de cevada, já que nenhum desses genótipos apresentou esta inserção. Considerando que a linhagem transgênica L5 foi significativamente melhor que o cultivar convencional mais tolerante, o impacto do transgene (gene *TaALMT1* sob comando do promotor da ubiquitina de milho) deve ser avaliado após sua incorporação em genótipos brasileiros de cevada.

6 VITA

Jéssica Rosset Ferreira é filha de Dalmir do Amaral Ferreira e Geneci Rosset Ferreira. Nasceu em Passo Fundo, RS, em 09 de março de 1992. Coursou o primeiro e o segundo grau no Colégio Salvatoriano Bom Conselho em Passo Fundo. Ingressou no Curso de Ciências Biológicas, na Universidade de Passo Fundo (UPF), em Passo Fundo no ano de 2009. Durante a graduação atuou como bolsista de iniciação científica no Laboratório de Citogenética Animal do Instituto de Ciências Biológicas da UPF e como estagiária no Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno (NBAC) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo (CNPT/Embrapa) e no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Agronomia e Veterinária da UPF. Formou-se Bióloga em 2013. No mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre - RS, ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).