

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

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ALUMÍNIO TÓXICO EM
AVEIA BRANCA (*Avena sativa* L.)**

**Emerson Limberger
Engenheiro Agrônomo (UFRGS)**

**Dissertação apresentada como um dos
requisitos à obtenção do
Grau de Mestre em Fitotecnia
Área de Concentração Plantas de Lavoura**

**Porto Alegre (RS), Brasil.
Maio de 2006**

Dedico à minha família:
meus pais
Magda e Siderio Limberger
meus irmãos
Cristiano e Alexandre

AGRADECIMENTOS

A Carla e Sandra pela orientação, amizade e confiança que depositaram em mim.

Agradaço à Tatiana Boff pelas discussões de protocolos, que sempre geraram bons frutos, pelo trabalho de bancada que realizamos em conjunto e principalmente pelo trabalho de bancada que ela realizou sozinha por mim. Acima de tudo agradeço pela amizade. Tati, valeu!

Em nome de Mauricio Kobiraki, gerente da estação de pesquisa da Pioneer Sementes, agradeço a possibilidade dada pela empresa para eu terminar este mestrado.

Ao Paulo Roberto da Silva, grande amigo que embora tenha passado um quarto do meu mestrado nos EUA, tem uma longa trajetória de trabalho comigo.

Ao Itamar Cristiano Nava que me antecedeu neste projeto e gerou uma fenotipagem em estado da arte.

Ao professor Marcelo Pacheco, pela ajuda em parte das análises estatísticas.

A Laize Espindula, bolsista de iniciação do programa e que executou os experimentos fenotípicos.

A Carmen Luiza Feitosa de Lima Gomes que prontamente respondia meus emails para enviar as dezenas de artigos que a solicitei, e não houve revista nem edição que ela não encontrasse na Biblioteca da Tamu.

A Simone Rolim de Oliveira pela companhia dedicada nestes últimos anos, que tornou toda esta jornada muito mais fácil e agradável.

À CAPES pela bolsa de pesquisa nos dois primeiros semestres.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

IDENTIFICAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ALUMÍNIO TÓXICO EM AVEIA BRANCA (*Avena sativa* L.)¹

Autor: Emerson Limberger
Orientadora: Carla Andrea Delatorre
Co-orientadora: Sandra Cristina Kothe Milach

RESUMO

O alumínio é o metal mais comum na crosta terrestre e está presente em grande parte das regiões de produção agrícola em todo o mundo. Em condições de solos ácidos (pH<4,5), o que caracteriza os solos de grande parte da região Centro-Sul do Brasil, o alumínio torna-se um metal tóxico ($Al^{+2} \rightleftharpoons Al^{+3}$) à maior parte das plantas cultivadas. Desta forma, é importante identificar variedades e espécies mais tolerantes na tentativa de se isolar genes de tolerância por se tratar de um caráter agrônomico de interesse. Em aveia foi identificado um gene dominante de grande efeito e dois alelos (Al e al) na população UFRGS17 e UFRGS930598. Os objetivos deste trabalho foram converter e testar marcadores de DNA, de espécies correlatas à aveia, associados à tolerância ao alumínio e, identificar seqüências de RNA mensageiro diferentemente expressas na presença e na ausência de alumínio tóxico, na tentativa de se isolar possíveis candidatos à tolerância e que sejam exclusivos da espécie. O SNP identificado em aveia para XBCD1117 não se apresentou associado à tolerância ao alumínio quando testado em linhagens recombinantes de UFRGS17 X UFRGS930598. Logo, o gene para tolerância ao alumínio presente em UFRGS17 não é ortólogo ao gene *Alp* presente no cromossomo 4HS em cevada. Na análise de 68 clones foram identificadas 12 seqüências únicas. Destas, três não apresentaram homologia com seqüências depositadas em bancos de dados e, devido às suas especificidades, merecem ser mais estudadas. Três seqüências apresentaram-se como fortes candidatas à tolerância ao alumínio tóxico em aveia, por já haverem sido identificadas como genes que conferem o caráter em outras espécies. Uma delas é um fator de ribosilação ADP e as outras duas são receptores-cinases.

¹ Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (83 p.) Maio, 2006.

MOLECULAR ANALYZIS AND STUDY OF EXPRESSION OF TOXIC ALUMINIUM RESPONSIVE GENES IN OAT (*Avena sativa*)¹

Author: Emerson Limberger
Adviser: Carla Andrea Delatorre
Co-adviser: Sandra Cristina Kothe Milach

ABSTRACT

Aluminum is the most common metal on the Earth crust and it is found on most of the arable regions of the planet. Aluminum becomes a toxic metal ($Al^{+2} \rightleftharpoons Al^{+3}$) to the greatest part of crop plants in acidic soil conditions (pH<4,5), which characterizes most of the soils of the Central and Southern part of Brazil. Therefore, it is important to find more tolerant varieties and species, in order to isolate tolerance genes for it is a character of agronomic interest. A major effect dominant gene having two alleles, *Al* and *al*, was identified in oat in the population from the cross between UFRGS17 and UFRGS930598. The objectives of this work were to convert and test DNA markers associated with aluminum tolerance from oat related species, and to identify differentially expressed sequences from messenger RNA from a tester probe grown in aluminum stress condition and a not stressed driver probe, so species-specific oat candidate genes could be isolated. The SNP identified in oat from XBCD1117 was not associated to aluminum tolerance in the recombinant lines from UFRGS17 X UFRGS930598. Therefore, the gene involved in the aluminum tolerance at UFRGS17 may not be orthologus to gene *Alp* present at chromosome 4HS in barley. The analysis of 68 isolated sequences showed 12 exclusive ones. Among them, three clones did not have any homology with genbank sequences, and due to its high specificity are worth of future investigation. Three other sequences revealed high chances as candidates genes for toxic aluminum tolerance in oat, for they are already been identified as genes regulating this trait in other species. One of them is an ADP-ribosilation factor and the others are two receptor kinases.

¹ Master of Science Dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil, (83p.) May, 2006.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	01
2. Revisão Bibliográfica	03
2.1 – Genética da tolerância ao alumínio em aveia	07
2.2 – Mecanismos de tolerância ao alumínio	10
2.2.1 – Ácidos orgânicos.....	12
2.1.1.1 – Transporte de ácidos orgânicos	13
2.2.1.2 – Mudanças em enzimas do ciclo de ácidos orgânicos	14
2.2.2 – Transportador de alumínio	15
2.2.3 – Controle de peroxidação	16
3. Objetivo geral.....	19
3.1 – Objetivos específicos	19
4. Material e métodos	20
4.1 – Material genético.....	20
4.2 – Conversão de marcadores	21
4.3 – Extração de DNA	21
4.4 – Amplificação e reações de PCR.....	22
4.5 – Desenvolvimento de SNPs.....	23
4.6 – Análise de marcadores SSR	25
4.7 – Análise de regressão para os marcadores polimórficos	27
4.8 – Experimento para definição da dose de Al para estudos de expressão.....	28
4.9 – Análise de Expressão.....	29
4.10 – Macroarranjo	30
4.10.1 – Indução do estresse por alumínio	30
4.10.2 – Extração de RNA e mRNA.....	32
4.10.3 – Marcação quente do mRNA.....	33
4.10.4 – Preparo das membranas	34
4.10.5 – Hibridização	35
4.10.6 – Lavagem das membranas	35
4.11 – Hibridização subtrativa	38
4.11.1 – Indução do estresse por alumínio	38
4.11.2 – Extração do RNA e mRNA.....	38
4.7.3 – Clonagem	39
4.7.4 – Seqüenciamento dos clones	40

4.7.5 – Análise de seqüências	41
5. Resultados e Discussão	43
5.1 – Análise fenotípica	47
5.2 – Marcadores moleculares	49
5.2.1 Marcadores convertidos STS e SNP	49
5.2.1 Marcadores SSR.....	57
5.3 – Macroarranjo	58
5.4 – Seqüências diferencialmente expressas	59
5.4.1 Clone U17AL08	66
5.4.2 Clones U17AL04, U17AL07 e U17AL09	70
6. Conclusões	75
7. Perspectivas	76
8. Referências Bibliográfica	77
9. Apêndices	84

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Relação dos primers dos marcadores STS desenhados a partir das seqüências depositadas dos marcadores CDO1395, BCD1230, BCD1117 e WG464	21
2. Relação dos primers dos marcadores SNP desenhados a partir das seqüências obtidas a partir dos amplicons dos marcadores CDO1395, BCD1230, BCD1117	24
3. Modelo da ANOVA da regressão usada entre os marcadores polimórficos na população de aveia UFRGS 17 e UFRGS 930598 versus dados fenotípicos das linhagens recombinantes da mesma população e Teste t para o intercepto da regressão e do marcador daquela regressão	27
4. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final	28
5. Modelo de análise de variância para crescimento de raiz, para os genótipos de aveia UFRGS17 e UFRGS93598, em dois dias (bloco) e seis doses de alumínio (0, 200, 350, 500, 700 e 1000uM)	29
6. Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final	30
7. Composição da membrana de macroarranjo: posição, sonda, biblioteca de origem e tempo ao qual a espécie foi exposta ao alumínio para a geração da biblioteca, conforme detalhado na sessão acima.	36
8. Análise de variância para crescimento de raiz medido pelo seu comprimento final (cm), para os genótipos UFRGS17 e UFRGS930598, em dois dias (bloco) e seis doses de alumínio (0, 200, 350, 500, 700 e 1000 mM)	43
9. Médias e variâncias do comprimento de raiz de UFRGS 17 e UFRGS 930598 utilizadas nas comparações de médias pelo modelo Tukey-Kramer apresentadas na Figura 7	46
10. Análise da variância da regressão quadrática com platô do crescimento de raiz do genótipo de aveia UFRGS930598 versus dose de alumínio	48

11.	Componentes da equação de regressão do crescimento de raiz do genótipo de aveia UFRGS930598 versus dose de alumínio para a parte da curva sob função quadrática.....	48
12.	Análise da variância da regressão do marcador SSR AM1 versus rendimento.....	57
13-a.	Resultado de BLASTn versus banco de ESTs.....	51
13-b.	Resultado de BLASTn versus banco de DNA.....	52
13-c.	Resultado de BLASTx versus banco de DNA	53
14.	Comparativo dos clones obtidos de hibridização subtrativa de raízes da cultivar de aveia UFRGS 17 em resposta a alumínio tóxico e ESTs com menores esperanças de acordo com o tecido ou condição de onde foram extraídos os mRNAs	66

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Reação da ligninase I, uma das rotas da síntese de lignina, com destaque para o consumo de peróxido tóxico (caixa vermelha) e geração de água (caixa azul)	12
2. Fluxograma esquemático do desenvolvimento e análise de marcadores moleculares na população de aveia UFRGS 17 com UFRGS 930598	25
3. Fluxograma esquemático da análise de marcadores SSR na população de aveia UFRGS 17 com UFRGS 930598	26
4. Fluxograma esquemático do macroarranjo de contraste entre cDNAs marcados de UFRGS 17 na presença e ausência de alumínio tóxico e cDNAs de milho, sorgo, trigo, arroz e braquiária diferencialmente expressos por estresse de alumínio.....	31
5. Fluxograma esquemático do desenvolvimento e análise da hibridização subtrativa da cultivar de aveia UFRGS 17 submetida por uma hora a presença ou ausência de alumínio tóxico.....	39
6. Gráfico do crescimento de raiz representado pelo comprimento final (cm) de UFRGS17 (azul) e UFRGS930598 (amarelo) em doses crescentes de alumínio em diferentes concentrações do metal (μM) cuja forma fonte foi cloreto de alumínio, barras verticais indicam desvio padrão	46
7. Comparação de médias do crescimento de raiz dos genótipos de aveia UFRGS 17 e UFRGS 930598 em seis doses de alumínio pelo modelo Tuckey-Kramer, NS (não significativo, $\alpha > 0,05$), * (significativo $0,05 > \alpha > 0,01$), ** (significativo $\alpha < 0,01$)	47
8. Alinhamento dos mapas genéticos de aveia (Kanota x Ogle) e centeio (UC90 x E-line) e o mapa físico composto de trigo (ABD), com destaque (caixa de texto amarela) para a região heteróloga da sonda Xbcd1117. O mapa de trigo com os locos em verde à esquerda e o mapa de aveia com os QTLs em marrom à esquerda. (alinhamento feito com o aplicativo cMap e banco de dados do GrainGenes)	54
9. Alinhamento comparativo das seqüências de UFRGS17 e UFRGS93598 amplificadas com o primer STS1117. Programa: needle, Formato de alinhamento: srspair, matriz: EDNAFULL,	

	Penalidade de abertura de Gap: 10,0; Penalidade de extensão de Gap: 0,5, Comprimento: 154; Identidade: 153/154 (99,4%), Similaridade: 153/154 (99,4%), Gaps: 1/154 (0,6%), Score: 755,0	55
10.	Alinhamento comparativo das seqüências UFRGS17 e UFRGS93598 amplificadas com o primer STS1395. Programa: needle, Formato de alinhamento: srspair, matriz: EDNAFULL, Penalidade de abertura de Gap: 10,0; Penalidade de extensão de Gap: 0,5; Tamanho: 356pb; Identidade: 341/356 (95,8%), Similaridade: 341/356 (95,8%), Gaps: 12/356 (3,4%), Score: 1683,0	55
11.	Alinhamento comparativo das seqüências UFRGS17 e UFRGS93598 amplificadas com o primer STS1230. Programa: needle, Formato de alinhamento: srspair, Matriz: EDNAFULL, Penalidade de abertura de Gap: 10,0; Penalidade de extensão de Gap: 0,5; Comprimento: 698, Identidade: 691/698 (99,0%), Similaridade: 691/698 (99,0%), Gaps: 3/698 (0,4%), Score: 3421.0	56
12.	Alinhamento dos fatores de ribosilação relacionados com tolerância a metais e da U17AL08_ORF traduzida para proteína.....	69
13.	Dendograma do Bootstrapping das seqüências de fatores de ribosilação envolvidos em resposta de estresse por metais, Bj.AY701398 e Bj.AY331383 de Brassica juncea sob estresse por cádmio, manutenção da membrana plasmática e tráfego intracelular At.M95166, At.NM130285 e At.X7738 de Arabidopsis thaliana.....	69
14.	Dendograma do Bootstrapping das seqüências de receptores cinases U17AL07, U17AL09 e U17AL04 isolados de aveia em estresse por alumínio e outros receptores cinase Wak1 de Arabidopsis thaliana (tolerância à alumínio). AY083679 e AY08682 de Avena sativa (resistência à ferrugem da folha), AY038010 de Avena sativa (Pc68).	74

1 – INTRODUÇÃO

Solos ácidos são comuns em áreas agricultáveis em todo o mundo. O baixo pH do solo aliado à presença de alumínio constituem um cenário crítico para o cultivo de diversas culturas de interesse agrônomico. A alta disponibilidade de prótons (H^+) converte o alumínio da forma bivalente (Al^{2+}) para a forma trivalente (Al^{3+}). O íon trivalente de alumínio é tóxico às plantas, por competir com nutrientes essenciais ao desenvolvimento celular, como cálcio e fósforo, induzir o depósito de calose que impedem o fluxo celular e, principalmente, por gerar espécies reativas de oxigênio, como superóxido e peróxido, que oxidam biomoléculas como lipoproteínas da membrana plasmática. O efeito da toxicidade é a inibição do crescimento radicular.

A correção e manutenção do pH através da calagem é a prática mais usada para permitir o desenvolvimento vegetal adequado em solos com presença de alumínio. No entanto, com o advento do sistema de cultivo de semeadura direta, a prática de incorporação do calcário não é mais executada nas áreas que adotam este sistema, o que gera um gradiente de pH nas camadas superficiais do solo onde se encontra a rizosfera. Quanto mais profunda a camada, menor a correção do pH e maior o efeito da toxicidade do alumínio. Assim, a zona de crescimento radicular fica limitada.

Diversas espécies e genótipos dentro de espécies apresentam níveis de tolerância diferentes. As estratégias de destoxificação ou imobilização do alumínio

tóxico que leva as plantas à tolerância são muito diversificadas. Algumas das estratégias são exudação de ácidos orgânicos no solo para imobilizar o alumínio, transporte de alumínio para vacúolo ou meio externo e encapsulação do alumínio em vesículas no citoplasma.

O presente trabalho propõe-se a identificar genes relacionados à tolerância ao alumínio em aveia branca (*Avena sativa* L.), uma espécie hexaplóide, com genoma grande e complexo. A tolerância ao alumínio, na população de aveia usada neste estudo (UFRGS 17 x UFRGS 530598), é monogênica.

O acesso a um número pequeno de genes em um genoma grande é intrincado. Desta forma, as técnicas a serem usadas devem ser as mais pontuais possíveis. O presente estudo baseou-se em três técnicas: conversão de marcadores de DNA associados ao caráter de tolerância ao alumínio em espécies com alta sintenia com a aveia, macroarranjo de RNA com sondas de genes de outras espécies da família poaceae responsáveis ao alumínio e hibridização subtrativa de mRNA na presença e ausência de estresse por alumínio.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Solos ácidos ocupam aproximadamente 30% (ou 3.950 milhões de hectares) de todos os solos terrestres excluindo aqueles de regiões polares. Dentro da gama destes solos com baixo pH, 67% são ocupados por florestas ou reflorestamento, 18% por pradaria, savana e vegetação de estepe e apenas 4,5% (179 milhões de hectares) é usado para cultivo de plantas de lavoura (von Uexküll e Mutert, 1995). Considerando apenas a superfície cultivada, tem-se os solos ácidos como um limitante para a produção, pois aproximadamente metade dos solos agricultáveis é ácido (Kochian et al., 2005). Boa parte dos solos ácidos possui também quantidades significativas de alumínio trocável.

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre, abrangendo aproximadamente 7% de sua massa (Delhaize & Ryan, 1995). A presença de alumínio trocável no solo é um fator limitante à produtividade dos cultivos. A espécie trivalente de alumínio se dá na forma de hexaidrato octaedro ($\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$), a qual é a mais nociva para o crescimento das plantas (Kochian, 1995). A superfície potencial das membranas celulares possui carga negativa, o que intensifica a interação com o hexaidrato octaedro trivalente de alumínio (Kinraide et al., 1994). Inúmeras formas de alumínio coexistem em equilíbrio nos solos, no entanto, a hidrólise de ânions de alumínio, como o aluminato ($\text{Al}(\text{OH})_4^-$), para a forma de cátion trivalente ocorre em condições de solos ácidos, com o pH abaixo de 5 (Delhaize & Ryan, 1995). O Al também é antagonista de Cálcio, sendo

considerado o fator mais importante que afeta a absorção deste nutriente pela planta (Foy, 1974) e, neste caso, o efeito já se dá em pH 5,5 o que intensifica ainda mais o problema para os agricultores.

Desta forma, tolerância ao Alumínio passa a ser um caráter importante em termos de benefícios a serem incorporados em cultivares modernas de espécies cultivadas. Principalmente, considerando-se que diferentes espécies apresentam níveis variados de tolerância ao alumínio. Em um estudo comparativo baseado no recrescimento de raiz, centeio foi a espécie mais tolerante, seguida por trigo-mourisco, triticale e trigo (Yang et al. 2005), confirmando uma classificação anterior, exclusiva de cereais de inverno, onde centeio é o mais tolerante, seguido por aveia, trigo e depois cevada (Mugwira et al., 1976).

A aveia branca (*Avena sativa* L.) é uma planta da família das Poaceas, onde se encontram as espécies de maior contribuição para a alimentação humana, como o trigo (pertencente à tribo das Pooideae, a mesma da aveia) e o arroz (tribo das Oryzaceae).

A aveia branca é uma espécie hexaplóide ($2n=6x=42$) e possui os genomas AACDD. Os subgenomas A e D são altamente relacionados (Leggett & Markhand, 1995) e, provavelmente, o genoma D nunca tenha existido, mas sim derivado diretamente do genoma A (Leggett 1996 apud Li et al., 2000a). Embora a espécie tenha evoluído numa primeira fase por alopoliploidia e posteriormente derivado de espécies bastante correlatas como *A. insularis* (provável doadora do genoma C) e *A. barbata* (provável doadora do genoma B) e *A. sterilis* (provável ancestral direto), a reprodução é estável.

A estabilidade reprodutiva pode decorrer de controle genético no balanceamento meiótico ou do fato que, durante o processo evolutivo, tenha

havido várias translocações, cujos ciclos tenham diferenciado suficientemente os cromossomos a ponto de não causar pareamentos desbalanceados (Zhou, 1999), o que levaria a uma alta taxa de infertilidade. A análise de 248 marcadores RAPD polimórficos possibilitou a identificação de presença ou ausência de translocações entre diferentes espécies que contribuíram na evolução da aveia branca. Assim, pôde-se identificar a região do centro de origem como sendo o sudoeste da Ásia, atualmente Irã, Iraque e Turquia. Antes, especulava-se apenas que o grupo de espécies da aveia era originário de regiões frias, provavelmente oriente médio ou sul da Europa.

A evolução neste tipo de ambiente frio restringe seu cultivo no Brasil às regiões mais ao sul do Brasil. Os solos que compõem a área onde atualmente a aveia é cultivada no país são geralmente ácidos. Em pH abaixo de 5, o que constitui a maior parte destes solos, o alumínio adquire forma catiônica Al^{3+} , tornando-se tóxico para as plantas. A viabilização do cultivo nessas áreas se dá via correção do pH com calcário, para a conversão do alumínio para o seu íon Al^{2+} .

O cultivo de aveia branca tornou-se uma alternativa de cultura para a lavoura de inverno na região Sul (Federizzi et al., 1995). Áreas onde tradicionalmente eram plantados apenas trigo e cevada, agora têm a aveia como alternativa dentro dos sistemas que integram a semeadura direta como uma das práticas conservacionistas de solo. Dados demonstram que, quando a rotação de culturas for diversificada e apresentar a aveia branca como um de seus componentes, esta se caracteriza como uma das opções de menor risco e maior rentabilidade para a propriedade rural (Santos et al., 2004).

O aumento no consumo de aveia possibilitou a instalação de novas indústrias que processam o grão da aveia na região, o que facilita a venda do produto e garante um melhor preço.

A viabilização desta cadeia produtiva se faz através da disponibilidade de variedades adaptadas à região. O caráter reprodutivo da aveia (por autogamia) e o clima ideal para produção de sementes possibilitam a reutilização da semente em várias safras consecutivas, sem afetar o rendimento. Desta forma, a compra anual para a implantação da lavoura não é obrigatória. Logo, não há interesse por parte das empresas privadas de semente em melhorar e comercializar esta espécie. Atenta a esta demanda e consciente de seu papel na sociedade, a Faculdade de Agronomia da UFRGS desenvolve desde 1974 um programa de melhoramento genético de aveia. Desde então, já foram lançadas 22 variedades. O caráter tolerância ao alumínio é um dos objetivos do programa e teve o interesse aumentado nos últimos anos devido ao sistema de cultivo em semeadura direta. Foram desenvolvidos estudos de herança genética da tolerância ao alumínio em aveia e a caracterização do germoplasma. A identificação dos genes de tolerância ao alumínio pode permitir o desenvolvimento de marcadores para seleção assistida e ainda transformação de espécies menos tolerantes e importantes para o Brasil, como a cevada.

Devido ao grande tamanho do genoma da aveia branca, cerca de 12.600 Mb (Carels & Bernardi, 2000), e grande redundância do mesmo, a identificação de genes via mapeamento torna-se uma prática laboriosa e demorada, este problema é agravado pelas diferenças de translocação entre as linhas parentais (O'Donoghue, 2000).

A hibridização subtrativa é uma técnica recente, descrita em 1996, para o isolamento de genes. O método é eficiente, baseia-se na supressão de PCR e combina a normalização de RNA expressos em diferentes níveis e subtração de RNAs iguais em um único procedimento (Diatchenko et al, 1996). O RNA total representa uma fração pequena dos ácidos nucléicos celulares, quando comparado ao DNA. Dentro dos ácidos ribonucléicos a diferença na quantidade oscila de 1 a 5% entre tRNA e mRNA, o que aumenta muito as chances de se acessar um gene. Através da hibridização subtrativa, é possível aumentar ainda mais essas chances pela eliminação dos genes constitutivos, o que torna a técnica como uma das melhores opções para o isolamento de genes diferencialmente expressos.

Em estudos nas populações de aveia do germoplasma da UFRGS, a herança da tolerância ao alumínio foi identificada como sendo monogênica ou oligogênica (como será apresentado a seguir). Acessar uma quantidade reduzida de genes em um genoma grande passa a ser muito mais provável quando se parte de uma porção menor do mesmo. Por isso, o trabalho de expressão torna-se uma ferramenta mais eficiente do que as que usam DNA ou mRNA não subtraído e ainda pode contribuir no entendimento do mecanismo de tolerância, o que não é possível através de técnicas de análise molecular baseadas em DNA.

2.1 – Genética da tolerância ao alumínio em aveia

Diversos trabalhos têm estudado a herança do caráter tolerância ao alumínio em aveia. Com base em um estudo com 21 genótipos do programa de melhoramento da UFRGS, Sánchez-Chacón (1998) detectou herança monogênica, com um par de alelos e ação de dominância. Já Wagner (1999), em

um trabalho realizado com genótipos UFRGS17, UFRGS911715 e UFRGS 930598 concluiu que a tolerância genética ao alumínio é governada por um ou dois genes e chamou os alelos de tolerância de A1 e A2 e os de sensibilidade de a1 e a2. Mais recentemente, de Oliveira (2002) estudou oito genótipos de aveia também do programa da UFRGS. Ele constatou que a tolerância ao alumínio é geneticamente herdável e controlada por um gene com alelos múltiplos. Nava et al. (2005) testaram 333 linhagens recombinantes, oriundas do cruzamento de UFRGS 17 e UFRGS 930598-6, e encontraram 163 (48,9%) fenótipos sensíveis e 170 (51,1%) tolerantes ao alumínio, confirmando os trabalhos anteriores e ratificando a hipótese de um gene controlando este caráter na espécie (segregação 1:1; χ^2 0,147, P =0.70).

Embora muito se saiba da genética da tolerância ao alumínio em aveia branca, há poucos dados moleculares referentes a mesma. Oliveira (2002) testou 19 marcadores do tipo SSR e 24 combinações de primers AFLP com três nucleotídeos aleatórios, mas nenhum deles mostrou-se associado ao caráter estudado.

A busca por marcadores moleculares específicos, fortemente ligados a genes de interesse, ou o marcador sendo o próprio gene, tem sido uma constante para a viabilização do uso dos mesmos em programas de melhoramento genético. Em espécies com pouca informação molecular, como é o caso da aveia, a geração deste tipo de informação torna-se ainda mais difícil. Moore et al. (1995) identificaram regiões heterólogas entre os cromossomos de cereais, a alta colinearidade estava presente entre *triticeae* (*Triticum spp* e *Aegilops*), milho, milheto, arroz, sorgo e cana-de-açúcar. Devos e Gale (1997) adicionaram ao modelo o genoma da aveia, usando mapas de uma população diplóide (genoma

A). O alinhamento apresentou 20 regiões sintênicas com o arroz, cujo genoma é a base de comparação e o menor dentre todos os genomas comparados, sendo o da aveia-preta o maior. O conteúdo gênico, assim como a sua posição no cromossomo, independentemente do tamanho do genoma e número cromossômico é extremamente conservado entre espécies de cereais da família das poaceas. Assim, a exploração de dados moleculares de uma espécie para outra passa a ser uma opção definitivamente pertinente (Devos e Gale, 2000)

Baseado na existência da sintonia é possível usar dados de espécies filogeneticamente próximas para encurtar o tempo e o trabalho no desenvolvimento destes marcadores.

Ried e Anderson (1996) identificaram o primeiro marcador ligado ao locus Alt_{BH} , que confere tolerância ao alumínio à variedade de trigo BH1146. O marcador AFLP localizou-se a 1,1 cM do gene Alt_{BH} no braço longo do cromossomo 4DL e explicou 85% da variação fenotípica para este caráter. O marcador foi derivado do clone BCD1230 e recebeu o nome de Xbcd1230.

Miftahudin et al. (2002), baseados na sintonia existente entre os cereais, testaram a sonda BCD1230 de trigo em centeio. Esta co-segregou com o gene $Alt3$ daquela espécie, ficando a uma distância de 0cM.

Marcadores do tipo RFLP, Xabg472 e XWG464, previamente mapeados no braço longo do cromossomo 4H de cevada, foram usados para ancorar os demais marcadores do grupo de ligação onde foi identificado o gene Alp . O grupo compôs XWG464 e XCDO1395 a 2,1 cM norte de Alp (co-segregação entre os marcadores inviabilizou a determinação da ordem dos mesmos), XBCD1117 a 2,1cM sul de Alp e os demais marcadores Xabg472, XBCD1230, Xbcd15 e Xag114 (Tang et al., 2000). Assim, foi possível determinar novos marcadores

ligados a genes de tolerância ao alumínio, bem como determinar a sua posição no genoma de cevada. No entanto, o marcador BCD1230, quando testado em cevada, ficou a 33 cM do loco Alp, demonstrando independência de segregação em cevada do mesmo marcador previamente caracterizado para tolerância em trigo e centeio.

Nenhum trabalho de mapeamento conseguiu identificar o loco da tolerância em aveia branca. Em uma espécie diplóide de aveia preta (*Avena strigosa*), Wight et al. (2006) identificaram uma série de marcadores relacionados à tolerância a alumínio. No mapa construído para aveia preta, foi possível encontrar quatro QTLs (Quantitative Trait Loci). Dois dos QTLs caíram em regiões de marcadores anônimos não ancorados (neste caso AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism) e juntos explicaram 55% da variação. Dois outros QTLs caíram em região de marcadores caracterizados (SCAR, sequence characterized amplified region). O primeiro deles explicou 39% do caráter e é possivelmente ortólogo ao loco *Alm1* de trigo e arroz. O segundo pode ser ortólogo de *Alm2* em milho.

As informações de marcadores específicos para aveia são bastante limitadas. No que diz respeito a mecanismos de atuação, menos ainda se sabe da tolerância em aveia.

2.2 – Mecanismos de tolerância ao alumínio

Kochian et al. (2004), em uma ampla revisão sobre o caráter, dividiram a tolerância ao alumínio em dois tipos: mecanismos de exclusão e mecanismos de destoxificação interna. Em ambos os tipos de tolerância, os ácidos orgânicos têm um papel fundamental. No primeiro, o alumínio é complexado na solução do solo, impedindo a absorção pela planta, e no segundo o alumínio é absorvido, mas

complexado internamente por ácidos orgânicos, os quais anulam sua toxicidade.

Matsumoto (2005) subdivide em seis os tipos de destoxificação interna, e refere-se a estes como mecanismos intracelulares de tolerância. São eles: 1) quelação do alumínio por ácidos orgânicos ou compostos fenólicos no citosol; 2) compartimentação do alumínio no vacúolo; 3) promoção de processos biossintéticos de ácidos orgânicos que são exudados na rizosfera e ou quelados com alumínio nas células; 4) propriedades da parede celular como conteúdo de pectina e extensibilidade; 5) propriedades da membrana plasmática, incluindo características bioquímicas e eletrofisiológicas; 6) anulação do estresse induzido por oxigênio.

Há uma vasta gama de sugestões para mecanismos de tolerância ao alumínio. A maior parte dos genes até agora isolados e todas as mudanças fisiológicas detectadas parecem governar um processo mais de alívio do estresse do que ser um gene/mecanismo exclusivo de tolerância ao alumínio *per se*. O exemplo mais elucidativo foi demonstrado por Kato (2001) e Ezaki et al. (2005), ambos relacionaram a tolerância ao alumínio com aumento na síntese de lignina. O primeiro havia sugerido um provável efeito quelante da lignina sobre o íon Al^{3+} , imobilizando-o antes de causar qualquer efeito danoso na célula. O segundo comprovou, no entanto, que a tolerância ao alumínio conferido pelo aumento na expressão em arábido de *AtBCB* (*Blue copper binding protein*), gene relacionado à síntese de lignina em arábido, é indireto. Neste caso, a tolerância é devido ao efeito de dreno de peróxidos. No metabolismo da lignina, *downstream* ao gene *AtBCB*, há consumo de peróxidos em diversos passos do processo de polimerização dos fenóis, os quais formarão posteriormente a lignina e cuja matriz é a fenilalanina. Um exemplo do consumo de peróxidos na síntese

de lignina é pela enzima ligninase I, demonstrado na Figura 1. Desta forma, o aumento de síntese da lignina gera um consumo maior de peróxidos tóxicos à planta o que leva simultaneamente a dois efeitos, o aumento do depósito de lignina e a tolerância ao alumínio.

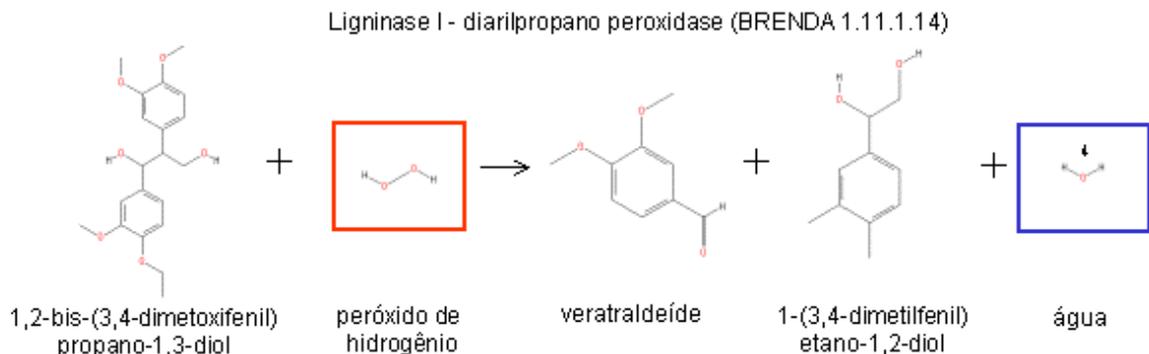


Figura 1: Reação da ligninase I, uma das rotas da síntese de lignina, com destaque para o consumo de peróxido tóxico (caixa vermelha) e geração de água (caixa azul)

Mariano & Keltjens (2005) sugerem que a absorção de nutrientes pode ser uma chave importante na tolerância ao alumínio. Os autores realizaram o escrutínio de 10 genótipos de milho que diferiam quanto à tolerância a alumínio para crescimento de raiz e concentração interna de nutrientes. Foi possível associar maior absorção de cálcio e magnésio positivamente com a tolerância ao alumínio, sob a presença de Al³⁺ na solução.

2.2.1 Ácidos orgânicos

Existem dois mecanismos distintos referentes a como ácidos orgânicos podem conferir tolerância ao alumínio tóxico. O primeiro deles, mais antigo e mais amplamente estudado, baseia-se na exudação de ácidos orgânicos pelas raízes no solo. Uma vez livres na solução do solo os ácidos orgânicos quelariam o Al³⁺

antes de este atingir a rizosfera, impedindo sua penetração na raiz. O segundo mostra a modificação de enzimas relacionadas ao ciclo de ácidos orgânicos. Ambos modelos são apresentados a seguir.

2.1.1.1 - Transporte de ácidos orgânicos

Dentre todos os genes de tolerância ao alumínio, o mais estudado é aquele encontrado no loco Alt em trigo. Sasaki et al. (2004) descreveram o primeiro gene associado com este loco a uma distância mínima de 0,25cM. Foram isolados dois alelos, um de uma linha sensível e outro de uma linha tolerante de trigo. Os alelos foram denominados respectivamente ALMT1-1 e ALMT1-2 e suas proteínas divergiam apenas em dois aminoácidos. No entanto, ambos alelos conferiam tolerância a alumínio quando expressos no mesmo nível. *ALMT1* consiste de um transportador de malato constitutivo. Delhaize et al. (2004) usaram o gene *ALMT1* para transformar cevada e introduzir tolerância ao alumínio com sucesso na espécie, a qual é bastante sensível ao íon. A teoria de exudação de malato foi reforçada neste estudo ao identificar exudação de malato somente nas linhagens transgênicas e não nas do tipo selvagem. Yamaguchi et al. (2005) demonstraram a localização subcelular de ALMT1 na membrana plasmática, como era esperado para uma proteína de transporte. O experimento também confirmou a expressão de *ALMT1* na ausência de Al e mostrou correlação entre níveis de mRNA e proteínas. Todos estes estudos comprovaram que o transporte de ácido orgânico induz tolerância ao alumínio tóxico em plantas e genes que exerçam funções de transportadores de membrana são grandes candidatos para conferir o caráter.

2.2.1.2 – Mudanças em enzimas do ciclo de ácidos orgânicos

Embora a relação entre os ácidos orgânicos e a tolerância ao alumínio já estivesse caracterizada por consequência da quelação do íon Al^{3+} , apenas o sentido *downstream* do mecanismo de ação era conhecido. O efeito *per se* que resultava na tolerância estava bem definido, mas as modificações do metabolismo de ácidos orgânicos e quais implicações teriam em processos celulares devido ao seu desvio de rota ainda não haviam sido identificadas. Em trigo, onde a secreção de ácidos orgânicos está bem caracterizada, nenhuma diferença foi encontrada na atividade de enzimas relacionadas ao ciclo de anabolismo destes. As enzimas PEPcase (EC 4.1.1.31), NADH-malato desidrogenase (EC 1.1.1.37), citrato sintase (EC 2.3.3.1) e NADP⁺-isocitrato desidrogenase (EC 1.1.1.42) tiveram a mesma atividade entre genótipos sensíveis e tolerantes (Li et al., 2000b; Ryan et al., 1995). A atividade das mesmas enzimas foi testada em variedades de triticales sensível e tolerante ao alumínio, tanto no ápice quanto nos segmentos maduros das raízes. O resultado foi o mesmo obtido para trigo e centeio, assim o efluxo de ácidos orgânicos não é regulado pelos níveis internos dos mesmos nem pela capacidade das células das raízes sintetizarem malato e citrato (Hayes & Ma, 2003).

Gonçalves et al. (2005) foram pioneiros em encontrar diferenças entre enzimas correlatas ao ciclo de ácidos orgânicos e, assim, identificar mudanças no metabolismo *upstream* dos ácidos orgânicos. Em um estudo com plântulas de sorgo (*Sorghum bicolor*) de duas variedades divergentes quanto à tolerância ao alumínio, foram encontradas mudanças de atividade de fumarase (EC 4.2.1.2) e malato desidrogenase (EC 1.1.1.37) nas raízes, além de fumarase nas folhas e de enzimas de ácido trans-aconítico e citrato desidratase (Citrato \rightleftharpoons cis-aconitato +

H₂O) (EC 4.2.1.4), especialmente em raízes. Também foi relatado, no mesmo trabalho, um grande aumento na secreção de ácidos orgânicos (ácidos málico, t-aconítico, Fumárico, Succínico, Quínico, Cítrico) em sorgo tolerante assim como em sorgo sensível em resposta ao alumínio. Após a exposição, no entanto, sorgo tolerante secretou maior quantidade de ácidos orgânicos.

Este trabalho veio a esclarecer o paradigma que existia quanto ao fato do dreno de ácidos orgânicos, em variedades tolerantes, não afetar diretamente o rendimento das mesmas. Plantas tolerantes possuem enzimas que respondem à presença de alumínio aumentando a sua atividade após a indução do estresse, podendo haver a reposição de ácidos orgânicos para a planta tentar equilibrar as perdas para o meio extracelular, sem que acabe gerando um dano ainda maior no citosol pela falta de elementos do ciclo do ácido cítrico.

2.2.2 – Transportador de alumínio

Larsen et al. (2005) estudaram três linhagens mutantes de *Arabidopsis thaliana* sensíveis ao alumínio e os denominaram *als1*, *als2* e *als3* (da sigla em inglês para *Aluminum sensitive* 1, 2 e 3, “sensível a alumínio 1, 2 e 3”), cada uma contendo um gene mutante *ALS1*, *ALS2* e *ALS3*, respectivamente. O terceiro mutante foi cruzado com o tipo selvagem Columbia e através de clonagem baseada em mapeamento foi possível isolar o gene *ALS3*, o qual possuía similaridade com o gene de bactéria *ybbM* que é um transportador ABC (*ATP Binding Cassete*) e em *Escherichia coli* confere tolerância a metais. No entanto, não foi encontrada nenhuma similaridade significativa entre *ALS3* e *TaMDR1* (Sasaki et al., 2004), embora este também seja um transportador ABC previamente descrito, e esteja relacionado com tolerância ao alumínio em trigo.

Os transportadores ABC constituem uma superfamília de proteínas com dois domínios, uma região transmembrana pouco conservada e o sítio de hidrólise do ADP extremamente conservado. Como a maioria dos transportadores ABC forma dímeros, o número final de domínios da proteína funcional acaba sendo quatro. Os transportadores ABC estão envolvidos no transporte de uma vasta gama de moléculas, desde pequenos íons até macromoléculas.

O gene *ALMT1* também é um transportador de membrana que confere tolerância ao alumínio, embora não tenha sido classificado na família ABC. O mais importante é o fato de o gene *ALMT1* ser um gene constitutivo, ao contrário dos transportadores ABC *ALS1* de *A. thaliana* e *TaMDR1* de *T. aestivum*, cujas expressões são reguladas pelo nível de alumínio em solução.

2.2.3 – Controle de peroxidação

O controle dos danos causados por ROS (da sigla em inglês: *Reactive Oxygen Species*), espécies reativas de oxigênio, tem sido o modelo mais explorado nos trabalhos recentes de tolerância ao alumínio. Diferentes enzimas foram propostas para o modelo, como glutatona S-transferase (gene *parB*) de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Ezaki et al., 2000), peroxidases também de tabaco, que usam o ascorbato e a glutatona como doadores de elétrons na redução de radicais livres (Devi et al., 2003), e enzimas consumidoras de ROS como MnSOD (manganês superoxidase mitocondrial) em *Brassica napus* (Basu et al., 2001).

O íon Al^{3+} forma ligações eletrostáticas preferencialmente com doadores de oxigênio, como carboxilatos e fosfatos. Devido à localização apoplástica do Al^{3+} , as pectinas da parede celular e a superfície da membrana plasmática são as mais atingidas (Yamamoto, 2001). O principal efeito nocivo do alumínio acaba sendo a

peroxidação lipídica, que leva a desestruturação da membrana celular e inibe o crescimento radicular. Basu et al. (2004) abordam em *Saccharomyce cerevisiae* o ciclo metabólico da glutathione como meio de contornar o efeito danoso da geração de ROS pelo alumínio, através de um sistema de eliminação de ROS em duas etapas. Primeiramente via superóxido dismutase, com formação de peróxido e consumo de dois prótons e posteriormente via catalase, com formação de água e O₂, ou tioredoxina peroxidase e GSH peroxidase. Nestes dois últimos casos faz-se necessária a reciclagem dos sítios redox das mesmas.

Ezaki et al. (2004) comprovaram o aumento da expressão de dois genes de glutathione S transferase (*AtGST1* e *AtGST11*) de arabidopsis, induzidos por alumínio, entre outros estresses como frio, calor, H₂O₂, Paraquat, cádmio e cobre. A destoxificação via glutathione S transferase se dá através da reação $RX + \text{glutathione reduzida} \rightleftharpoons HX + R\text{-S-glutathione}$, onde em RX o R pode ser grupos alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos e o X radicais sulfato, nitrila, halido, todos eles em qualquer combinação (Atkins et al., 2003). A alta inespecificidade permite a ação contra vários elementos tóxicos, os quais são complexados pela glutathione S-transferase.

Ezaki et al. (2005) conseguiram contornar o efeito da peroxidação em levedura e arabidopsis com a superexpressão do gene *AtBCB*, que diretamente promove a síntese de lignina e cujo processo contém um dreno natural de peróxidos. Assim, um aumento na demanda por peróxido é capaz de remediar o efeito de estresse por alumínio. A falta de dreno para o peróxido nas linhagens sensíveis causou peroxidação lipídica e conseqüentemente o estresse.

Outras formas de contornar a toxicidade por alumínio, capazes de conferir tolerância, já foram descritas. Ryan et al. (1997) identificaram em trigo um

transportador aniônico da plasmalema ativado por alumínio que estava envolvido, principalmente, com o efluxo de cloro (Cl^-). Wang e Yang (2005) comprovaram o aumento de quantidade de enzimas antioxidantes como Lipoxigenase (LOX, EC 1.13.11.12) e na atividade de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) e redução no conteúdo de ascorbato (ASC) no ápice de raízes de *Cassia tora*.

3. OBJETIVO GERAL

Identificar variações em seqüências de DNA e no transcriptoma da aveia (*A. sativa*) associadas à tolerância ao alumínio, a fim de identificar estratégias moleculares para a seleção e desenvolvimento de genótipos de aveia tolerantes a esse estresse.

3.1. Objetivos específicos

3.1.1. Identificar variações de DNA entre duas variedades de aveia divergentes quanto à tolerância ao alumínio e testar se essas variações são associadas a essa característica;

3.1.2. Construir uma biblioteca subtrativa a fim de obter um grupo de seqüências diferencialmente expressas de um genótipo tolerante de aveia em presença versus ausência de alumínio;

3.1.3. Identificar fragmentos de DNA diferencialmente expressos em um genótipo tolerante de aveia cultivado na presença e na ausência de alumínio em solução hidropônica, a fim de determinar quais genes candidatos podem ser explorados na identificação de genótipos tolerantes de aveia.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material genético

O material genético constituiu-se de duas variedades de aveia branca divergentes quanto à tolerância ao alumínio: UFRGS 17 (tolerante) (COR²/CTZ³/PENDEK/ME1563//76-29-76-23/75-28/C1833) e UFRGS 930598 (sensível) (UFRGS15/UFRGS881920). UFRGS 17 é uma variedade comercial desde 1996 e registrada na LVEC (List of Varieties Eligible for Certification) da OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). UFRGS 930598 é uma linhagem do Programa de Melhoramento Genético de Aveia da UFRGS. O genótipo UFRGS 930598 foi usado nos estudos de marcadores moleculares, para escrutínio dos primers. O genótipo tolerante foi usado no estudo de marcadores, assim como nos estudos de expressão: um macroarranjo e uma hibridização subtrativa, em ambos o mRNA foi extraído em condição de estresse por alumínio (testador) e na ausência de estresse (controle).

Um total de 94 linhagens recombinantes F₆, do cruzamento entre estes genótipos foi selecionado de uma população maior, previamente fenotipada para recrescimento da raiz após estresse por alumínio por Nava (2005a). O critério de seleção foi baseado no desvio máximo em direção tanto à tolerância quanto à sensibilidade ao alumínio, principalmente na escolha dos acessos tolerantes, já que há um grande desvio dentro deste grupo como discutem Nava et al. (2005). Cada grupo foi composto por 47 linhagens. As linhagens foram usadas para

análise de segregação dos marcadores que se apresentaram polimórficos entre os genótipos parentais.

4.2 Conversão de marcadores

Marcadores do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) XCDO1395, XBCD1230, XBCD1117 e XWG464 altamente ligados à tolerância ao alumínio em espécies de cereais foram convertidos a marcadores STS (*Sequence Tagged Site*) para amplificação em PCR. As seqüências depositadas no *genebank* foram acessadas e a partir delas desenhou-se primers através do aplicativo Primer3. Os mesmos foram sintetizados pela Invitrogen. Dentre eles, BCD1230 associado aos locos ALT3 de centeio e ALT_{BH} de trigo; BCD1117 e BCD1395 com o loco Alp de cevada.

Tabela 1: Relação dos primers dos marcadores STS desenhados a partir das seqüências depositadas dos marcadores CDO1395, BCD1230, BCD1117 e WG464

STS	Seqüência	Tamanho (bp)	
		Amplicon	Primer
BCD1230-F	5' GGAGCAAAGGCTGGAGTTGT 3'	695	20
BCD1230-R	5' TGCCACCAAACCCAGGATT 3'		20
BCD1117-F	5' TGAACCTTGATGCCAGAATGC 3'	153	20
BCD1117-R	5' TCCTGAATAAGGTCTTCATACCAA 3'		24
CDO1395-F	5' CAGAAAGGCAGTGCTCCAAT 3'	355	20
CDO1395-R	5' TTATCACGGGAAAGGGATCA 3'		20
XWG464-F	5' AGTCCAAATGATGTCACAGG 3'	-	20
XWG464-R	5' AGGACTGTGAAGGATGCTTACT 3'	-	22

4.3 Extração de DNA

Cinquenta sementes de cada um dos genótipos UFRGS 17 (tolerante), UFRGS 930598 (sensível) e de 94 linhagens recombinantes foram colocadas em papel germinador e levadas a BOD para germinar. A temperatura foi mantida constante (19°C) sob ausência de luz. Os coleótilos foram coletados no quinto dia e macerados em nitrogênio líquido para a extração do DNA, que seguiu o protocolo de Murray e Thompson (1980). A microextração foi feita com um total de 620µl de tampão (CTAB 1% (p/V), 1,4 mM NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0) pré-aquecido a 65°C para um terço do volume (0,5mL) de tecido macerado. Após agitação em vórtex, foi adicionado 1µL de proteinase K à mistura, que foi incubada a 65°C no tampão de extração por 60 min, com agitação a cada intervalo de 10 min. Após a incubação, a solução foi resfriada em temperatura ambiente e adicionados 150µL de fenol e 150µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A separação das fases foi em 6 min de centrifugação a 15.000 rpm. A solução com o DNA foi transferida para novos tubos e o DNA precipitado com etanol 95% a -20°C, ressuspenso em TE (Tris HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) e tratado com RNase A. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Genesis II, Spectronic).

4.4 Amplificação e reações de PCR

A reação de PCR seguiu concentrações ideais para enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) (MgCl₂ 1,5mM, dNTP 200µM, tampão da polimerase 1X, 1U de Taq DNA polimerase e 10 pmol de cada primer, as reações foram feitas em um volume final de 25 µl). As amplificações foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.). Os produtos de amplificação foram separados em

gel de agarose 3%, tamponados com TBE 0,5x, corados com brometo de etídio (8uL para 300mL de gel) e visualizados em transluminador UV.

A amplificação de PCR com os primers STS foi de 40 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C em 1 min e extensão a 72°C em 2 min. Para diferenciar das sondas originais, os marcadores foram denominados STS1395, STS1230, STS1117 e STS464. Os marcadores STS amplificaram uma banda cada um e de mesmo tamanho nos genótipos UFRGS 17 e UFRGS 630598. Como a análise dos amplicons não evidenciou polimorfismo entre os genótipos tolerante e sensível, estes foram convertidos a marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

4.5 Desenvolvimento de SNPs

Os amplicons das reações de amplificação dos marcadores STS1395, STS1230 e STS1117 foram clonados utilizando o produto de PCR diretamente da reação, pois cada reação gerou apenas um amplicon, o que dispensa a separação em gel. A clonagem seguiu o protocolo do kit TOPO TA (Invitrogen), sendo que a transformação foi feita por choque térmico. A obtenção dos clones seguiu o mesmo protocolo descrito para a hibridização subtrativa. O seqüenciamento visou identificar variações nucleotídicas internas, que não poderiam ser identificadas por eletroforese. Novos primers foram desenhados para as mudanças nucleotídicas existentes entre as seqüências das variedades UFRGS17 e UFRGS930598. O ponto de anelamento 3' concentrou a(s) mudança(s), tendo o desenho a composição adequada para parear no DNA molde de UFRGS 17 e não parear em UFRGS930598. Como os primers focaram

mudanças nucleotídicas específicas, foram denominados como SNP1395, SNP1230 e SNP1117.

Os SNPs foram testados com a mesma reação de polimerase que os primers dos quais foram derivados, no entanto todos eles amplificaram bandas também em UFRGS93598.

Diversas temperaturas de pareamento e duração de ciclos foram testadas com o intuito de tornar a amplificação dos primers específica. A especificidade foi atingida apenas para o primer SNP1117 e constituiu de 57°C por 45 s, 72°C por 30 s num total de 30 ciclos de amplificação.

Tabela 2: Relação dos primers dos marcadores SNP desenhados a partir das seqüências obtidas a partir dos amplicons dos marcadores CDO1395, BCD1230, BCD1117

SNP	Seqüência	Tamanho (bp)	
		Amplicon	Primer
SNP1230-F	5' GGAGCAAAGGCTGGAGTTGT 3'	691	20
SNP1230-R	5' ACCAAACCCAGGATTGGCC 3'		19
SNP1117-F	5' TGAAC TTGATGCCAGAATGC 3'	116	20
SNP1117-R	5' GGTCTTCATACCAAAGATGT3'		24
SNP1395-F	5' CAGAAAGGCAGTGCTCCAAT 3'	340	20
SNP1395-R	5' ATCACTAGGTGATTCAGAAT 3'		20

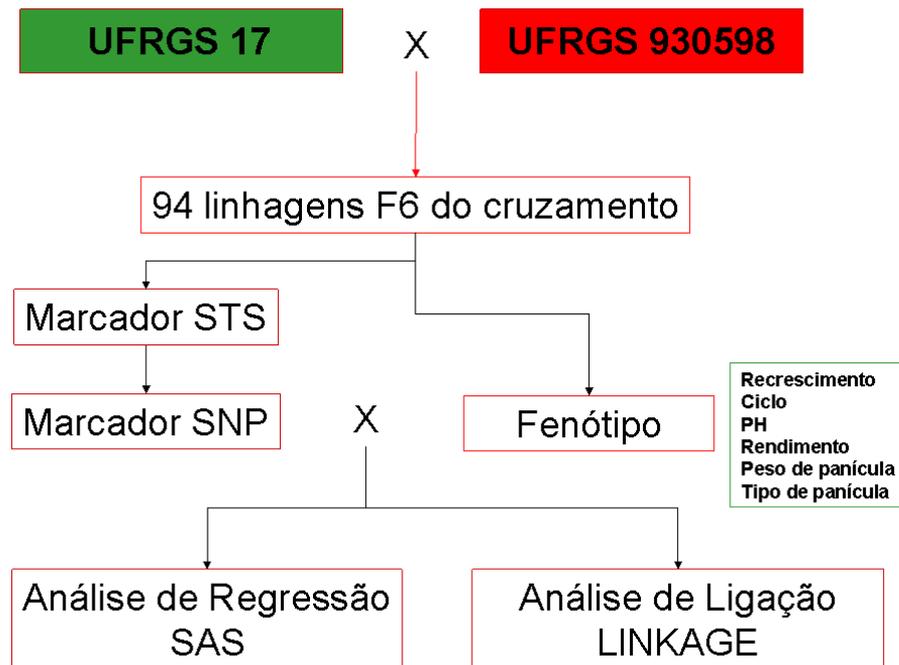


Figura 2 : Fluxograma esquemático do desenvolvimento e análise de marcadores moleculares na população de aveia UFRGS 17 com UFRGS 930598

4.6 Análise de marcadores SSR

Os seguintes primers de marcadores *Simple Sequence Repeat* (SSR), específicos para aveia, foram testados: AM1, AM2, AM3, AM4, AM5, AM6, AM14, AM15, AM17, AM19, AM21, AM22, AM23, AM24, AM25, AM27, AM28, AM31, AM35, AM40, AM41, AM42, AM11, AM26, AM30, AM38, AM83, AM84, AM85, AM86, AM87, AM90, AM91, AM93, AM95, AM96, AM98, AM102, AM104, AM108, AM112, AM113, AM114, AM115, 270-1, 270S-1, 669-1, 1407-1, 1158-1, 1882-1, 1950-2, AM81, AM82, AM88, AM89, AM94, AM99, AM100, AM101, AM103, AM105, AM106, AM107, AM109, AM110, AM111, AM117, AM118, AM119, AM120, AM121, AM122, AM123, AM124, AM92, AM97, AM116, perfazendo um total de 77 marcadores. A reação de amplificação seguiu as indicações dos autores Pal et al. (2002) e Li et al. (2000a), tanto para a solução quanto para os ciclos de PCR.

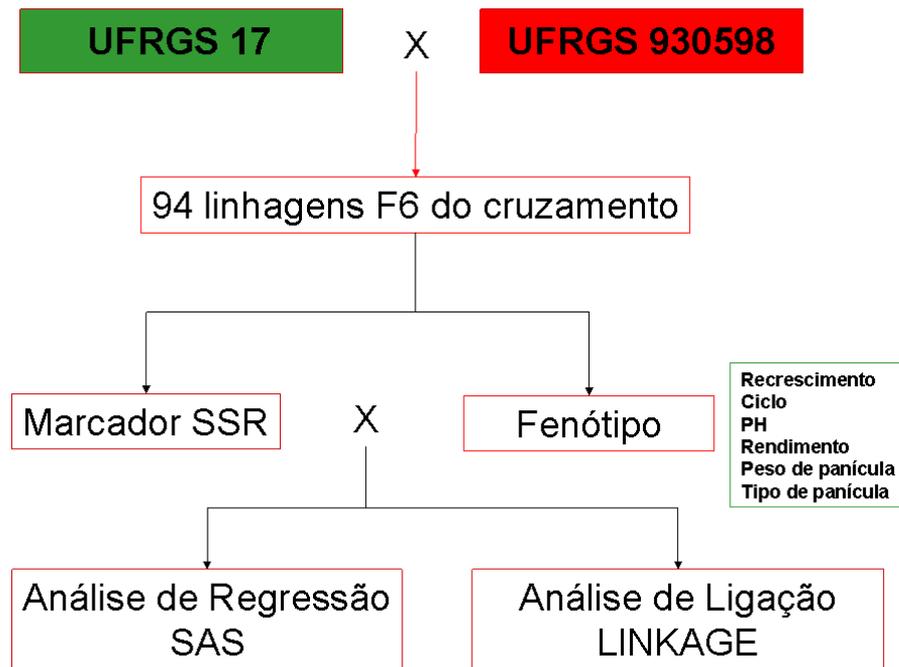


Figura 3: Fluxograma esquemático da análise de marcadores SSR na população de aveia UFRGS 17 com UFRGS 930598.

4.7 Análise de regressão para os marcadores polimórficos

O modelo de regressão linear foi usado para detecção de relação entre os marcadores e os dados fenotípicos da população UFRGS 17 e UFRGS 930598. O número de marcadores válidos variou de acordo com o marcador usado devido a limitações intrínsecas na técnica de PCR. Desta forma, os graus de liberdade foram exclusivos a cada marcador conforme o número de reações validadas. Assim, os marcadores microsatélites apresentam os seguintes graus de liberdade: AM1=79-1, AM2=62-1 e AM25=76-1, e o marcador SNP1117=41-1.

Tabela 3: Modelo da ANOVA da regressão usada entre os marcadores polimórficos na população de aveia UFRGS 17 e UFRGS 930598 versus dados fenotípicos das linhagens recombinantes da mesma população e Teste t para o intercepto da regressão e do marcador daquela regressão

Causas Variação	GL	QM	F-teste
Modelo	1	SQM/GL^{Erro}	QM^{Modelo}/QM^{Erro}
Erro experimental	Número de Marcadores válidos-1	SQM/GL^{Erro}	
Total Corrigido			
Variável	GL	Estimativa do parâmetro	Valor t
Intercépto	1	4117,146	/Erro
Marcador	1 ²	471,028	3,29

²Embora os marcadores SSR sejam codominantes, não foi encontrado nenhum heterozigoto, devido à geração em teste, portanto o grau de liberdade foi 1 e não 2.

4.8 Experimento para definição da dose de Al para estudos de expressão

A análise de resposta das variedades UFRGS17 e UFRGS960598 foi testada quanto ao crescimento de raiz primária em solução hidropônica. As sementes foram selecionadas para que tivessem um tamanho aproximado. Todas estavam estocadas em geladeira, a 4°C. Antes de serem colocadas para geminar, as sementes foram descascadas (através da remoção da lema e pálea), lavadas em álcool 70% por um minuto, desinfetadas com hipoclorito de sódio 2% por três minutos e lavadas três vezes em água destilada. Depois de desinfetadas, as sementes foram passadas para papel germinador (40 sementes por folha), e mantidas em de BOD (temperatura constante de 19°C e regime de 12h de luz) por dois dias. As plântulas com tamanho de radícula uniforme, foram transferidas para solução hidropônica, com seis doses de alumínio 0, 200, 350, 500, 700 e 1000uM,

todas ajustadas para pH=4. O volume de solução por recipiente foi de 2,5L, providos com presença constante de aeração. Cada um dos recipientes teve 10 plântulas de UFRGS17 e UFRGS930598. Os recipientes foram mantidos dentro de tanque com termostado regulado para 25°C. Na terceira data, quando foi feita última repetição do experimento, a temperatura ambiente aumentou, e conseqüentemente a temperatura da água também. A solução nutritiva foi feita para cada repetição a partir da mesma diluição, sendo trocada a cada 48 horas durante sete dias, depois dos quais as plantas foram retiradas e foram fotografadas. As imagens foram usadas para medição do comprimento de raiz com auxílio do software de domínio público ImageJ (NIH).

Tabela 4: Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final

	Massa Molecular	Concentração final do sal
Ca(NO₃)₂·4H₂O	236,16	4,000 mM
MgSO₄·7H₂O	246,48	2,000 mM
KNO₃	101,10	4,000 mM
(NH₄)₂SO₄	132,14	0,435 mM
KCl	74,55	0,500 µM
MnSO₄·1H₂O	169,01	2,000 µM
CuSO₄·5H₂O	249,68	0,300 µM
ZnSO₄·7H₂O	287,54	0,800 µM
NaCl	58,45	30,000 µM
Na₂MoO₄·2H₂O	241,95	0,100 µM
H₃BO₃	59,80	10,000 µM
GeoFe-6*		0,900 mM
AlCl₃·6H₂O	241,43	700,000 µM**

*1kg de GeoFe-6 tem 60g de Ferro 55,8g

**Refere-se à concentração do Alumínio e não do sal, aproximadamente 20ppm

Os dados do crescimento de raiz observados para os genitores UFRGS 930598 e UFRGS 17, nas três repetições (blocos no tempo) foram submetidos à análise da variância, com a utilização do teste F. O modelo de delimitação aplicado foi o de blocos casualizados com parcelas subdivididas. A detecção de

significância no bloqueamento, devido ao terceiro bloco, foi efeito da temperatura ambiente. A eficiência do bloqueamento permitiu a retirada dos dados da terceira data, de forma que na análise final foram usadas apenas as repetições referentes a primeira e segunda data, como demonstrado na tabela da análise da variância abaixo.

Tabela 5: Modelo de análise de variância para crescimento de raiz, para os genótipos de aveia UFRGS17 e UFRGS93598, em dois dias (bloco) e seis doses de alumínio (0, 200, 350, 500, 700 e 1000uM)

Causas Variação	GL	QM	F-teste
Bloco (A)	1	SQ^A/GL^A	SQ^{Bloco}/QM^{Erro}
Dose (B)	5	SQ^B/GL^B	$SQ^B/QM^{(AxB)}$
AxB	5	SQ^{AxB}/GL^{AxB}	SQ^{AxB}/QM^{Erro}
Genótipo (C)	1	SQ^C/GL^C	$SQ^{Genótipo}/QM^{Erro}$
BxC	5	SQ^{BxC}/GL^{BxC}	SQ^{AxB}/QM^{Erro}
Erro experimental	170	SQ^{Erro}/GL^{Erro}	
Total	187		

4.9 Análise de Expressão

A análise de expressão constituiu de dois experimentos isolados. Um macroarranjo e uma hibridização subtrativa. Em ambos os casos, foi usado apenas o padrão de expressão da variedade resistente. O tratamento testador constituiu de mRNA de UFRGS 17 sob estresse por alumínio e o tratamento controle de mRNA de UFRGS 17 sem estresse por alumínio.

A maioria dos processos foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS, sendo que as exceções estão discriminadas.

4.10 Macroarranjo

4.10.1 Indução do estresse por alumínio

Seiscentas sementes da variedade UFRGS 17 foram separadas em grupos de 60 sementes por papel germinador e levadas a câmara de crescimento do tipo BOD. O regime de fotoperíodo foi de 12/12 dia/noite, com o dia artificial começando às 6:00 AM. A temperatura foi constante de 20°C. No quinto dia, as plântulas foram transferidas para bandejas com solução hidropônica com aeração constante e solução nutritiva de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6: Composição da solução nutritiva: fontes minerais usadas e concentração final

	Massa Molecular	Concentração final do sal
Ca(NO₃)₂·4H₂O	236,16	4,000 mM
MgSO₄·7H₂O	246,48	2,000 mM
KNO₃	101,10	4,000 mM
(NH₄)₂SO₄	132,14	0,435 mM
KH₂PO₄	136,10	0,500 μM
MnSO₄·H₂O	169,01	2,000 μM
CuSO₄·5H₂O	249,68	0,300 μM
ZnSO₄·7H₂O	287,54	0,800 μM
NaCl	58,45	30,000 μM
Na₂MoO₄·2H₂O	241,95	0,100 μM
H₃BO₃	59,80	10,000 μM
GeoFe-6*		0,900 μM
Al₂(SO₄)₃·18H₂O	666,42	700,000 μM**

*1kg de GeoFe-6 tem 60g de Ferro 55,8g

**Refere-se a concentração do Alumínio e não do sal, aproximadamente 20ppm

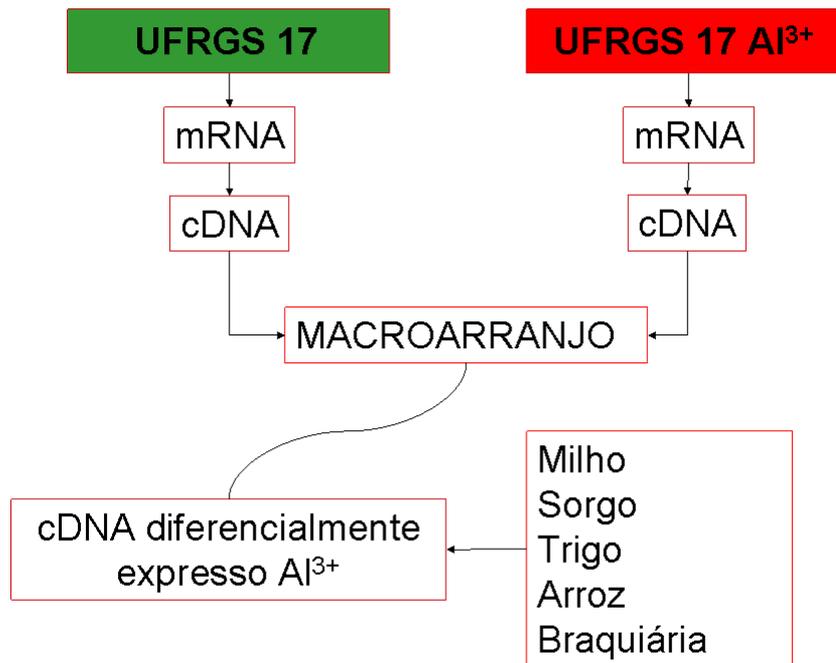


Figura 4: Fluxograma esquemático do macroarranjo de contraste entre cDNAs marcados de UFRGS 17 na presença e ausência de alumínio tóxico e cDNAs de milho, sorgo, trigo, arroz e braquiária diferencialmente expressos por estresse de alumínio

O crescimento em meio hidropônico durou dois dias. Às 8:00 da manhã, metade da população de plântulas tiveram Al adicionado na solução, na forma de sulfato de alumínio, até atingir a concentração de 700 μM de alumínio. A adição de alumínio foi suficiente para baixar o pH para 4. O processo de transferência foi rápido e reproduzido da mesma forma nas plantas controle, ou seja, estas, embora fossem recolocadas de novo na mesma solução nutritiva, foram suspensas simultaneamente para equalizar os efeitos da exposição das raízes ao ar.

O estresse por alumínio durou uma hora. A coleta foi feita de forma alternada entre Teste e Controle até que todo o tecido estivesse coletado. Este cuidado é importante para evitar qualquer efeito de genes regulados pelo ciclo circadiano, que poderiam gerar falsos positivos nas amostras se estas não estivessem devidamente sob o mesmo regime luminoso.

O processo de coleta do tecido foi através da suspensão da bandeja de crescimento e imersão da mesma em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as pontas das raízes foram cortadas com estilete (a lâmina congelada), o tecido colocado em tubos Falcon 50mL (estéreis e livres de RNase) e levados para ultra-refrigerador (-75°C) até o momento da extração.

4.10.2 Extração de RNA e mRNA

A extração de RNA total em larga escala foi pelo método de Carpenter e Simon (1998). O tampão de extração continha Tris HCl pH9 (200mM), LiCl (400mM), EDTA (25mM) e SDS (1%). Aproximadamente cinco gramas de tecido fresco de pontas de raiz foram macerados em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido. O pó resultante da maceração foi transferido para tubos Falcon de 50mL, resistentes a solventes orgânicos e livres de Rnase. Para cada 5g de tecido foram adicionados 10mL de tampão de extração. Após agitação em vortex, para homogeneizar, a solução foi centrifugada à temperatura ambiente, por cinco minutos a 7500rpm. A fase aquosa foi removida e transferida para um tubo Falcon novo. Repetiu-se o processo de extração, mas desta vez com apenas 7mL de tampão. O isolamento dos ácidos nucleicos da solução usou 17mL de fenol:clorofórmio (1:1). O material foi centrifugado da mesma forma anterior. A fase aquosa mais uma vez removida e transferida para novo tubo. A precipitação dos ácidos nucleicos se deu com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,3 e 2 volumes de álcool 95%. Para aumentar o rendimento os tubos foram gelados a -70°C por 30 min e centrifugados a 12000rpm por 10min a 4°C. O sobrenadante foi decantado. O pellet foi tratado com 10mL de Cloreto de lítio 2M para a extração do RNA total. Após misturar vigorosamente em vortex e pôr em gelo por

30 min, a solução foi centrifugada a 12000rpm a 4°C por 10 min. O RNA foi então diluído em água ultrapura e estéril de acordo com o tamanho do pellet. A qualidade do RNA total foi aferida em gel de agarose 1,5% com tampão de TAE. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro (Spectronic Genesys). A extração de mRNA foi feita com o kit PolyATtract® Isolation Systems V (Promega). Foi utilizada a quantidade máxima de extração, com adição de água para atingir o volume necessário de reação de 500uL. O RNA mensageiro foi quantificado em espectrofotômetro. A qualidade do mRNA total foi aferida em gel de agarose 1,5% com tampão de TAE.

4.10.3 Marcação radioativa do mRNA

A marcação do mRNA e os demais procedimentos para análise de macroarranjo foram realizados nos laboratórios da EMBRAPA Milho e Sorgo, com colaboração do Dr. Antônio Álvaro Purcino.

A reação de marcação usou o kit HotScribe First Strand cDNA labelling (Amersham Biosciences), exceto para a enzima de transcriptase reversa do kit, que foi substituída por SuperScript II RT (Invitrogen). A marcação usou 1,536 ug de mRNA Controle e 1,452ug de mRNA Teste. O cDNA foi desnaturado para desfazer os díbridos com mRNA, tratado com NaOH 2,5M e HEPES 2M (filtrado em Millipore 0,45um), e purificado em microcolunas de cromatografia (MicroSpin S-300 HR Columns, Amersham Pharmacia) através de centrifugação por dois minutos a 3000 rpm, para remoção do excesso de P³² e ficando pronto para a hibridização.

4.10.4 Preparo das membranas:

As membranas Nylon Hybond XL (Amersham Bioscience) foram carimbadas com 88 clones da biblioteca de resposta a alumínio da EMBRAPA Milho e Sorgo e oito controles. Todas as sondas aparecem discriminadas na Tabela 7, a descrição refere-se ao resultado do BLAST do primeiro seqüenciamento. Para a produção da membrana, os clones foram amplificados em 24 ciclos de PCR com primers M13 avante e reverso e mix para Taq polimerase (Invitrogen). Um “*bulk*” de quatro reações foi feito, totalizando 4ug de cDNA, que foram secos em centrifuga a vácuo gelada (SpinFreezer HETO), ressuspensos em 60uL de água e 15uL de glicerol. A desnaturação foi realizada com 0,2M NaOH a 37°C por 15min. A transferência das sondas padrão para a membrana foi feita com carimbo, sendo realizadas quatro etapas de 53,3ng de cDNA em cada uma delas, para que no final, cada ponto de hibridização contivesse aproximadamente 210ng de cDNA. O processo foi o mesmo para a alocação da repetição, que segue o mesmo ordenamento e posição no carimbo. A fixação dos clones na membrana foi através de tratamento térmico e de radiação UV com forno UV Stralink 2.400.

A posição identificada na primeira coluna da Tabela 5 refere-se a distribuição dos poços de uma placa de PCR para 96 reações. A mesma posição foi usada para o gabarito da imagem da auto-radiografia gerada pela exposição do filme às sonda marcadas do macro-arranjo. Tanto a imagem quanto o gabarito estão no Apêndice 1.

4.10.5 Hibridização

As membranas foram pré-hibridizadas em tubos de hibridização com 15mL de tampão (5X SSPE, 5X solução de Denhart, 0,5% de SDS) e 1,5ug de esperma de salmão a 65°C por quatro horas no forno de hibridização com a rotação ligada.

O cDNA marcado foi colocado no tubo de hibridização por uma noite, a 65°C e com rotação ligada.

4.9.6 Lavagem das membranas.

Foram feitos três passos de lavagem de 45 minutos, no primeiro com SSPE 2X e SDS 0,1% e o segundo e terceiro com SSPE 1X e SDS 1%. A membrana foi seca entre papéis filtro. O filme fotográfico foi exposto à radiação em ultra-refrigerador por uma semana.

Tabela 7: Composição da membrana de macroarranjo: posição, sonda, biblioteca de origem e tempo ao qual a espécie foi exposta ao alumínio para a geração da biblioteca, conforme detalhado na sessão acima.

Posição (placa e membrana)	Genes	Biblioteca de origem Espécie (Cultivar)	Tempo de exposição ao Al
A1	(-) sem DNA	<i>Controle negativo</i>	N/A
B1	TOPO (M13F / M13R)	<i>Controle negativo</i>	N/A
C1	1001 / E09 – Tubulina	<i>Controle positivo</i>	N/A
D1	1001 / H04 – Fator de elong.	<i>Controle positivo</i>	N/A
E1	1003 / E12 – Actina	<i>Controle positivo</i>	N/A
F1	1004 / D09 - Ubiquitina	<i>Controle positivo</i>	N/A
G1	1004 / G01 – Ubiquitina C	<i>Controle positivo</i>	N/A
H1	1004 / D02 – Tubulina	<i>Controle positivo</i>	N/A
A2	Strongyloides ratti mRNA for metallopanstimulin	Milho (Cateto)	1 hora
B2	Subunit ATP synthase mitochondrial mRNA	Milho (Cateto)	1 hora
C2	S adenosylmethionine decarboxilase	Milho (Cateto)	1 hora
D2	Rice Sec 14 gene	Milho (Cateto)	1 hora
E2	ADT/ATP translocase	Milho (Cateto)	1 hora
F2	Wheat protein kinase	Milho (Cateto)	1 hora
G2	P.capsici gene for cutinase	Milho (Cateto)	1 hora
H2	Zea mays 25S rRNA gene transposon-like sequence	Milho (Cateto)	1 hora
A3	P.meliaceum plastidic aspartate aminotranferase	Milho (Cateto)	1 hora
B3	Maize heat shock protein 70 kda (hsp 70)	Milho (Cateto)	1 hora
C3	Wheat sec 61p	Milho (Cateto)	1 hora
D3	Amppd 3 gene	Milho (Cateto)	4 horas
E3	chain peptidase precursor (DGMPP)	Milho (Cateto)	4 horas
F3	mRNA for S-adenosylmethionine decarboxylase	Milho (Cateto)	4 horas
G3	mRNA for metallopanstimulin	Milho (Cateto)	4 horas
H3	mRNA of a 21 kD pepitide	Milho (Cateto)	4 horas
A4	Ketoacyl reductase (G 18 gene)	Milho (L3)	1 hora
B4	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Milho (L3)	1 hora
C4	Zea mays CL4190-1 mRNA sequence	Milho (L3)	1 hora
D4	mRNA for calreticulin	Milho (L3)	1 hora
E4	Zea mays clone d elongation factor 1 alpha mRNA	Milho (L3)	1 hora
F4	mRNA for U2 snRNP auxiliary factor	Milho (L3)	1 hora
G4	JEYF 14/16 GENE OF Rhizobium sp.	Milho (L3)	4 horas
H4	Wheat cathepsin B	Milho (L3)	4 horas
A5	Protein 684 (mg684 gene)	Milho (L3)	4 horas
B5	Cutinase	Milho (L3)	4 horas
C5	Putative senescence associated protein	Milho (L3)	1 hora
D5	Tubulin alpha chain – maize	Milho (Cateto)	24 horas
E5	L.ascorbato peroxidase (APA)	Milho (Cateto)	24 horas
F5	Zea Mays PCO 085932 MrNA sequence	Sorgo	1 hora
G5	Zea Mays CL2281-1 mRNA sequence	Sorgo	1 hora
H5	Atropa belladonna partaila mRNA, 3 UTR, clone nh 13,4	Sorgo	1 hora
A6	Setaria itálica actin mRNA	Sorgo	1 hora
B6	Homo sapiens type II transmembrane protein MDL--1	Sorgo	1 hora
C6	Dianthuns caryophyllus putative mtN3-like protein nRNA	Sorgo	1 hora
D6	Nicotiana sylvestris Nspcc3 gene for phosphoenolpyruvate	Sorgo	1 hora
E6	Sacharum hybrid cultivar CP72-2086 elongation factor 1 alpha	Sorgo	1 hora
F6	Zea mays cellulose synthase 1 (CesA-1)mRNA	Sorgo	1 hora
G6	Zea mays CL2935-1 mRNA sequence	Sorgo	1 hora
H6	Zea mays PCO 124171 mRNA sequence	Sorgo	1 hora

Tabela 7 (continuação): Composição da membrana de macroarranjo, posição, sonda, biblioteca de origem e tempo de exposição ao alumínio

Posição (placa e membrana)	Genes	Biblioteca de origem Espécie (Cultivar)	Tempo de exposição ao Al
A7	Zea mays PCO 087051 mRNA sequence	Sorgo	1 hora
B7	Arabidopsis thaliana fibrillarlin 2	Sorgo	1 hora
C7	Zea mays CL253-2 mRNA	Sorgo	1 hora
D7	Hordeum vulgare L. mRNA for serine carboxypeptidase	Sorgo	1 hora
E7	Sacharum hybrid cultivar H32-8560 polyubiquitin	Sorgo	1 hora
F7	Zea mays PCO 064714 mRNA	Sorgo	1 hora
G7	Zea mays mRNA for adenosine kinase	Sorgo	1 hora
H7	Zea mays mRNA for maíse 20S proteasome alpha subunit	Sorgo	1 hora
A8	Zea mays PCO 131201 mRNA	Sorgo	1 hora
B8	Solanum bulbocastanum style self-incompatibility putative	Sorgo	1 hora
C8	P. miliaceum mRNA for aspartate aminotransferase	Sorgo	1 hora
D8	Zea mays PCO 135520	Sorgo	1 hora
E8	Arabidopsis thaliana acyl-CoA binding protein	Sorgo	1 hora
F8	Sacharum hybrid cultivar C2H2 zinc-finger protein serrate mRNA	Sorgo	1 hora
G8	Homo sapiens mRNA expressed only in placental villi	Sorgo	1 hora
H8	Zea mays PCO 071606 mRNA	Sorgo	1 hora
A9	Zea mays PCO 067271 mRNA	Sorgo	1 hora
B9	Arabidopsis thaliana similar to dihydroflavonol	Sorgo	1 hora
C9	Zea mays CL 2281-1 mRNA sequence	Sorgo	4 horas
D9	Zea mays DNA for cysteine proteinase inhibitor	Sorgo	4 horas
E9	Orysa sativa ADP-ribosylation factor (Os-ARF1)mRNA	Sorgo	4 horas
F9	Zea mays PCO 119463 mRNA sequence	Sorgo	4 horas
G9	Rice DNA for aldolase C-1	Arroz	1 hora
H9	O. sativa (japonic cultivar-group) mRNA for peroxidase	Arroz	1 hora
A10	O. sativa NADP-specific isocitrate dehydrogenase nRNA	Arroz	1 hora
B10	Rice mRNA for ATP/ADP translocator	Arroz	1 hora
C10	Zea mays PCO 145462 mRNA sequence	Arroz	1 hora
D10	Rice mRNA, partial homologus to chaperonin 10 gene	Arroz	1 hora
E10	O. sativa NADP-specific isocitrate dehydrogenase mRNA	Arroz	1 hora
F10	O. sativa Wilm's tumor-related protein QM mRNA	Arroz	1 hora
G10	O. sativa gene for ovp1 – H – translocation inorganic phosphatase	Arroz	1 hora
H10	O. sativa V-ATPase B gene vacuolar APTase B subunit	Arroz	1 hora
A11	O. sativa mRNA for mitochondrial phosphate transporter	Arroz	1 hora
B11	O. sativa mRNA for EF-1 alpha	Arroz	1 hora
C11	O. sativa mRNA for calcium-binding protein	Arroz	1 hora
D11	Zea mays cellulose synthase - 99 (CesA-9) mRNA	Arroz	1 hora
E11	Phosphate transport system	Braquiária	1 hora
F11	Sec 14 like protein [orysa sativa]	Braquiária	1 hora
G11	Catalase	Braquiária	1 hora
H11	Protein tyrosine phosphatase	Braquiária	1 hora
A12	SocE [Myxococcus xanthus]	Braquiária	1 hora
B12	Putative leucine zipper protein	Braquiária	1 hora
C12	NADH dehydrogenase subunit 4	Trigo	1 hora
D12	Class III chitinase	Trigo	1 hora
E12	Major facilitator family trans.	Braquiária	1 hora
F12	Zea mays CL 615 mRNA sequence	Braquiária	1 hora
G12	Zea mays PCO 138354mRNA sequence	Milho (L3)	1 hora
H12	Daucus carota mRNA for cyclin D2	Sorgo	4 horas

4.11 Hibridização subtrativa

4.11.1 Indução do estresse por alumínio

O cultivo das plântulas para extração de mRNA para a hibridização subtrativa seguiu as mesmas etapas já descritas anteriormente para o macroarranjo, com pequenas modificações. A mudança foi realizada na solução de indução de estresse. O sulfato de alumínio foi substituído por cloreto de alumínio (AlCl_3 , massa molecular do hexaidrato=241,43), o qual é mais solúvel e estável que o sulfato. O fosfato de potássio da solução de indução de estresse por alumínio foi substituído por cloreto de potássio, de forma que o potássio continuasse na mesma molaridade que na solução anterior, mas sem a presença de fósforo, que pode precipitar o alumínio. O aumento na molaridade de cloro não afetou o desenvolvimento celular. O tratamento controle foi trocado para uma solução igual ao tratamento testador, também sem fósforo, mas sem alumínio. O pH foi corrigido para 4 com HCl após a adição do alumínio.

A coleta de tecido seguiu os mesmos passos da primeira extração.

4.11.2 Extração do RNA e mRNA

O RNA total foi extraído com o kit de extração Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen). O bulk de 10 extrações de testador e 10 extrações de controle foi feito. O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e a qualidade aferida em gel de agarose 1% TAE 0,5%. A extração de mRNA usou 2 μg de tRNA e seguiu o protocolo do kit de extração NucleoTrap® mRNA (Clontech). O mRNA puro foi quantificado em espectrofotômetro e a qualidade aferida em gel de agarose 1% TAE 0,5%. Todos os passos a seguir, desde a síntese da primeira fita de cDNA, seguiram o protocolo de hibridização subtrativa do kit PCR-Select (Clontech). A

subtração foi feita apenas em um sentido (avante), tendo como testador UFRGS 17 sob estresse por alumínio e controle UFRGS 17 sem estresse por alumínio.

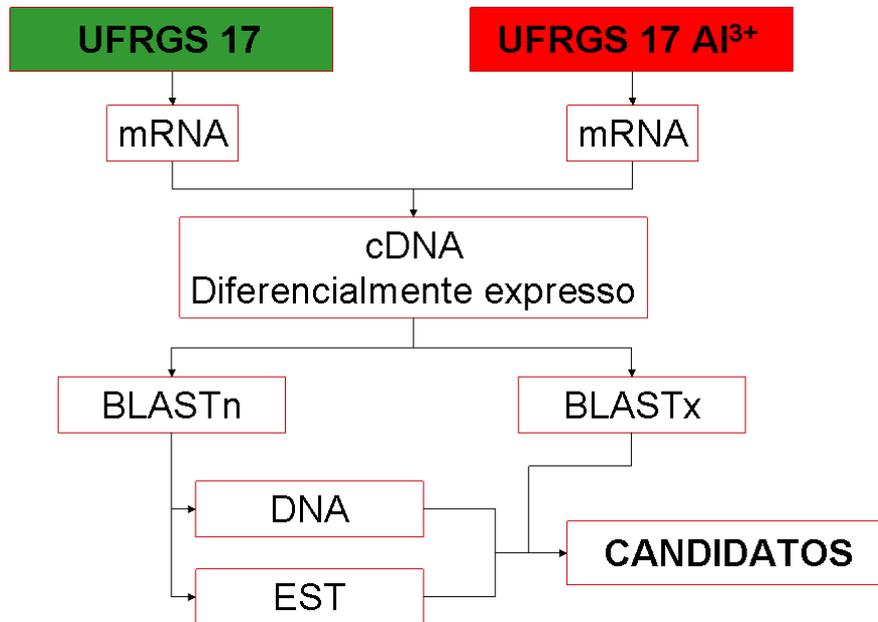


Figura 4: Fluxograma esquemático do desenvolvimento e análise da hibridização subtrativa da cultivar de aveia UFRGS 17 submetida por uma hora a presença ou ausência de alumínio tóxico.

4.11.3 Clonagem

O produto final da subtração foi submetido a uma extensão com meia unidade de Taq polimerase por 10 minutos a 72°C, para viabilizar a clonagem. A Taq promove a adenilação no final das fitas apenas no sentido 3 min, formando uma cauda A. O produto final do PCR 2 possui terminações cegas que inviabilizariam a transformação pelo protocolo do kit TOPO, se não fosse a geração destas caudas A pela Taq polimerase.

A transformação foi feita com o kit TOPO através do método de eletroporação. O vetor usado foi PCR 2.1 e o produto para inserção usou 4ul do amplicon do último passo da subtração. A ligação constituiu de 1ul da solução salina diluída, 1 µl do vetor, a reação durou 30 min a 23°C. Uma alíquota de 2 µL

do produto da ligação foi usado para 40 μ L de meio com células eletrocompetentes. A transformação foi por eletroporação, utilizando Micropulser Electroporation Apparatus Bio-RAD (Lab. de Fitopatologia Molecular – UFRGS, Porto Alegre, RS). As células foram mantidas no gelo por 1min, em seguida, transferidas para cubeta, e submetidas ao choque de transformação.

Seguida à transformação, foram adicionados 1 mL de meio Lb líquido na cubeta. O material foi recuperado por ciclos de pipetagem de ressuspensão. As células foram crescidas por uma hora a 37°C com agitação constante. Após, 40uL do material foi plaqueado e crescido por 16 horas a 37°C em placas contendo LB sólido, ampicilina (10ug/ml) e x-gal. Colônias brancas isoladas foram selecionadas e testadas (reação de amplificação utilizando primers do vetor, seguida de análise em gel de agarose 2,5% 0,5xTBE). Após análise do gel as colônias foram resselecionadas. Os clones positivos foram crescidos em Lb líquido por 18 horas a 37° sob agitação. Os plasmídeos foram extraídos utilizando o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) e quantificados.

4.11.4 Seqüenciamento dos clones

O seqüenciamento das amostras foi realizado no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNAs-moldes (30 a 45 ng) foram marcados por PCR utilizando-se 3,2 pmol do primer M13 da Invitrogen (M13-F 5'GTAAAACGACGGCCAG 3' e M13-R 5'CAGGAAACAGCTATGAC 3') e 2 uL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) em um volume final de 10 uL. As reações de marcação foram realizadas em

termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min, seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Depois de marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 uL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de seqüenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “DT3100POP6{BDv3}v1.mob”; BioLIMS Project “3100_Project1”; Run Module 1 “StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100”; e Analysis Module 1 “BC-3100SR_Seq_FASTA.saz”.

4.11.5 Análise de seqüências

Os cromatogramas de todas as seqüências foram analisados visualmente através do aplicativo BioEdit. Somente seqüências com alta definição foram utilizadas e apenas as regiões com picos bem definidos. Após a delimitação das do início e término das seqüências por resolução, as mesmas foram convertidas para formato FASTA e testadas para presença de vetores, adaptadores e primers das etapas anteriores. As seqüências foram submetidas ao aplicativo VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/>) e tiveram as extremidades contaminantes removidas, deixando apenas a fração interna que correspondesse ao cDNA oriundo do RT-PCR. Depois de limpas, as seqüências foram alinhadas (custo de abertura do GAP=10, custo de extensão do GAP=2 e custo de GAP final equivalente) com aplicativo CLC Combined Workbench 1.0.2. Foi possível identificar as seqüências isoladas mais de uma vez em clones diferentes.

Pequenas diferenças nucleotídicas foram consideradas como artefato de PCR e foram ignoradas.

Após a obtenção das seqüências, o alinhamento pairwise foi realizado utilizando o pacote de aplicativos *online*.

A análise de BLAST (modelo de alinhamento com GAPS de Altschul et al., 1997) foi feita para a seqüência que apresentava o maior tamanho entre os clones iguais. Foram realizados BLASTn (seqüência de DNA alinhada com banco de dados de DNA e outro com banco de cDNA), BLASTx (seqüência de DNA traduzida para proteína, com fases de leituras abertas, alinhadas com banco de proteína), BLAST de domínios (seqüência de DNA com tradução exclusiva de ORFs alinhada com matrizes de domínios).

Para a análise de BLASTn (nr) foram usados os bancos de dados completos para nucleotídeos (GenBank+EMBL+DDBJ+PDB) exceto EST, STS, GSS, amostras ambientais ou fases 0, 1 or 2 de seqüências HTGS, totalizando 3.857.020 seqüências. Um segundo BLASTn foi feito exclusivamente para ESTs e usou os bancos de dados do GenBank+EMBL+DDBJ para EST, totalizando 35.372.460 seqüências.

O BLASTx foi feito com o bando de dados Genes do KEGG.

A análise de domínio foi feita com o aplicativo InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>) usando os seguintes bancos de dados: BlastProDom, FPrintScan, HMMPiR, HMMPfam, HMMSmart, HMMTigr, ProfileScan, ScanRegExp, SuperFamily, SignalPHMM, TMHMM, HMMPanther, Gene3D. A varredura foi feita com seqüência em nucleotídio e rigor de ORF proporcional ao tamanho da seqüência.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise fenotípica

A análise de variância foi significativa para os genótipos e as doses testados (Tabela 8). A interação entre dose e genótipo também foi significativa. A significância da interação entre genótipo e dose deve-se ao fato de a variedade UFRGS17 não haver demonstrado tendência para a diminuição no comprimento de raiz em nenhuma das doses, enquanto a variedade UFRGS930598 mostrou claramente uma redução no comprimento de raiz com a adição do alumínio na solução (Figura 6). Os limites testados evidenciam que o nível de perda de tolerância para UFRGS17 não foi atingido e uma concentração de até 1000 μM de alumínio não afeta o desenvolvimento radicular desta variedade.

Os resultados também caracterizam uma maior variância para a variedade tolerante, confirmando os dados de Nava (2005^a). Como o alumínio não afeta o desempenho da UFRGS17 a variância acaba medindo outros efeitos (vigor da semente, lesão mecânica no transplante etc), que não aquele que está sendo testado diretamente, ou seja, a tolerância ao alumínio. Ao revés, como a variedade UFRGS930598 é afetada pelo estresse do alumínio na solução, na medida em que haja dose, o crescimento de raiz diminui e a variância é bem menor que a variância no controle sem alumínio. A grande variância da variedade UFRGS17, em todos os níveis, dificulta a comparação de médias entre níveis.

Estes resultados permitiram gerar novas hipóteses com relação à uniformidade das variâncias do crescimento de raiz. Na ausência por alumínio,

apenas outros efeitos são fontes de variação, e assim, espera-se que as variâncias de UFRGS17 e UFGRS930598 sejam equivalentes. O teste F foi aplicado para as variâncias de UFRGS17 e UFGRS930598 para cada dose de alumínio. Apenas no nível zero, não foi detectada diferença significativa ($F=0,75$) nas variâncias entre as duas variedades, com intervalo de confiança de 95% (limite inferior de 0,31 e limite superior de 1,83). Para todos os demais níveis houve diferenças para o teste de igualdade de variâncias.

Como o experimento foi realizado em três datas diferentes (bloqueamento no tempo) foi possível detectar variação entre as mesmas. O bloqueamento foi eficiente, pois as datas apresentaram significância no teste F. A temperatura ambiente foi superior na última data, o que afetou o desenvolvimento radicular de ambas as variedades. Embora não tenha sido o objetivo original, observou-se que o estresse por calor pode afetar a tolerância ao alumínio. O teste de Duncan ($\alpha=0,05$) não encontrou diferença significativa entre as médias dos blocos dia 1 e 2 ($m_1=3,56$ e $m_2=3,43$). Ambas as médias são diferentes da média do dia 3 ($m_3=2,09$).

A alta tolerância de UFRGS17 durante o tempo de crescimento em solução hidropônica, nos leva a acreditar que o mecanismo de destoxificação do alumínio em aveia não seja através de exudação de ácidos orgânicos. Se assim o fosse, a liberação dos mesmos deveria ser proporcional à concentração de alumínio, que em solução nutritiva apresenta-se móvel, ao contrário do solo. Como as plantas eram do mesmo genótipo e cultivadas no mesmo regime de luz e nutrientes, considera-se que a todas tenham uma taxa metabólica e geração de fotoassimilados equivalentes. Assim, esperar-se-ia uma considerável diminuição no tamanho das raízes na medida em que a dose fosse aumentada, devido a

grande perda energética pela liberação de ácidos orgânicos na solução para quelação do alumínio, o que causaria um grande dreno de esqueletos de carbono para repor as perdas de ácidos orgânicos, o que refletiria um menor desenvolvimento geral da planta, inclusive raízes. Isso não foi observado.

Tabela 8: Análise de variância para crescimento de raiz medido pelo seu comprimento final (cm), para os genótipos UFRGS17 e UFRGS930598, em dois dias (bloco) e seis doses de alumínio (0, 200, 350, 500, 700 e 1000 μM)

Causas Variação	GL	QM	F-teste	Pr
Bloco (A)	1	0,906	0,56	0,4549
Dose (B)	5	3,827	16,82	0,0038
AxB	5	0,227	0,14	0,9825
Genótipo (C)	1	107,986	66,87	<.0001
BxC	5	4,794	2,97	0,0135
Erro experimental	170	1,615		
Total	187			

A Figura 6 permite visualizar a igualdade de médias e de variâncias das variedades UFRGS17 e UFRGS930598 quando comparadas na ausência por alumínio. O teste de Tuckey-Kramer confirma a igualdade entre as médias de UFRGS17 em todas as doses e UFRGS930598 na dose zero (Figura 7). Não foram detectadas diferenças significativas entre as médias de crescimento de raiz de UFRGS930598 nas diferentes doses testadas. Assim, o efeito de diminuição de crescimento de raiz na variedade sensível na dose mais baixa (200 μM) foi o mesmo que na dose mais alta (1000 μM).

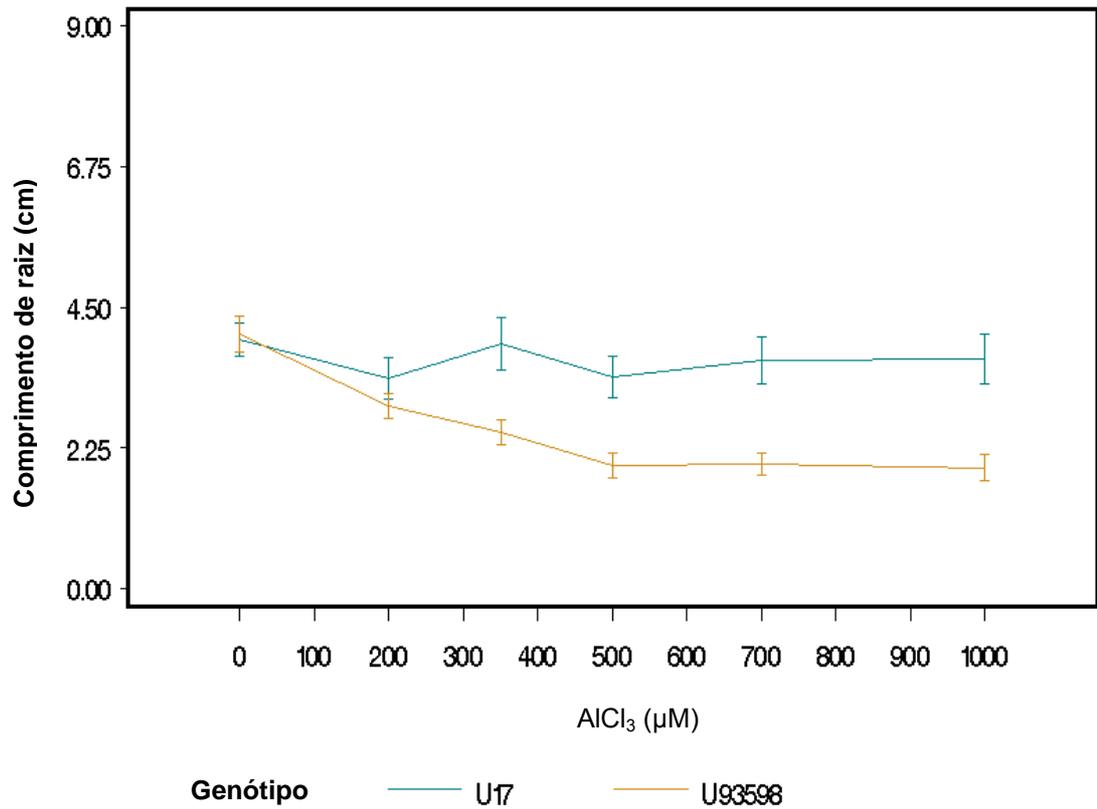


Figura 6: Gráfico do crescimento de raiz representado pelo comprimento final (cm) de UFRGS17 (azul) e UFRGS930598 (amarelo) em doses crescentes de alumínio em diferentes concentrações do metal (μM) cuja forma fonte foi cloreto de alumínio, barras verticais indicam desvio padrão

Tabela 9: Médias e variâncias do comprimento de raiz de UFRGS 17 e UFRGS 930598 utilizadas nas comparações de médias pelo modelo Tukey-Kramer apresentadas na Figura 7.

Genótipo	Dose de alumínio (μM)	Comprimento da raiz (cm)	
		Média	Variância
U17	0	3,93	1,400
U17	200	3,35	2,501
U17	350	3,85	3,875
U17	500	3,25	2,413
U17	700	3,45	2,987
U17	1000	3,55	2,980
U93598	0	3,99	1,868
U93598	200	2,82	0,950
U93598	350	2,41	0,950
U93598	500	1,87	0,780
U93598	700	1,98	0,841
U93598	1000	1,91	1,199

		UFRGS17					U93598					
		200	350	500	700	1000	0	200	350	500	700	1000
UFRGS17	0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**
	200		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**
	350			NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**
	500				NS	NS	NS	NS	NS	**	*	**
	700					NS	NS	NS	NS	**	**	**
	1000						NS	NS	NS	**	**	**
U93598	0						*	**	**	**	**	**
	200								NS	NS	NS	NS
	350									NS	NS	NS
	500										NS	NS
	700											NS
	1000											

Figura 7: Comparação de médias do crescimento de raiz dos genótipos de aveia UFRGS 17 e UFRGS 930598 em seis doses de alumínio pelo modelo Tuckey-Kramer, NS (não significativo, $\alpha > 0,05$), * (significativo $0,05 > \alpha > 0,01$), ** (significativo $\alpha < 0,01$)

O modelo de regressão para determinar a resposta de inibição de crescimento de raiz em doses crescentes de alumínio foi determinado. A análise de variância da regressão do crescimento de raiz de UFRGS17 versus a dose de alumínio, não foi significativa ($F=0,14$ e $p=0,7130$), como era esperado. Logo, esta variedade não responde à mudança nos níveis de alumínio testados. Já a análise de variância da regressão com a variedade UFRGS930598 foi significativa ($F=42,72$ e $p < ,0001$). Logo, testou-se a significância da dose ($t=-6,54$ e $p < ,0001$) e do intercepto da curva ($t=20,89$ e $p < ,00001$). O modelo de regressão quadrática apresentou maior $R^2=0,2259$.

O modelo biológico verificado neste estudo não pode ser explicado por uma regressão quadrática, pois caracterizaria o aumento no crescimento de raiz na medida em que a dose de alumínio fosse aumentada após o ponto de inflexão da curva. Por tanto, foi testada uma regressão quadrática com platô. O método de iteração de Gauss-Newton foi aplicado através do procedimento não linear (Proc NLin) do pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., 1999). A quarta iteração

identificou o ponto de convergência da regressão quadrática para o platô (estabilização da curva onde os y não variam mais).

Tabela 10: Análise da variância da regressão quadrática com platô do crescimento de raiz do genótipo de aveia UFRGS930598 versus dose de alumínio.

Causas Variação	GL	QM	F-teste	Pr
Modelo	2	477,3	51,86	<0,0001
Resíduo	137	1,196		
Total	139			

A dose na qual a curva da equação atinge a estabilização, identificada pelo modelo, foi de 128,998 μ M de alumínio. Ou seja, é uma dose inferior àquelas testadas. A regressão estimou o crescimento de raiz na dose máxima de resposta da curva como sendo igual a 2,244cm. A partir deste ponto, o comportamento de crescimento de raiz torna-se estável, e não difere mais independentemente da dose de alumínio aplicada. Os componentes para a região da equação que segue o modelo matemático de regressão quadrática estão apresentados na Tabela 11 e seguem a seguinte fórmula:

$$\text{Crescimento de raiz} = 4,0749 - 0,0155 \times (\text{Dose}) + 0,00001 \times (\text{Dose})^2$$

Tabela 11: Componentes da equação de regressão do crescimento de raiz do genótipo de aveia UFRGS930598 versus dose de alumínio para a parte da curva sob função quadrática.

	Estimado	Erro padrão aproximado	Intervalo de confiança (95%)	
a	4,0749	0,2332	3,6137	4,536
b	-0,0155	0,00107	-0,0176	-0,0134
c	0,00001	.	.	.

Os dados da regressão confirmaram o teste múltiplo de médias. A média de UFRGS930598 sem alumínio é diferente das demais médias de todos os

outros níveis com alumínio, mas não foram encontradas evidências que diferenciem as médias de crescimento de raiz entre as doses de alumínio. Assim, as doses testadas não foram altas o suficiente para afetar o crescimento de raiz da variedade tolerante e, ao mesmo tempo, foram altas demais para determinar um padrão de redução entre dose e crescimento de raiz para a variedade sensível.

5.2 Marcadores moleculares

5.2.1 Marcadores convertidos STS e SNP

O produto de PCR dos marcadores STS XCDO1395, XBCD1230 e XBCD1117 em UFRGS17 e UFRGS930598, foi um fragmento de DNA cada e no tamanho esperado em relação à seqüência da qual foram desenhados os primers, o que demonstra grande conservação nestes locos entre aveia e as espécies de origem das sondas. No entanto, todos eles mostraram-se monomórficos para os pais. O marcador XWG464 não apresentou consistência de amplificação para o pai UFRGS930598 mostrando em gel um leve arraste que não permitia identificar o tamanho exato da banda.

Todos os quatro marcadores moleculares do tipo STS (Sequence Tagged Sites), oriundos dos RFLPs Xbcd1230, Xcdo1395, Xwg464 e Xbcd1171, identificados como associados à tolerância ao alumínio, mostraram-se presentes no genoma da aveia, mas sem variações entre os pais tolerante e sensível. Após a conversão desses em marcadores STS, gerou-se a hipótese de que poderiam haver variações pequenas demais para serem identificadas por eletroforese, podendo estar relacionadas com variações nucleotídicas nessas seqüências. O seqüenciamento permitiu comprovar esta hipótese através da detecção de

diferenças internas entre os amplicons para as seqüências amplificadas pelos três marcadores testados (Figuras 9, 10 e 11).

O alinhamento entre as seqüências de UFRGS 17 (154pb) e UFRGS 930598 (153pb) obtidas pelo marcador STS1117, apresentou similaridade de 99,4% com a mesma região da sonda Xbcd1117 (BE438923), sendo que a variação encontrada foi a inserção de um nucleotídeo “T” na posição 30 na seqüência de UFRGS 17. Para o marcador STS Xbcd1230, as seqüências de UFRGS 17 (697pb) e UFRGS 930598 (695pb) apresentaram similaridade de 99%. As diferenças encontradas foram nas posições de número 613 e 677 (substituição de T por C), 674 (inserção de G), 675 (substituição de C por G) na seqüência de UFRGS 17. Já para o marcador STS Xcdo1395, a similaridade entre as seqüências UFRGS 17 (355pb) e UFRGS 930598 (356pb) foi de 98,9%. As diferenças foram nas posições 221 (substituição de T por C), 320 e 327 (substituição de G por A) e 333 (deleção de A) na seqüência de UFRGS 17.

Com base nestas pequenas diferenças, desenharam-se novos primers SNPs derivados dos STSs XCDO1395 e XBCD1230. No entanto, as diferenças foram muito pequenas para possibilitar amplificações diferenciais. Quando se aumentava muito a temperatura de pareamento, para aumentar também a especificidade entre o primer e o DNA molde, perdia-se totalmente a geração de amplificação, ao passo que uma temperatura imediatamente mais baixa gerava amplicons para todos os acessos. Outra possibilidade é que os SNPs detectados para XCDO1395 e XBCD1230 poderiam ser artefatos de seqüenciamento. Por outro lado, o SNP desenvolvido para o marcador XBCD1117 permitiu análise em agarose.

A distribuição alélica do SNP1117 foi de A=23 e a=22, sendo o alelo A a presença de banda, ou seja, o alelo do pai UFRGS17. O teste do marcador SNP1117 para segregação 1:1 teve um $\chi^2=0,022$ (não significativo P=0,88). O resultado de frequência alélica para a amostragem usada mostrou-se de acordo com o esperado para linhagens recombinantes de uma população F₆ avançada sem seleção. A análise permitiu o uso deste em testes com os dados fenotípicos.

A hipótese de ligação genética do alelo A com o caráter de tolerância e do alelo a com o de sensibilidade ao alumínio foi testada com os aplicativos LINKAGE e SAS. O teste de $\chi^2=0,98$ (não significativo, P=0,32) demonstrou independência na segregação do marcador SNP1117 com o recrescimento de raiz nesta população de aveia. O teste F da análise de regressão também não foi significativo (F=3,06 e P=0.0874), sendo que a regressão confirmou a independência na segregação. A contribuição da presença do marcador para a mudança no recrescimento da raiz foi baixa, R²=0,0664. Os dados demonstram que, embora o marcador STS1117 seja informativo para a população UFRGS 17 com UFRGS 930598, ele não serve para programas de melhoramento para seleção assistida para tolerância ao alumínio em aveia. Além disso, esses resultados sugerem que o gene de tolerância ao alumínio em aveia presente em UFRGS 17 não seja ortólogo ao gene *Alp* presente na região associada ao marcador XBCD1117 em cevada, no entanto também é possível que em aveia o marcador XBCD1117 não esteja associado ao gene ortólogo ao *Alp*, similar ao ocorrido com o marcador XBCD1230, o qual está associado ao gene ortólogo ao *Alp* em cevada, mas não em trigo.

O marcador ainda foi testado para os seguintes dados fenotípicos: pilosidade, peso de panícula, tipo de panícula, estatura, rendimento de grão e

peso hectolitro para dados de 2004 e dias para o florescimento (ciclo) com dados de dois anos (2003 e 2004).

A análise de variância da regressão do marcador SNP1117 foi significativa para ciclo²⁰⁰³ (F=5,8 e p=0,020), ciclo²⁰⁰⁴ (F=12,2 e p=0,001), PH (F=5,33 e p=0,026) e rendimento (F=10,81 e p=0,002).

A regressão explicou 10,26% (2003) e 21,06% (2004) da variação para ciclo, 9,34% para PH e 18,93% para rendimento, com as equações:

$$\text{Ciclo}^{2003} = 110,55 - 2,64 \times (\mathbf{SNP1117})$$

$$\text{Ciclo}^{2004} = 113,53 - 2,89 \times (\mathbf{SNP1117})$$

$$\text{PH} = 53,36 + 2,21 \times (\mathbf{SNP1117})$$

$$\text{Rendimento} = 4.117,15 + 471,03 \times (\mathbf{SNP1117})$$

Os “b’s” das regressões mostram que os marcadores estiveram sempre associados com a melhoria dos caracteres agrônômicos testados. Para ciclo o “b” foi negativo, ou seja, a presença do alelo identificado pelo marcador contribui com a redução do número de dias para florescimento, e o encurtamento do ciclo é buscado na maioria dos programas de melhoramento de diversas culturas. Já para peso do hectolitro e rendimento o “b” da equação foi positivo. Neste caso, a presença do alelo contribui para o aumento do peso do hectolitro, assim como no aumento na produtividade.

A análise de ligação foi significativa (p=0,01) apenas para ciclo (2004), mas a distância encontrada foi de 37,21cM com erro de +/-7,37cM. O tamanho pequeno da amostra é o provável causador da falta de significância para o teste de ligação entre o marcador e os outros dados fenotípicos, além da alta taxa de recombinação entre o marcador e ciclo 2004.

Os dados da regressão de rendimento e ciclo para o marcador SNP1117 corroboram com o mapa da população de aveia hexaplóide derivada do cruzamento das variedades Kanota e Ogle (Figura 8). O mapa Oat-KxO/QTL do GrainGenes, identifica o marcador RFLP BCD1117 a 10,9cM do marcador UMN13 e 8,6cM de CDO1092 (distâncias calculadas com função Kosambi). O marcador BCD1117 mapeou na posição 42,20 cM do grupo de ligação 16. Nesta região foram encontrados dois QTLs para rendimento, um QTL para dias para exerceção de panícula e um QTL para peso de panícula.

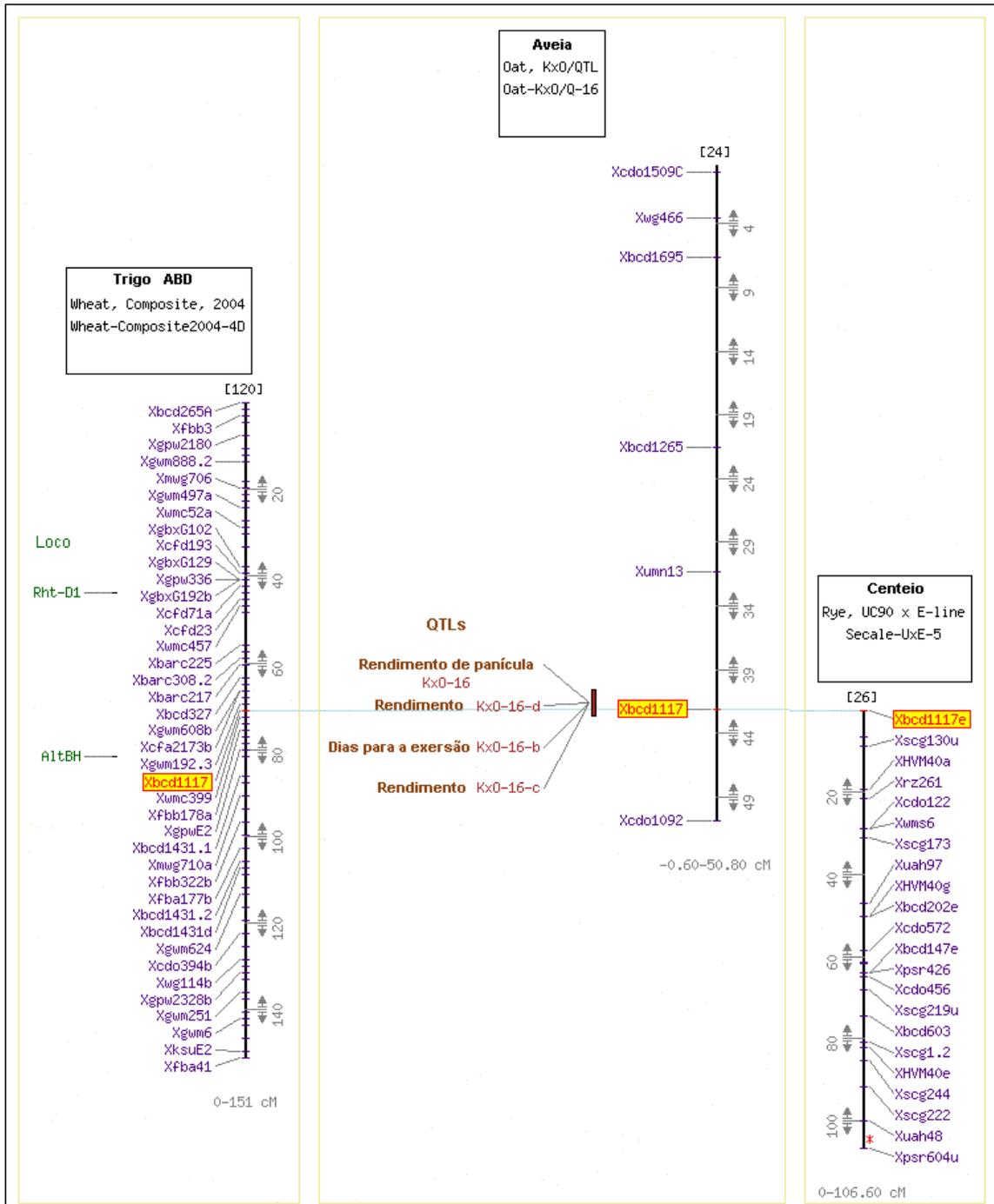


Figura 8: Alinhamento dos mapas genéticos de aveia (Kanota x Ogle) e centeio (UC90 x E-line) e o mapa físico composto de trigo (ABD), com destaque (caixa de texto amarela) para a região heteróloga da sonda Xbcd1117. O mapa de trigo com os locos em verde à esquerda e o mapa de aveia com os QTLs em marrom à esquerda. (alinhamento feito com o aplicativo cMap e banco de dados do GrainGenes)

```

                20                               40
UFRGS930598 TCCTGAATAA GGTCTTCATA CCAAAGATG - CAATTTCTTT TTTTCTCTT
UFRGS17     TCCTGAATAA GGTCTTCATA CCAAAGATGT CAATTTCTTT TTTTCTCTT

                60                               80                               100
UFRGS930598 CTGGTTCCCC TATGTAAGCT GTCATTAGAT TGAGATCATT AGTCTGTACT
UFRGS17     CTGGTTCCCC TATGTAAGCT GTCATTAGAT TGAGATCATT AGTCTGTACT

                120                              140
UFRGS930598 TAGCCTGTGA TATGATATGG TGTAATTTTG TTTAGCATTC TGGCATCAAG
UFRGS17     TAGCCTGTGA TATGATATGG TGTAATTTTG TTTAGCATTC TGGCATCAAG

UFRGS930598 TTCA
UFRGS17     TTCA

```

Figura 9: Alinhamento comparativo das seqüências de UFRGS17 e UFRGS93598 amplificadas com o primer STS1117. Programa: needle, Formato de alinhamento: srspair, matriz: EDNAFULL, Penalidade de abertura de Gap: 10,0; Penalidade de extensão de Gap: 0,5, Comprimento: 154; Identidade: 153/154 (99,4%), Similaridade: 153/154 (99,4%), Gaps: 1/154 (0,6%), Score: 755,0

```

                20                               40
UFRGS930598 CAGAAAGGCA GTGCTCCAAT GCTGAAGAAG CTCCTGCTCT TGACCAGAGG
UFRGS17     CAGAAAGGCA GTGCTCCAAT GCTGAAGAAG CTCCTGCTCT TGACCAGAGG

                60                               80                               100
UFRGS930598 TATCCTCCAG CTTTCTGCTT CTTTTATTTA ACTCTGCATT TCCATGCATT
UFRGS17     TATCCTCCAG CTTTCTGCTT CTTTTATTTA ACTCTGCATT TCCATGCATT

                120                              140
UFRGS930598 ATATGGATTA ACACCTGACT TCACAATACA GGTATCAATA TCTGAGCAAT
UFRGS17     ATATGGATTA ACACCTGACT TCACAATACA GGTATCAATA TCTGAGCAAT

                160                              180                              200
UFRGS930598 GCTGTGCTAC AAGCCAAAAG TGCAGGCATT ACCGCTGATT CGTCGAGAAA
UFRGS17     GCTGTGCTAC AAGCCAAAAG TGCAGGCATT ACCGCTGATT CGTCGAGAAA

                220                              240
UFRGS930598 TCCTATCGAT AGTAGTACAG TGGATCTACT TGAAGGCAAA CTTGCAGTGC
UFRGS17     TCCTATCGAT AGTAGTACAG CGGATCTACT TGAAGGCAAA CTTGCAGTGC

                260                              280                              300
UFRGS930598 TTCGGTTCCA AATGCAAATC AAACAAGAAC TGGAGTCCGT GGCTTTGCGG
UFRGS17     TTCGGTTCCA AATGCAAATC AAACAAGAAC TGGAGTCCGT GGCTTTGCGG

                320                              340
UFRGS930598 CTTGAAAGTG TTCCAAGCAG TTCTGAGTCA CCATAGTGAT CCCTT - - - -
UFRGS17     CTTGAAAGTG TTCCAAGCAA TTCTGAATCA CC - TAGTGAT CCCTTTCCCG

UFRGS930598 - - - - -
UFRGS17     TGATAA

```

Figura 10: Alinhamento comparativo das seqüências UFRGS17 e UFRGS93598 amplificadas com o primer STS1395. Programa: needle, Formato de alinhamento: srspair, matriz: EDNAFULL, Penalidade de abertura de Gap: 10,0; Penalidade de extensão de Gap: 0,5; Tamanho: 356pb; Identidade: 341/356 (95,8%), Similaridade: 341/356 (95,8%), Gaps: 12/356 (3,4%), Score: 1683,0

```

                                20                               40
UFRGS930598 GGAGCAAAGG CTGGAGTTGT ATTGAACCCT GGGACCCAC TCAGTGCGAT
UFRGS17      GGAGCAAAGG CTGGAGTTGT ATTGAACCCT GGGACCCAC TCAGTGCGAT

                                60                               80                               100
UFRGS930598 TGAATATGTA CTTGAATGTA AGATTTATTC CCTCTCCAAT ATTAATATTT
UFRGS17      TGAATATGTA CTTGAATGTA AGATTTATTC CCTCTCCAAT ATTAATATTT

                                120                              140
UFRGS930598 CAGGGACGTC GATAAGGTTT GGTAAATCAA TTAATGGTAC ACGATTAGTG
UFRGS17      CAGGGACGTC GATAAGGTTT GGTAAATCAA TTAATGGTAC ACGATTAGTG

                                160                              180                              200
UFRGS930598 AGGATTGGTG TTGGACGAAG CACATAACCT CTTCGGAGTA CGCATGCGAT
UFRGS17      AGGATTGGTG TTGGACGAAG CACATAACCT CTTCGGAGTA CGCATGCGAT

                                220                              240
UFRGS930598 TATGTGGATT GGGGCACCTG GCTAGTCTCT CCTATTATTA TTTAGCTACT
UFRGS17      TATGTGGATT GGGGCACCTG GCTAGTCTCT CCTATTATTA TTTAGCTACT

                                260                              280                              300
UFRGS930598 CATCATGATT TTCTTCTATC AGCATAACGA TAGTAGCATT TCTGTTTGAG
UFRGS17      CATCATGATT TTCTTCTATC AGCATAACGA TAGTAGCATT TCTGTTTGAG

                                320                              340
UFRGS930598 ATGTGAATAT GCTGCTTCTG GTGAGATTTG ATGACAATCT TTACCACATG
UFRGS17      ATGTGAATAT GCTGCTTCTG GTGAGATTTG ATGACAATCT TTACCACATG

                                360                              380                              400
UFRGS930598 ATCATCTCGA CTTTTTTGAC TACCATGGGC ACAGACATGG TATGCCTTGG
UFRGS17      ATCATCTCGA CTTTTTTGAC TACCATGGGC ACAGACATGG TATGCCTTGG

                                420                              440
UFRGS930598 GTACGATTAG CCTAACAGGG TTCATAGTAA AACTTCCATT CTTAGTGCAT
UFRGS17      GTACGATTAG CCTAACAGGG TTCATAGTAA AACTTCCATT CTTAGTGCAT

                                460                              480                              500
UFRGS930598 ATTACAATGT GCGTTTCCCA TCTTACAATG AATTGCTTTG GGTAAGATTA
UFRGS17      ATTACAATGT GCGTTTCCCA TCTTACAATG AATTGCTTTG GGTAAGATTA

                                520                              540
UFRGS930598 ATGCCAGTTA AACTGTTGCA TTTCTAACTG TGCTTGCAC T AGACAAATAG
UFRGS17      ATGCCAGTTA AACTGTTGCA TTTCTAACTG TGCTTGCAC T AGACAAATAG

                                560                              580                              600
UFRGS930598 ATATCTCTTT AGTTTATAGC TAGCCAGCA AGGTATATAC CACTTTTTCA
UFRGS17      ATATCTCTTT AGTTTATAGC TAGCCAGCA AGGTATATAC CACTTTTTCA

                                620                              640
UFRGS930598 TGATTTTCCT GATAGATGAC AAGCTATTGC ATTTGTTTGC CTGTGCAGCT
UFRGS17      TGATTTTCCT GACAGATGAC AAGCTATTGC ATTTGTTTGC CTGTGCAGCT

                                660                              680
UFRGS930598 GTTGATCTGG NATTGATTAT GTCCG - TCAA TCC - GGGTTT GGTGGGC -
UFRGS17      GTTGATCTGG TATTGATTAT GTCGGGCCAA TCCTGGGTTT GGTGGGCA

```

Figura 11: Alinhamento comparativo das seqüências UFRGS17 e UFRGS93598 amplificadas com o primer STS1230. Programa: needle, Formato de alinhamento: srspair, Matriz: EDNAFULL, Penalidade de abertura de Gap: 10,0; Penalidade de extensão de Gap: 0,5; Comprimento: 698, Identidade: 691/698 (99,0%), Similaridade: 691/698 (99,0%), Gaps: 3/698 (0,4%), Score: 3421.0

5.2.2 Marcadores SSR

De todos os marcadores *Simple Sequence Repeat* (SSR) testados, apenas AM1, AM2 e AM25 foram informativos. Todos os marcadores foram escrutinados em gel de agarose de alta densidade (3% de concentração), mas apresentaram bandas de mesmo tamanho. Um segundo escrutínio foi feito em gel de acrilamida para tentar identificar pequenas variações de tamanho entre os alelos, não passíveis de serem detectadas em agarose. Em acrilamida, foi possível identificar um grande número de bandas *stutters*. Estas bandas foram identificadas em ampliações diferentes e com DNA de origem diferente. Elas foram sempre presentes e com coloração uniforme, sem haver uma que se destacasse mais, o que tornaria imprecisa a tentativa de identificar qual delas correspondia ao alelo alvo do primer. Os dados foram então desconsiderados.

Dentre os três SSRs com amplificação estável e polimórficos para UFRGS17 e UFRGS930598, apenas um, AM1, foi associado com os dados fenotípicos testados. A análise de regressão do marcador foi significativa para rendimento de grão.

Tabela 12: Análise da variância da regressão do marcador SSR AM1 versus rendimento

Causas Variação	GL	QM	F-teste	Pr
Modelo	1	2383786	10,81	0,0021
Erro experimental	78	220541		
Total Corrigido	79			

Variável	GL	Estimativa do parâmetro	Erro padrão	Valor t	Pr
Intercépto	1	4117,146	100,12	41,12	<,00001
AM1	1	471,028	143,24	3,29	0,0021

A localização física do marcador AM1 no mapa da aveia hexaplóide é desconhecida (GrainGenes) e logo, não se pode checar a presença de QTLs para este SSR.

5.3 Macroarranjo

O macroarranjo teve um total de oito controles, sendo dois destes negativos (como esperados não marcaram) e seis sondas de controles positivo, cuja expressão deveria ter caráter constitutivo. No entanto, isto não foi observado, possivelmente porque as membranas utilizadas foram elaboradas para macroarranjos de milho. Apenas dois dos controles foram expressos tanto na ausência quanto na presença por alumínio, mostrando-se verdadeiramente como genes constitutivos também em aveia. Foram eles um fator de alongação e uma ubiquitina.

A α e a β -Tubulina tiveram a expressão inibida pelo alumínio e a actina e outra ubiquitina tiveram a expressão induzida pelo alumínio. Convém ressaltar que uma seqüência de α -tubulina foi expressa diferencialmente em milho, sendo induzida em resposta a exposição por 24h ao alumínio, clone este presente no macroarranjo.

O caráter não constitutivo da expressão destes genes pode ser creditado a uma hipótese que haja mais de um gene para proteínas de mesma função. Para tal pode-se especular duas pressuposições. A presença de mais de um alelo com mesma função e que, obrigatoriamente, tenha diferença grande o suficiente para impedir a hibridização do DNA prova com o cDNA testado, mas ao mesmo tempo, permitir que o mRNA produza uma proteína com mesma função, ou que apresente o mesmo efeito.

Dentre as sondas obtidas pela EMBRAPA, seis delas tiveram sua expressão induzida por alumínio no genótipo de aveia UFRGS17. Não foram consideradas diferenças quantitativas de expressão devido a desuniformidade da expressão dos controles positivos. Para o caráter qualitativo, as seqüências expressas em UFRGS17 na presença de alumínio foram, um fator de alongação alfa, uma V-ATPase com subunidade vacuolar, um translocador ATP/ADP, o gene de proteína transmembrana MDL tipo II, uma proteína putativa associada à senescência e uma seqüência subtrativa de milho ao estresse por alumínio, cujo BLAST deu homologia à proteína mg684 de *Mus musculus*. No macroarranjo existem quatro fatores de alongação alfa, o controle e outros três induzidos por alumínio, um em milho (E4), um em sorgo (E6) e um em arroz (B11) todos obtidos após uma hora de exposição ao estresse.

5.4 Seqüências diferencialmente expressas:

O total de colônias submetidas para seqüenciamento foi de 68, das quais, devido à qualidade de leitura no seqüenciador ou problemas na reação de amplificação com os nucleotídeos marcados, apenas 58 clones com excelente resolução foram usados no estudo. Todas as seqüências foram alinhadas e, do total de 58, apenas 12 mostraram-se exclusivas. As seqüências foram nomeadas para realização das análises seguintes, seguindo um critério de nomeação com três partes, o primeiro componente do nome foi U17, para identificar a variedade da qual são oriundos os mRNA, a variedade UFRGS17, o segundo AL, para o fenótipo tolerância ao alumínio e, o terceiro, uma numeração para a identificação do clone, iniciando-se em 01 até 12.

Os clones apresentaram as seguintes identificações: U17AL01 com 12 seqüências iguais, U17AL02 com 10, U17AL03 com 9, U17AL04 com 3, U17AL05 com 6, U17AL06 com 1, U17AL07 com 2, U17AL08 com 10, U17AL09 com 1, U17AL10 com 2, U17AL11 e U17AL12 com 1, em relação as 58 totais.

Tabela 13-a: Resultado de BLASTn versus banco de ESTs

Clone	Acesso	Esperança	Identidade	Gaps	Descrição
U17AL01	CN816173.1	2E-31	175/201 (87%)	6/201 (2%)	cDNA de raiz da cultivar Ogle (<i>Avena sativa</i>) clone HRO4517_G07_M13, seqüência de mRNA
U17AL02	CN816173.1	3E-64	225/250 (90%)	8/250 (3%)	cDNA de raiz da cultivar Ogle (<i>Avena sativa</i>) clone HRO4517_G07_M13, seqüência de mRNA.
U17AL03	CN814922.1	3E-132	432/483 (89%)	13/483 (2%)	cDNA de raiz da cultivar Ogle (<i>Avena sativa</i>) clone HRO4503_H12_P23, seqüência de mRNA
U17AL04	CN821116.1	7E-148	382/412 (92%)	6/412 (1%)	cDNA de folha estiolada da cultivar Ogle (<i>Avena sativa</i>) clone HRO4427_F10_L19, seqüência de mRNA.
U17AL05	CN814922.1	8E-145	376/407 (92%)	5/407 (1%)	cDNA de raiz da cultivar Ogle (<i>Avena sativa</i>) clone HRO4503_H12_P23, seqüência de mRNA.
U17AL06	CN816148.1	1E-100	303/333 (90%)	6/333 (1%)	cDNA de raiz da cultivar Ogle (<i>Avena sativa</i>) clone HRO4517_E06_I11, seqüência de mRNA.
U17AL07	CN816148.1	1E-130	372/407 (91%)	7/407 (1%)	cDNA de raiz da cultivar Ogle (<i>Avena sativa</i>) clone HRO4517_E06_I11, seqüência de mRNA
U17AL08	BJ247611.1	2E-159	322/327 (98%)	5/327 (1%)	clone whf2p09 de cDNA de <i>Triticum aestivum</i> , seqüência de mRNA 5'.
U17AL09	CN816580.1	2E-145	378/408 (92%)	6/408 (1%)	cDNA de folha estiolada da cultivar Ogle (<i>Avena sativa</i>) clone HRO4427_F10_L19, seqüência de mRNA
U17AL10					BLAST sem resultado
U17AL11					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL12					Resultado com esperança desconsiderável

Tabela 13-b: Resultado de BLASTn versus banco de DNA

Clone	Acesso	Esperança	Identidade	Gaps	Descrição
U17AL01	AB039840.1	2E-22	121/138 (87%)	3/138 (2%)	Seqüência de DNA satélite de Avena sativa
U17AL02	AB039840.1	5E-103	294/317 (92%)	8/317 (2%)	Seqüência de DNA satélite de Avena sativa
U17AL03	AB039840.1	5E-23	125/143 (87%)	3/143 (2%)	Seqüência de DNA satélite de Avena sativa
U17AL04	AY038010.1	9E-30	204/240 (85%)	9/240 (3%)	Isolado Pc68LrkC2 de Avena sativa com retrotransposon e DNA repetitivo ligado a um gene de receptor cinase
U17AL05					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL06	ASA005500	1E-22	104/118 (88%)	1/118 (0%)	pAs121 de <i>Avena strigosa</i> , seqüência repetitiva de DNA
U17AL07	AY083682.1	3E-08	65/74 (87%)	1/74 (1%)	Clone OP45 de <i>Avena sativa</i> , cluster gênico do receptor cinase, seqüência completa
U17AL08	BT018007.1	1E-80	289/327 (88%)	5/327 (1%)	Clone EL01N0527E05.c de Zea mays seqüência de mRNA
U17AL09	AY038010.1	4,00E-32	214/252 (84%)	9/252 (3%)	Isolado Pc68LrkC2 de Avena sativa com retrotransposon e DNA repetitivo ligado a um gene de receptor cinase
U17AL10					BLAST sem resultado
U17AL11					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL12					Resultado com esperança desconsiderável

Tabela 13-c: Resultado de BLASTx versus banco de DNA

Clone	Acesso	Esperança	Positivos	GAPS	Description
U17AL01	CAJ04956.1	8e-05	73/193 (37%)	27/193 (13%)	Proteína hipotética [Leishmania major]
U17AL02	CAJ04956.1	0.005	57/158 (36%)	21/158 (13%)	Proteína hipotética [Leishmania major]
U17AL03					BLAST sem resultado
U17AL04					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL05					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL06					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL07					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL08	AAP55187.1	3e-58	103/108 (95%)	0/108 (0%)	ADP-ribosylation factor [Daucus carota]
U17AL09					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL10					BLAST sem resultado
U17AL11					Resultado com esperança desconsiderável
U17AL12					Resultado com esperança desconsiderável

Há um grande número de seqüências de ESTs de aveia depositadas nos bancos de genes. Embora os resultados de BLAST retornem várias seqüências de alta homologia com a seqüência em teste, nenhuma delas apresenta informações referentes à função ou mesmo, predição de função. A maior parte delas foi usada para desenvolvimento de marcadores, usados posteriormente em projetos de mapeamento da espécie. O ano de publicação destas seqüências é de 2004, sem que tenha havido adição de comentários às mesmas, o que indica que não houve continuidade no estudo destas no que diz respeito ao transcriptoma. No entanto, já é de grande valia a informação referente à espécie e ao tecido do qual foi extraído o RNA. Dos doze clones, nove retornam seqüências de raiz com esperança máxima de $2e^{-31}$, sendo oito seqüências de aveia e uma de trigo (*Triticum aestivum*) (Tabela 13).

O fato de as seqüências depositadas não serem oriundas, em sua maioria, de condições de estresse, permite-se inferir que a maioria das seqüências isoladas na subtração possui caráter de expressão constitutivo, ou se forem genes induzidos ou com expressão intensificada, estes são induzidos por outros estresses além do alumínio. Os clones U17AL04, U17AL06, U17AL07 e U17AL08 possuem alta esperança com ESTs de bibliotecas de escrutínio por diferentes estresses. A Tabela 14 apresenta as seqüências com maior esperança para os três tipos de resultados mais comuns em todos os BLASTs: raiz, folhas verdes, folhas estioladas e estresse. A relação com condições de estresse é a seguinte: o clone U17AL04 tem alta homologia com a seqüência de *Agrostis capillaris* inoculado com dollar spot fungus; os clones U17AL06 e

U17AL07 parearam com ESTs de *Festuca arundinacea* Schreb sob estresse de choque térmico de calor em brotos; o U17AL08 com mRNA extraído da bainha de trigo sob estresse salino.

Tabela 14: Comparativo dos clones obtidos de hibridização subtrativa de raízes da cultivar de aveia UFRGS 17 em resposta a alumínio tóxico e ESTs com menores esperanças de acordo com o tecido ou condição de onde foram extraídos os mRNAs.

Clone	Raiz	Folhas verdes	Folhas estioladas	Estresse
U17AL01	$2,00E^{-31}$			
U17AL02	$3,00E^{-64}$			
U17AL03	$3,00E^{-132}$	$5,00E^{-08}$		
U17AL04	$7,00E^{-77}$		$7,00E^{-148}$	$6,00E^{-25}$
U17AL05	$8,00E^{-145}$	$2,00E^{-16}$		
U17AL06	$1,00E^{-100}$			$5,00E^{-10}$
U17AL07	$1,00E^{-130}$			$1,00E^{-32}$
U17AL08	$3,00E^{-124*}$			$6,00E^{-92}$
U17AL09	$2,00E^{-77}$		$2,00E^{-145}$	

*Hordeum vulgare

O valor de abertura de GAPs nos alinhamentos com seqüências de DNA e de ESTs foram baixos e equivalentes para os dois tipos de análise (Tabela 13-a e b), o que pode indicar que estes genes não possuam íntrons, ou que estes sejam bastante pequenos.

5.4.1 Clone U17AL08

O resultado de BLASTx do clone U17AL08 apresenta evidências de que este clone seja um fator de ribosilação-ADP, comumente chamados de ARFs, da sigla em inglês ADP-ribosilation Factor. O BLASTx do clone tem esperança de $2e^{-47}$ com fator de ribosilação-ADP de cenoura (*Daucus carota*). O mesmo BLASTx da seqüência isolada retorna os 50 primeiros acessos exclusivamente

como fatores de ribosilação-ADP confirmados ou supostos, com esperanças de oscilam de $2e^{-52}$ a $2e^{-28}$.

ARFs estão envolvidas em componentes de passos de tráfego de membranas, incluindo o retículo endoplasmático, a envelopagem nuclear e elementos das rotas endocíticas, provavelmente a membrana plasmática e o endossoma em seus estágios iniciais (Boman e Kahn, 1995).

Já há relato de provável relação de fatores de ribosilação-ADP com estresse causado por metais. Minglin et al. (2005) isolaram 19 genes diferencialmente expressos em *Brassica juncea* sob estresse por cádmio, dos quais dois eram ARFs (AY701398 e AY331383). Concluiu-se que ARFs podem exercer um papel regulatório significativo no combate a estresses múltiplos impostos pelo acúmulo de cádmio na planta. No macroarranjo avaliado anteriormente existe um fator de ribosilação-ADP (E9), este foi identificado através de hibridização subtrativa em sorgo após quatro horas de exposição ao alumínio tóxico.

Fatores de ribosilação, como M95166 e X7738 de *Arabidopsis* também estão envolvidos com o tráfego intracelular por vesículas formadas no complexo de golgi, manutenção da morfologia do retículo endoplasmático e reciclagem da membrana plasmática (Lee et al., 2002a).

O alinhamento das ARFs M95166 e X7738 isoladas por Lee et al. (2002a), AY701398 e AY331383 isoladas por Minglin et al. (2005) mostrou alto consenso com o clone U17AL08_ORF (Figura 12). A análise de Bootstrapping

revelou que, entre as ARFs avaliadas, a mais similar à U17AL08_ORF é X7738 (Figura 13).

Zhuang (2005), através da transformação de arábido com uma ARF de arroz, observou mudanças na regulação do crescimento da raiz devido ao aumento do efeito da auxina. As hipóteses geradas com este resultado especulam o acúmulo de auxina pela diminuição de seu transporte, pelo aumento de sua produção ou pelo aumento de sensibilidade à auxina. Plantas transgênicas possuindo superexpressão de ARF apresentaram maior taxa relativa de crescimento de raiz. Os autores concluem que a ARF está relacionada com a regulação do crescimento radicular em plantas. O principal efeito tóxico do alumínio é a inibição do crescimento radicular, como já foi discutido anteriormente.

A ARF X7738 pode estar envolvida na polimerização da actina e também na reciclagem da membrana plasmática. Ambas condições são imprescindíveis para o devido funcionamento celular. A actina usada como controle no macroarranjo, foi expressa somente na presença de alumínio, o que leva a crer que o estresse por alumínio ativou a expressão de mais genes de actina, como já discutido anteriormente. Mas este pode ser um sinal que confirma a hipótese da relação entre actina e ARFs de Lee et al (2002) pode estar correta, pois ambas são induzidas por alumínio.

A toxicidade por alumínio também pode ser atenuada em leveduras por um sistema de transporte de vesícula no qual o gene *sec19* está envolvido e, acredita-se que o gene isolado em tabaco *NtGDI1* exerça em plantas a mesma função que *sec19* tem em fungos (Ezaki et al., 2005). Embora não haja alta homologia entre *sec19* e ARFs, ambas proteínas exercem funções similares, o que permite especular que tanto *sec19* quanto as ARFs AY701398 e AY331383 e a ORF U17AL08 podem conferir o mesmo fenótipo, neste caso tolerância ao alumínio.

Estes dados sugerem que talvez o mecanismo de tolerância em aveia seja a presença de uma ARF. Como os resultados de análise de EST demonstram expressão constitutiva para esta mesma seqüência, a tolerância deve ser resultado de um incremento de expressão deste gene constitutivo. A diferença é grande suficiente para permitir o isolamento do mesmo por hibridização subtrativa.

5.4.2 Clones U17AL04, U17AL07 e U17AL09

O BLASTn da seqüência U17AL07 revelou alta homologia com o receptor cinase OP45 e as seqüências U17AL04 e U17AL09 com o também receptor cinase Pc68LrkC2.

Receptores-cinases pertencem a uma vasta família gênica, presente tanto em animais como vegetais, que têm a capacidade de perceber e processar informações a partir de sinais químicos via receptores na superfície celular (Shiu e Bleeker, 2001^A). Os receptores-cinases são proteínas caracterizadas pela

presença de três sítios específicos: um domínio de percepção de sinal na extremidade aminoterminal situado na região extracelular, uma região transmembrânica e um domínio de atividade cinase na extremidade carboxiterminal situado dentro do citosol (Walker, 1994).

Em uma revisão bastante abrangente em receptores-cinases de plantas, Shiu & Bleecker (2001^B) classificam as relações de percepção de acordo com as seguintes respostas: função de crescimento e desenvolvimento, interações patógeno-hospedeiro e resposta a estresse; controle de padrão de expressão por tecido específico ou global e padrão de expressão por indução. Para isso, os motivos de percepção exercem um papel decisivo. A interação de ativação da cascata de sinalização pode ser diretamente com outra proteína, com carboidratos diversos (como componentes de parede celular) ou com hormônios esteróides, como BRI1 de *arabidopsis*. Não há relato até o momento de uma interação entre o domínio receptor diretamente com metais tóxicos, o que poderia ser uma possibilidade para a resposta ao alumínio. Acreditava-se que resposta direta de receptores-cinases com metais fosse intermediada por sítios EGFs (*Epidermal Growth Factors*), os quais exerceriam ligações diretas com Ca^{2+} . Estas ligações ocorreriam em uma família de receptores cinases chamada de WAK (Cell Wall-Associated Receptor Kinase). As pectinas são importantes sinalizadores das WAK e sabe-se hoje que o cálcio intermedia todas as ligações entre galacturonídeos e os sítios dos receptores-cinases, provavelmente através de pontes entre o receptor e a pectina (Decreux & Messiaen, 2005).

A mutação de um gene WAK em arabidopsis (*WAK2*) levou ao desenvolvimento radicular atrofiado devido à redução da atividade das invertases vacuolares da raiz e do *steady state* dos mRNAs destes genes (Kohorn, 2006). Como discutido anteriormente, o alumínio é um antagonista do cálcio. A mutação de *Wak2* apresenta um fenótipo similar ao da toxicidade por alumínio, ou seja, a redução no comprimento de raiz, talvez a tolerância ao alumínio seja através da presença de um sítio de ligação com o cálcio mais específico.

Em aveia, a expressão modificada de dois receptores cinases, mais especificamente ALrk10 e Ork10 do cluster OP10rc (AY083679) estão relacionadas com a resistência a ferrugem da folha (Cheng e Armstrong, 2002). Análise de expressão por Northern Blot indicou o caráter constitutivo do gene e específico de folhas. Não houve expressão em raiz de aveia deste receptor-cinase. A resistência deu-se através do silenciamento tanto de ALrk10 quanto Ork10 e estes passaram a ser os primeiros genes cuja resistência se dá através da inibição de suas expressões. ALrk10 e Ork10 pertencem a um grupo de receptores cinases relacionados à defesa contra patógenos e estresse oxidativo.

Os clones U17AL04 e U17AI09 têm alta homologia como mais de um receptor-cinase: Pc68LrkC2 ($9e^{-30}$ e $4e^{-32}$, esperança, respectivamente), Pc68LrkC1 ($2e^{-24}$ e $2e^{-27}$), Pc68LrkB1 ($2e^{-24}$ e $2e^{-27}$), Pc68LrkC5 ($3e^{-23}$ e $6e^{-25}$) e Pc68LrkB2 ($3e^{-23}$ e $6e^{-25}$). O clone U17AL07 tem homologia unicamente com o receptor cinase OP45 ($3e^{-08}$).

A maior evidência que caracteriza os clones U17AL07, U17AL04 e U17AL09 como possíveis candidatos à tolerância ao alumínio em aveia é a identificação do receptor-cinase *WAK1* de *Arabidopsis thaliana* como gene capaz de conferir tolerância ao alumínio nesta espécie. Além de ter sua expressão identificada após a indução de estresse por alumínio, o gene foi capaz de introduzir tolerância em um ecótipo de *Arabidopsis* sensível, quando expresso constitutivamente com o promotor 35S (Sivaguru et al., 2003).

O gene *WAK1* é o gene com resposta mais rápida ao estresse por alumínio já isolado. *WAK1* atingiu expressão máxima em 1 hora após a exposição, mantendo um padrão estável até o término da medição (4 horas).

A relação entre tolerância ao Al, níveis de Ca, resposta a patógenos e regulação gênica já foi especulada em trigo, através de uma série de genes afetados tanto por Al, quanto por Ca e patógenos (Hamel et al, 1998).

Várias evidências indicam a possibilidade de o fator de ribosilação e receptor cinase serem candidatos a tolerância ao alumínio em aveia. Vale ressaltar que ambos possuem respostas similares, as quais conferem exatamente o mesmo fenótipo, como relações de crescimento celular adequado, como já discutido anteriormente. É possível que estes genes atuem juntos na tolerância ao alumínio em aveia, em algum tipo de rota ainda não elucidada.

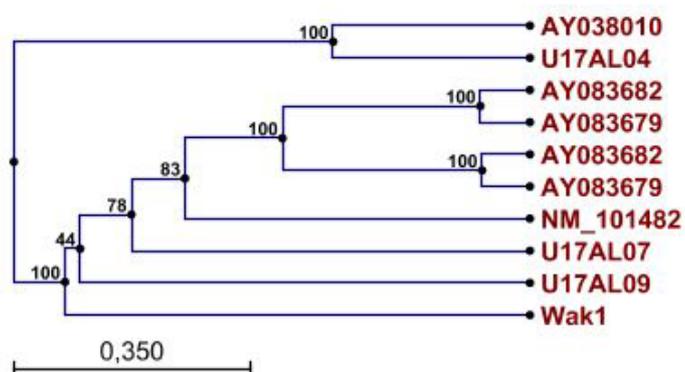


Figura 14: Dendrograma do Bootstrapping das seqüências de receptores cinases U17AL07, U17AL09 e U17AL04 isolados de aveia em estresse por alumínio e outros receptores cinase Wak1 de *Arabidopsis thaliana* (tolerância à alumínio). AY083679 e AY08682 de *Avena sativa* (resistência à ferrugem da folha), AY038010 de *Avena sativa* (Pc68).

6. Conclusões

1. O gene para tolerância ao alumínio presente em UFRGS 17 não deve ser ortólogo ao gene *Alp* presente no cromossomo 4HS em cevada uma vez que não está associado ao marcador XBCD1117 que identifica a região heteróloga em cevada
2. Na população UFRGS17 com UFRGS930598 o SNP1117 é um marcador associado ao rendimento de grãos, ciclo e PH e o SSR AM1 está associado ao rendimento de grãos..
3. A subtração em aveia é uma técnica eficaz e faz-se necessária uma seleção grande de clones para se obter uma biblioteca mais representativa.
4. As doze seqüências isoladas são genes supostos a conferir tolerância ao alumínio em aveia.

7. Perspectivas

Os dados discutidos nesta dissertação somados ao QTL do mapa de aveia do GrainGenes indicam um potencial para o marcador SNP1117 para uso em programas de melhoramento de aveia branca que visem diminuir o ciclo e aumentar o rendimento de grãos na espécie. Para tal, se faz importante a validação do marcador SNP1117 em outras populações de aveia branca que variem quanto ao rendimento e ciclo.

A não existência de seqüências com homologia com U17AL10, U17AL11 e U17AL12 torna-as com alto precedente para estudo de caracterização, pois podem caracterizar novos tipos de genes.

As demais seqüências devem ser testadas para padrão de expressão temporal, já que genes de receptores-cinases, como as U17AL04 e U17AL09, podem apresentar expressão intermitente.

As seqüências obtidas permitirão o desenho de novos primers para testar se há diferenças entre as variedades tolerante e sensível.

7 - Referências Bibliográficas

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, Reino Unido, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANOOP, V.M.; BASU, U.; MCCAMMON, M.T.; MCALISTER-HENN, L.; TAYLOR, G. J. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, p. 2205–2217, 2003.

ATKINS, W.M.; WANG, R.W.; BIRD, A.W.; NEWTON, D.J.; LU, A. Y. The catalytic mechanism of glutathione S-transferase (GST). Spectroscopic determination of the pKa of Tyr-9 in rat alpha 1-1 GST. **Journal of Biological Chemistry**, Nova lorque, v. 268, n. 26, p. 19188-19191, 1993.

BASU, U.; GOOD, A.G.; TAYLOR, G.J. Transgenic Brassica napus plants overexpressing aluminum-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminum. **Plant Cell Environment**, Nova lorque, v. 24, p. 1269–1278, 2001.

BASU, U.; SOUTHRON, J.L.; STEPHENS, J.L.; TAYLOR, G.J. Reverse genetic analysis of the glutathione metabolic pathway suggests a novel role of PHGPX and URE2 genes in aluminum resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlim, v. 271, p. 627–637, 2004.

BOMAN, A.L.; KAHN, R.A. Arf proteins: the membrane traffic police? **Trends Biochemical Sciences**, Amsterdam v. 20, n. 4, p. 147-150, 1995.

CARELS, N.; BERNARDI, G. Two classes of genes in plants. **Genetics**, Nova lorque, v. 154, p. 1819-1825, 2000.

CARPENTER, D.; SIMON, A.E. Preparation of RNA In: MARTÍNEZ-ZAPATER J.M.; SALINAS, J. **Methods in Molecular Biology Volume 82 ARABIDOPSIS PROTOCOLS** (1998). Totowa, Nova lorque: Humana Press, 1998. 440 p.

CHENG, D.W.; HE, S.; ARMSTRONG, K.C. Modified expression of two receptor kinase genes in hexaploid oat (*Avena sativa* L.) on inoculation with crown rust. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Tóquio, v. 61, n. 5, 281–288, 2002.

DECREUX A.; MESSIAEN J. Wall-associated kinase WAK1 interacts with cell wall pectins in a calcium-induced conformation. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 2, p. 268-278, 2005.

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

DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; HEBB, D.M.; YAMAMOTO, Y.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 101 n. 2, p. 15249–15254, 2004.

DEVI, S.R.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. An intracellular mechanism of aluminum tolerance associated with high antioxidant status in cultured tobacco cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**, Nova Iorque, v. 97, p. 59–68, 2003.

DEVOS, K.M.; GALE, M.D. Comparative genetics in the grasses, **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 35, p. 3–15, 1997.

DEVOS, K.M.; GALE, M.D. Genome Relationships: The Grass Model in Current Research. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 637–646, 2000.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y.-F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV, E.D.; SIEBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, p. 6025–6030, 1996.

EZAKI, B.; GARDNER, R. C.; EZAKI, Y.; MATSUMOTO, H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 122, p. 657–665, 2000.

EZAKI, B.; SASAKI, K.; MATSUMOTO, H.; NAKASHIMA, S. Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the NtGDI1 gene **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 420, p. 2661–2671, 2005.

EZAKI, B.; SUZUKI, M.; MOTODA, H.; KAWAMURA, M.; NAKASHIMA, S.; MATSUMOTO H.; Mechanism of Gene Expression of Arabidopsis Glutathione S-

Transferase, AtGST1, and AtGST11 in Response to Aluminum Stress. **Plant Physiology**, Lancaster, v.134, p.1672–1682, 2004.

FEDERIZZI, L.C. ACAUAN, L.R.; CARVALHO, F.I.F. Variabilidade fenotípica de diferentes caracteres da panícula em aveia (*Avena sativa* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.2, p.223-229, 1995.

FOY, C.D. Effects of Soil Calcium Availability on Plant Growth. In: CARSON E.W. (Ed) **The plant root and its environment**. Charlottesville: University Press of Virginia, 1974.

HAMEL, F.; BRETON, C.; HOUDE, M. Isolation and characterization of wheat aluminum-regulated genes: possible involvement of aluminum as a pathogenesis response elicitor **Planta**, Berlin, v. 205, p. 531-538, 1998.

HAYES, J.E.; MA, J.F. Al-induced efflux of organic acid anions is poorly associated with internal organic acid metabolism in triticale roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 388, p. 1753-1759, 2003.

GONÇALVES, J. F. DE C.; CAMBRAIA, J.; MOSQUIM, P.R.; ARAÚJO, E.F. Aluminum effect on organic acid production and accumulation in sorghum. **Journal of Plant Nutrition**, Nova Iorque, v. 28, p. 507–520, 2005.

KATO, Y.; Structure of plant cell walls and implications of nutrient acquisition. In: AE, N.; ARIHARA, J.; OKADA, K.; SRINIVASAN, A. (Eds) **Plant nutrient acquisition**. Berlin: Springer-Verlag, 2001, p. 276–296.

KINRAIDE, T.B.; RYAN, P.R.; KOCHIAN, L.V. Al³⁺-Ca²⁺ Interactions in aluminum rhizotoxicity 2. Evaluating the Ca²⁺-displacement hypothesis. **Planta**, Berlin, v. 192, n. 1, p. 104-109, 1994.

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 Plant Physiology Plant Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 55, p. 459-493, 2005.

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

KOHORN, B.D.; KOBAYASHI, M.; JOHANSEN, S.; RIESE, J.; HUANG, L.-F.; KOCH, K.; FU, S.; DOTSON, A.; BYERS, N. An Arabidopsis cell wall-associated kinase required for invertase activity and cell growth. **The Plant Journal**, Oxford, v. 46, p. 307–316, 2006.

LARSEN, P.B.; GEISLER, M.J.B.; JONES, C.A.; WILLIAMS, K.M.; CANCEL, J.D. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, p. 353–363, 2005.

LEE, M.H.; MIN, M.K.; LEE, Y. J.; JIN, J.B.; SHIN, D.H.; KIM, D.H.; LEE, K.-H.; HWANG, I. ADP-ribosylation factor 1 of Arabidopsis plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, p. 1507–1520, 2002

LEGGETT, J.M.; MARKHAND, S.M. The genomic identification of some monosomics of *Avena sativa* L. cv Sun II using GISH. **Genome**, Ottawa, v.38, p.747–751, 1995

LI, C.D.; ROSSNAGEL, B.G.; SCOLES, G.J. The development of oat microsatellite markers and their use in identifying relationships among *Avena* species and oat cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.101, p.1259–1268, 2000a.

LI, X. F.; MA, J.F.; MATSUMOTO, H. Pattern of aluminum-induced secretion of organic acids differs between rye and wheat. **Plant Physiology**, Lancaster, v.123, p.1537–1543, 2000b.

MARIANO, E.D.; KELTJENS, W.G. Long-term effects of aluminum exposure on nutrient uptake by maize genotypes differing in aluminum resistance. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v.28, p.323–333, 2005.

MATSUMOTO, H. Molecular aspect of Al tolerance in crop plants: novel Al-activated malate transporter gene in wheat roots. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tóquio, v. 51, n. 5, p. 613-615, 2005.

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

MINGLIN, L.; YUXIU, Z.; TUANYAO, C. Identification of genes up-regulated in response to Cd exposure in *Brassica juncea* L. **Gene**, Amsterdam, v.363, p.151–158, 2005.

MOORE, G.; DEVOS, K.M.; WANG, Z.; GALE, M.D. Grasses, line up and form a circle. **Current Biology**, Londres, v. 5, n. 7, p. 737-739, 1995.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

MUGWIRA, L.M.; ELGAWHARY, S.M.; PATEL, K.I. Differential tolerances of triticale, rye and barley to aluminum in nutrient solution. **Agronomy Journal**, Madison, v. 68, p. 782-783, 1976.

NAVA, I.C.; DELATORRE, C.A.; DUARTE, I. T. DE L.; PACHECO, M.T.; FEDERIZZI, L.C. Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). **Euphytica**, Dordrecht, Manuscrito, 2005.

NAVA, I.C. **Estratégias de avaliação e herança da tolerância ao alumínio em linhagens recombinantes de aveia (*Avena sativa* L.)** 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

O'DONOUGHUE, L.S.; KIANIAN, S.F.; RAYAPATI, P.J.; PENNER, G.A., SORRELLS, M.E.; TANKSLEY, S.D.; PHILLIPS, R.L.; RINES, H.W.; LEE, M.; FEDAK, G.; MOLNAR, S.J.; HOFFMAN, D.; SALAS, C.A.; WU, B.; AUTRIQUE, E.; VAN DEYNZE, A. A molecular linkage map of cultivated oat. **Genome**, Ottawa, v. 38, p. 368-380, 1995.

OLIVEIRA, P.H. **Herança genética e mapeamento molecular da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia**. 2002. 101 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

PAL, N.; SANDHU, S.; DOMIER, L.L.; KOLB, F.L. Development and characterization of microsatellite and RFLP-derived PCR marker in oat **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 912-918, 2002.

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

RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P.J. Malate efflux from root apices and tolerance to aluminum are highly correlated in wheat. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood Victoria, v. 22, p. 531-536, 1995.

RYAN, P.R.; SKERRETT, M.; FINDLAY, G.P.; DELHAIZE, E.; TYERMAN, S. D. Aluminum activates an anion channel in the apical cells of wheat roots **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 94, p. 6547-6552, 1997.

SÁNCHEZ-CHACÓN, C.D. **Herança da tolerância e sensibilidade à tolerância do alumínio em aveia (*Avena sativa* L.)**. 1998. 73f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

SANTOS, H.P.; AMBROSI, I.; LHAMBY, J.C.B.; do CARMO, C. Lucratividade e risco de sistemas de manejo de solo e de rotação e sucessão de culturas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.1, p.97-103, 2004.

SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S.J.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, Oxford, v. 37, p. 645-653, 2004.

SHIU, S.-H.; BLEECKER, A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 10763-10768, 2001.

SHIU, S.-H.; BLEECKER, A. B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. **Science STKE**, Washington, re. 22, p. 1-13, 2001.

SIVAGURU, M.; EZAKI, B.; H.E., Z.H.; TONG, H.; OSAWA, H.; BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; MATSUMOTO, H. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, n. 4, p. 2256-66, 2003.

TANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KOCHIAN, L. V.; GARVIN, D. F. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. **Crop Science**, Washington, v. 40, p. 778–782, 2000.

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

WAGNER, C.M. **Herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia**. 1999, 62 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

WALKER, JC. Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, p. 1599-1609, 1994.

WANG, Y.-S.; YANG, Z.-M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 12, p. 1915–1923, 2005.

WIGHT, C.P.; KIBITE, S.; TINKER, N.A.; MOLNAR, S.J. Identification of molecular markers for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v.112, p.222–231, 2006.

YAMAGUCHI, M.; SASAKI, T.; SIVAGUR, M.; YAMAMOTO, Y.; OSAWA, H.; AHN, S. J.; MATSUMOTO, H. Evidence for the plasma membrane localization of al-activated malate transporter (ALMT1). **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 5, p. 812–816, 2005.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 125, p. 199–208, 2001.

YANG, J.L.; ZHENG, S.J.; HE, Y.F.; TANG, C.X.; ZHOU, G.D. Genotypic differences among plant species in response to aluminum stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, 28: 949–961, 2005.

ZHOU, X.; JELLEN, E.N.; MURPHY, J.P. Progenitor germplasm of domesticated hexaploid oat. **Crop Science**, Madison, v.39, p.1208–1214, 1999.

ZHUANG, X.; XU, Y.; CHONG, K.; LAN, L.; XUE, Y.; XU, Z. OsAGAP, an ARF-GAP from rice, regulates root development mediated by auxin in Arabidopsis. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.28, p.147–156, 2005.

8 – APÊNDICES

Apêndice 1: Autorradiografia das membranas controle (C) e testadora (T) do macroarranjo com gabarito da posição das sondas na membrana de acordo com Tabela 7



Gabarito do carimbo das duas repetições na membrana com a amplificação das sondas responsivas ao alumínio da EMBRAPA.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12												
B1	A1	B2	A2	B3	A3	B4	A4	B5	A5	B6	A6	B7	A7	B8	A8	B9	A9	B10	A10	B11	A11	B12	A12
C1	B1	C2	B2	C3	B3	C4	B4	C5	B5	C6	B6	C7	B7	C8	B8	C9	B9	C10	B10	C11	B11	C12	B12
D1	C1	D2	C2	D3	C3	D4	C4	D5	C5	D6	C6	D7	C7	D8	C8	D9	C9	D10	C10	D11	C11	D12	C12
E1	D1	E2	D2	E3	D3	E4	D4	E5	D5	E6	D6	E7	D7	E8	D8	E9	D9	E10	D10	E11	D11	E12	D12
F1	E1	F2	E2	F3	E3	F4	E4	F5	E5	F6	E6	F7	E7	F8	E8	F9	E9	F10	E10	F11	E11	F12	E12
G1	F1	G2	F2	G3	F3	G4	F4	G5	F5	G6	F6	G7	F7	G8	F8	G9	F9	G10	F10	G11	F11	G12	F12
H1	G1	H2	G2	H3	G3	H4	G4	H5	G5	H6	G6	H7	G7	H8	G8	H9	G9	H10	G10	H11	G11	H12	G12
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12											