

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Tolerância ao Alumínio em Trigo:  
Identificação e Caracterização Molecular de Genes**

Tatiana Boff

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Sandra Cristina Kothe Milach  
Co-Orientadores: Euclides Minella e Luiz Carlos Federizzi

Porto Alegre  
Agosto de 2006.

### **Dados de Identificação**

1. Tatiana Boff, Bióloga, Ms.C., doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFRGS; **executora**.
2. Sandra Cristina Kothe Milach, Ph.D., professora colaboradora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, UFRGS e cientista da Pioneer Sementes; **orientadora**.
3. Euclides Minella, Ph.D., pesquisador da Embrapa Trigo; **co-orientador**.
4. Luiz Carlos Federizzi, Ph.D., professor titular do Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS; **co-orientador**.
5. Carla Andréa Delatorre, Ph.D., professor adjunto do Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS; **colaborador**.
6. Márcio Voss, Ph.D., pesquisador da Embrapa Trigo; **colaborador**.
7. Emerson Limberger, Ms.C., pesquisador associado da Pioneer Sementes; **colaborador**.
8. Laize Fraga Espindula, graduanda em Agronomia, UFRGS; **bolsista de Iniciação Científica**.

### **Locais de Execução**

1. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).  
Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, Passo Fundo, RS.
2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).  
Faculdade de Agronomia, Depto. Plantas de Lavoura.  
Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Porto Alegre, RS.

### **Financiamentos**

1. PADCT
2. FAPERGS
3. CNPQ
4. CAPES

## Índice

1	Porque não somos auto-suficientes na produção de trigo?.....	17
2	Alumínio, o grande vilão .....	18
3	Toxicidade e Tolerância, os dois lados da moeda.....	19
4	Ácidos Orgânicos, compostos multivalentes .....	21
5	Um, dois ou vários genes... afinal quantos genes governam esse caráter? Estudos de herança genética e mapeamento molecular .....	24
6	A caixa preta da tolerância ao alumínio tóxico: quais são os genes chaves? .....	29
7	Genótipos brasileiros, reservatórios de genes para tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	32
1	Introdução.....	36
2	Material e Métodos .....	38
2.1	Material Vegetal.....	38
2.2	Avaliação para Tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	38
2.3	Análises estatísticas .....	39
3	Resultados e Discussão .....	41
3.1	Herança da tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi: quantos genes?.....	41
3.2	Herança da Tolerância ao Al <sup>3+</sup> : Toropi x BH1146 possuem o mesmo gene?.....	46
3.3	Toropi e BH1146: diferentes fontes de genes para tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	55
3.3.1	Tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi e BH1146: voltando as origens.....	57
4	Conclusões.....	59
1	Introdução.....	61
2	Material e Métodos .....	63
2.1	Material Vegetal e Avaliação para Tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	63
2.2	Extração de DNA.....	63
2.3	Estratégia I: Conversão de marcadores e desenvolvimento de Marcadores SNPs .....	63
2.3.1	Conversão de marcadores RFLP a marcadores STS .....	63
2.3.2	Digestão com enzimas de restrição .....	65
2.3.3	Desenvolvimento de SNPs.....	65
2.4	Estratégia II: Análises de SSR e STS.....	68
2.4.1	Identificação dos Marcadores SSR e os STS .....	69
2.5	Estratégia III: Análises de AFLP .....	69
2.5.1	Digestão do DNA genômico .....	69
2.5.2	Ligação de adaptadores e ligação ao DNA.....	69
2.5.3	Pré-amplificação dos fragmentos de DNA .....	70
2.5.4	Amplificação seletiva dos fragmentos de DNA.....	70
2.5.5	Identificação dos Marcadores AFLP .....	70
2.6	Análises de Ligação .....	71
2.7	Construção do mapa genético.....	72
2.8	Detecção de QTLs para as características fenotípicas .....	72
2.9	Mapeamento físico dos marcadores.....	72
3	Resultados e Discussão .....	74
3.1	Conversão de Marcadores .....	74
3.2	Recuperando Polimorfismos: clivagem com enzimas de restrição.....	75
3.3	Desenvolvimento de Marcadores SNP .....	76

3.4	Conversão de Marcadores: uma estratégia que vale a pena? .....	81
3.5	Mapeamento.....	84
3.5.1	Análises de SSR e STS .....	84
3.5.2	Análises de AFLP.....	92
3.5.3	Construção do Mapa Molecular .....	92
3.5.4	Detecção de QTLs associados à tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	94
3.5.5	Mapeamento físico dos marcadores associados à tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi .....	109
3.5.6	Tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi: herança simples ou complexa?.....	110
4	Conclusões.....	112
1	Introdução.....	114
2	Materiais e Métodos .....	115
2.1	Material Vegetal.....	115
2.2	Construção da Biblioteca Subtraída .....	115
2.3	Seleção de Clones para Sequenciamento.....	116
2.4	Análise das Seqüências .....	116
2.5	Validação dos Experimentos de Hibridização Subtrativa .....	117
3	Resultados e Discussão .....	120
3.1	Identificação de Genes Regulados pelo Alumínio Tóxico.....	120
3.2	Mapeamento <i>in silico</i> : onde estão esses genes nesse vasto genoma?.....	130
3.3	Genes induzidos por alumínio tóxico: a maquinaria fisiológica modificando-se para tolerar o estresse.....	136
3.3.1	Ativando enzimas do Ciclo do Ácido Cítrico.....	136
3.3.2	Reforçando a Parede Celular e a Membrana Plasmática .....	137
3.3.3	Driblando as espécies reativas de oxigênio .....	140
3.3.4	Percebendo e Transmitindo: genes envolvidos na sinalização e na cascata de transdução .....	141
3.3.5	Um estímulo, várias respostas: indução de genes envolvidos em diversos processos metabólicos .....	144
3.4	Genes induzidos por alumínio tóxico em Toropi: quais são realmente diferentemente expressos? .....	155
3.5	De seqüências diferencialmente expressas a marcadores funcionais para tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	156
4	Tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi: em busca de genes candidatos .....	157
4.1	QTLs, Seqüências Diferencialmente Expressas e Mapeamento <i>in silico</i> .....	157
4.2	Tolerância ao alumínio em Toropi: novos mecanismos para um velho problema?.....	158
5	Conclusões.....	159

## Lista de Figuras

CAPÍTULO I	
Figura 1.	Distribuição global de solos ácidos. (Fonte: USDA, NRCS, World Soil Resources, Washington, D.C.)..... 18
Figura 2.	Ciclo do ácido cítrico. (Buchanan et al., 2000). ..... 22
Figura 3.	Mapas comparativos das regiões contendo genes de tolerância ao $Al^{3+}$ em trigo, cevada e centeio (modificado de Miftahudin et al., 2004). ..... 26
CAPÍTULO II	
Figura 1.	População Toropi x Anahuac após 96 horas de cultivo em solução nutritiva. Na ausência de $Al^{3+}$ : parte aérea (a) e raízes (b). Sob estresse de $Al^{3+}$ nas doses de: 74 $\mu M$ , parte aérea (c) e raízes (d); 148 $\mu M$ , parte aérea (e) e raízes (f); 222 $\mu M$ , parte aérea (g) e raízes (h). ..... 42
Figura 2.	Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x Anahuac após 96 h de estresse de $Al^{3+}$ (74 $\mu M$ ) em solução nutritiva. .... 44
Figura 3.	Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x Anahuac após 96 h de estresse de $Al^{3+}$ (148 $\mu M$ ) em solução nutritiva. .... 44
Figura 4.	Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x Anahuac após 96 h de estresse de $Al^{3+}$ (222 $\mu M$ ) em solução nutritiva. .... 45
Figura 5.	Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x BH1146 após 96 h de estresse de $Al^{3+}$ (74 $\mu M$ ) em solução nutritiva. .... 47
Figura 6.	Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x BH1146 após 96 h de estresse de $Al^{3+}$ (148 $\mu M$ ) em solução nutritiva. .... 48
Figura 7.	Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x BH1146 após 96 h de estresse de $Al^{3+}$ (222 $\mu M$ ) em solução nutritiva. .... 48
Figura 8.	Plântulas de trigo submetidas a 74 $\mu M$ de $Al^{3+}$ . Anahuac (a), Toropi (b), BH1146 (c), recombinantes sensíveis (d) e recombinantes tolerantes (e) da população Toropi x BH1146. .... 50
Figura 9.	Plântulas de trigo na ausência de $Al^{3+}$ . Toropi (a), BH1146 (b), Anahuac (c), recombinante tolerante (RIL 44) (d) e recombinante sensível (RIL 75) (e) da população Toropi x BH1146. .... 51
Figura 10.	Plântulas de trigo submetidas a 148 $\mu M$ de Al. Toropi (a), BH1146 (b), Anahuac (c), recombinante tolerante (RIL 44) (d) e recombinante sensível (RIL 75) (e) da população Toropi x BH1146. .... 51
Figura 11.	Plântulas de trigo submetidas a 222 $\mu M$ de Al. Toropi (a), BH1146 (b), Anahuac (c), recombinante tolerante (RIL 44) (d) e

	recombinante sensível (RIL 75) (e) da população Toropi x BH1146.....	52
Figura 12.	Linhagem recombinante tolerante (RIL 44) crescida na ausência de Al (a), em 148 $\mu$ M de Al repetição 1(b) e repetição 2(c), em 222 $\mu$ M de Al repetição 1(d) e repetição 2(e).....	52
Figura 13.	Linhagem recombinante sensível (RIL 75) crescida na ausência de Al (a), em 148 $\mu$ M de Al repetição 1(b) e repetição 2(c), em 222 $\mu$ M de Al repetição 1(d) e repetição 2(e).....	53
Figura 14.	Prováveis fontes de genes para tolerância ao Al <sup>3+</sup> em genótipos brasileiros de trigo, BH1146 e Toropi. (Modificado de De Souza, 1998).....	58
<b>CAPÍTULO III</b>		
Figura 1.	Mapas comparativos das regiões contendo genes de tolerância ao Al <sup>3+</sup> entre trigo, cevada e centeio (modificado de Miftahudin et al., 2004). Em destaque, marcadores RFLP utilizados pra conversão. ....	64
Figura 2.	Perfil eletroforético dos marcadores STS nos progenitores resolvidos em gel de agarose 2%. (T- Toropi, A- Anahuac, M- Marcador 100 pb).....	74
Figura 3.	Perfil de digestão dos fragmentos amplificados por PCR para os marcadores STS, após restrição com a enzima MseI, resolvidos em gel de agarose 2% (T: Toropi, A: Anahuac, M. marcador 100 pb).....	76
Figura 4.	Alinhamento das seqüências amplificadas pelo marcador <i>STS1117</i> em Toropi e Anahuac, em preto, as variações nucleotídicas. No retângulo, a seqüência utilizada para projeção do primer <i>SNP1117</i> . ....	77
Figura 5.	Alinhamento das seqüências amplificadas pelo marcador <i>STS1395</i> em Toropi e Anahuac, em preto, as variações nucleotídicas. No retângulo, a seqüência utilizada para projeção do primer <i>SNP1395</i> . ....	78
Figura 6.	Alinhamento das seqüências amplificadas pelo marcador <i>STS1230</i> em Toropi e Anahuac, em preto, as variações nucleotídicas. No retângulo, a seqüência utilizada para projeção do primer <i>SNP1230</i> . ....	79
Figura 7.	Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados por PCR para os marcadores SNPs em a) fragmento de 230 pb do <i>SNP1230</i> , b) fragmento de 356 pb amplificado do <i>SNP1395</i> e c) fragmento de 150 pb do <i>SNP1117</i> . (T-Toropi, A - Anahuac e M - Marcador 100 bp).....	80
Figura 8.	Perfil eletroforético do marcador <i>Xgdm129</i> em agarose (a) e em poliacrilamida (b). Toropi (T), Anahuac (A), RILs tolerantes (1,4,16) e RILs sensíveis (20,21,37). (Marcador 100 bp).....	85
Figura 9.	Perfil eletroforético do marcador <i>Xbarc105</i> Toropi (T), Anahuac (A). A seta indica os alelos amplificados de 139 pb e 200 pb pelo marcador. (Marcador 100 bp). ....	85

Figura 10.	Perfil eletroforético do marcador <i>Xbarc288</i> Toropi (T), Anahuac (A). A seta indica os alelos amplificados de 240 pb pelo marcador. (Marcador 100 bp). .....	85
Figura 11.	Localização do marcador SSR <i>Xgdm129</i> associado à tolerância ao $Al^{3+}$ no braço curto do cromossomo 4D. T: Toropi, A: Anahuac, linhagens tolerantes: (1T, 4T, 16T) linhagens sensíveis: (20S, 21S, 37S), N4A: N4AT4D, N4D: N4DT4B, N6B: N6BT6D, 4D: linha <i>Chinese Spring</i> , 4DS: Ditelossômico para o braço curto do cromossomo 4D, 4DL: Ditelossômico para o braço longo do cromossomo, M: marcador 100pb.....	86
Figura 12.	Mapas moleculares para o cromossomo 4D. Em vermelho marcadores utilizados, em azul marcadores associados ao gene de Toropi e em verde marcadores flanqueadores. Barras azuis gene de Toropi, barra vermelha gene <i>Alt<sub>BH</sub></i> , barra laranja gene <i>ALMT1</i> . (Modificado de Somers et al., 2004 (a); Pestsova et al., 2000 (b); Song et al., 2005 (c)). .....	89
Figura 13.	Perfil eletroforético do marcador AFLP <i>PaaaMcta</i> . Toropi (T), Anahuac (A). As setas indicam locos amplificados pelo marcador <i>PaaaMcta</i> , em associação (a) e em repulsão (b).....	92
Figura 14.	Mapa de ligação de trigo baseado na população F <sub>7</sub> Toropi x Anahuac. Distâncias no mapa são dadas em CentiMorgans. LOD4. ....	94
Figura 15.	QTLs detectados por análise de marcador por ponto para tolerância ao $Al^{3+}$ em Toropi localizado no grupo de ligação 17. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	96
Figura 16.	Distribuição dos QTLs detectados por mapeamento por intervalo simples para tolerância ao $Al^{3+}$ no mapa de Toropi. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	98
Figura 17.	QTLs detectados por mapeamento por intervalo simples para tolerância ao $Al^{3+}$ em Toropi localizado no grupo de ligação 2. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	99
Figura 18.	QTLs detectados por mapeamento por intervalo simples para tolerância ao $Al^{3+}$ em Toropi localizado no grupo de ligação 17. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	100
Figura 19.	Distribuição dos QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao $Al^{3+}$ no mapa de Toropi. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	101

Figura 20.	QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi localizado no grupo de ligação 1. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	102
Figura 21.	QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi localizado no grupo de ligação 2. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	103
Figura 22.	QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi localizado no grupo de ligação 6. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	104
Figura 23.	QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao Al <sup>3+</sup> em Toropi localizado no grupo de ligação 17. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico. ....	105
Figura 24.	QTLs detectados para tolerância ao Al <sup>3+</sup> na população de RILs F <sub>7</sub> de Toropi x Anahuac através de análises de ponto, mapeamento por intervalo simples e composto.....	108
Figura 25.	Localização dos marcadores presentes no grupo de ligação 2 de Toropi no genoma do trigo. 1 - marcador <i>PaaMga859</i> , 2 - marcador <i>PaaMga221</i> T: Toropi, A: Anahuac, t: linhagens tolerantes, s: linhagens sensíveis, 1A: N1AT1D, 1B: N1BT1D, 1D: N1DT1B, 2B: N2BT2D, 2D: N2DT2B, 3A: N3AT2D, 3B: N3BT3D, 3D: N3DT3B, 4A: N4AT4D, 4D: N4DT4B, 5A: N5AT5D, 5B: N5BT5D, 5D: N5DT5B, 6A: N6AT6D, 6B: N6BT6D, 7A: N7AT7D, 7B: N7BT7D, 7D: N7DT7B, M: marcador 100pb.....	110

#### CAPÍTULO IV

Figura 1.	Classificação funcional dos cDNAs de trigo regulados pelo alumínio com similaridade com seqüências dos bancos de dados do NCBI e do EMBL-EBI, utilizando BLASTx e Blast-wu. ....	126
Figura 2.	Classificação dos cDNAs pertencentes as categorias Proteína Hipotética e Sem Similaridade Significativa a partir da comparação com seqüências de ESTs dos bancos de dados do GrainGenes2.0 e do NCBI, utilizando Blastn. ....	126
Figura 3.	Mapeamento <i>in silico</i> das seqüências diferencialmente expressas utilizando a base de dados de EST's mapeadas de trigo do GrainGenes 2.0 – representação gráfica. ....	134
Figura 3.	Continuação.....	135
Figura 4.	Ciclo básico do metabolismo de ROS em resposta a estresses bióticos e abióticos.....	143
Figura 5.	Interações metabólicas entre estresses abióticos e bióticos. (Modificado de Poschenrieder et al., 2006). ....	150



- Figura 6. Dendograma do Bootstrapping da seqüência AluTp13 de trigo e outros fatores de transcrição bHLH de arroz (acessos Q6ZIP1, Q2R0R9, Q2QQ32, Q6ZFY4, Q2QMV), arabidopsis (acessos Q7XHI9, O81756 e Q8S3D3) e alfafa (acessos Q1SL31). ..... 153
- Figura 7. Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos de AluTp13 de trigo com as seqüências de fatores de transcrição bHLH de arroz (acessos Q6ZIP1, Q2R0R9, Q2QQ32, Q6ZFY4, Q2QMV), arabidopsis (Q7XHI9, O81756 e Q8S3D3) e alfafa (Q1SL31). ..... 154
- Figura 8. Macroarranjos de cDNAs de Toropi sob estresse de alumínio. Em (a) exposição por 2 h e em (b) exposição da mesma membrana por 18 h. .... 156
- Figura 9. Perfil eletroforético dos marcadores desenvolvidos com base nas seqüências diferencialmente expressas. T: Toropi, A: Anahuac, M: Marcador 100 pb. .... 157

## Lista de Tabelas

### CAPÍTULO I

Tabela 1.	Espécies de plantas cuja exudação de ácidos orgânicos está correlacionada com a tolerância ao alumínio .....	24
Tabela 2.	Relação dos genes e regiões cromossômicas identificados como relacionados à tolerância ao alumínio tóxico nos cereais de estação fria.....	28
Tabela 3.	Genes regulados por alumínio tóxico descritos na literatura. ....	30
Tabela 3.	Continuação ...	31

### CAPÍTULO II

Tabela 1.	Genótipo, origem, genealogia e resposta ao Al <sup>3+</sup> do germoplasma utilizado no presente estudo.....	38
Tabela 2.	Experimentos e tratamentos utilizados para fenotipagem das RILs quanto a tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	39
Tabela 3.	Média e desvio padrão do comprimento relativo da raiz principal (%) dos genótipos Toropi (tolerante) e Anahuac (sensível) avaliados quanto à tolerância ao Al <sup>3+</sup> em solução nutritiva .....	43
Tabela 4.	Comprimento relativo da raiz principal (%) de linhagens recombinantes F <sub>7</sub> da população Toropi x Anahuac avaliadas quanto à tolerância ao Al <sup>3+</sup> em solução nutritiva .....	43
Tabela 5.	Valores do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para as proporções observadas e esperadas entre as RILs F <sub>7</sub> de Toropi x Anahuac para o caráter tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	46
Tabela 6.	Média e desvio padrão do comprimento relativo da raiz principal (%) dos genótipos Toropi (tolerante) e BH1146 (tolerante) avaliados quanto à tolerância ao Al <sup>3+</sup> em solução nutritiva .....	47
Tabela 7.	Comprimento relativo da raiz principal (%) de linhagens recombinantes F <sub>6</sub> da população Toropi x BH1146 avaliadas quanto à tolerância ao Al <sup>3+</sup> em solução nutritiva .....	47
Tabela 8.	Valores do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para as proporções observadas e esperadas entre as RILs F <sub>6</sub> de Toropi x BH1146 para o caráter tolerância ao Al <sup>3+</sup> .....	49
Tabela 9.	Crescimento Relativo da Raiz Principal das linhagens selecionadas da população Toropi x BH1146 para todas as doses de alumínio tóxico .....	54

### CAPÍTULO III

Tabela 1.	Relação dos <i>primers</i> dos marcadores STS projetados a partir das seqüências depositadas dos marcadores RFLP <i>Xbcd1117</i> , <i>Xcdo1395</i> , <i>Xwg464</i> e <i>Xbcd1230</i> .....	65
Tabela 2.	Relação dos <i>primers</i> dos marcadores SNP projetados a partir das seqüências obtidas dos fragmentos amplificados em Toropi pelos marcadores <i>STS1117</i> , <i>STS1395</i> e <i>STS1230</i> .....	67
Tabela 3.	Combinações de <i>primers</i> Pst1/Mst1 utilizadas para amplificação seletiva seguindo o protocolo de AFLP, para mapeamento da população de linhagens recombinantes F <sub>7</sub> Toropi x Anahuac.....	71
Tabela 4.	Linhagens nulitetrassômicas de <i>Chinese Spring</i> utilizadas para o mapeamento físico dos marcadores no genoma do trigo.....	73

Tabela 5.	Análise de ligação dos marcadores SSRs e STS ao gene de tolerância ao $Al^{3+}$ através do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ).....	87
Tabela 6.	QTLs significantes: resultados da análise marcador por ponto.....	95
Tabela 7.	QTLs significantes: resultados do mapeamento por intervalo simples.....	97
Tabela 8.	QTLs significantes: resultados da análise de intervalo composto .....	100

#### CAPÍTULO IV

Tabela 1.	Clones fixados na membrana de nitrocelulose para o experimento de macroarranjo .....	118
Tabela 2.	<i>Primers</i> projetados com base nas seqüências de cDNAs diferencialmente expressas reguladas pelo alumínio tóxico em Toropi.....	118
Tabela 3.	Classificação dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo tolerante Toropi em resposta ao estresse de alumínio tóxico ( $Al^{3+}$ ) por 1 h.....	121
Tabela 3.	Continuação .....	122
Tabela 3.	Continuação .....	123
Tabela 3.	Continuação .....	124
Tabela 3.	Continuação .....	125
Tabela 4.	Classificação dos cDNAs diferencialmente expressos por Toropi em resposta ao estresse de alumínio.....	127
Tabela 4.	Continuação .....	128
Tabela 4.	Continuação .....	129
Tabela 5.	Mapeamento <i>in silico</i> das seqüências induzidas por $Al^{3+}$ em Toropi.....	131
Tabela 5.	Continuação .....	132
Tabela 5.	Continuação .....	133

## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ....

Aos meus pais por todo amor e carinho dedicados ao longo da minha vida. Por compreenderem a minha ausência em alguns momentos. E por terem insistido na minha ida à escola ainda no jardim de infância quando eu chorava desesperadamente pedindo para ficar em casa. A minha mãe, pela inúmeras vezes em que ela foi à escola para me ver e me tranquilizar de que tudo estava bem nos idos de 1983. Agradeço a eles, em especial, por terem me dado a minha irmã, que ao longo dos anos foi me ensinando o significado da palavra compartilhar! Eu amo vocês! Obrigada por todas lições de vida!

A minha amiga e orientadora Sandra Milach, por ter me aceitado em seu laboratório sabendo que nem pipetar (atividade crucial para o desenvolvimento dessa tese) eu sabia. Obrigado pela confiança e pela orientação brilhante nesse belíssimo trabalho. Acima de tudo obrigada pela amizade, pelas longas conversas nas madrugadas e por ter me permitido conviver com a tua família, que por algum tempo foi a minha família também. Mauro, Aline, Eduardo e Fernando obrigado por tornarem tão divertidos os meus dias em Passo Fundo!

Ao meu amigo e orientador Euclides Minella, o Chefe, uma grande pessoa! Uma agradável surpresa nesse doutorado. Obrigada pelas excelentes idéias, pelas discussões filosóficas, pelos ensinamentos. Acima de tudo, obrigada pela amizade, pela confiança, orientação e por ter tornado os meus dias na Embrapa tão mais agradáveis e divertidos.

Ao Márcio Voss, pequeno grande pesquisador da Embrapa Trigo, meu grande amigo. Obrigada pelo apoio logístico, principalmente pelas inúmeras vezes que trocastes as soluções nutritivas para mim e pelos lanches nos dias de implementação dos experimentos e medição de raízes. Espero que ainda encontre a sua desejada cidade para morar (23°C constantes) e me avise!

Ao Luiz Carlos Federizzi, meu co-orientador e professor no Departamento de Plantas de Lavoura. Obrigada pelas discussões, pelas idéias e por ter “segurados as pontas” quando as coisas não iam bem para o lados dos alunos da Sandra Milach.

A Carla Andréa Delatorre, pela amizade e orientação. Num primeiro momento, confesso que te olher atravessado, claro que em virtude das circunstâncias, hoje agradeço por teres voltado de Davis (CA, USA) no momento certo e por ter, em inúmeras vezes, gastado o seu tempo comigo buscando respostas para os bons e maus resultados. Obrigada mesmo, pelas horas gastas conversando sobre experiências profissionais e pessoais.

Bom agora tenho que agradecer aos amigos ou colegas de trabalho, se assim preferirem...

A Laize Fraga Espindula, menina de ouro, um achado nesse doutorado! Obrigada por tudo, pela dedicação ao trabalho, pela parceria nas análises dos géis, mas principalmente pela amizade! Realmente você me fez entender o significado da frase: “Amigos são irmãos que Deus nos permite escolher!”

Ao Emerson Limberger, grande amigo, grande parceiro, grande pessoa! Nossa nem sei como te agradecer. Para resumir tudo, muito obrigada por me permitir compartilhar de muitas horas na tua vida! Você é brilhante e admirável!. Obrigada por tudo!

A Danielle Costenaro, minha grande amiga! Companheira de vários momentos! Obrigada pelas tuas palavras nos momentos mais difíceis dessa jornada!

Ao Paulo Roberto da Silva, meu companheiro de trabalho... tudo bem, meu amigo também. Paulo obrigada pelos ensinamentos laboratoriais e pela ajuda na execução do trabalho. Meu companheiro de quatro anos de doutorado e meu amigo para o resto da vida! Valeu por tudo, mas principalmente por ter tornado tão agradável nossos intensos dias de trabalho.

Ao Fausto Borges Ferreira, meu grande amigo, por ter me auxiliado inúmeras vezes com o SAS (programa estatístico), Photoshop e outras ferramentas computacionais. Hoje meu amado noivo (desde setembro de 2007), que aos poucos foi tornando os meus dias tão mais divertidos e leves, apesar da distância.

Aos amigos de longos anos de trabalho os quais não citarei nomes para não correr o risco de esquecer de alguém! Obrigada Pessoas da minha vida pela amizade e companherismo!

A pessoas que se tornaram grande amigos, Maria Alice Weber, secretária do Departamento de Plantas de Lavoura, Sílvia Regina Centeno e Luciano Saucedo, secretários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

A Capes pela bolsa concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A EMBRAPA por ter cedido material vegetal e espaço físico para condução dos experimentos.

Obrigada.

## Tolerância ao Alumínio em Trigo: identificação e caracterização molecular de genes

Autor: Tatiana Boff

Orientador: Sandra Cristina Kothe Milach

Co-orientadores: Euclides Minella e Luiz Carlos Federizzi

### Resumo

Em trigo, os genes de tolerância ao alumínio tóxico ( $Al^{3+}$ ) tem sido identificada no cromossomo 4DL, incluindo o gene presente em BH1146, o mais estudado dos genótipos tolerantes brasileiros. Embora Toropi tenha sido identificado como um genótipo altamente tolerante ao  $Al^{3+}$ , a genética e a singularidade dessa fonte nunca tinha sido investigada. Os objetivos desse estudo foram investigar a genética da tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi e verificar se o gene é o mesmo presente em BH1146; mapear *quantitative trait loci* (QTLs) associados à tolerância ao alumínio em Toropi e investigar suas localizações no genoma de trigo e desenvolver uma biblioteca de subtração de Toropi objetivando identificar genes candidatos regulados por estresse de alumínio. Duas populações de linhagens recombinantes (recombinant inbred line – RIL), uma  $F_7$  de Toropi (tolerante) por Anahuac (sensível) e outra  $F_6$  RIL de Toropi por BH1146 foram avaliadas quanto à tolerância ao alumínio, avaliando a taxa de crescimento da raiz após tratamento com alumínio em solução hidropônica. A segregação genética indica a presença de um gene principal para tolerância ao  $Al^{3+}$ , denominado  $Alt_{Tp}$ , que difere do gene presente em BH1146.  $Alt_{Tp}$  está a 21cM do marcador microssatélite *Xgdm129*, previamente mapeado no cromossomo 4DS. Linhagens nulitetrassômicas e ditelossômicas foram utilizadas para confirmar a posição do  $Alt_{Tp}$  no braço curto do cromossomo 4D de trigo. Este é o primeiro estudo reportando a presença de um gene para tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo no cromossomo 4DS, confirmando a singularidade de Toropi como fonte de genes para essa característica. Outros QTLs foram identificados nesse estudo, incluindo um presente no cromossomo 3B de trigo que corresponde ao cromossomo 1 de arroz, onde foram identificados os maiores QTLs para a tolerância ao  $Al^{3+}$  nessa espécie. Cento e nove sequências foram obtidas pela análise de *Supression Subtractive Hybridization* (SSH), sendo 99 sequências únicas. Análises de seqüências revelaram genes envolvidos em diversas vias metabólicas incluindo metabolismo de ácidos orgânicos e carboidratos, transdução de sinais, fatores de transcrição, biossíntese de proteínas, proteínas envolvidas na aliviação de estresse oxidativo, estrutura de membrana e outras funções. É possível que  $Alt_{Tp}$  seja o gatilho para uma cascata de resposta ao estresse de  $Al^{3+}$  que envolve vias de sinalização e metabólicas complicadas. Esses genes de resposta ao estresse de trigo fornecem uma visão sobre o mecanismo de tolerância ao  $Al^{3+}$  em plantas.

## Aluminum tolerance in wheat: identification and characterization of genes

Author: Tatiana Boff

Adviser: Sandra Cristina Kothe Milach

Co-advisers: Euclides Minella e Luiz Carlos Federizzi

### Abstract

In wheat most of the of aluminum tolerance genes have been identified on chromosome 4DL, including one present in BH1146, the most studied wheat Brazilian tolerant genotype. Although Toropi has been identified as a highly tolerant genotype to  $Al^{3+}$ , the genetics and uniqueness of this source has never been investigated. The objectives of this study were to investigate the genetics of Toropi aluminum tolerance and its uniqueness compared to *Alt<sub>BH</sub>* gene present in BH1146; to map the quantitative trait loci (QTLs) associated to Toropi aluminum tolerance and investigate their genome locations in wheat; and to develop a differential library from Toropi aiming to identify candidate genes regulated by aluminum stress. Two recombinant inbred line populations (RILs), one  $F_7$  from Toropi (tolerant) by Anahuac (sensitive) and another  $F_6$  RIL from Toropi by BH1146, were screened for Al-tolerance by mensuring root growth rate following Al treatment in hidroponic solution. Genetic segregations indicated the presence of a major gene for aluminum tolerance in Toropi, named as *Alt<sub>TP</sub>*, which differs from the one present in BH1146. *Alt<sub>TP</sub>* is 21cM from *Xgdm129* SSR marker, which has been previously mapped on chromosome 4DS. Nulitetrasomic and ditelosomic lines were used to confirm *Alt<sub>TP</sub>* position on the wheat short arm of chromosome 4D. This is the first study to report a gene for aluminum tolerance in wheat on chromosome 4DS, confirming the uniqueness of Toropi as a genetic source for this trait. Other QTLs were identified in this study, including one present on wheat chromosome 3B which corresponds to rice chromosome 1, where most of aluminum tolerance QTLs have been identified in that species. One-hundred and nine sequences were obtained by the analysis of Supression Subtractive Hybridization (SSH), being 99 unique ones. Sequence analysis has revealed genes involved in several metabolic pathways including organic acid and carbohydrates metabolism, signal transduction, transcription factors, protein biosynthesis, oxidative stress alleviation, membrane structure and other functions. It is possible that *Alt<sub>TP</sub>* triggers a cascade of responses to aluminum stress, which involves complex signaling and metabolic pathways. These wheat response stress genes provide new insights about Al-tolerant mechanisms in plants.

## **CAPÍTULO I**

**Solos Ácidos, Alumínio Tóxico,  
Trigo: até onde podem conviver?  
O estado da Arte...**



## 1 Porque não somos auto-suficientes na produção de trigo?

O trigo é um cereal de inverno com centro de origem e diversidade localizado no sudoeste asiático (Hoyt, 1992). É uma espécie autógama, hexaplóide ( $2n=6x=42$ ), constituída de três diferentes genomas: A, B, D, sendo provavelmente *Triticum monococcum* o doador do genoma A, *Aegilops speltoides*, do genoma B e *Aegilops tauschii* do genoma D (Dvorak et al., 1998).

É a segunda cultura em produção de grãos, sendo superado apenas pela cultura do milho (FAO, 2006). A produção mundial foi de 626,8 milhões de toneladas em 2004, sendo os países asiáticos os líderes em produção ( $264,1 \text{ t ha}^{-1}$ ), seguidos da Europa ( $204,9 \text{ t ha}^{-1}$ ), Estados Unidos ( $82,7 \text{ t ha}^{-1}$ ) e América do Sul ( $20,0 \text{ t ha}^{-1}$ ). A Argentina é o maior produtor de trigo da América do Sul, contribuindo com 60% da produção – cerca de 12 milhões de toneladas, seguido do Brasil que produziu 4,8 milhões de toneladas em 2004 (FAO, 2006).

Apesar dos esforços das instituições brasileiras de pesquisa de trigo visando aumentar a produtividade deste cereal, grande parte do consumo interno não é suprido pela produção da triticultura brasileira. O balanço entre a oferta e a demanda deste cereal no Brasil é desfavorável, implicando na importação massiva e em um alto grau de dependência do país pelo trigo importado, principalmente vindo da Argentina (CONAB, 2005). Estima-se que, em 2005, foram gastos 854 milhões de dólares na importação de cereais, farinhas e preparados. Deste montante, 649 milhões de dólares (76%) corresponderam à importação de trigo, sendo este o primeiro produto a gerar déficit na balança comercial (MAPA, 2006).

Além de condições climáticas adversas que podem influenciar os índices de produtividade e qualidade ano a ano, como por exemplo, o excesso de chuvas na primavera, outros fatores limitam a alta produtividade interna de trigo. Entre estes salientam-se a germinação na pré-colheita ou germinação na espiga, que diminui o potencial e rendimento das lavouras por afetar negativamente o PH (peso hectolitro), reduzindo o valor comercial do grão; as doenças fúngicas, em especial a ferrugem da folha causada pelo fungo *Puccinia triticina*, que gera

instabilidade na colheita; e a toxicidade causada pelo alumínio em solos ácidos, que é a principal barreira para a expansão das fronteiras agrícolas.

## 2 Alumínio, o grande vilão ...

Os solos ácidos correspondem a aproximadamente 40% das terras aráveis do mundo (Kochian, 1995), sendo que valores baixos de pH (<5) ocorrem naturalmente em solos tropicais e vulcânicos (Snowden et al., 1995) (Figura 1). No Brasil, mais da metade do território é constituído por solos que apresentam limitações de natureza química à produção agrícola, como elevada acidez, toxicidade do alumínio e baixa disponibilidade de fósforo (Olmos & Camargo, 1976). Dentre esses fatores, a toxicidade do alumínio é reconhecida como o principal limitante para a produção agrícola em solos ácidos.

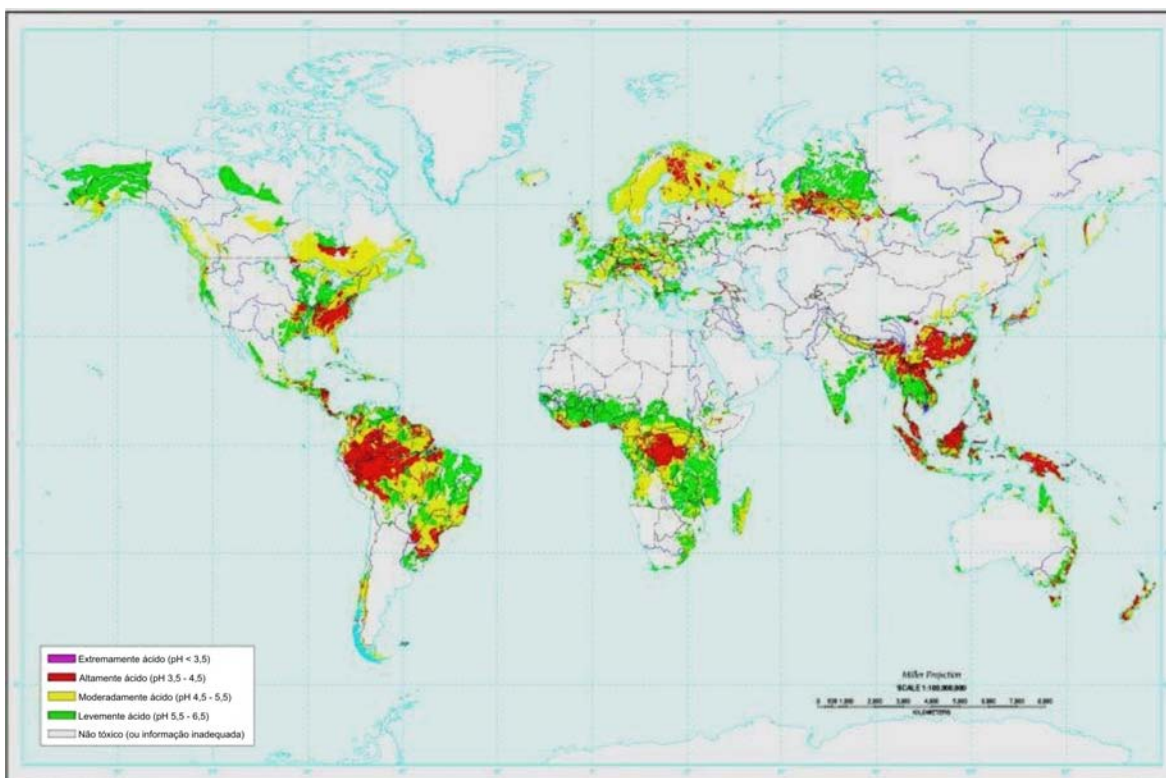


Figura 1. Distribuição global de solos ácidos. (Fonte: USDA, NRCS, World Soil Resources, Washington, D.C.).

O alumínio é o elemento químico natural mais abundante em solos ácidos (Hargrove & Thomas, 1984). Em geral, nos solos, o alumínio está presente na forma de alumino-silicatos e óxidos, sendo que, à medida que ocorre uma

diminuição do pH do solo, este solubiliza-se e adquire a forma fitotóxica de  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ , comumente referido como  $\text{Al}^{3+}$  (Delhaize & Ryan, 1995; Ma et al., 2001). No entanto, Foy (1984) considera a toxicidade do alumínio um dos fatores de estresse abiótico mais importantes, pois muitas plantas são sensíveis a concentrações micromolares deste metal.

O  $\text{Al}^{3+}$  interfere em uma série de processos fisiológicos e celulares. Segundo Kochian et al. (2005), a toxicidade do Al pode ser resultado de uma complexa interação do Al com o apoplasto (parede celular), com a membrana plasmática e com alvos simplásticos (citossol). Diversos estudos relatados na literatura buscam o entendimento da toxicidade do  $\text{Al}^{3+}$ , principalmente quanto aos processos fisiológicos afetados e o tempo de resposta das espécies. Ma et al. (2001) apontam que, enquanto algumas espécies apresentam sintomas e respostas detectáveis ao  $\text{Al}^{3+}$  dentro de alguns minutos após a exposição ao Al, outras são apenas discerníveis após longo tempo de exposição (horas ou dias).

Nos últimos dez anos grandes avanços no conhecimento a respeito da genética e dos mecanismos envolvidos na tolerância e na toxicidade do  $\text{Al}^{3+}$  em plantas foram obtidos. No entanto, como pode ser observado comparando-se as revisões descritas por Kochian (1995) e Kochian et al. (2005), ainda há muito para ser esclarecido.

### **3 Toxicidade e Tolerância, os dois lados da moeda**

As raízes são os órgãos mais sensíveis ao  $\text{Al}^{3+}$ , sendo o efeito mais imediato a inibição do crescimento, afetando a absorção e/ou translocação de nutrientes essenciais (Foy 1983). Dessa forma, a inibição do crescimento radicular após a exposição ao  $\text{Al}^{3+}$  tem sido extensivamente utilizada como indicativo da toxicidade do  $\text{Al}^{3+}$  (Foy, 1988). Contudo, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda não foram claramente elucidados, uma vez que o  $\text{Al}^{3+}$  pode interagir com múltiplos sítios tanto no simplasma como no apoplasto das células radiculares (Ma et al., 2001). Kochian et al. (2005) apontam que diversos alvos do  $\text{Al}^{3+}$  em diferentes rotas estariam associados com crescimento radicular e que haveria diversos sítios potenciais para injúria incluindo a parede celular, a

membrana plasmática, as vias de transdução de sinais, o citoesqueleto radicular e o DNA/núcleo.

Entre os diversos sítios de dano, a membrana plasmática merece considerável atenção. Devido às suas propriedades físico-químicas, o  $\text{Al}^{3+}$  pode interagir com a superfície carregada negativamente da membrana plasmática. Kochian (1995) e Kochian et al. (2005), citam os seguintes danos possivelmente causados pela interação do  $\text{Al}^{3+}$  com a membrana:

- afeta diretamente o empacotamento dos fosfolipídios e a fluidez da membrana, devido à afinidade que tem por lipídios constituintes da membrana, em especial por fosfatidilcolina;
- inibe o transporte intercelular através dos plasmodesmas, uma vez que induz a síntese e o acúmulo de calose na membrana;
- gera uma despolarização instantânea da membrana devido a interações diretas e indiretas com diferentes vias de transporte de íons;
- inibe a atividade de bombas  $\text{H}^+$ -ATPase, impedindo a formação e a manutenção do gradiente de prótons transmembrana;
- inibe a absorção de cátions como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ;
- interage diretamente com diferentes bombas e canais de proteínas;
- modula a atividade de transportadores via alterações no potencial de membrana.

Em suma, a exposição ao  $\text{Al}^{3+}$  pode gerar distúrbios no processo de absorção e transporte de íons, afetando a homeostase iônica nas células das raízes. No entanto, nem todas as espécies são sensíveis ao  $\text{Al}^{3+}$ , sendo que algumas apresentam mecanismos eficientes de tolerância, permitindo crescimento e desenvolvimento em regiões de solos ácidos.

Diversos são os mecanismos que permitem às plantas tolerar o estresse causado pelo  $\text{Al}^{3+}$ , sendo esses classificados como mecanismos internos, que detoxificam o  $\text{Al}^{3+}$  dentro do simplasma, e externos, que minimizam a absorção do  $\text{Al}^{3+}$  (Kochian, 1995). Segundo Ma et al. (2001), o entendimento da natureza destes mecanismos de tolerância tem sido foco de várias pesquisas na área de fisiologia do estresse. Várias revisões recentes sobre os mecanismos de tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  são encontradas na literatura (Ma et al., 2001; Barceló &

Poschenrieder, 2002; Ma & Furukawa, 2003; Kochian et al., 2004 e Kochian et al., 2005).

Dentre os mecanismos externos de tolerância ao  $Al^{3+}$  propostos, citam-se a exudação de ácidos orgânicos e compostos fenólicos e rizodeposições. Muitas evidências apontam para o papel central dos ácidos orgânicos na detoxificação do  $Al^{3+}$  (Ma et al., 2001).

#### **4 Ácidos Orgânicos, compostos multivalentes**

Ácidos orgânicos são compostos de baixo peso molecular, com no mínimo um grupo carboxil, tais como citrato, malato, fumarato, oxalacetato e malonato. Muitos deles estão presentes em todas as células vivas como intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), a principal via respiratória envolvida na oxidação do piruvato.

Os ácidos orgânicos estão diretamente envolvidos em muitos processos metabólicos, incluindo assimilação de carbono e nitrogênio, regulação do pH citosólico e do potencial osmótico, e manutenção do balanço das cargas durante excesso de absorção de cátions (Ryan et al., 2001; Mariano et al., 2005).

Devido ao papel central que exercem dentro do metabolismo celular, sua síntese e concentrações tendem a ser precisamente reguladas. Alterações na atividade das enzimas relacionadas à biossíntese ou degradação dos ácidos orgânicos podem levar ao acúmulo destes no citoplasma.

Sugere-se que o ciclo do ácido cítrico em plantas seja regulado pelo turnover de enzimas, pelo transporte de metabólitos, pela razão ADP:ATP e também pelo pH (Nelson & Cox, 2004). Várias enzimas são substancialmente afetadas pelos níveis de AMP, ADP e ATP presentes, entre elas a citrato sintase e a 2-oxoglutarato desidrogenase. A enzima succinato desidrogenase é inibida competitivamente pelo malonato, um homólogo do succinato, constituindo um possível ponto de controle do ciclo, uma vez que malonil CoA é um constituinte celular comum, requerido por exemplo para biossíntese de ácidos graxos (Brownleader et al. 1997). A Figura 2 apresenta esquematicamente o ciclo do ácido cítrico.

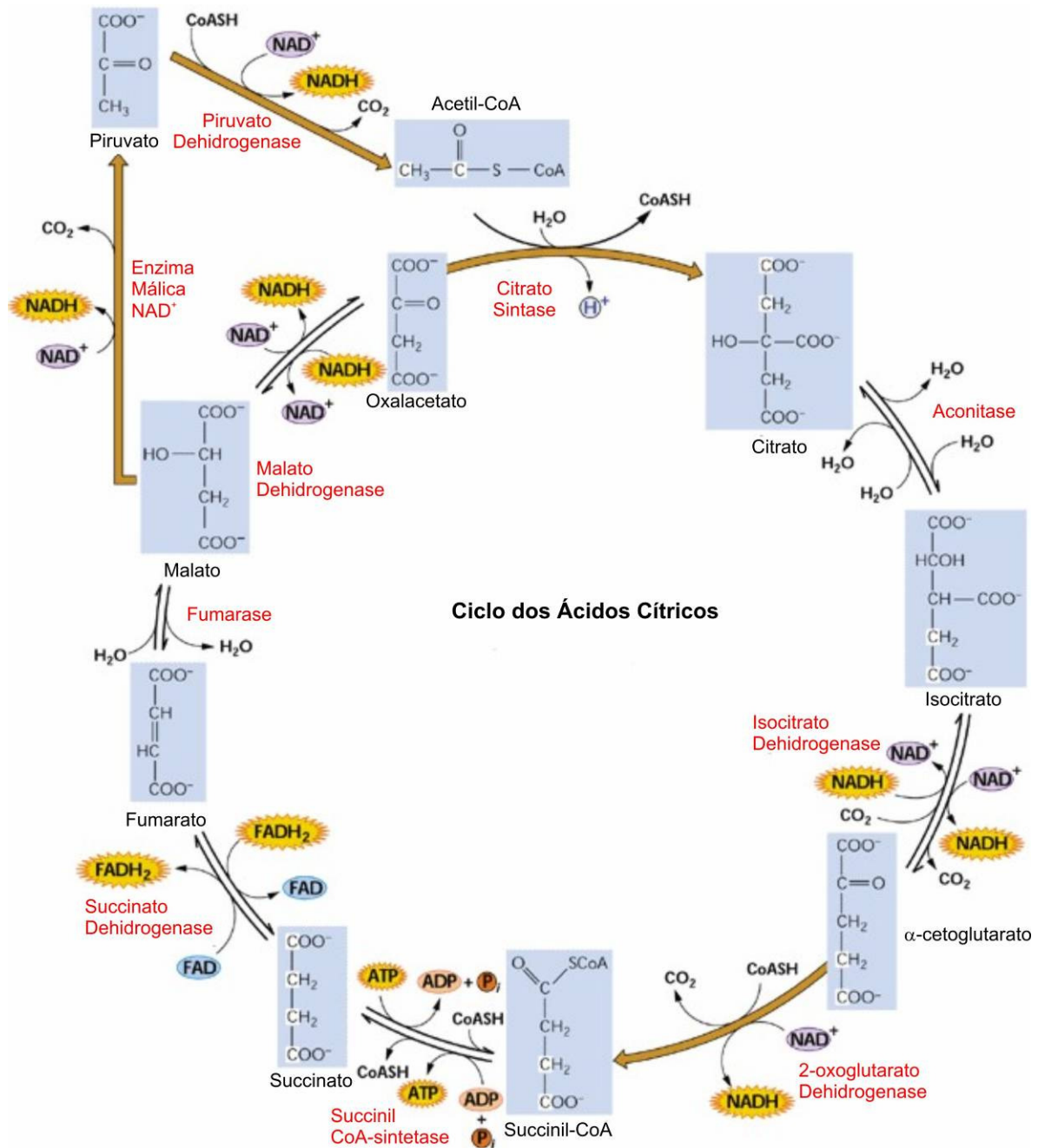


Figura 2. Ciclo do ácido cítrico. (Buchanan et al., 2000).

A exudação de ácidos orgânicos como um mecanismo de tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  é um processo muito bem caracterizado em diversas espécies e tem sido indicado como um mecanismo importante em trigo (Delhaize et al., 1993a, 1993b; Ryan et al., 1995a, 1995b).

Ma et al. (2001) sugerem a existência de dois padrões de secreção de ácidos orgânicos em resposta ao  $\text{Al}^{3+}$ . No padrão I, ocorre liberação de ácidos orgânicos simultaneamente à exposição ao  $\text{Al}^{3+}$ . Em trigo, por exemplo, Delhaize

et al. (1993) detectaram secreção de malato entre 15 e 30 minutos após a exposição ao  $Al^{3+}$ . A rapidez da resposta encontrada para o padrão I, sugere que o  $Al^{3+}$  ative um mecanismo pré-existente e que a indução de novas proteínas não seja requerida. Desta forma, o  $Al^{3+}$  poderia simplesmente ativar um transportador de membrana plasmática para iniciar o efluxo de ácidos orgânicos (Ma et al., 2001).

No padrão II, a secreção de ácidos orgânicos ocorre somente várias horas após a exposição ao  $Al^{3+}$ . Esta resposta é estimulada pela interação do  $Al^{3+}$  com a célula, via receptores protéicos da membrana, para ativar a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas com o próprio metabolismo dos ácidos orgânicos ou com seus transportadores de membrana plasmática. O atraso na resposta pode ser um indício de que a síntese protéica é requerida (Ma et al., 2001).

Recentemente, Sasaki et al. (2004) comprovaram a hipótese da existência de um mecanismo constitutivo para explicar o padrão de secreção do tipo I. Esse autores clonaram o gene *ALMT1* (aluminum-activated malate transporter) que codifica uma proteína de membrana, constitutivamente expressa em ápices de raízes de trigo, capaz de conferir tolerância às plantas pela exudação de malato induzida pelo  $Al^{3+}$ . Delhaize et al. (2004) sugerem ser este gene um forte candidato a conferir tolerância ao  $Al^{3+}$ , uma vez que cevada transgênica expressando esse gene apresentou alto nível de tolerância tanto em hidroponia quanto em solos ácidos. Salienta-se que a cevada é a espécie mais sensível entre os cereais.

A Tabela 1 apresenta a relação de algumas culturas de importância econômica, o tipo de ácido orgânico liberado na presença de  $Al^{3+}$  e o padrão de secreção sugerido.

Mecanismos internos de tolerância ao  $Al^{3+}$  envolvem a complexação e a detoxificação do alumínio após sua entrada no citoplasma, reduzindo efetivamente a atividade do  $Al^{3+}$  no citosol e prevenindo sua ligação com componentes celulares sensíveis (Ma et al., 2001). Esse processo é bem caracterizado para *Hydrangea macrophylla* (Ma et al., 1997), *Fagopyrum esculentum* (Ma et al., 1998) e *Melastoma malabathricum* (Watanabe et al., 2000).

Tabela 1. Espécies de plantas cuja exudação de ácidos orgânicos está correlacionada com a tolerância ao alumínio (Adaptado de Ma & Furukawa, 2003)

Cultura	Ácido Orgânico	Padrão de Secreção	Referência
Arroz	citrato	-	Ishikawa et al., 2000
Aveia	citrato	-	Zheng et al., 1998
Centeio	citrato / malato	II	Li et al., 2000
Cevada	citrato	I e II	Zhao et al., 2003
Milho	malato, citrato, oxalato	-	Pellet et al., 1995, Kollmeier et al., 2001
Soja	citrato	II	Yang et al., 2000
Trigo	malato	I	Delhaize et al., 1993, Ryan et al., 1995
Triticale	citrato, malato	II	Ma et al., 2000

Aumentar a capacidade de tolerar o  $Al^{3+}$  ou incorporar essa característica em espécies sensíveis tem sido o objetivo de melhoristas de plantas em todo mundo, visando o aumento da produção em solos ácidos. Para tanto, torna-se fundamental conhecer a base genética desse caráter para se delinear eficientemente estratégias que permitam chegar ao objetivo no menor tempo possível. Nesse sentido, o foco dos melhoristas tem sido direcionado para espécies economicamente importantes de gramíneas como trigo, arroz, milho, cevada e centeio.

## **5 Um, dois ou vários genes... afinal quantos genes governam esse caráter? Estudos de herança genética e mapeamento molecular**

Estudar a herança genética de um determinado caráter é o passo inicial em qualquer programa de melhoramento. Segundo Federizzi et al. (1999), o conhecimento de como os caracteres são transmitidos é fundamental para a adoção de estratégias adequadas para o desenvolvimento de variedades superiores. Para caracteres qualitativos, como estatura de planta e tolerância ao  $Al^{3+}$ , um único gene tem grande efeito no fenótipo e a substituição desse por outro pode modificar drasticamente o desempenho da planta. Já para caracteres quantitativos, como rendimento e peso de grãos, muitos genes têm pequeno



efeito no fenótipo e a substituição de um gene por outro não reflete mudanças mensuráveis no caráter.

No caso da tolerância ao  $Al^{3+}$  para trigo, cevada, centeio e tritcale a herança é considerada simples, sendo atribuída a um ou poucos genes. Já para arroz e milho, a herança é considerada complexa, de natureza quantitativa. Nessa revisão será dado enfoque aos cereais de inverno.

Na cevada (*Hordeum vulgare* L.) sugere-se que a característica seja monogênica, sendo a variação entre os cultivares devida à ação de vários alelos (Minella & Sorrells, 1992). Minella & Sorrells (1997) localizaram o gene *Alp* no cromossomo 4H, do cultivar Dayton, através da análise de trissômicos. Tang et al. (2000) identificaram marcadores RFLP (*Random Fragment Length Polymorphism*) ligados ao gene de tolerância ao  $Al^{3+}$  (*Alp*), em populações derivadas do cruzamento entre os cultivares Dayton (tolerante) e Harlan (sensível). Os autores mapearam um gene de tolerância no braço longo do cromossomo 4H localizado a 2,1cM do marcador *Xbcd1117* e a 2,1cM do lado oposto dos marcadores *Xwg464* e *Xcdo1395*. O marcador *Xbcd1230* ficou a 33cM deste gene em cevada (Figura 3).

Para o centeio (*Secale cereale* L), considerada a espécie mais tolerante ao  $Al^{3+}$  entre os cereais, foi sugerida a existência de, no mínimo, três genes, os quais foram localizados nos cromossomos 6RS (*Alt1*), 3RL (*Alt2*) e 4RL (*Alt3*) (Aniol & Gustafson, 1984; Gallego & Benito, 1997; Gallego et al., 1998). Miftahudin et al. (2002), estudando linhagens recombinantes  $F_6$ , mapearam três marcadores AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) associados com o gene *Alt3* em centeio, denominados pelos autores como *AMAL1* a *AMAL5*. Os marcadores *AMAL1* e *AMAL4* estão a 0.4 cM do gene; já o marcador *AMAL5* foi localizado a 0.7cM de distância do outro lado do gene *Alt3*. O marcador *Xbcd1230* apresentou-se associado ao gene *Alt3*, tendo co-segregado com o mesmo (Figura 3). Miftahudin et al. (2004) desenvolveram dois marcadores STS (*Sequence Tagged Sites*), *B1* e *B4*, que flanqueiam o gene *Alt3* a uma distância de 0.4 cM do gene *Alt3* (Figura 3). Um novo gene para tolerância ao  $Al^{3+}$ , *Alt4*, em centeio foi localizado no cromossomo 7RS, no cultivar Ailés, estando o marcador *SCIM811*<sub>1376</sub> ligado ao gene *Alt4* (Matos et al., 2005).

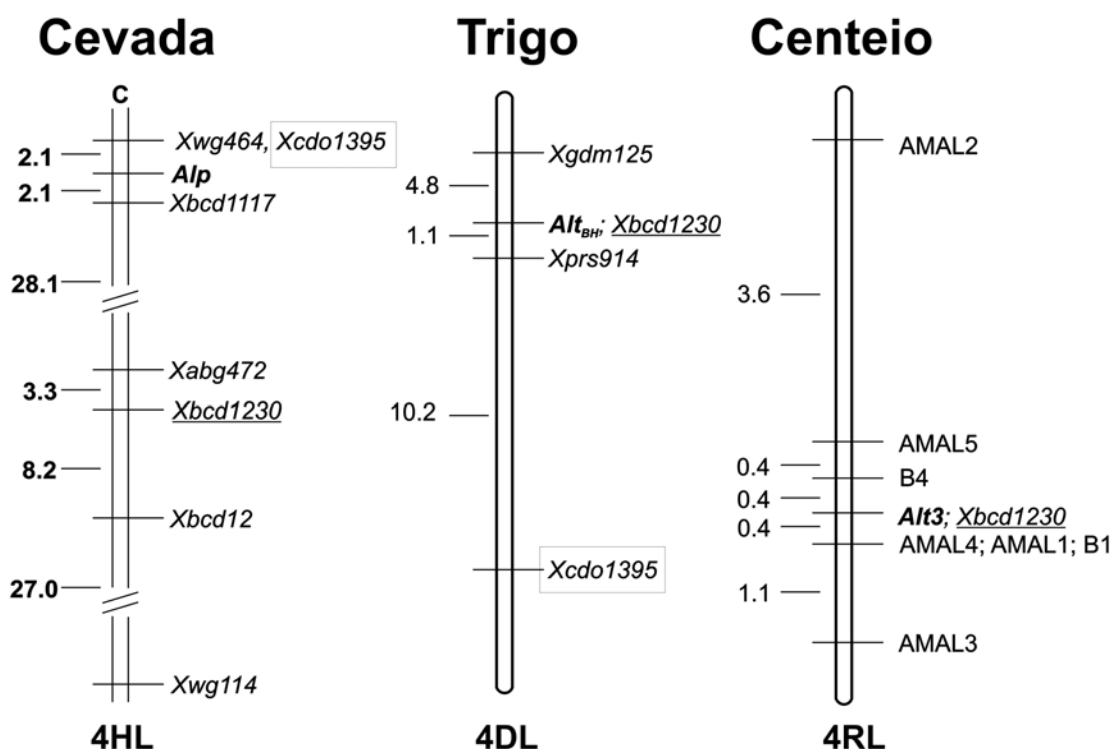


Figura 3. Mapas comparativos das regiões contendo genes de tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo, cevada e centeio (modificado de Miftahudin et al., 2004).

Em aveia (*Avena sativa* L.) as evidências apontam para existência de um ou dois genes envolvidos na tolerância. Sanches-Chacón et al. (2000) sugerem que a tolerância seja conferida por um gene, com ação gênica de dominância. Já Wagner et al. (2001) obtiveram resultados que indicam a presença de um a dois genes dominantes envolvidos na tolerância ao  $Al^{3+}$ . Oliveira et al. (2005) sugerem que o caráter seja governado por um gene com alelos múltiplos, com ação gênica de aditividade. Nava et al. (2006) confirmam essa teoria, sugerindo que a tolerância ao  $Al^{3+}$  seja conferida pela presença de um gene de grande efeito, sendo que os genótipos tolerantes possuem os alelos  $Al_aAl_a$  e os genótipos sensíveis os alelos  $al_aal_a$ . Em *A. strigosa* foram identificados quatro QTL's (*Quantitative Trait Loci*) associados à tolerância ao  $Al^{3+}$ , que juntos explicam 55% da variação fenotípica (Wight et al., 2006).

A herança da tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo tem sido extensivamente relatada. Herança monogênica com ação de dominância foi sugerida para alguns cultivares, enquanto que para outros foi identificado controle multigênico

(Campbell & Lafever, 1981; Aniol, 1984; Camargo, 1984; Somers & Gustafson, 1995; Somers et al., 1996; Riede & Anderson, 1996).

Aniol & Gustafson (1984) estudando linhagens ditelossômicas de trigo, apontam a existência de várias regiões do genoma que podem ter genes de tolerância ao  $Al^{3+}$ , estando localizadas nos cromossomos 5AS, 6AL, 7AS, 2DL, 3DL e 4DL. Essa hipótese também foi levantada por Papernik et al. (2001) estudando a tolerância ao  $Al^{3+}$  em *Chinese Spring*, que localizaram regiões nos cromossomos 5AS, 7AS e 4DL de pequeno efeito na tolerância.

Segundo Kerridge & Kronstad (1968), a tolerância ao  $Al^{3+}$  apresentada pelo cultivar de trigo Atlas 66 é devida à ação de um gene recessivo localizado no cromossomo 5D de trigo. No entanto, vários estudos têm identificado a localização do gene de tolerância ao  $Al^{3+}$  no braço longo do cromossomo 4D. No cultivar BH1146, o gene é denominado *Alt<sub>BH</sub>*, enquanto que para o cultivar “Chinese Spring” ele é chamado de *Alt2*.

Lagos et al. (1991) foram pioneiros no estudo da localização do gene que confere tolerância ao  $Al^{3+}$  em BH1146, identificando o gene no cromossomo 4D através da análise genética de monossômicos.

Luo & Dvorak (1996) analisando linhagens com substituições dissômicas em *Chinese Spring* identificaram um gene, *Alt2*, localizado no braço longo do cromossomo 4D. Ainda realizaram mapeamento por marcadores RFLP, estando o gene localizado num intervalo de 4cM flaqueado pelos marcadores *Xpsr914* e *Xpsr1051*.

Riede & Anderson (1996) mapearam o gene *Alt<sub>BH</sub>* no braço longo do cromossomo 4D de BH1146, sendo que nesse estudo foi identificado um marcador RFLP (*Xbcd1230*) localizado a 1.1 cM do gene, que explicou 85% da variação fenotípica para o caráter. Um segundo marcador, *Xcdo1395*, foi localizado a 10.2 cM do gene (Figura 3).

Rodriguez-Milla & Gustafson (2001) avaliaram 91 linhagens recombinantes derivadas do cruzamento entre os genótipos BH1146 e Anahuac e localizaram o gene *Alt<sub>BH</sub>* no intervalo de 5.9 cM entre os marcadores *Xgdm125* e *Xpsr914*, sendo que *Xbcd1230* co-segregou com o gene (Figura 3).

Recentemente, Raman et al. (2005) mapearam o gene *ALTM1* no cromossomo 4DL utilizando linhagens de deleção *Chinese Spring*. Ma et al. (2005) realizaram análises de QTL baseado em marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) utilizando o cultivar Atlas 66. Esses autores identificaram um QTL na região distal do cromossomo 4DL, que explicou cerca de 50% da variação fenotípica para tolerância ao  $Al^{3+}$ , sendo flanqueado pelos marcadores *Xgdm125* e *Xwmc331*. A Tabela 2 apresenta um resumo de genes já identificados e caracterizados para as principais espécies de cereais adaptados à estação fria.

Tabela 2. Relação dos genes e regiões cromossômicas identificados como relacionados à tolerância ao alumínio tóxico nos cereais de estação fria

Cultura	Gene ou QTL's	Localização Cromossômica	Referência
Aveia preta	4 Qtls	?	Wight et al., 2006
Aveia branca	1	?	Oliveira et al., 2005; Nava et al., 2006
Centeio	<i>Alt1</i>	6R	Aniol & Gustafson, 1984
Centeio	<i>Alt2</i>	3RL	Aniol & Gustafson, 1984
Centeio	<i>Alt3</i>	4RL	Aniol & Gustafson, 1984
Centeio	<i>Alt4</i>	7RS	Matos et al., 2005
Cevada	<i>Alp</i>	4HL	Minella & Sorrells, 1997
Trigo	?	5D	Kerridge & Kronstad, 1968
Trigo	?	5AS, 6AL, 7AS, 2DL, 3DL e 4DL	Aniol & Gustafson, 1984
Trigo	?	4D	Lagos et al., 1991
Trigo	<i>Alt<sub>BH</sub></i>	4DL	Riede & Anderson, 1996
Trigo	<i>Alt2</i>	4D	Luo & Dvorak, 1996
Trigo	?	5AS, 7AS e 4DL	Papernik et al., 2001
Trigo	<i>ALMT1</i>	4DL	Raman et al., 2005
Triticale	?	3R	Ma et al., 2000

A correta localização de genes de tolerância ao  $Al^{3+}$  bem como a identificação de marcadores moleculares ligados e/ou associados a estes são importantes para programas de melhoramento, seja para sua transferência por métodos clássicos de melhoramento ou por transgenia. Marcadores moleculares são importantes ferramentas nesse caso por permitir o monitoramento da

transferência destes genes para cultivares elites que apresentam sensibilidade ao  $Al^{3+}$  (Riede & Anderson, 1996).

Além disto, Tang et al. (2000) sugerem a utilização desses marcadores como uma ferramenta básica, em estudos de mapeamento comparativo, para responder questões relacionadas a ortologia de locos de tolerância ao  $Al^{3+}$  encontrados em espécies diferentes. Observa-se que os genes de tolerância estão localizados no braço longo do cromossomo 4 e intimamente associados ao marcador obtido com a sonda *Xbcd1230* em trigo e centeio e, em posição inversa, no cromossomo de cevada (Figura 3). Esta associação de *Xbcd1230* com os genes *Alt<sub>BH</sub>*, *Alt3* e *Alp*, reforça a idéia, segundo Tang et al. (2000) e Miftahudin et al. (2002), de que estes genes são locos ortólogos, devido ao alto nível de sintonia entre os braços dos cromossomos 4RL, 4DL e 4HL.

## **6 A caixa preta da tolerância ao alumínio tóxico: quais são os genes chaves?**

Embora vários genes associados à tolerância ao  $Al^{3+}$  já tenham sido identificados, os seus produtos gênicos ainda não são conhecidos, à exceção do gene *ALMT1* e *AtALMT1* (*Arabidopsis thaliana* aluminum malate transporter) (Hoekenga et al., 2006). Nesse sentido, o desafio torna-se descobrir que produtos gênicos são codificados por esses genes, quais são ativados ou reprimidos na presença do  $Al^{3+}$ , quais são as rotas e processos metabólicos que levam à tolerância ao  $Al^{3+}$ .

Vários trabalhos já foram realizados buscando identificar genes induzidos pelo  $Al^{3+}$ . Drummond et al. (2001) realizando a prospecção de genes de cana-de-açúcar em resposta ao alumínio, apresentam uma revisão de grande parte dos genes envolvidos na tolerância em outras espécies. Os autores realizaram uma classificação dos genes de acordo com o processo metabólico em que estariam envolvidos, os quais seriam: metabolismo de ácidos orgânicos; estresse oxidativo; defesa contra patógenos; componentes de parede celular; transdução de sinais; além de outros sem função conhecida. Embora se reconheça o papel central dos ácidos orgânicos na tolerância ao  $Al^{3+}$ , poucos genes envolvidos na rota de biossíntese destes foram isolados em estudos de expressão diferencial. Xiao et

al. (2005) sugerem que não exista uma indução ou regulação de genes envolvidos na síntese de ácidos orgânicos, mas sim uma ativação de genes relacionados aos transportadores. A Tabela 3 apresenta a relação de alguns genes já identificados em resposta ao alumínio em diversas espécies vegetais.

Tabela 3. Genes regulados por alumínio tóxico descritos na literatura. Modificado de Rodriguez-Milla et al. (2002)

Gene	Planta	Possível Proteína	Referência
<i>pEARL18</i>	Arabidopsis	Transdutor de resposta fototrópica	Richards et al. (1998)
<i>pEARL11</i>	Arabidopsis	Proteína hidrofóbica rica em prolina	Richards et al. (1998)
<i>pEARL12</i>	Arabidopsis	Desconhecida	Richards et al. (1998)
<i>ALD</i>	Arabidopsis	Aldolase cloroplastidial	Richards et al. (1998)
<i>pEARL14</i>	Arabidopsis	Proteína hidrofílica rica em prolina	Richards et al. (1998)
<i>pEARL15</i>	Arabidopsis	S-reticulina oxidase	Richards et al. (1998)
<i>BCB</i>	Arabidopsis	Proteína <i>blue copper-binding</i>	Richards et al. (1998)
<i>PER</i>	Arabidopsis	Peroxidase	Richards et al. (1998)
<i>ALA</i>	Arabidopsis	Alanina aminotransferase	Richards et al. (1998)
<i>CAB</i>	Arabidopsis	Proteína ligadora de clorofila <i>a</i> e <i>b</i>	Richards et al. (1998)
<i>CZSOD</i>	Arabidopsis	Superóxido dismutase Cu/Zn	Richards et al. (1998)
<i>CAT X</i>	Arabidopsis	Catalase	Richards et al. (1998)
<i>F14D16.13</i>	Arabidopsis	Possível oxalato oxidase	Hoekenga et al. (2003)
<i>F14D16.17</i>	Arabidopsis	Proteína similar ao PSUVII	Hoekenga et al. (2003)
<i>F5M15.22</i>	Arabidopsis	<i>cor47</i>	Hoekenga et al. (2003)
<i>T27G7.20</i>	Arabidopsis	Possível oleoil-(ACP) hidrolase	Hoekenga et al. (2003)
<i>F24B9.2</i>	Arabidopsis	L-ascorbato peroxidase	Hoekenga et al. (2003)
<i>MLN1.10</i>	Arabidopsis	<i>hox7</i>	Hoekenga et al. (2003)
<i>MFC16.10</i>	Arabidopsis	S-reticulina oxidase	Hoekenga et al. (2003)
<i>MPL12.21</i>	Arabidopsis	Desconhecida com assinatura fosfatase	Hoekenga et al. (2003)
<i>K10A8.120</i>	Arabidopsis	Desconhecida com assinatura P loop	Hoekenga et al. (2003)
<i>MNJ7.15</i>	Arabidopsis	Co-transportador sódio-dicarboxilato	Hoekenga et al. (2003)
<i>ALS3</i>	Arabidopsis	Transportador tipo ABC	Larsen et al. (2005)
<i>AtALMT1</i>	Arabidopsis	Transportador de malato ativado por Al	Hoekenga et al. (2006)
<i>RicMT</i>	Arroz	Metalotioneína classe II	Yu et al. (1998)
<i>OsAR11</i>	Arroz	UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase	Mao et al. (2004)
<i>OsAR12</i>	Arroz	O-deacetilbaccatina III-10-O-acetil transferase	Mao et al. (2004)
<i>OsAR13</i>	Arroz	Quinona oxidoreductase	Mao et al. (2004)
<i>OsAR14</i>	Arroz	Inibidor de proteinase	Mao et al. (2004)
<i>OsAR15</i>	Arroz	Fator de alongação EF-2	Mao et al. (2004)
<i>OsAR16</i>	Arroz	SUMO-1	Mao et al. (2004)
<i>OsAR17</i>	Arroz	Proteína tipo MCT-1	Mao et al. (2004)
<i>OsAR18</i>	Arroz	Proteína de arroz tipo KN1	Mao et al. (2004)
<i>OsAR19</i>	Arroz	Possível retroelemento pol	Mao et al. (2004)
<i>OsAR20</i>	Arroz	Histona H4	Mao et al. (2004)
<i>U17AL08</i>	Aveia	fator de ribosilação-ADP	Limberger (2006)
<i>U17AL07</i>	Aveia	receptor quinase	Limberger (2006)
<i>U17AL04</i>	Aveia	Receptor quinase	Limberger (2006)
<i>U17AL09</i>	Aveia	Receptor quinase	Limberger (2006)
<i>Sad A</i>	Ervilha	Álcool desidrogenase (cadeia curta)	Brosché & Strid (1999)
<i>PU1</i>	Ervilha	Poliubiquitina	Brosché & Strid (1999)
<i>Chs</i>	Ervilha	Chalcona sintase	Brosché & Strid (1999)
<i>Psdrr230</i>	Ervilha	Proteína de resistência à doença	Sävenstrand et al. (2000)

Tabela 3. Continuação ...

Gene	Planta	Possível Proteína	Referência
<i>PsLRRP</i>	Ervilha	Proteína rica em repetições leucina	Sävenstrand et al. (2000)
<i>PsExt</i>	Ervilha	Extensina	Sävenstrand et al. (2000)
<i>PAL111</i>	Fumo	Proteína regulada por auxina	Ezaki et al. (1995)
<i>PAL142</i>	Fumo	Glutaciona S-transferase	Ezaki et al. (1995)
<i>PAL139</i>	Fumo	Proteína rica em cisteína	Ezaki et al. (1995)
<i>PAL141</i>	Fumo	Desconhecida	Ezaki et al. (1995)
<i>PAL 201</i>	Fumo	Peroxidase aniônica	Ezaki et al. (1995)
<i>GDI 3</i>	Fumo	Inibidor de dissociação-GDP	Ezaki et al. (1995)
<i>GST</i>	Milho	Glutaciona S-transferase	Caçado et al. (2005)
<i>Sali3-2</i>	Soja	Auxina <i>down-regulated</i> ADR6	Ragland & Soliman (1997)
<i>Sali5-4a</i>	Soja	Auxina <i>down-regulated</i> ADR6	Ragland & Soliman (1997)
<i>Wali 1</i>	Trigo	Metalotioneína classel	Snowden & Gardner (1993)
<i>Wali 2</i>	Trigo	Proteína rica em cisteína	Snowden & Gardner (1993)
<i>Wali3</i>	Trigo	Inibidor de proteinase	Snowden & Gardner (1993)
<i>Wali 4</i>	Trigo	Fenilalanina amônia liase	Snowden & Gardner (1993)
<i>Wali 5</i>	Trigo	Inibidor de proteinase	Snowden & Gardner (1993)
<i>Wali 6</i>	Trigo	Inibidor de proteinase	Richards et al. (1994)
<i>Wali 7</i>	Trigo	Desconhecida	Richards et al. (1994)
<i>Shh</i>	Trigo	S-adenosil-L-homo-Cis hidrolase	Richards & Gardner (1994)
<i>H3</i>	Trigo	Histona H3	Richards & Gardner (1994)
<i>H4</i>	Trigo	Histona H4	Richards & Gardner (1994)
<i>Hsp7</i>	Trigo	Proteína <i>heat shock</i> 70	Richards & Gardner (1994)
<i>Glc1</i>	Trigo	$\beta$ -1,3-Glucanase	Cruz-Ortega et al. (1997)
<i>Wfim1</i>	Trigo	Proteína fimbrina do citoesqueleto	Cruz-Ortega et al. (1997)
<i>War 5.2</i>	Trigo	Cis proteinase	Hamel et al. (1998)
<i>War 13.2</i>	Trigo	Oxalato oxidase	Hamel et al. (1998)
<i>VATPase</i>	Trigo	ATPase vacuolar	Hamilton et al. (2001)
<i>R<sub>5</sub>P<sub>3</sub>E</i>	Trigo	Ribulose-5-fosfato-3-epimerase	Rodriguez-Milla & Gustafson (2001)
<i>ALMT1</i>	Trigo	Transportador de malato ativado por Al	Sasaki et al. (2004)
	Trigo	Cluster de gene regulado por ABA	Xiao et al. (2005)
<i>CDPK1</i>	Trigo	Proteína quinase dependente de Ca <sup>2+</sup>	Xiao et al. (2005)
<i>MOJ9.27</i>	Trigo	Proteína fosfatase serine/treonine	Xiao et al. (2005)
<i>At5g18500</i>	Trigo	Proteína quinase family	Xiao et al. (2005)
<i>Asr1</i>	Trigo	Proteína induzida por ABA e estresses	Xiao et al. (2005)
<i>Ces-2</i>	Trigo	Celulose sintase 2	Xiao et al. (2005)
<i>IVR3</i>	Trigo	Invertase da parede celular	Xiao et al. (2005)
	Trigo	Proteína rica em prolina	Xiao et al. (2005)
<i>SOD-3</i>	Trigo	Manganês superóxido dismutase	Xiao et al. (2005)

No caso de trigo, vários genes já foram identificados como induzidos pelo Al<sup>3+</sup>, principalmente genes envolvidos em cascata de transdução de sinais como genes codificando proteína quinase dependente de Ca<sup>2+</sup> e proteína fosfatase serine/treonine. No entanto, o gene mais importante descoberto até o momento foi o *ALMT1* (Sasaki et al., 2004) o qual já teve seu homólogo, *AtALMT1*, clonado em arabidopsis (Hoekenga et al., 2006). Esses dois genes são essenciais para a tolerância ao Al<sup>3+</sup> em trigo e em arabidopsis.

A identificação de genes responsivos ao  $Al^{3+}$  é importante para a engenharia genética, pois possibilita aumentar a tolerância em espécies sensíveis e, principalmente em cultivares elites, através da superexpressão de genes endógenos ou pela expressão de genes exógenos. Tolerância ao  $Al^{3+}$  foi alcançada em canola, fumo e arabidopsis através da superexpressão de genes que codificam as enzimas citrato sintase ou malato desidrogenase, derivados de plantas ou bactérias, que aumentam a biossíntese de ácidos orgânicos. Em outros casos, a superexpressão de genes induzidos por alumínio, como por exemplo, o gene glutationa-S-transferase (*parB*) e peroxidase (*NtPox*) de fumo também aumentaram a tolerância (Ezaki et al., 2000). A superexpressão do gene *ALMT1* em cevada foi capaz de induzir a tolerância nessa espécie tanto em solução hidropônica quanto em testes a campo (Delhaize et al., 2004). Já em arroz, a superexpressão desse gene não aumentou os níveis de tolerância embora a exudação de malato tenha sido aumentada (Sasaki et al, 2004), provavelmente pelos altos níveis de tolerância endógena da espécie.

A introgressão de genes como *ALMT1* e de outros que possam conferir e/ou aumentar a tolerância em culturas sensíveis, seja através de cruzamentos dirigidos ou transgenia, é uma estratégia importante a ser considerada para aumentar a produtividade em solos ácidos. A descoberta de genótipos que possam ser utilizados como novas fontes de genes é igualmente importante.

## **7 Genótipos brasileiros, reservatórios de genes para tolerância ao $Al^{3+}$**

Garvin & Carver (2003) sugerem que a maior fonte de genes para tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo sejam os genótipos brasileiros. Dentre os vários genótipos brasileiros destacam-se Frondoso, por ser a fonte de genes para Atlas 66, e BH1146. As principais descobertas a respeito desse caráter, como a localização do gene no cromossomo 4DL e a identificação do gene *ALMT1* foram feitas utilizando Atlas66 e BH1146. No entanto, estudos realizados no Centro Nacional de Pesquisa em Trigo (EMBRAPA) visando classificar genótipos quanto à tolerância ao  $Al^{3+}$  identificaram outros materiais interessantes (Voss, comunicação pessoal). Nessa avaliação, um material em especial, o cultivar



Toropi, apresentava um comportamento diferenciado, mantendo o crescimento radicular à medida que se aumentavam as doses de alumínio, podendo representar uma outra fonte de genes.

Toropi é um cultivar antigo cultivado no RS, cujas principais características são adaptação a solos ácidos e pobres, ciclo longo e resistência de planta adulta às principais raças causadoras de ferrugem da folha. Por sua adaptação a solos ácidos, Toropi possivelmente é uma fonte adicional de tolerância ao alumínio em trigo. A identificação e a caracterização de genes responsáveis por esse caráter e o entendimento das relações genéticas entre a tolerância de Toropi e as demais fontes, permitirá o uso adequado das mesmas no melhoramento para tolerância ao alumínio em trigo.

Com base no conhecimento acumulado ao longo dos anos a respeito da tolerância ao alumínio em cereais, em especial em trigo, as seguintes premissas científicas nortearam o presente estudo, quais sejam:

- 1- entre as fontes de genes para tolerância ao alumínio em trigo, provindos de materiais genéticos brasileiros, constitui-se Toropi como uma fonte diferente daquelas já caracterizadas geneticamente nesta espécie, em especial a presente em BH1146;
- 2- marcadores moleculares identificados como associados à tolerância ao alumínio tóxico em Toropi podem auxiliar na caracterização genética e molecular desse caráter em trigo, bem como no mapeamento comparativo com outras fontes de tolerância nessa e em outras espécies de cereais;
- 3- uma vez elucidados, os mecanismos moleculares de tolerância ao alumínio em Toropi auxiliarão no entendimento dos processos envolvidos na expressão desse caráter em trigo.

Os objetivos desse trabalho foram:

- estimar o número de gene(s) envolvidos na tolerância ao alumínio tóxico em Toropi (Capítulo II);
- identificar marcadores moleculares associados ao(s) gene(s) de tolerância ao alumínio em Toropi (Capítulo III);

- localizar o(s) gene(s) de tolerância ao alumínio tóxico em Toropi no genoma do trigo e utilizar essa informação no mapeamento comparativo com outras fontes já mapeadas nessa e em outras espécies de cereais (Capítulo III);
- contribuir para a elucidação das relações genéticas entre os diferentes genes de tolerância ao alumínio tóxico em cereais (Capítulo III);
- identificar e caracterizar genes de trigo diferencialmente expressos na presença do alumínio em Toropi (Capítulo IV);
- identificar os mecanismos molecular-fisiológicos envolvidos na tolerância ao alumínio tóxico em Toropi (Capítulo IV).

## **CAPÍTULO II**

**Investigando as bases genéticas da tolerância ao alumínio tóxico em Toropi**

**Tatiana Boff, Sandra C. K. Milach, Euclides Minella,  
Laize F. Espindula, Márcio Voss, Luiz Carlos Federizzi**

## 1 Introdução

Os solos brasileiros apresentam em sua grande maioria alta acidez e níveis de alumínio elevados, o que leva à toxidez e baixa disponibilidade de fósforo, exigindo grandes investimentos com corretivos e fertilizantes para obtenção e estabilização de altos rendimentos nas principais culturas de importância econômica.

Níveis de alumínio que apresentam toxidez para as plantas representam a principal restrição para o crescimento e a produtividade das culturas em solos ácidos (Olmos & Camargo, 1976; Foy, 1983). Altas concentrações de alumínio tóxico ( $\text{Al}^{3+}$ ) na solução do solo reduzem o crescimento por inibição da divisão e alongação celular no meristema apical das raízes, limitando a absorção e/ou translocação de água e nutrientes essenciais (Foy, 1983; Kochian, 1995; Ma & Furukawa, 2003; Kochian et al., 2005). O  $\text{Al}^{3+}$  também precipita o fósforo (P) nas raízes, reduzindo sua translocação para parte aérea (Alam, 1981). O fósforo tem um papel essencial na ciclagem de energia em todas as células e sua deficiência causa mudanças significativas no metabolismo, alterando as concentrações internas de P inorgânico, ATP e ADP, o que afeta o metabolismo respiratório e influencia todas as reações dependentes desses intermediários (Ryan et al., 2001).

O  $\text{Al}^{3+}$  livre na superfície do solo pode ser reduzido pela aplicação de calcário. No entanto, essa prática torna-se inviável economicamente e tecnicamente para as camadas mais profundas do solo. Rao et al. (1993) apontam que a aplicação de calcário pode aliviar a acidez do solo, porém não é uma opção econômica para pequenos agricultores e nem representa uma estratégia efetiva para reduzir a acidez no subsolo. Nesse contexto, o uso de variedades tolerantes ao  $\text{Al}^{3+}$ , por razões ambientais, econômicas e práticas, é a alternativa mais pertinente para exploração agrícola em solos ácidos.

Variabilidade genética inter e intraespecífica para tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  têm sido detectada em várias espécies e explorada com sucesso por programas de melhoramento. Entre os cereais, o centeio é a espécie mais tolerante seguida da aveia, do trigo e da cevada (Foy et al., 1965; Foy, 1983).

O controle genético da tolerância ao  $Al^{3+}$  tem sido extensivamente estudado entre os cereais (Capítulo I). Vários genes que controlam esse caráter e representam casos de herança simples foram localizados nos cromossomos 3RL, 4RL, 6RS e 7RS de centeio (Gallego & Benito, 1997; Gallego et al., 1998; Matos et al., 2005), 4HL de cevada (Minella & Sorrels, 1992), 4DL de trigo (Aniol & Gustafson, 1984; Lagos et al., 1991; Riede & Anderson, 1996; Luo & Dvorak, 1996; Ma et al., 2005; Raman et al., 2005) e no cromossomo 3 de sorgo (Magalhães et al., 2004).

Herança complexa tem sido relatada para arroz, milho e em alguns casos, para trigo. Para a cultura do arroz, QTLs foram identificados nos cromossomos 1, 3 e 9 (Wu et al., 2000; Ma et al., 2002; Nguyen et al., 2001, 2002, 2003). Em milho, a tolerância tem sido considerada pela maioria dos pesquisadores como de natureza quantitativa, sendo que até momento foram identificadas cinco regiões importantes no genoma localizadas nos cromossomos 2, 6 e 8 (Ninamango-Cardenas et al., 2003). Em trigo, alguns autores sugerem que múltiplos genes localizados nos cromossomos 5AS, 6AL, 7AS, 2DL, 3DL e 4DL estejam controlando o caráter (Aniol & Gustafson, 1984; Camargo, 1984; Papernik et al., 2001).

A capacidade de genótipos brasileiros de trigo se desenvolverem adequadamente em condições de solos ácidos e sua importância como fonte de genes para a tolerância ao  $Al^{3+}$  é reconhecida mundialmente, sendo que vários cultivares tipicamente utilizados para estudos de tolerância ao  $Al^{3+}$  são brasileiros (BH1146 e Carazinho) ou descendem de materiais brasileiros, como Atlas 66, descendente do cultivar Frondoso. Para BH1146 sugere-se a existência de um gene de maior efeito no fenótipo no cromossomo 4D (Riede & Anderson, 1996), enquanto que para Atlas 66 foram identificados genes nos cromossomos 5D (Kerridge & Kronstad, 1968) e 4DL (Sasaki et al., 2004; Ma et al., 2004; Raman et al., 2005), evidenciando que diferentes genes estão presentes no germoplasma brasileiro de trigo.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi estudar a herança genética da tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi e investigar se esse genótipo representa uma fonte de tolerância diferente daquela de BH1146.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Material Vegetal

Duas populações de linhagens recombinantes (RILs – *Recombinant Inbred Lines*) foram utilizadas para avaliação quanto a tolerância  $Al^{3+}$ , cuja genealogia e resposta ao  $Al^{3+}$  estão descritas na Tabela 1. A primeira população foi composta por 124 RILs  $F_7$  derivadas do cruzamento entre Toropi x Anahuac. A segunda constitui-se de 79 RILs  $F_6$  derivadas do cruzamento entre Toropi x BH1146. As duas populações foram desenvolvidas e gentilmente cedidas pelo Dr. Euclides Minella, do Centro Nacional de Pesquisa de Trigo - Embrapa Trigo, de Passo Fundo, RS.

Tabela 1. Genótipo, origem, genealogia e resposta ao  $Al^{3+}$  do germoplasma utilizado no presente estudo

Genótipo	Origem	Genealogia	Resposta ao $Al^{3+}$
Anahuac	México	II 12300//Lerma Rojo 64/815613/Norteño 67	Sensível
BH1146	Brasil	PG1/Fronteira/Mentana	Tolerante
Toropi	Brasil	Petiblanco//Frontana/Quaderna	Tolerante

### 2.2 Avaliação para Tolerância ao $Al^{3+}$

A avaliação para tolerância ao  $Al^{3+}$  no presente estudo foi realizada pelo método de Crescimento Relativo da Raiz Principal (CRRP) igualmente denominado na literatura de “*Relative Tolerance Index*” (RTI) (Somers et al., 1996), de acordo com a metodologia proposta por Baier et al. (1995).

Sementes de cada linha (aproximadamente 100) foram desinfetadas com solução comercial de hipoclorito de sódio (2%) por três minutos, seguido de três lavagens com água deionizada. Em seguida, as sementes foram colocadas para germinar em papel germiteste, incubadas por 24 h a 4°C, sendo posteriormente colocadas em câmaras de germinação a 23°C  $\pm$  1, por 46 h. Para a avaliação foram utilizadas oito plântulas de cada linha, para cada nível a ser testado, com comprimento de raiz similar (aproximadamente 1 cm).

Plântulas de cada linha foram colocadas sob tela plástica, com as raízes submersas em dois litros de solução nutritiva sem adição de fósforo (0,4 mM  $CaCl_2$ , 0,65 mM  $KNO_3$ , 0,01 mM  $(NH_4)_2SO_4$ , 0,25 mM  $MgCl_2$ , 0,04 mM  $NH_4NO_3$ )

em câmara de crescimento, sob condições controladas ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ; 12 h luz : 12 h escuro). Os tratamentos utilizados foram ausência de Al (0 ppm),  $74\ \mu\text{M}$  Al (2 ppm),  $148\ \mu\text{M}$  Al (4 ppm),  $222\ \mu\text{M}$  Al (6 ppm),  $370\ \mu\text{M}$  Al (10 ppm),  $550\ \mu\text{M}$  Al (15 ppm) e  $740\ \mu\text{M}$  Al (20 ppm), sendo que o alumínio foi usado na forma  $\text{AlCl}_3$ . Durante os experimento, a solução nutritiva foi mantida com pH 4,0 e aeração constante. A cada 24 h a solução era trocada para manutenção do pH. Após 96 h, o experimento era interrompido e as plântulas acondicionadas a  $-20^\circ\ \text{C}$  até o momento da medição das raízes. No total foram realizados seis experimentos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Experimentos e tratamentos utilizados para fenotipagem das RILs quanto a tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$

Experimento	Ano	População	Nº de Linhagens	Tratamentos (ppm)							
				0	2	4	6	10	15	20	
I	2002	Toropi x Anahuac	96	x	x						
II	2003	Toropi x Anahuac	84	x		x					
III	2004	Toropi x Anahuac*	107	x	x	x	x				
IV	2005	Toropi x BH1146*	76	x	x						
V	2006	Toropi x BH1146*	75	x		x	x				
VI	2006	Toropi x BH1146*	11	x				x	x	x	

\* Experimentos realizados com duas repetições por nível.

As duas raízes mais longas foram medidas para cada plântula em todos os tratamentos incluindo a dose controle. O CRRP foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{CRRP} = \frac{\text{média do comprimento da raiz principal na dose "x"}}{\text{média do comprimento da raiz principal na ausência de } \text{Al}^{3+}}$$

onde, "x" corresponde a dose de  $\text{Al}^{3+}$  avaliada.

A variável foi denominada de CRRP2 quando a dose avaliada foi de  $74\ \mu\text{M}$ , CRRP4 para  $148\ \mu\text{M}$ , CRRP6 para  $222\ \mu\text{M}$ , CRRP10 para  $370\ \mu\text{M}$ , CRRP15  $\mu\text{M}$  para  $550\ \mu\text{M}$  e CRRP20  $740\ \mu\text{M}$  de alumínio.

### 2.3 Análises estatísticas

A determinação do número de genes envolvidos com a tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  foi realizada com base na distribuição de freqüências da média de CRRP das

linhagens recombinantes para cada uma das duas populações. A definição do intervalo de classe foi feita conforme proposto por Steel & Torrie (1980), sendo que o tamanho de cada classe não excedeu um quarto do desvio padrão da população em estudo para variável em questão.

A classificação das linhagens recombinantes em sensíveis ou tolerantes ao alumínio tóxico foi feita com base no ponto médio de CRRP dos progenitores. Assim, esse valor foi de 0,50 para 74  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ , sendo consideradas sensíveis linhagens com  $\text{CRRP} \leq 0,50$  e tolerantes linhagens com  $\text{CRRP} > 0,50$ . O mesmo critério de classificação foi utilizado por Rodriguez-Milla & Gustafson (2001) para distinguir as linhagens da população BH1146 x Anahuac, usando também como variável o crescimento relativo da raiz principal. Para as doses de 148  $\mu\text{M}$  e 222  $\mu\text{M}$ , para população Toropi x Anahuac foram consideradas sensíveis  $\leq \text{CRRP}$  0,30 < tolerantes e para a população Toropi x BH1146, sensíveis  $\leq \text{CRRP}$  0,40 < tolerantes

As hipóteses genéticas testadas foram: a) 1 tolerante: 1 sensível ao  $\text{Al}^{3+}$  para população linhagens recombinantes  $F_7$  de Toropi x Anahuac, esperada na segregação de um gene maior para tolerância presente em Toropi; e b) 3 tolerantes: 1 sensível para linhagens recombinantes de Toropi x BH1146, esperada no caso de haverem dois genes distintos de tolerância, um proveniente de Toropi e outro de BH1146. No segundo caso a identificação de linhagens  $F_6$  recombinantes sensíveis ao  $\text{Al}^{3+}$  é um indicativo de que Toropi e BH1146 são fontes distintas de tolerância.

O teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), conforme apresentado por Steel & Torrie (1980) foi utilizado para testar a adequação dos dados ao modelo genético adotado. O valor do teste  $\chi^2$  foi obtido pela fórmula:

$$\chi^2 = \sum \frac{(F_0 - F_E)^2}{F_E}, \text{ onde:}$$

$F_0$  = frequência observada para cada classe;

$F_E$  = frequência esperada para cada classe com base na proporção mendeliana.



### **3 Resultados e Discussão**

#### **3.1 Herança da tolerância ao $Al^{3+}$ em Toropi: quantos genes?**

A população  $F_7$  de RILs derivadas do cruzamento entre Toropi x Anahuac foi avaliada em três doses de  $Al^{3+}$ , 74  $\mu M$ , 148  $\mu M$  e 222  $\mu M$ , em três experimentos diferentes. Em geral, doses mais baixas ( $\leq 37 \mu M$ ) de alumínio são utilizadas para testes para discriminação de genótipos tolerantes e sensíveis para trigo, centeio e cevada (Aniol & Gustafson, 1984; Riede & Anderson, 1996; Minella & Sorrels, 1997; Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001; Miftahudin et al., 2002; Ma et al., 2005). Camargo & Felício (1984) sugerem que concentrações superiores a 148  $\mu M$  de alumínio na solução paralisam completamente o crescimento radicular em trigo, até mesmo nos genótipos com máxima tolerância. Nossos resultados contradizem essa teoria uma vez que foi possível diferenciar as linhagens tolerantes e sensíveis em todas as doses, incluindo superiores a essa.

A medida em que se aumentou as doses de alumínio observou-se visualmente uma redução da parte aérea e do crescimento radicular como pode ser visto na Figura 1.

A diferença de crescimento relativo da raiz principal entre Toropi e Anahuac foi de aproximadamente 0.40 em todos os experimentos realizados, sendo que os valores de CRRP para os progenitores estão apresentados na Tabela 3 e a média da população bem como valores mínimos, máximos e desvio padrão na Tabela 4.

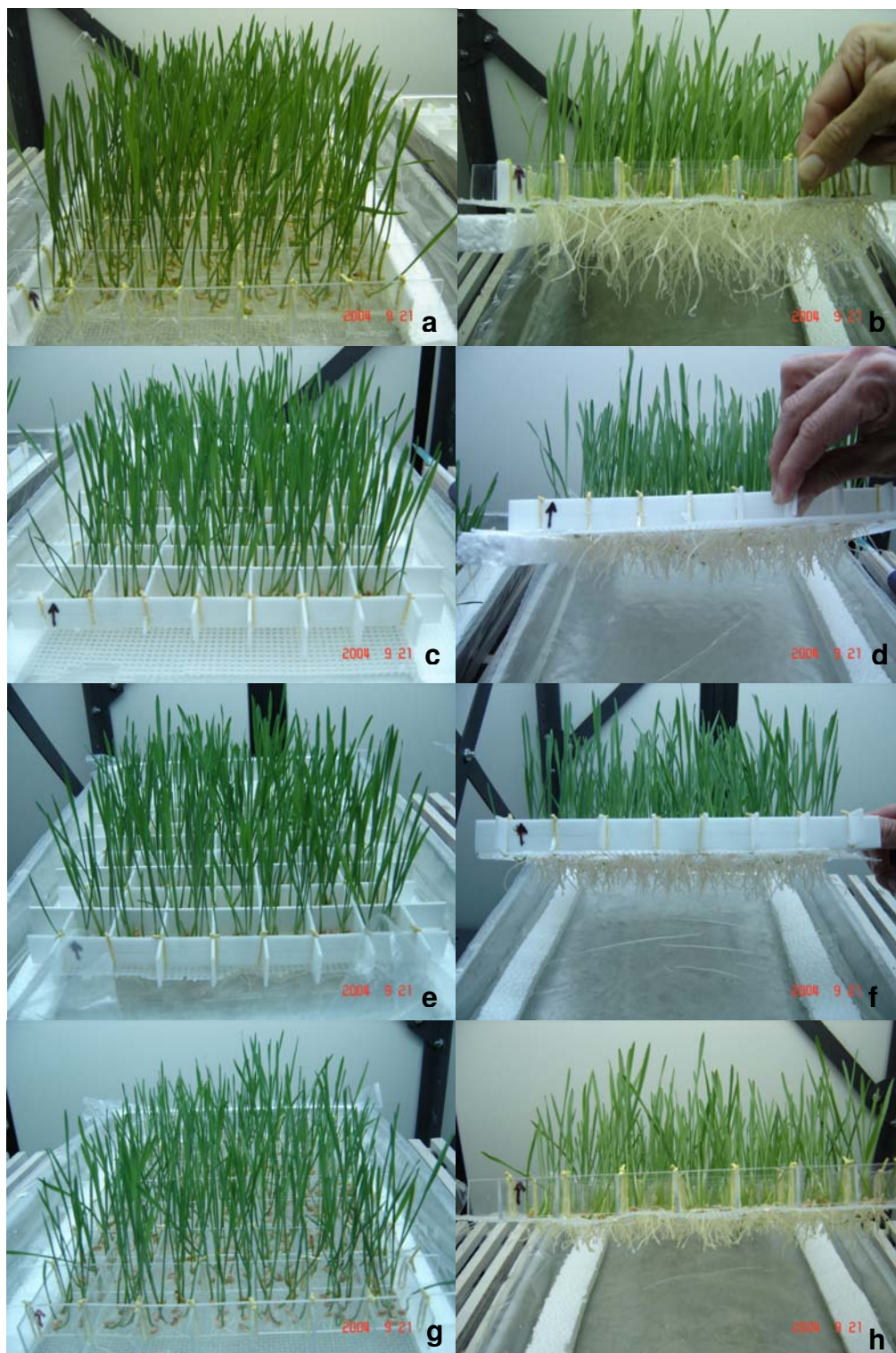


Figura 1. População Toropi x Anahuac após 96 horas de cultivo em solução nutritiva. Na ausência de  $\text{Al}^{3+}$ : parte aérea (a) e raízes (b). Sob estresse de  $\text{Al}^{3+}$  nas doses de: 74  $\mu\text{M}$ , parte aérea (c) e raízes (d); 148  $\mu\text{M}$ , parte aérea (e) e raízes (f); 222  $\mu\text{M}$ , parte aérea (g) e raízes (h).

Tabela 3. Média e desvio padrão do comprimento relativo da raiz principal (%) dos genótipos Toropi (tolerante) e Anahuac (sensível) avaliados quanto à tolerância ao  $Al^{3+}$  em solução nutritiva

Experimento	Doses	Toropi		Anahuac	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
I <sup>1</sup>	74 $\mu$ M	0,76	0,06	0,34	0,04
II <sup>1</sup>	148 $\mu$ M	0,67	0,15	0,35	0,05
III <sup>2</sup>	74 $\mu$ M	0,67	0,06	0,23	0,06
III <sup>2</sup>	148 $\mu$ M	0,58	0,08	0,14	0,04
III <sup>2</sup>	222 $\mu$ M	0,50	0,03	0,14	0,03

<sup>1</sup>média de oito plantas; <sup>2</sup>média de duas repetições, oito plantas cada.

Tabela 4. Comprimento relativo da raiz principal (%) de linhagens recombinantes F<sub>7</sub> da população Toropi x Anahuac avaliadas quanto à tolerância ao  $Al^{3+}$  em solução nutritiva

Experimento	Doses	Media População	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão
I <sup>1</sup>	74 $\mu$ M	0,47	0,19	0,82	0,06
III <sup>1</sup>	74 $\mu$ M	0,47	0,19	0,81	0,07
III <sup>2</sup>	148 $\mu$ M	0,56	0,18	0,95	0,11
III <sup>2</sup>	148 $\mu$ M	0,34	0,14	0,59	0,07
III <sup>2</sup>	222 $\mu$ M	0,30	0,14	0,52	0,06

<sup>1</sup>média de oito plantas; <sup>2</sup>média de duas repetições, oito plantas cada.

As distribuições das freqüências para população Toropi x Anahuac para as doses avaliadas estão nas apresentada nas Figuras 2 a 4.

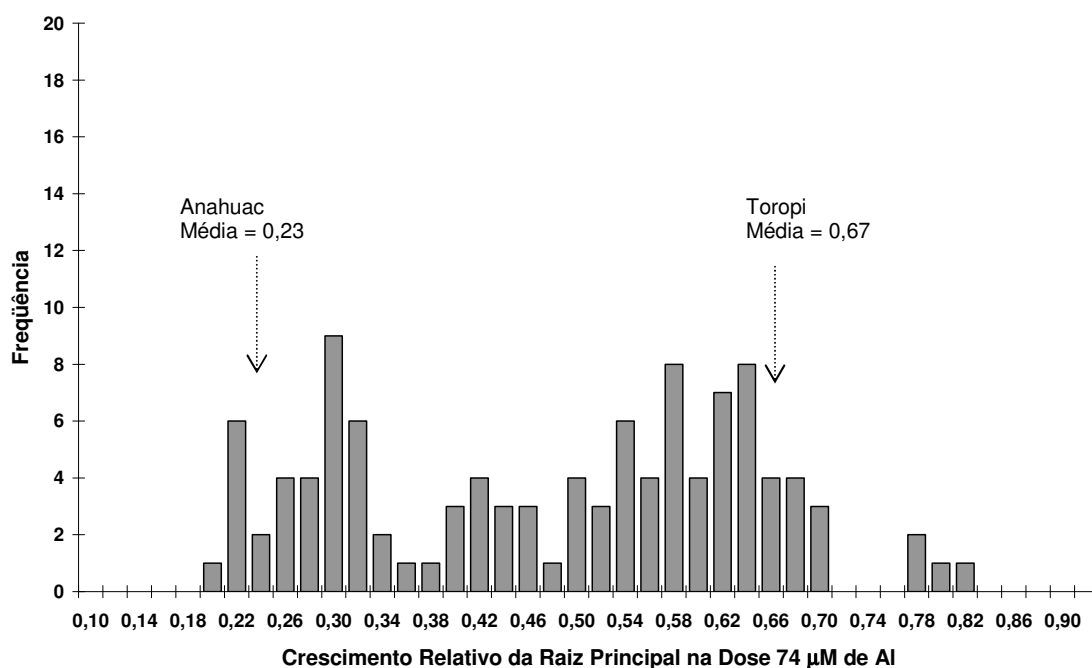


Figura 2. Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x Anahuac após 96 h de estresse de  $Al^{3+}$  (74  $\mu M$ ) em solução nutritiva.

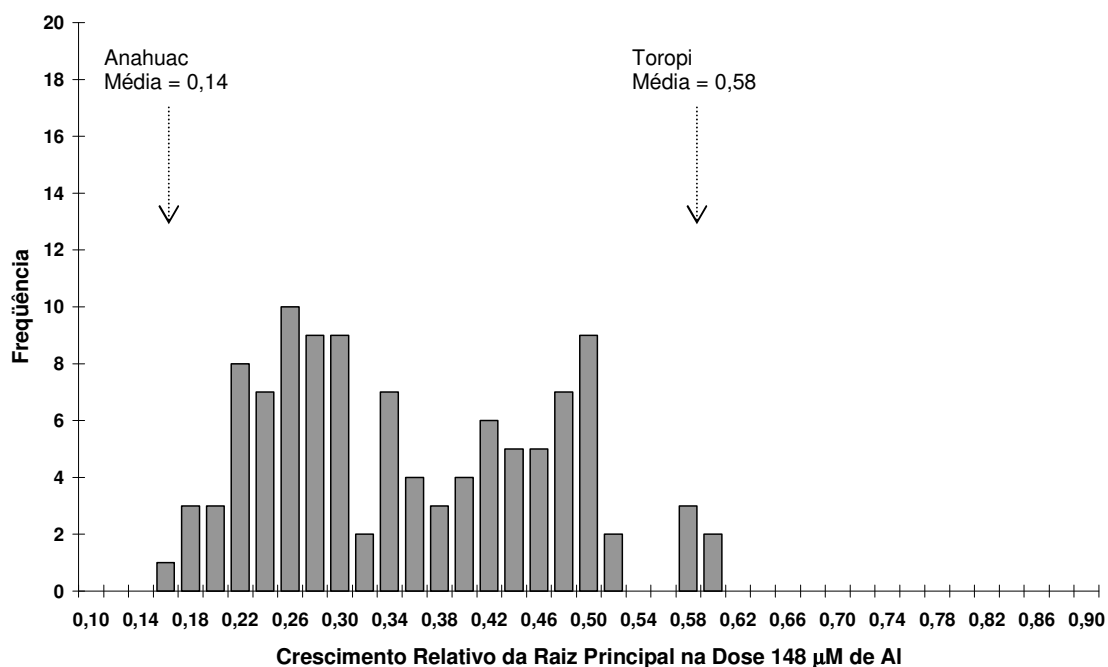


Figura 3. Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x Anahuac após 96 h de estresse de  $Al^{3+}$  (148  $\mu M$ ) em solução nutritiva.

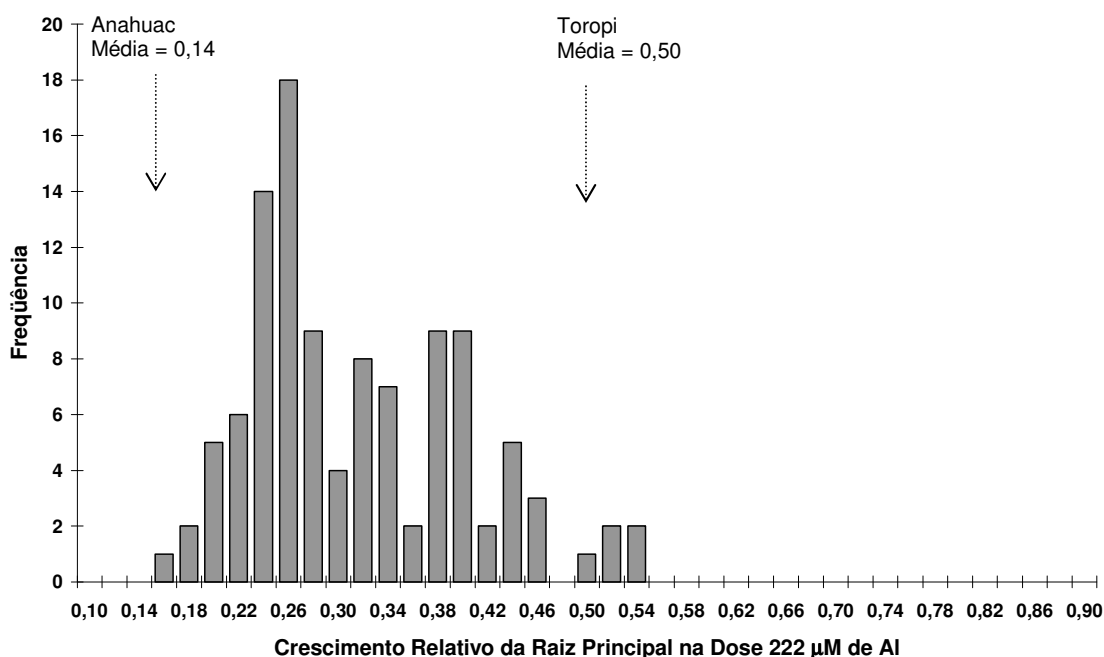


Figura 4. Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x Anahuac após 96 h de estresse de  $\text{Al}^{3+}$  ( $222 \mu\text{M}$ ) em solução nutritiva.

Distribuição contínua de freqüência com tendência bimodal foi observada em todas as doses de  $\text{Al}^{3+}$  para população Toropi x Anahuac (Figuras 2 a 4). O formato bimodal da distribuição é um indicativo da presença de um gene de maior efeito no fenótipo presente em Toropi que permite a distinção de um grupo mais sensível e outro mais tolerante nessa população. A variação quanto ao grau de tolerância ou sensibilidade dentro de cada grupo pode ser explicada pela existência de outros genes de tolerância modulando a expressão do caráter.

A hipótese genética formulada de um gene maior para o caráter tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  em Toropi foi testada para cada dose pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), cujos valores estão demonstrados na Tabela 5.

A herança da tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  em trigo tem sido extensivamente relatada, sendo na maioria das vezes considerada monogênica, com efeito de dominância (Aniol & Gustafson, 1984; Lagos et al., 1991; Riede & Anderson, 1996; Luo & Dvorak, 1996; Ma et al., 2005; Raman et al., 2005). Alguns autores sugerem que múltiplos genes localizados nos cromossomos 5AS, 6AL, 7AS, 2DL, 3DL e 4DL

estejam controlando o caráter (Aniol & Gustafson, 1984; Camargo, 1984; Papernik et al., 2001).

Tabela 5. Valores do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para as proporções observadas e esperadas entre as RILs F<sub>7</sub> de Toropi x Anahuac para o caráter tolerância ao Al<sup>3+</sup>

Experimentos	Doses	Observado		Esperado		GL	$\chi^2_{\text{calc}}$	p
		T <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>	T <sup>3</sup>	S <sup>4</sup>			
I <sup>1</sup>	74 $\mu$ M	46	50	48	48	1	0,17 <sup>ns</sup>	0,68
II <sup>1</sup>	148 $\mu$ M	48	36	42	42	1	1,71 <sup>ns</sup>	0,19
III <sup>2</sup>	74 $\mu$ M	53	54	53,5	53,5	1	0,01 <sup>ns</sup>	0,92
III <sup>2</sup>	148 $\mu$ M	57	50	53,5	53,5	1	0,45 <sup>ns</sup>	0,50
III <sup>2</sup>	222 $\mu$ M	44	63	53,5	53,5	1	3,37 <sup>ns</sup>	0,06

<sup>1</sup>média de oito plantas; <sup>2</sup>média de duas repetições, oito plantas cada, <sup>3</sup>Tolerante; <sup>4</sup>Sensível. ns= não significativo pelo teste do  $\chi^2$  a 1% de probabilidade;  $\chi^2_{(1)} = 6,64$ .

Os resultados apresentados nesse trabalho são consistentes com a teoria de um gene de efeito maior controlando a tolerância ao alumínio tóxico em Toropi em todas as doses de alumínio testadas. No entanto, é possível que outros genes de efeito menor no fenótipo estejam atuando conjuntamente como proposto por Camargo (1981) para o genótipo Atlas 66. Resta determinar se o gene presente em Toropi é o mesmo de BH1146, o genótipo brasileiro mais bem caracterizado para tolerância ao Al<sup>3+</sup>.

### 3.2 Herança da Tolerância ao Al<sup>3+</sup>: Toropi x BH1146 possuem o mesmo gene?

Para determinar se Toropi e BH1146 possuem o mesmo gene controlando os mecanismos de tolerância ao Al<sup>3+</sup>, estudos de herança foram realizados com uma população de RILs F<sub>6</sub> derivadas do cruzamento entre Toropi x BH1146. A população foi primeiramente avaliada na dose de 74  $\mu$ M e de acordo com os resultados obtidos procederam-se avaliações nas doses de 148  $\mu$ M e 222  $\mu$ M. Em todos os experimentos realizados, os progenitores foram incluídos bem como o genótipo sensível Anahuac.

A variável resposta avaliada foi CRRP, sendo que os valores para os progenitores e para Anahuac, genótipo sensível controle, estão apresentados na Tabela 6 e a média da população bem como valores mínimos, máximos e desvio padrão na Tabela 7.

Tabela 6. Média e desvio padrão do comprimento relativo da raiz principal (%) dos genótipos Toropi (tolerante) e BH1146 (tolerante) avaliados quanto à tolerância ao  $Al^{3+}$  em solução nutritiva

Experimento <sup>1</sup>	Doses	Toropi		BH1146		Anahuac	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
I	74 $\mu$ M	0,85	0,06	0,83	0,10	0,41	0,04
II	148 $\mu$ M	0,76	0,16	0,78	0,14	0,34	0,03
III	222 $\mu$ M	0,62	0,08	0,57	0,09	0,24	0,06

<sup>1</sup>média de duas repetições, oito plantas cada.

Tabela 7. Comprimento relativo da raiz principal (%) de linhagens recombinantes  $F_6$  da população Toropi x BH1146 avaliadas quanto à tolerância ao  $Al^{3+}$  em solução nutritiva

Experimento <sup>1</sup>	Doses	Média População	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão
I	74 $\mu$ M	0,58	0,36	0,86	0,05
II	148 $\mu$ M	0,57	0,32	0,95	0,10
III	222 $\mu$ M	0,48	0,24	0,69	0,09

<sup>1</sup>média de duas repetições, oito plantas cada.

A distribuição das freqüências para população Toropi x BH1146 para as doses avaliadas está apresentada nas Figuras 5, 6 e 7.

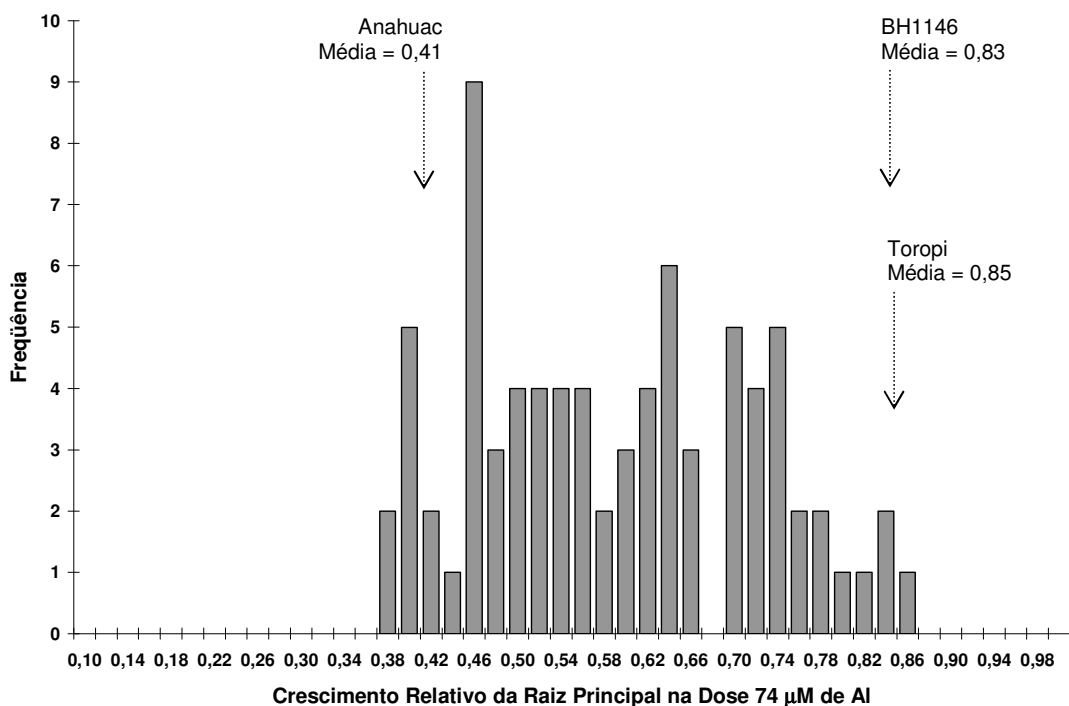


Figura 5. Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x BH1146 após 96 h de estresse de  $Al^{3+}$  (74  $\mu$ M) em solução nutritiva.

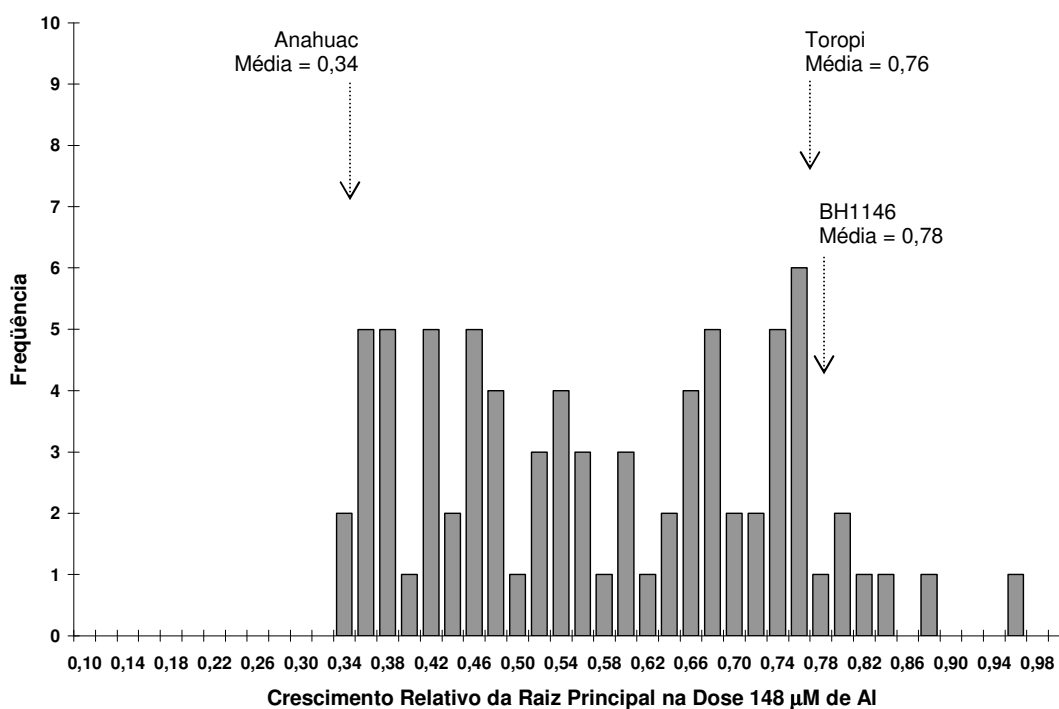


Figura 6. Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x BH1146 após 96 h de estresse de Al<sup>3+</sup> (148 μM) em solução nutritiva.

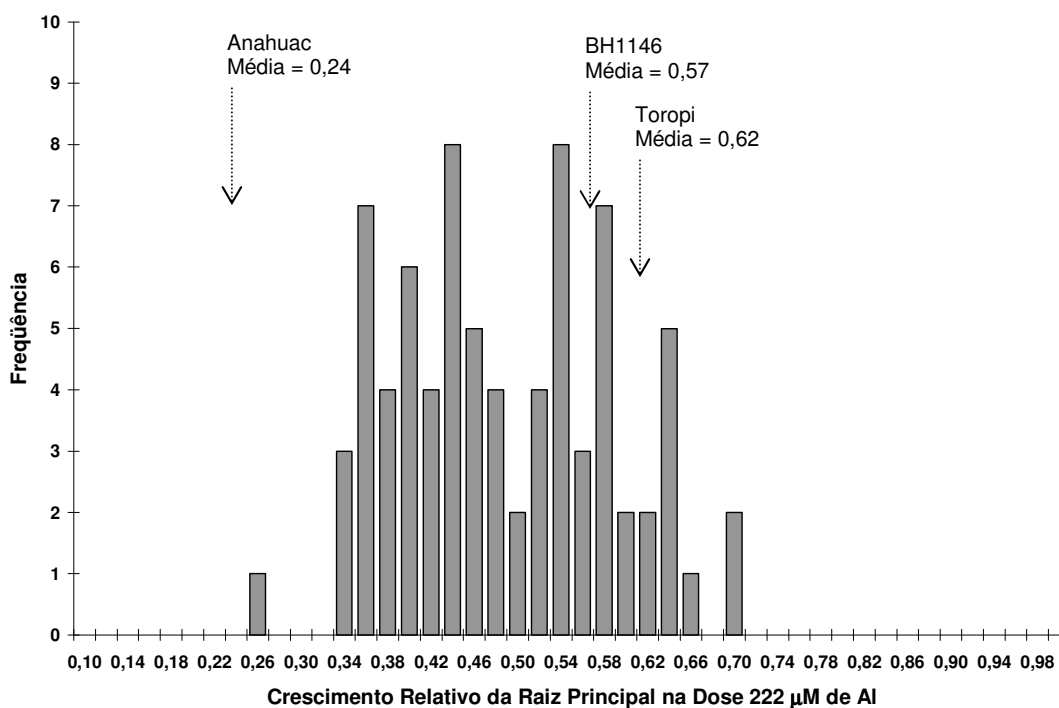


Figura 7. Distribuição das freqüências do comprimento relativo da raiz principal (%) da população Toropi x BH1146 após 96 h de estresse de Al<sup>3+</sup> (222 μM) em solução nutritiva.



A hipótese genética formulada de dois genes para o caráter tolerância ao  $Al^{3+}$  na população derivada do cruzamento entre Toropi x BH1146 foi testada para cada dose pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ), cujos valores estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8. Valores do teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para as proporções observadas e esperadas entre as RILs  $F_6$  de Toropi x BH1146 para o caráter tolerância ao  $Al^{3+}$

Experimentos <sup>1</sup>	Doses	Observado		Esperado		GL	$\chi^2_{calc}$	p
		T	S	T	S			
I	74 $\mu$ M	51	25	57	19	1	2,52 <sup>ns</sup>	0,11
II	148 $\mu$ M	61	14	56,3	18,7	1	1,57 <sup>ns</sup>	0,21
III	222 $\mu$ M	52	23	56,3	18,7	1	1,32 <sup>ns</sup>	0,25

<sup>1</sup>média de duas repetições, oito plantas cada; T: Tolerante; S: Sensível. ns= não significativo pelo teste do  $\chi^2$  a 1% de probabilidade;  $\chi^2_{(1)} = 6,64$ .

A segregação observada em todas as doses foi consistente com a proporção esperada 3:1, três linhagens tolerantes para uma linhagem sensível, sendo a tolerância ao alumínio tóxico nessa população governada por dois genes diferentes, um oriundo de Toropi e outro oriundo de BH1146.

A presença de recombinantes sensíveis com fenótipo similar a Anahuac (sensível) em todas as doses testadas, suporta a hipótese de que Toropi e BH1146 possuem genes diferentes (Figuras 8 a 13). Conjuntamente, a presença de segregantes nas doses de 148  $\mu$ M e 222  $\mu$ M, com média de CRRP similar a média dos progenitores sugere a presença de uma nova combinação gênica e/ou efeito aditivo de diferentes genes.

A partir da identificação desses segregantes buscou-se avaliar a transgressividade e o possível efeito de aditividade desses genes. As linhagens mais tolerantes (RILs 9, 43, 44, 54, 87, 93), as linhagens sensíveis (RILs 13, 16, 24, 75, 90), BH1146, Toropi e Anahuac foram submetidas a doses mais elevadas de alumínio (ausência, 370  $\mu$ M, 550  $\mu$ M e 740  $\mu$ M) para se confirmar a aditividade dos genes.

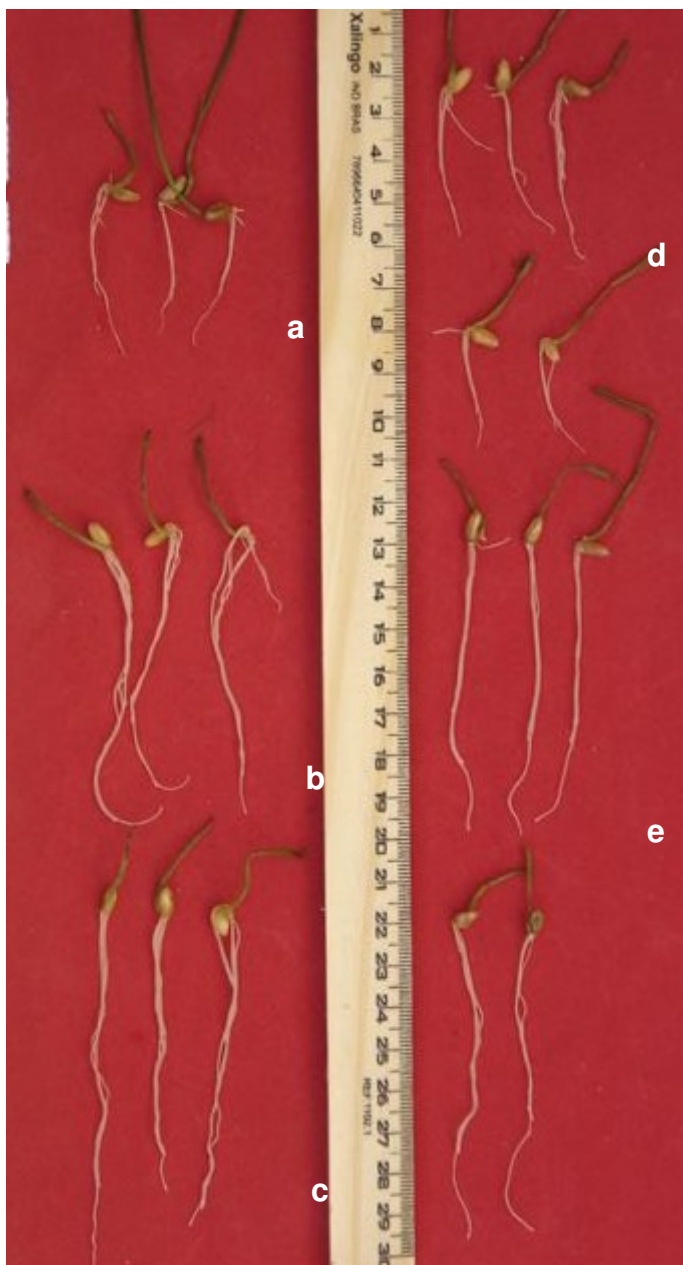


Figura 8. Plântulas de trigo submetidas a  $74 \mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . Anahuac (a), Toropi (b), BH1146 (c), recombinantes sensíveis (d) e recombinantes tolerantes (e) da população Toropi x BH1146.



Figura 9. Plântulas de trigo na ausência de  $\text{Al}^{3+}$ . Toropi (a), BH1146 (b), Anahuac (c), recombinante tolerante (RIL 44) (d) e recombinante sensível (RIL 75) (e) da população Toropi x BH1146.



Figura 10. Plântulas de trigo submetidas a  $148 \mu\text{M}$  de  $\text{Al}$ . Toropi (a), BH1146 (b), Anahuac (c), recombinante tolerante (RIL 44) (d) e recombinante sensível (RIL 75) (e) da população Toropi x BH1146.





Figura 11. Plântulas de trigo submetidas a 222  $\mu\text{M}$  de Al. Toropi (a), BH1146 (b), Anahuac (c), recombinante tolerante (RIL 44) (d) e recombinante sensível (RIL 75) (e) da população Toropi x BH1146.

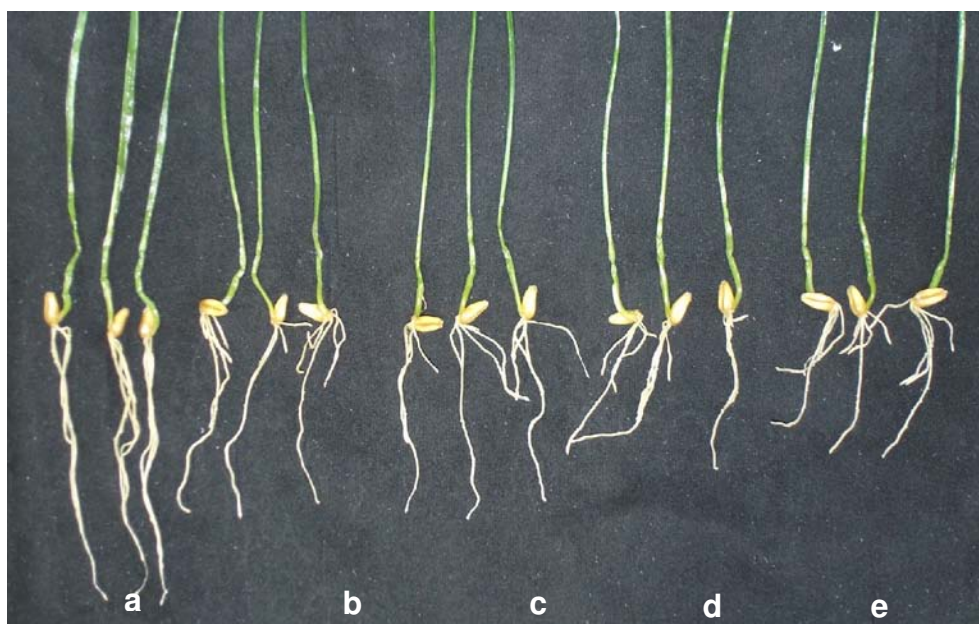


Figura 12. Linhagem recombinante tolerante (RIL 44) crescida na ausência de Al (a), em 148  $\mu\text{M}$  de Al repetição 1(b) e repetição 2(c), em 222  $\mu\text{M}$  de Al repetição 1(d) e repetição 2(e).

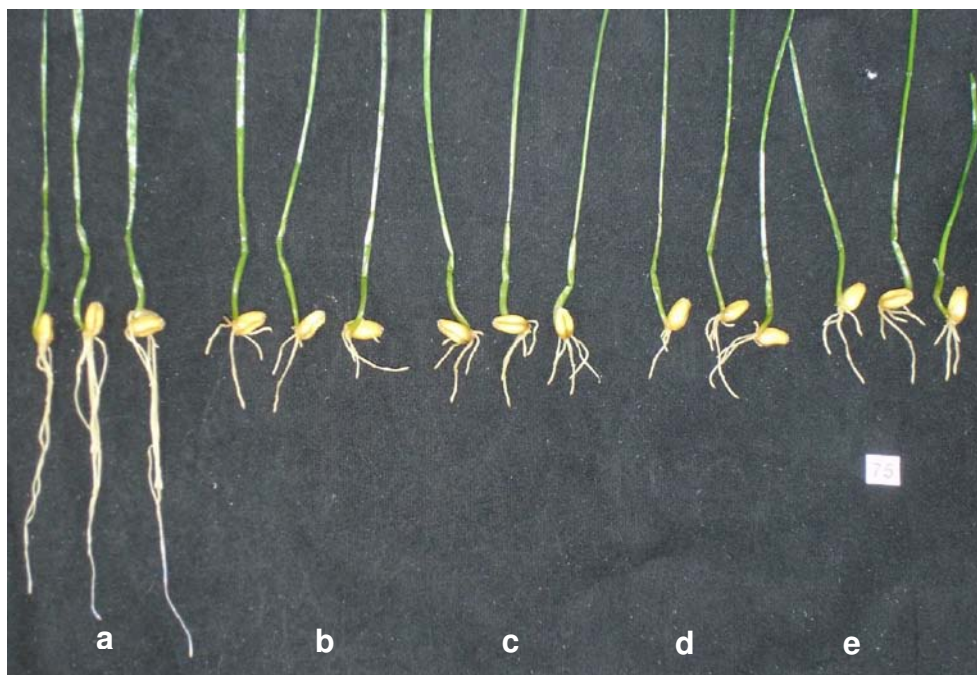


Figura 13. Linhagem recombinante sensível (RIL 75) crescida na ausência de Al (a), em 148  $\mu\text{M}$  de Al repetição 1(b) e repetição 2(c), em 222  $\mu\text{M}$  de Al repetição 1(d) e repetição 2(e).

A Tabela 9 apresenta os valores de CRRP e desvios padrão para as linhagens selecionadas bem como para os progenitores e Anahuac em todas as doses avaliadas. Não houve diferença significativa entre as linhagens tolerantes e a média dos progenitores (Toropi e BH1146) e nem entre as linhagens sensíveis e a média de Anahuac.

As linhagens 16, 24 e 75 foram sensíveis em todas as doses testadas, apresentando fenótipo muito similar ao de Anahuac enquanto que as linhagens 9, 44 e 54 foram tolerantes em todas as doses, mas não significativamente diferentes dos progenitores.

A ausência de linhagens apresentando crescimento relativo maior que os progenitores nas doses mais elevadas, sugere a não aditividade desses genes em combinação ou que os mesmos genes controlem um mesmo mecanismo de tolerância.

Tabela 9. Crescimento Relativo da Raiz Principal das linhagens selecionadas da população Toropi x BH1146 para todas as doses de alumínio tóxico

Linhagens (Fenótipo)	CRRP 74 $\mu\text{M}$		CRRP 148 $\mu\text{M}$		CRRP 222 $\mu\text{M}$		CRRP 370 $\mu\text{M}$		CRRP 550 $\mu\text{M}$		CRRP 740 $\mu\text{M}$	
	Media <sup>1</sup>	Desvio Padrão	Media <sup>1</sup>	Desvio Padrão	Media <sup>1</sup>	Desvio Padrão	Media <sup>1</sup>	Desvio Padrão	Media <sup>1</sup>	Desvio Padrão	Media <sup>1</sup>	Desvio Padrão
13 (S)	0,39	0,04	0,39	0,03	0,34	0,05	0,22	0,04	0,24	0,04	0,24	0,03
16 (S)	0,47	0,03	0,32	0,06	0,29	0,09	0,25	0,03	0,24	0,04	0,26	0,04
24 (S)	0,49	0,06	0,34	0,06	0,29	0,05	0,22	0,02	0,22	0,03	0,22	0,02
75 (S)	0,46	0,03	0,35	0,08	0,36	0,08	0,19	0,02	0,18	0,03	0,21	0,02
Anahuac (S)	0,41	0,04	0,34	0,03	0,24	0,06	0,23	0,02	0,19	0,03	0,20	0,01
90 (?)	0,70	0,05	0,34	0,07	0,34	0,05	0,24	0,01	0,24	0,02	0,23	0,05
9 (T)	0,76	0,06	0,83	0,05	0,62	0,06	0,28	0,04	0,29	0,02	0,28	0,03
43 (T)	0,61	0,09	0,73	0,07	0,56	0,09	0,26	0,02	0,25	0,02	0,24	0,03
44 (T)	0,74	0,10	0,95	0,07	0,66	0,06	0,25	0,02	0,25	0,03	0,24	0,03
54 (T)	0,61	0,06	0,88	0,12	0,64	0,15	0,21	0,03	0,23	0,03	0,20	0,01
87 (T)	0,82	0,09	0,85	0,11	0,46	0,09	0,30	0,05	0,31	0,04	0,26	0,05
93 (T)	-	-	0,76	0,07	0,61	0,06	0,28	0,02	0,27	0,03	0,27	0,02
BH1146 (T)	0,83	0,10	0,78	0,14	0,57	0,09	0,24	0,03	0,21	0,04	0,19	0,04
Toropi (T)	0,85	0,06	0,76	0,16	0,62	0,08	0,36	0,06	0,34	0,05	0,35	0,05

T: tolerante ao  $\text{Al}^{3+}$ , S: sensível ao  $\text{Al}^{3+}$ ; <sup>1</sup> média de duas repetições, oito plantas cada.

Outra hipótese é de que tenha sido atingido o limite biológico da espécie quanto às doses de alumínio. Sabe-se que entre os cereais, trigo é a segunda cultura mais sensível ao  $Al^{3+}$ , sendo que doses superiores a 222  $\mu M$  são altas o suficiente para parar o crescimento fazendo com que as plantas somente se mantenham durante o estresse.

Lagos et al. (1991), avaliando recrescimento como indicativo de tolerância ao  $Al^{3+}$ , testaram quatro genótipos de trigo (BH1146, Siete Cerros, CI 14124 e Atlas 66) em cinco concentrações de alumínio (74, 148, 222, 296 e 370  $\mu M$ ). Entre os genótipos avaliados somente BH1146 apresentou fenótipo tolerante em todas as concentrações de  $Al^{3+}$ . Nava et al. (2006) utilizaram Toropi e Anahuac como testemunhas no estudo de avaliação da tolerância em aveia com 740  $\mu M$  de alumínio em solução, sendo que esses genótipos não apresentaram recrescimento da raiz principal.

Neste trabalho Toropi e BH1146 apresentaram índices de crescimento relativo superiores a Anahuac até a dose de 222  $\mu M$ , apresentando reação de sensibilidade a partir desta dose.

### **3.3 Toropi e BH1146: diferentes fontes de genes para tolerância ao $Al^{3+}$**

O estudo das bases genéticas da tolerância ao  $Al^{3+}$  é a primeira estratégia para se investigar a diversidade de genes para esse caráter. Em geral, são utilizados cruzamentos entre genótipos tolerantes e sensíveis ao alumínio, o que restringe os resultados obtidos ao cruzamento em questão. A exploração da diversidade gênica para tolerância ao  $Al^{3+}$  somente pode ser adequadamente acessada por estudo genéticos com populações oriundas do cruzamento entre cultivares tolerantes (Garvin & Carver, 2003). Os autores sugerem que, nesse caso, pode-se inferir se a tolerância é devida a ação de um mesmo ou diferente gene, podendo ainda avaliar se esses genes possuem efeitos aditivos ou não.

Neste trabalho, a base genética da tolerância em trigo foi estudada utilizando-se duas populações, sendo uma oriunda do cruzamento entre genótipo tolerante e genótipo sensível (Toropi x Anahuac), e outra desenvolvida a partir do cruzamento entre Toropi e BH1146, ambos tolerantes.

O estudo da herança na população de RILs de Toropi x Anahuac indica que a tolerância ao  $Al^{3+}$  é governada por um gene de efeito maior, sendo que outros genes menores também estão afetando o caráter. O resultado encontrado é consistente com a teoria de que a tolerância ao alumínio em trigo é de herança simples e governada por um ou dois genes (Kochian, 1995; Garvin & Carver, 2003; Kochian et al., 2004; Kochian et al., 2005). A hipótese de um gene principal foi confirmada em todas as doses testadas em mais de um experimento (Tabela 5).

Para complementar esse estudo e trazer informações mais precisas sobre a diversidade de genes para a tolerância ao  $Al^{3+}$ , em especial em materiais de origem brasileira, buscou-se investigar se a tolerância em Toropi e BH1146 é devida a ação de um mesmo gene ou não. Garvin e Carver (2003) apontam que a presença de linhagens, oriundas do cruzamento entre genótipos tolerantes, com maior sensibilidade ao alumínio que os pais (segregação transgressiva) permite inferir se os genes presentes são os mesmos ou não.

O estudo das bases genéticas da tolerância ao  $Al^{3+}$ , utilizando a população de RILs  $F_6$  proveniente do cruzamento Toropi x BH1146, permitiu identificar linhagens que apresentavam sensibilidade semelhante ao genótipo Anahuac, reconhecido mundialmente pela alta sensibilidade ao alumínio. A presença dessas linhagens indica que são genes diferentes controlando o caráter em BH1146 e Toropi (Minella, 1989; Garvin & Carver, 2003). Juntamente a hipótese de 3:1 foi testada em todas as doses avaliadas e comprovada pelo teste do qui-quadrado (Tabela 8).

Poucos estudos são encontrados na literatura investigando se diferentes genótipos tolerantes possuem os mesmos genes controlando a tolerância ao  $Al^{3+}$ . Em cevada, foram avaliadas três populações derivadas do cruzamento entre genótipos brasileiros altamente tolerantes (Antártica 1, BR 1 e FM 404) em três doses de alumínio (3, 5 e 7  $\mu M$ ), sendo que nenhuma linha apresentou fenótipo sensível, indicando que a tolerância nesses genótipos é controlada pelo mesmo gene ou por genes altamente ligados (Minella, 1989; Minella & Sorrels, 1992; Minella & Sorrels, 2002).



Outra hipótese é que exista em trigo variação alélica dentro de um determinado loco contribuindo para variação quanto a tolerância ao  $Al^{3+}$ . Variação alélica já foi sugerida por Minella & Sorrels (1992) para cevada e por Rhue et al. (1978) para milho, onde a tolerância é controlada por um único gene com múltiplos alelos condicionando vários níveis de tolerância entre os genótipos. Garvin & Carver (2003) sugeriram que o mesmo possa ocorrer para trigo, baseados no fato de que BH1146, altamente tolerante, Chinese Spring e Atlas 66, menos tolerantes, possuem os genes de tolerância localizados todos no braço longo do cromossomo 4D (Luo & Dvorak, 1996; Riede & Anderson, 1996; Ma et al., 2005; Raman et al., 2005). A localização do gene de tolerância em Toropi no genoma do trigo poderá ajudar a elucidar essa hipótese.

### **3.3.1 Tolerância ao $Al^{3+}$ em Toropi e BH1146: voltando as origens**

Toropi e BH1146, assim como Frontana, Fronteira, Maringá e Frondoso, são genótipos de trigo tolerantes ao alumínio que compartilham ancestrais comuns.

Há muitas evidências de que a tolerância ao alumínio tóxico dos genótipos brasileiros seja proveniente de três fontes: Polyssú, coletado em Guaporé, RS, em 1914; PG1, uma seleção de Polyssú oriundo de Ponta Grossa, PR, em 1924; de linhagens Alfredo Chaves, derivadas de variedades crioulas de trigo, conhecidas como Turco, cultivadas na região da colônia no RS em 1929 (Beckman, 1976).

Na década de 20, os programas de melhoramento do Brasil passaram a selecionar genótipos mais adaptados com base na tolerância ao crestamento (sintoma de toxidez do alumínio). Entre os genótipos selecionados, um em particular, Polyssú, exibia excepcional tolerância ao crestamento e foi utilizado intensivamente em cruzamentos com outros genótipos (Beckman, 1976; De Souza, 1998).

Polyssú foi cruzado com uma série de linhagens AC (Alfredo Chaves), principalmente, AC 3-21, AC 4-21 e Ac 6-21. A partir desses cruzamentos, surgiram na década seguinte os cultivares de trigo Toropi, Frontana, Fronteira, BH1146, Maringá, Frondoso, Colônias e Rio Negro. Esses cultivares historicamente refletem a alta tolerância ao  $Al^{3+}$  Polyssú ou Alfredo Chaves.

Analisando a genealogia de Toropi e BH 1146 (Figura 14) e seus progenitores, observa-se que ambos genótipos possuem como fonte de tolerância ao  $Al^{3+}$  genes oriundos do genótipo Polyssú e das linhagens Alfredo Chaves.

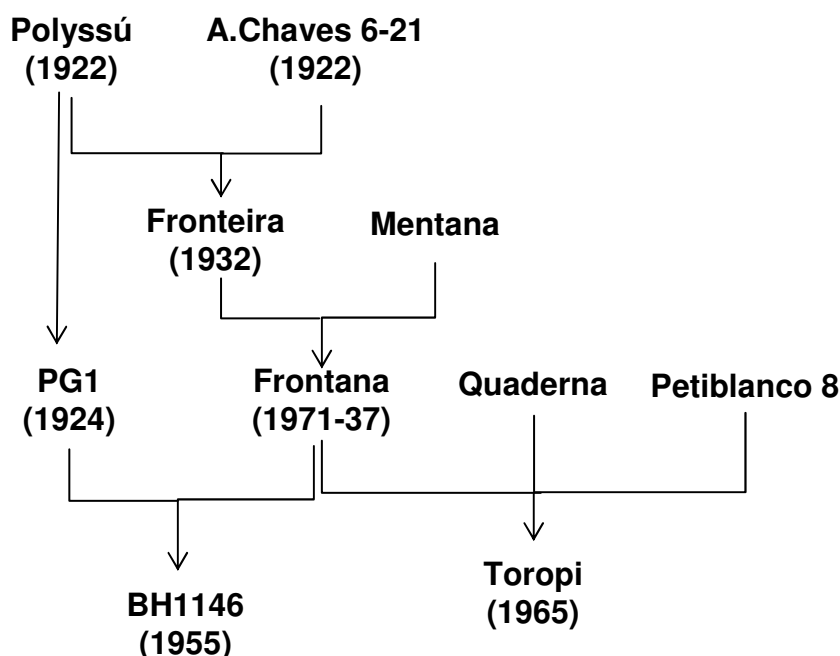


Figura 14. Prováveis fontes de genes para tolerância ao  $Al^{3+}$  em genótipos brasileiros de trigo, BH1146 e Toropi. (Modificado de De Souza, 1998).

De Souza (1998) sugere que a tolerância de BH1146 seja proveniente de PG1 e ou Fronteira, que por sua vez é descendente de um cruzamento simples entre Polyssú com Alfredo Chaves 6-21. A tolerância de Toropi pode ser proveniente de Frontana 1971-37 e/ou Petiblanco 8.

Uma hipótese a ser investigada é de que a tolerância em Toropi seja conferida por um gene proveniente das linhagens Alfredo Chaves e que em BH1146 esse caráter seja governado pelo gene vindo de Polyssú.

Parece que o maior nível de tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo tenha derivado das fontes brasileiras Polyssú e Alfredo Chaves, sendo essas e combinações delas usadas mundialmente para o melhoramento da produção de trigo em solos ácidos. O genótipo Altas 66 (EUA), tolerante ao  $Al^{3+}$ , provavelmente possui como fonte de genes esses mesmos genótipos, pois deriva do cruzamento de Frondoso com Redhart3/Noll28. Frondoso por sua vez é originário do cruzamento de

Frontana com Mentana. Logo, evidencia-se que o gemoplasma brasileiro é uma rica e importante fonte de genes para esse caráter e que Toropi representa uma alternativa importante para a incorporação desse caráter em cultivares elites. O próximo passo agora é determinar se esse gene de Toropi está presente na mesma região que os genes já descritos até o momento.

#### **4 Conclusões**

O presente estudo permite concluir que a tolerância ao  $Al^{3+}$  de Toropi é governada por um gene maior, sendo o efeito desse modulado pela existência de outros genes de efeito menor no fenótipo. Além disso, o gene principal presente em Toropi é diferente daquele em BH1146, podendo ser considerado uma fonte adicional de tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo.

### **CAPÍTULO III**

**Mapeando genes que conferem tolerância ao alumínio tóxico em Toropi**

**Tatiana Boff, Sandra C. K. Milach, Euclides Minella,  
Laize F. Espindula, Emerson Limberger**

## 1 Introdução

A toxicidade do  $Al^{3+}$  é o principal fator limitante para produção de trigo em solos ácidos (Foy & Silva, 1991), que correspondem a aproximadamente 40% das terras potencialmente aráveis do mundo (von Uexküll & Mutert, 1995; Kochian, 1995). No Brasil, o problema ainda é mais relevante uma vez que solos com níveis tóxicos de  $Al^{3+}$  ocorrem em mais de 50% do território (Olmos & Camargo, 1976). Dessa forma, um dos objetivos do melhoramento genético de trigo tem sido aumentar a tolerância ao alumínio tóxico ( $Al^{3+}$ ) visando incrementar a produção desse cereal através da expansão das fronteiras agrícolas.

Concentrações micromolares de  $Al^{3+}$  afetam o crescimento e desenvolvimento radicular, reduzindo a aquisição de água e nutrientes (Carver & Ownby, 1995; Kochian, 1995; Kochian et al., 2005), limitando significativamente a produtividade das culturas em solos ácidos. Práticas de calagem podem contornar os efeitos tóxicos do  $Al^{3+}$ , no entanto, são ineficientes por se limitarem às camadas superficiais do solo.

Portanto, a alternativa mais adequada para superar esse problema é a exploração da variabilidade genética existente para o desenvolvimento de cultivares tolerantes ao  $Al^{3+}$ , o que poderá contribuir efetivamente para o aumento da produtividade de muitas culturas através da expansão das fronteiras agrícolas (Carver & Ownby, 1995).

A elucidação das bases genéticas da tolerância ao  $Al^{3+}$  pode auxiliar na determinação das estratégias mais adequadas no melhoramento de cereais para esse caráter. Nesse sentido, a precisa localização genética e física de marcadores moleculares associados ao caráter, agregado a um polimorfismo detectável nessa região, pode ser valiosa estratégia para clonagem de genes (Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001), bem como para seleção assistida por marcadores moleculares (Milach, 1998).

A herança da tolerância ao  $Al^{3+}$  em cereais tem sido amplamente estudada, conforme demonstrado no Capítulo I e II. Em trigo, a herança da tolerância ao  $Al^{3+}$  tem sido alvo de muitos estudos e controvérsias. Alguns estudos indicam que a tolerância está sob controle monogênico (Somers & Gustafson, 1995; Luo &

Dvorák, 1996; Riede & Anderson, 1996; Somers et al., 1996) enquanto outros sugerem que múltiplos genes estejam controlando o caráter (Aniol & Gustafson, 1984; Camargo, 1984; Papernic et al., 2001).

Sugere-se que o braço longo do cromossomo 4D seja chave na tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo por conter os principais genes já identificados:  $Alt_{BH}$  no cultivar BH1146 (Riede & Anderson, 1996),  $Alt_2$  no cultivar Chinese Spring (Luo & Dvorák, 1996) e  $ALTM1$  no cultivar Atlas 66 (Raman et al., 2005).

Marcadores moleculares associados a genes que conferem tolerância ao  $Al^{3+}$  já foram identificados em várias espécies (Ma et al., 2000; Tang et al., 2000; Miftahudin et al., 2002; Miftahudin et al., 2004; Matos et al., 2005; Miftahudin et al., 2005).

Para o trigo, o marcador RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)  $Xbcd1230$  foi identificado a 1,1 cM do gene  $Alt_{BH}$  e explicou 85% da variação fenotípica para tolerância ao  $Al^{3+}$  em BH1146 (Riede & Anderson, 1996). Em outro estudo, Rodriguez-Milla & Gustafson (2001) demonstraram que esse gene está localizado num intervalo de 5,9 cM delimitado pelos marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*)  $Xgdm125$  e  $Xprs914$ . No cultivar Atlas 66, um QTL (*Quantitative Trait Loci*) que responde por 50% da variação fenotípica foi mapeado na região distal do cromossomo 4DL, estando flanqueado pelos marcadores SSR  $Xgdm125$  e  $Xprs914$  (Ma et al., 2005).

Os principais genes envolvidos na tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo têm sido identificados usando cultivares brasileiros ( $Alt_{BH}$  de BH1146) ou de origem brasileira ( $ALMT1$  de Atlas 66 (Fronoso//Redhart3/Noll)), sendo esse germoplasma reconhecido mundialmente pela sua importância como fonte de novos genes.

Os objetivos desse trabalho foram identificar e disponibilizar marcadores moleculares associados aos genes que conferem tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi, mapear esses genes no genoma de trigo e investigar as relações genéticas entre os diferentes genes para tolerância ao  $Al^{3+}$  em cereais.

## 2 Material e Métodos

### 2.1 Material Vegetal e Avaliação para Tolerância ao Al<sup>3+</sup>

Uma população de 124 linhagens recombinantes (RILs – *Recombinant Inbred Lines*) derivadas do cruzamento entre Toropi (Al-tolerante) x Anahuac (Al-sensível) foi utilizada para fenotipagem quanto à tolerância ao Al<sup>3+</sup> (Capítulo II). A população para o mapeamento consistiu de 90 linhagens escolhidas ao acaso entre as 124 RILs. Linhagens nulitetrassômicas e ditelossômicas de Chinese Spring, da coleção do John Innes Center e do USDA-Sears, respectivamente, foram utilizadas para verificar a localização cromossômica dos marcadores selecionados. A avaliação para tolerância ao Al<sup>3+</sup> foi realizada conforme descrito no Capítulo II (Item 2.2).

### 2.2 Extração de DNA

O DNA da população de mapeamento foi isolado de coleótilos de plantas individuais de cada RIL selecionada. Os coleótilos foram macerados em nitrogênio líquido e mantidos a -20°C até o momento da extração do DNA. O protocolo utilizado para a extração do DNA foi o proposto por Murray & Thompson (1980), sendo o DNA posteriormente diluído para 250 ng  $\mu\text{l}^{-1}$  e para 20 ng  $\mu\text{l}^{-1}$ .

Para mapeamento da tolerância ao Al<sup>3+</sup> de Toropi foram utilizadas três diferentes estratégias: 1- Conversão de Marcadores Moleculares e Desenvolvimento de Marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), 2- Análises de SSR e 3- Análises de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), cujas metodologias estão descritas separadamente.

### 2.3 Estratégia I: Conversão de marcadores e desenvolvimento de Marcadores SNPs

#### 2.3.1 Conversão de marcadores RFLP a marcadores STS

Marcadores do tipo RFLP *Xcdo1395*, *Xbcd1117* e *Xwg464* ligados à tolerância ao alumínio em espécies de cereais foram convertidos a marcadores STS (*Sequence Tagged Site*) para amplificação em PCR (Figura 1). As seqüências depositadas no *genebank* foram acessadas e a partir delas projetou-se primers através do aplicativo Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi->

bin/primer3/primer3\_www.cgi), conforme mostrado na Tabela 1. A síntese destes foi feita pela Invitrogen. Além destes, foi utilizado o marcador *STS1230*, previamente convertido a *Xbcd1230* (Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001).

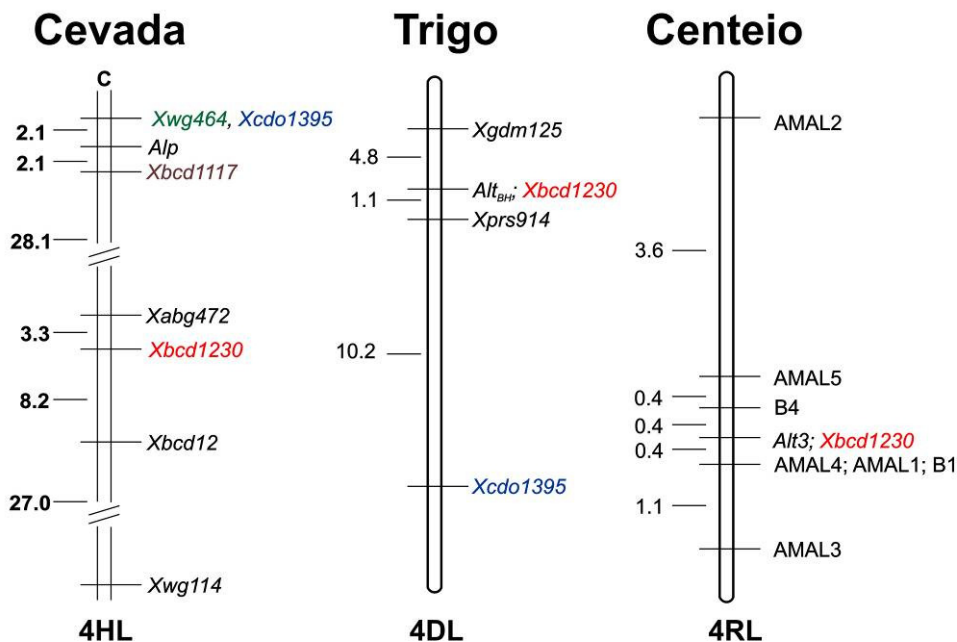


Figura 1. Mapas comparativos das regiões contendo genes de tolerância ao  $Al^{3+}$  entre trigo, cevada e centeio (modificado de Miftahudin et al., 2004). Em destaque, marcadores RFLP utilizados pra conversão.

A reação de amplificação seguiu concentrações ideais para enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen),  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTP 200  $\mu$ M, tampão da polimerase 1X, 1U de Taq DNA polimerase e 10  $\mu$ mol de cada primer em um volume final de 25  $\mu$ l. As amplificações foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc), com 40 ciclos de 94  $^{\circ}C$  por 1', 55  $^{\circ}C$  1', 72  $^{\circ}C$  2' e extensão final a 72  $^{\circ}C$  por 10'.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2%, tamponados com TBE 0,5 X, corados com brometo de etídio (8  $\mu$ l para 300 ml de gel), visualizados em transluminador UV. As imagens foram capturadas e digitalizadas através do aplicativo EDAS (Kodak Digital Science TM).



Tabela 1. Relação dos *primers* dos marcadores STS projetados a partir das seqüências depositadas dos marcadores RFLP *Xbcd1117*, *Xcdo1395*, *Xwg464* e *Xbcd1230*

<b>Primers</b>	<b>Seqüência</b>
STS1117-F	5' TGAAC TTGATGCCAGAATGC 3'
STS1117-R	5' TCCTGAATAAGGTCTTCATACCAA 3'
STS1395-F	5' CAGAAAGGCAGTGCTCCAAT 3'
STS1395-R	5' TTATCACGGGAAAGGGATCA 3'
STS464-F	5' AGTCCAAATGATGTCACAGG 3'
STS464-R	5' AGGACTGTGAAGGATGCTTACT 3'
STS1230-F <sup>1</sup>	5' GGAGCAAAGGCTGGAGTTGT 3'
STS1230-R <sup>1</sup>	5' TGCCCACCAAACCCAGGATT 3'

<sup>1</sup>(Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001).

Fragmentos amplificados monomórficos foram digeridos com enzimas de restrição visando a recuperação do polimorfismo e também seqüenciados para se projetar marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

### 2.3.2 Digestão com enzimas de restrição

Os fragmentos amplificados pelos marcadores STS nos progenitores foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição: EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, DraI e MseI. A digestão foi feita a 37°C por 2 h. Os fragmentos digeridos foram separados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo. O padrão de digestão foi avaliado nos progenitores e comparados quanto ao polimorfismo.

### 2.3.3 Desenvolvimento de SNPs

#### 2.3.3.1 Clonagem e Análise de Clones Positivos

Os fragmentos amplificados pelos marcadores STS nos progenitores foram clonados utilizando o produto de PCR diretamente da reação. Clonagens independentes por fragmento/marcador/progenitor foram realizadas e os fragmentos foram ligados no vetor pCR "2.1-TOPO" (Invitrogen). Em seguida, os vetores contendo os fragmentos foram inseridos em células competentes (*E. coli*, linhagem XL1) por choque térmico. As células foram crescidas por 16 h em placas de Petri contendo meio LB/agar com ampicilina (50 µg ml<sup>-1</sup>).

As análises dos clones positivos foram feitas por PCR, para qual foi preparada uma solução contendo os seguintes componentes: tampão para PCR (Tris HCl 20 mM, KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTP (0,8 mM) e *primer* reverso

(30 ng) (seqüência presente no vetor), *Taq* DNA polimerase (1 U), água ultra pura para completar um volume total de 20 µl. Com o auxílio de uma ponteira previamente esterilizada uma amostra da colônia a ser analisada foi colhida e misturada na solução para PCR. Foram selecionadas 10 colônias para cada fragmento/marcador/progenitor. O programa no termociclador consistiu de um passo inicial de 94°C por 10' para lise das células e inativação de nucleases, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1', 55°C por 1', 72°C por 1' e um passo final de 72°C por 10'. Após a PCR, as amostras foram migradas em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio. As imagens foram digitalizadas através do EDAS (Kodak Digital Science TM). Para o sequenciamento, foram selecionados os clones que apresentavam o tamanho de fragmento do progenitor mais o tamanho do vetor. A extração dos plasmídeos dos clones selecionados foi realizada utilizando o "Kit Purelink™ Quick Plasmid Miniprep" (Invitrogen) e o "Perfectprep Plasmid Mini Kit" (Eppendorf).

### 2.3.3.2 Seqüenciamento

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-molde (30 a 45 ng) foram marcados por PCR utilizando-se 3,2 pmol do *primer* M13 reverso e 2 µl do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µl. 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' seguida de 25 ciclos de 96°C por 10", 55°C por 5" e 60°C por 4'. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol 70%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µl de formamida, desnaturados a 95°C por 5', resfriados em gelo por 5' e eletroinjetados no seqüenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v.1.0.1* (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”.

### 2.3.3.3 Análises das seqüências e projeção de primers SNP

O seqüenciamento visou identificar variações nucleotídicas internas, do tipo inserções e deleções, existentes entre as seqüências amplificadas por Toropi e Anahuac, que não poderiam ser identificadas por eletroforese. A análise das seqüências foi feita utilizando ferramentas de bioinformática, como Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990), nas bases de dados de proteínas não redundantes do NCBI - *National Center Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para comparação das seqüências foi feito o alinhamento par a par, utilizando o programa CLC Workbench (<http://www.clcbio.com>). Os *primers* foram projetados manualmente, buscando ter a composição adequada para parear no DNA molde de Toropi e não parear em Anahuac. Como os *primers* focaram mudanças nucleotídicas específicas, foram denominados como *SNP1395 R*, *SNP1230 F* e *SNP1117 F*, sendo os *primers* complementares os respectivos STS (Tabela 2).

Os SNPs foram testados com a mesma reação de polimerase, tanto para a solução quanto para os ciclos de PCR, que os *primers* dos quais foram derivados (Item 2.3.1). Diversas combinações de temperaturas de pareamento e duração de ciclos foram testadas com o intuito de tornar a amplificação dos *primers* específica.

Tabela 2. Relação dos *primers* dos marcadores SNP projetados a partir das seqüências obtidas dos fragmentos amplificados em Toropi pelos marcadores *STS1117*, *STS1395* e *STS1230*

SNP/STS	Seqüência	Fragmento Esperado (pb)
SNP1117-F	5' AATTACACCATATCACATCAC 3'	130
STS1117-R	5' TCCTGAATAAGGTCTTCATACCAA 3'	
STS1395-F	5' CAGAAAGGCAGTGCTCCAAT 3'	345
SNP1395-R	5' GGAAAGGGATCACTGGGTGAT 3'	
SNP1230-F <sup>1</sup>	5' ATGCAGTAAACTTACTTGCA 3'	230
STS1230-R <sup>1</sup>	5' TGCCCACCAAACCCAGGATT 3'	

<sup>1</sup>(Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001).

Os fragmentos foram igualmente separados em gel 2%, TBE 0,5 X, corados com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador de UV e a imagem capturada pelo sistema da Kodak. O padrão de bandas foi comparado entre os progenitores para cada marcador buscando-se identificar polimorfismos. A partir da identificação de polimorfismo entre os genótipos parentais, avaliou-se a presença ou ausência da banda polimórfica na progênie.

#### **2.4 Estratégia II: Análises de SSR e STS**

Marcadores microssatélites previamente mapeados no cromossomo 4D incluindo *Xgdm34*, *Xgdm40*, *Xgdm61*, *Xgdm125*, *Xgdm129*, *Xgdm165*, *Xgdm194*, *Xgdm608*, *Xgdm609*, *Xwmc48*, *Xwmc52*, *Xwmc331*, *Xbarc48*, *Xbarc98*, *Xbarc105*, *Xbarc217*, *Xbarc225*, *Xbarc288*, *Xbarc308*, *Xbarc334*, *Xbarc1069*, *Xbarc1118*, *Xbarc1145* e *Xbarc1148* (Röder et al., 1998; Pestsova et al., 2000; Gupta et al., 2002; Song et al., 2005) foram testados nos progenitores para verificar a existência de polimorfismos. Os marcadores do tipo STS, *B1* e *B4*, associados ao gene *Alt3* de centeio (Miftahudin et al., 2002) e o marcador *STSALMT1*, projetado com base no gene que codifica um transportador de malato ativado por alumínio (Sasaki et al., 2004) também foram utilizados.

As reações de amplificação seguiram protocolos descritos em (Röder et al., 1998; Pestsova et al., 2000; Rodriguez-Milla and Gustafson, 2001; Gupta et al., 2002; Miftahudin et al., 2002; Sasaki et al., 2004; Song et al., 2005). Os fragmentos amplificados por marcadores SSR e STS foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3% e 2%, respectivamente, contendo tampão tris-ácido bórico-EDTA a 0,5 X (TBE), submetidos a voltagem de 120 V por 2 h. Os marcadores de peso molecular utilizados foram DNA ladder 100 pb (Invitrogen) e DNA ladder 123 pb (Amersham). A visualização dos padrões de bandas para identificação dos polimorfismos foi feita através da técnica de coloração com brometo de etídeo. A visualização dos géis foi feita em transiluminador de UV e a imagem capturada pelo sistema Kodak Digital Science.

Os fragmentos amplificados por marcadores SSR foram resolvidos também por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (19:1 – acrilamida:bisacrilamida), a 80 W, por aproximadamente 3 h. Foram aplicados 3,5 µl de cada amostra no gel,

as quais foram previamente desnaturadas a 94 °C por 10'. Além dos 90 indivíduos da população, foram aplicadas duas amostras dos dois genitores e duas amostras do marcador DNA ladder 100 pb (Invitrogen) a fim de permitir a posterior determinação do tamanho dos fragmentos separados no gel. A coloração dos géis para identificação das bandas polimórficas foi feita com nitrato de prata, seguindo o protocolo sugerido por "Silver Sequence™ Promega Corporation" (1996). A análise visual das bandas foi realizada em mesa com luz fluorescente por dois leitores independentemente.

#### **2.4.1 Identificação dos Marcadores SSR e os STS**

Os dados dos marcadores SSR, obtidos por interpretação visual das imagens captadas, foram codificados conforme descrito a seguir. O código A foi conferido quando o indivíduo segregante era igual ao genitor Toropi, ou seja, apresentou o mesmo alelo do genitor 1; o código B, quando o indivíduo era igual ao genitor Anahuac e o código H quando o indivíduo era heterozigoto, ou seja, apresentou um alelo de cada genitor. Os dados codificados foram, então, utilizados na análise de ligação e mapeamento.

### **2.5 Estratégia III: Análises de AFLP**

A técnica de AFLP seguiu o protocolo de Vos et al. (1995), com algumas adaptações, que estão descritas a seguir.

#### **2.5.1 Digestão do DNA genômico**

A digestão de 250 ng de DNA foi feita em duas etapas: digestão com uma enzima de corte freqüente (MseI) combinada com uma enzima de corte raro (PstI), sendo ambas enzimas da New England (Biolabs). O DNA foi digerido primeiramente com a enzima de corte freqüente por duas horas a 65°C e posteriormente com a enzima de corte raro, por duas horas a 37°C.

#### **2.5.2 Ligação de adaptadores e ligação ao DNA**

Adaptadores específicos senso e anti-senso (Mse 1.1 e 1.2; Pa 1.1 e 1.2) (Invitrogen) foram anelados a 65°C por 10', 37°C por 10' e 25°C por 10'. Os adaptadores ligados foram adicionados ao DNA digerido e ligados ao mesmo

tempo durante duas horas a temperatura ambiente, com auxílio da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen).

### **2.5.3 Pré-amplificação dos fragmentos de DNA**

Para uma seleção inicial de fragmentos foi utilizado o nucleotídeo seletivo A para o primer Pst1 e C para o primer Mse1, sendo denominados P + A e M + C, respectivamente. O DNA ligado foi pré-amplificado, em aparelho termociclador (MJ PTC100) durante 20 ciclos, a 94 °C por 30", 56 °C por 1' e 72 °C por 1' em uma solução de 37,5 ng de P + A primer; 37,5 ng de M + C primer; 0,8 mM dNTP; 1 X tampão da Taq DNA polimerase; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 U de Taq DNA polimerase. Após o término do programa, cada amostra foi diluída com água ultra pura estéril, na proporção 1:5 (DNA:água).

### **2.5.4 Amplificação seletiva dos fragmentos de DNA**

Os fragmentos amplificados na etapa anterior foram selecionados novamente a partir da amplificação com 40 combinações de primers Pst1/Mse1, contendo dois nucleotídeos arbitrários adicionais (Tabela 3).

A reação de amplificação seletiva foi realizada em termociclador, com ciclos de 94 °C por 60", 65 °C por 60" e 72 °C por 90", sendo que o passo de anelamento iniciou com 65 °C e diminuiu 1 °C sucessivamente até atingir 56 °C, seguindo nessa temperatura por 23 ciclos. O protocolo de reação de PCR foi o seguinte: 30 ng de primer Pst1; 30 ng de primer Mse1; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,8 mM dNTP; 1 X tampão da Taq DNA polimerase. Ao final do processo de amplificação seletiva foram adicionados a cada amostra 20 ml da solução de uréia (8 M) acrescida de 0,025% de xileno cianol, 0,025% de azul de bromofenol e 0,04% de orange G. Fragmentos amplificados foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida 5%, conforme descrito no Item 2.4.

### **2.5.5 Identificação dos Marcadores AFLP**

A partir da identificação de polimorfismo entre os genótipos parentais, avaliou-se a presença ou ausência da banda polimórfica na progênie. Os dados foram analisados como presença (1) ou ausência (0) de bandas e foram transformados por códigos A, B, C e D, adequados ao programa.

O código A foi conferido aos indivíduos segregantes semelhantes ao genitor 1 (P1), quando o mesmo apresentou ausência de banda (A=P1=0). Os demais códigos foram estabelecidos da seguinte forma: B=P2=0, D=P1=1 e C=P2=1.

Para nomenclatura dos marcadores utilizou-se a letra P, indicando a enzima Pst1, seguido dos nucleotídeos seletivos do *primer*. Logo após utilizou-se a letra M, indicando a enzima Mse1, também seguido dos nucleotídeos do *primer*. O número apresentado no final do nome de cada marcador indica o tamanho aproximado do fragmento obtido, como por exemplo, PcgMta464.

Tabela 3. Combinações de *primers* Pst1/Mst1 utilizadas para amplificação seletiva seguindo o protocolo de AFLP, para mapeamento da população de linhagens recombinantes F<sub>7</sub> Toropi x Anahuac

Reação	Primer Pst1 (P+A)	Primer Mse1 (M+C)	Reação	Primer Pst1 (P+A)	Primer Mse1 (M+C)
1	AC	GC	21	AG	TC
2	CA	GG	22	AG	TT
3	AT	CC	23	TT	GA
4	GT	CA	24	AA	AC
5	AA	TT	25	AA	GA
6	TT	TT	26	TT	TG
7	AC	GA	27	TC	CG
8	TC	TA	28	AG	CC
9	AA	TA	29	CC	GG
10	AA	CG	30	AA	TC
11	AG	GA	31	GA	TG
12	CA	TA	32	AT	TT
13	TC	TG	33	GG	AG
14	CA	TC	34	GG	TG
15	GA	CG	35	CC	CC
16	GA	AG	36	TA	GC
17	CA	CT	37	AA	AG
18	GA	CT	38	TG	TC
19	GA	AC	39	CC	GA
20	CA	CC	40	TT	TC

## 2.6 Análises de Ligação

Os marcadores SSR, SNP e STS polimórficos entre Toropi e Anahuac foram avaliados na população segregante. As associações de ligação e as distâncias entre os marcadores e o gene de tolerância ao Al<sup>3+</sup> foram estimadas pelo programa estatístico Linkage (Suiter et al., 1983).

## **2.7 Construção do mapa genético**

Para a identificação dos grupos de ligação com base nos marcadores de SSR, STS e AFLP as frequências de recombinação foram calculadas usando o programa Mapmaker/Exp 3.0 (Lander et al., 1987) e convertidas em centiMorgans (cM) usando a função Kosambi de mapeamento (Kosambi, 1944).

## **2.8 Detecção de QTLs para as características fenotípicas**

Após a construção do mapa, os marcadores efetivamente integrados ao mapa foram submetidos à análise de mapeamento por intervalo simples e composto para identificação de quais deles estão associados à tolerância ao Al<sup>3+</sup> através do programa Windows QTL Cartographer v. 2.5 (Wang et al., 2006). O nível de significância de LOD para detectar o QTL foi de 2,5.

## **2.9 Mapeamento físico dos marcadores**

Para confirmação da localização dos marcadores SSRs associados ao gene de tolerância ao Al<sup>3+</sup> em Toropi foram utilizadas linhagens nulitetrassômicas de Chinese Spring para os cromossomos 4D (CSN4DT4B) e 6B (CSN6BT6D) e linhagens ditelossômicas para o braço curto (CS4DS) e longo (CS4DL) do cromossomo 4D. Para mapeamento dos QTLs no genoma do trigo foram utilizadas linhagens nulitetrassômicas apresentadas na Tabela 4. As reações de amplificação para os marcadores associados ao gene de tolerância ao Al<sup>3+</sup> foram repetidas utilizando DNA das linhagens nulitetrassômicas. Os fragmentos amplificados foram resolvidos em gel de agarose para marcadores SSR e em gel de poliacrilamida para os marcadores AFLP. A localização do fragmento amplificado nas linhagens nulitetrassômicas foi feita com base na ausência do fragmento.



Tabela 4. Linhagens nulitetrassômicas de *Chinese Spring* utilizadas para o mapeamento físico dos marcadores no genoma do trigo

<b>Cromossomo</b>	<b>Linhagem Nulitetrassômica</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Linhagem Nulitetrassômica</b>
1A	N1AT1D	4D	N4DT4B
1B	N1BT1D	5A	N5AT5D
1D	N1DT1B	5B	N5BT5D
2B	N2BT2D	5D	N5DT5B
2D	N2DT2B	6A	N6AT6D
3A	N3AT2D	6B	N6BT6D
3B	N3BT3D	7A	N7AT7D
3D	N3DT3B	7B	N7BT7D
4A	N4AT4D	7D	N7DT7B

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Conversão de Marcadores

A conversão de marcadores RFLP *Xcdo1395*, *Xbcd1117* e *Xwg464* a STS mostrou-se eficiente para o caso em estudo. O tamanho dos fragmentos amplificados por PCR para os marcadores *STS1230* e *STS1117* foi de 780 pb e 150 pb, respectivamente. Já para o marcador *STS1395* dois fragmentos de 178 pb e 355 pb foram obtidos, em ambos os progenitores (Figura 2). A amplificação demonstra a grande conservação nestes locos entre trigo e as espécies de origem da sonda (*BCD1230* e *BCD1117* de cevada; *CDO1395* de aveia). No entanto, todos eles apresentaram padrão de bandas monomórfico entre os progenitores. O marcador *XWG464* não apresentou consistência de amplificação para os progenitores mostrando em gel arraste que não permitia identificar o tamanho exato da banda.

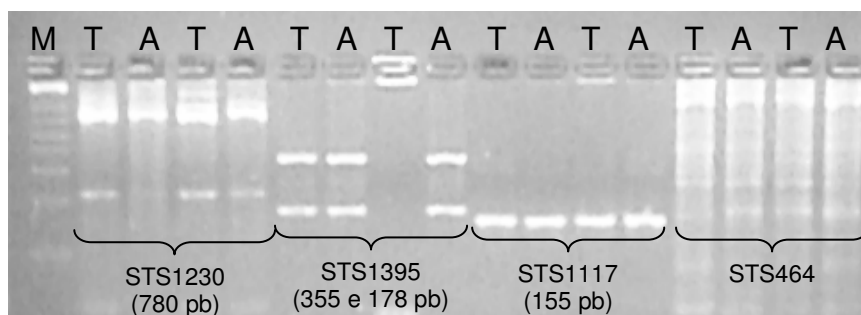


Figura 2. Perfil eletroforético dos marcadores STS nos progenitores resolvidos em gel de agarose 2%. (T- Toropi, A- Anahuac, M- Marcador 100 pb).

Todos os marcadores moleculares STS mostraram-se presentes no genoma do trigo, mas sem variações entre os pais tolerante e sensível. Rodriguez-Milla & Gustafson (2001) também verificaram a perda do polimorfismo entre BH1146 e Anahuac ao converter o marcador RFLP *XBCD1230* a marcador STS.

Ferreira & Grattapaglia (1998) afirmaram que uma característica comum a todos os tipos de conversão de marcadores RFLP para PCR é a redução do polimorfismo genético. Nesse processo, o polimorfismo em cada loco convertido passa a depender essencialmente de variações no comprimento do fragmento

amplificado, ou seja, exclusivamente de eventos de inserções e/ou deleções na região coberta pela PCR.

No caso do trigo, a ausência de polimorfismo pode ser explicada pelos baixos níveis de variação nas seqüências de DNA. Bryan et al. (1999) converteram sondas de RFLP de trigo a marcadores STS e sequenciaram os produtos de PCR. A análise das seqüências demonstrou baixa taxa de polimorfismo de nucleotídeo, aproximadamente 1 nucleotídeo polimórfico a cada 1000 pb.

Um outro fator responsável pela redução do polimorfismo é o fato das sondas RFLP serem preferencialmente selecionadas para regiões de cópia única ou de baixo número de cópias (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Por exemplo, o uso de clones de cDNA concentra as sondas em regiões transcritas do genoma, logo, não incluem introns, que são importante fonte de polimorfismo molecular devido à menor pressão evolutiva atuando nessas regiões.

Uma das formas de recuperar o polimorfismo em marcadores convertidos é clivar os fragmentos amplificados com enzimas de restrição. Busca-se desta forma identificar variações em sítios de restrição principalmente por mutações de ponto (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Especificamente no caso do trigo, devido ao baixo nível de polimorfismo e o alto grau de homologia entre os três genomas, se faz necessário a digestão dos produtos de PCR com um grande número de enzimas de restrição para encontrar polimorfismos, se eles existirem (Konieczny & Ausbel, 1993).

### **3.2 Recuperando Polimorfismos: clivagem com enzimas de restrição**

Os fragmentos amplificados pelos marcadores STS foram clivados com as enzimas de restrição EcoRI, EcoRV, HindIII, PstI, DraI e MseI. O padrão de clivagem foi igual entre os progenitores evidenciando que não há variação nos sítios de restrição dessas enzimas nos fragmentos amplificados, como pode ser visto para digestão com a enzima MseI (Figura 3).



Figura 3. Perfil de digestão dos fragmentos amplificados por PCR para os marcadores STS, após restrição com a enzima *MseI*, resolvidos em gel de agarose 2% (T: Toropi, A: Anahuac, M. marcador 100 pb).

Enzimas de restrição têm sido utilizadas com bastante sucesso para recuperação de polimorfismo em marcadores convertidos (Shah et al., 2000; Weiland & Yu, 2003; Ma et al., 2004; Miftahudin et al., 2004; Piao et al., 2004; Avila et al., 2006; Saka et al., 2006; Xiang et al., 2006). No entanto, essa estratégia não foi eficiente para os marcadores convertidos para tolerância ao  $Al^{3+}$  ou por não haver realmente diferenças nos sítios de restrição dessas enzimas ou pelo pequeno número de enzimas testadas, o que limita as chances de se encontrar tais variações.

Uma outra hipótese é de que existem variações pequenas demais para serem identificadas por eletroforese e dessas não ocorrerem nos sítios das enzimas testadas, podendo estar relacionadas com variações nucleotídicas nessas seqüências e podendo ser alvo para projeção de *primers* para marcadores SNPs.

### 3.3 Desenvolvimento de Marcadores SNP

O seqüenciamento dos fragmentos amplificados por PCR para os marcadores *STS1117*, *STS1395* e *STS1230* permitiu comprovar esta hipótese através da detecção de variações pequenas entre os fragmentos amplificados por Toropi e Anahuac, conforme pode ser visualizado nas Figuras 4 a 6.

Pequenas variações do tipo inserções, deleções e substituições de bases foram encontradas nas seqüências amplificadas pelos marcadores STS, sendo as substituições de bases a variação mais comum. As análises de Blast dessas seqüências mostraram que as seqüências amplificadas pelos *STS1117* e *STS1395* apresentaram similaridade com a seqüência de origem da sonda, indicando o alto grau de conservação da seqüência entre trigo, cevada e aveia. O mesmo não foi visto para a seqüência amplificada pelo marcador *STS1230*.

Um mapa de restrição foi gerado para cada fragmento. Detectou-se a presença de um sítio para a enzima AflIII na seqüência do fragmento amplificado pelo *STS1117* em Toropi e um sítio para DraIII no fragmento amplificado pelo *STS1395*. No entanto, pelo custo elevado dessas enzimas, que inviabiliza seu emprego rotineiro na seleção assistida por marcadores, a alternativa mais adequada torna-se projetar *primers* específicos para as variações nucleotídicas.

Com base nestas pequenas diferenças, novos *primers* para marcadores SNPs derivados dos marcadores *STS1395*, *STS1117* e *STS1230* foram projetados, como pode ser visto nas Figuras 4 a 6. Para o marcador *STS1395* foi selecionado o fragmento de 356 pb.

Segundo Rafalski (2002), marcadores SNPs representam a base da maioria das diferenças entre os alelos e são uma ferramenta atrativa a ser utilizada na seleção assistida no melhoramento. A característica mais atrativa dos SNPs é que eles permitem acessar diferenças na seqüência dos genes responsáveis por determinadas características, surgindo como uma alternativa promissora para driblar o problema central do melhoramento de plantas: a precisão de seleção para caracteres desejáveis (Thro et al., 2004).

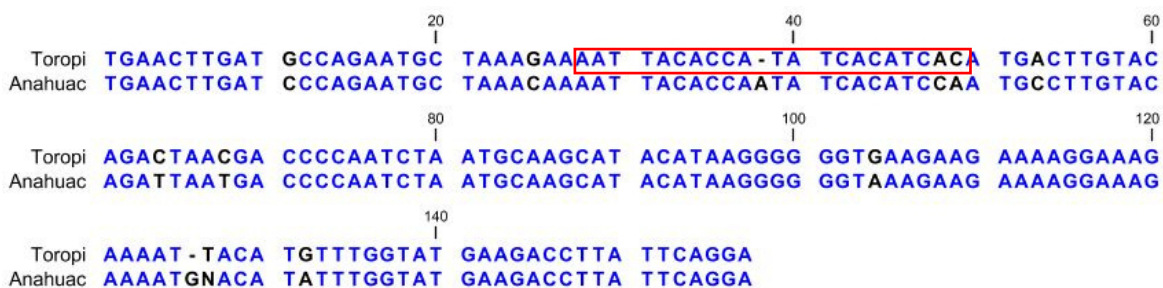


Figura 4. Alinhamento das seqüências amplificadas pelo marcador *STS1117* em Toropi e Anahuac, em preto, as variações nucleotídicas. No retângulo, a seqüência utilizada para projeção do primer *SNP1117*.

		20		40		60
TOROPI	TTATCACG	GG	AAAGGGATCA	CTGGGTGAT	CACCACTGCC	TGGGATAGTT
ANAHUAC	TTATCACGGG	AAAGGGATCA	CTGGTTGCCT	CACCACTGCC	TGGGATAGTT	TCAAGCCGTG
		80		100		120
TOROPI	AAGCCATAGA	CTCCAGTTCT	TGTTTAATTT	GCATTTGAAA	CCGAAGAACT	GCAAGTTTGC
ANAHUAC	AAGCCATAGA	CTCCAGTTCT	TGTTTAATTT	GCATTTGAAA	CCGAAGCACT	GCAAGTTTGC
		140		160		180
TOROPI	CTTCAAGTAG	ATCCACTGTA	CTACTGTCAA	TAGGATTTCT	CGACGAATCG	GCAGCAATGC
ANAHUAC	CTTCAAGTAG	ATCCACTGTA	CTACTGTCAA	TAGGATTTCT	CGACGAATCG	GCAGCAATGC
		200		220		240
TOROPI	CTGCACTTTT	AGCCTGTAGC	ACAGCATTGC	TCAGATATTG	ATACCTGGAT	TCCAAAGTTA
ANAHUAC	CTGCACTTTT	AGCCTGTAGC	ACAGCATTGC	TCAGATATTG	ATACCTGGAT	TCCAAAGTTA
		260		280		300
TOROPI	GGTGTTAATA	GATACAACAC	ATGGACATAC	GGAGGTAAAG	AAAAGAAGCA	GAACAAAATG
ANAHUAC	GGTGTTAATA	GATACAACAC	ATGGACATAC	GGAGGTAAAG	AAAAGAAGCA	GAACAAAATG
		320		340		
TOROPI	TGGAGACCTC	TGGTCAAGAG	CAGGAGCTTC	TTCGGCATTG	GAGCACTGCC	TTTCTG
ANAHUAC	TGGAGACCTC	TGGTCAAGAG	CAGGAGCTTC	TTCGGCATTG	GAGCACTGCC	TTTCTG

Figura 5. Alinhamento das seqüências amplificadas pelo marcador *STS1395* em Toropi e Anahuac, em preto, as variações nucleotídicas. No retângulo, a seqüência utilizada para projeção do primer *SNP1395*.



		20		40		60
TOROPI	TGCCACCAA	ACCCAGGATT	GACTGAC <b>N</b> TT	CCTCAATACC	AGATCAACAG	CTGCACAGGC
ANAHUAC	TGCCACCAA	ACCCAGGATT	GACTGAC - TT	ACTCAATACC	AGATCAACAG	CTGCACAGGC
		80		100		120
TOROPI	AAACAAATGC	AATAGCTTGT	CAGCTGTCAG	TACATGGTGA	ATGCTCAAGA	TAATCATGAA
ANAHUAC	AAACAAATGC	AATAGCTTGT	CAGCTGTCAG	TACATGGTGA	ATGCTCAAGA	TAATCATGAA
		140		160		180
TOROPI	AGATGATATA	TGTCTTGTTT	AGTCTAGTTA	TAAACTACAG	ACATGTTTAC	TTGTCGAGCG
ANAHUAC	AGATGATATA	TGTCTTGTTT	AGTCTAGTTA	TAAACTACAG	ACATGTTTAC	TTGTCGAGCG
		200		220		240
TOROPI	TAAGACACAG	TTAGAAA <b>TGC</b>	AACTAAGTTT	TACTGCAATT	AGTCTTATCC	AAGGCAGAGT
ANAHUAC	TAAGACACAG	TTAGAAACGT	AACTAAGTTT	TACTGCAATT	AGTCTTATCC	AAGGCAGAAT
		260		280		300
TOROPI	ACCGTTACAT	GGAAATAAGT	AAAAAAGGTG	CAGAGTCTAT	GTTACACCAA	GAAAGCCTTG
ANAHUAC	ACCGTTACAT	GGAAATAAGT	AAAAAAGGTG	CAGAGTCTAT	GTTACACTAA	GAAAGCCTTG
		320		340		360
TOROPI	GAACTTTCAC	TTTGAATCCC	GTTAATTAAT	CTTATCCAAG	GAACACCATG	TGAGTACATG
ANAHUAC	GAACTTTCAC	TTTGAATCCC	GTTAATTAAT	CTTATCCAAG	GAACACCATG	TGAGTACATG
		380		400		420
TOROPI	TGGATAGTCA	AGTAAGTCGA	GATGATCATG	TAGTGAAAAT	TGTCACAAAT	TCCCACCAGA
ANAHUAC	TGGATAGTCA	AGTAAGTCGA	GATGATCATG	TAGTGAAAAT	TGTCACAAAT	TCCCACCAGA
		440		460		480
TOROPI	AGCAGTACAA	GTTTCATCTT	AACTAGAACG	CTAGCTATAC	TTATACCTAT	GCTGATAAAA
ANAHUAC	AGCAGTACAA	GTTTCATCTT	AACTAGAACG	CTAGCTATAC	TTATACCTAT	GCTGATAAAA
		500		520		540
TOROPI	GAAAACCATG	ATGAGTA <b>AGC</b>	TAAATAGTAC	GAGTGACTAG	CCCGATCTAC	AGAATCACAT
ANAHUAC	GAAAACCATG	ATGAGTA - GC	TAAATAGTAC	GAGTGACTAG	CCCGATCTAC	AGAATCACAT
		560		580		600
TOROPI	ACATATTCTG	ATTAGGTTTT	GTGCTTCTTC	CAACACCAAT	<b>C</b> NTTTCGTGA	GTCACCATTT
ANAHUAC	ACATATTCTG	ATTAGGTTTT	GTGCTTCTTC	CAACACCAAT	C - TTTTCGTGA	GTCACCATTT
		620		640		660
TOROPI	TAGTGTTAA -	TACTAATCTA	GTACCATCCA	TTGATTTTCC	AAACATTA - G	CACATCCCGA
ANAHUAC	TAGTGTTAAA	TACTAATCTA	GTACCATCAA	TTGATTTTCC	AAACATTAAG	CACATCCCGA
		680		700		720
TOROPI	GATACCATC -	GTTATGTAGA	GAGGAAGAAT	TNNTANTTCA	AGTNCATATT	CTNTCGCACT
ANAHUAC	GATACCATCA	GTAATGTAGA	GAGAAGAATT	CTTACATTCA	AGTACATATT	CTATCGCACT
		740		760		780
TOROPI	GAAG <b>N</b> GGGG -	TCCCAGGGGT	NAAAANCACC	TCCGCCTTTT	GCT - CCANGG	GCNANTTCNG
ANAHUAC	GGGG <b>N</b> GGGGG	NCCCAGGGTT	CAAAACAAC	CCAGCCTTTT	GCC <b>N</b> CCAGGG	GCGAANTNCA
TOROPI	CCCA - - - - -	- - - - - C				
ANAHUAC	GCNNACTGGG	GGGGC				

Figura 6. Alinhamento das seqüências amplificadas pelo marcador *STS1230* em Toropi e Anahuac, em preto, as variações nucleotídicas. No retângulo, a seqüência utilizada para projeção do primer *SNP1230*.

Diversos trabalhos na literatura apontam com sucesso o desenvolvimento e utilização de marcadores SNPs para identificação de características desejáveis (Hayashi et al., 2004; Tirka et al., 2004; Beales et al., 2005; Rostoks et al., 2005; Bundock et al., 2006; Konishi et al., 2006; Xiang et al., 2006).

Após a identificação dos SNPs e a projeção dos *primers*, o passo crucial para se detectar o polimorfismo é estabelecer as condições ideais da PCR no que refere a temperatura de pareamento (TP) e número de ciclos (NC). Diversas combinações de TP e NC foram testadas, sendo que quando se aumentava muito a TP, perdia-se totalmente a geração de amplificação, ao passo que uma temperatura imediatamente mais baixa gerava fragmentos para todos os acessos.

Polimorfismo entre os progenitores somente foi obtido para o marcador *SNP1230*, com TP de 52°C e 35 ciclos, conforme pode ser visto na Figura 7. Para os marcadores *SNP1117* e *SNP1395* não foram obtidos polimorfismos entre os progenitores. Apesar de mais remota, uma possibilidade é que os SNPs detectados para *STS1395* e *STS1117* poderiam ser artefatos de seqüenciamento, embora cada clone tenha sido seqüenciado duas vezes, tendo nos dois casos obtido-se o mesmo resultado. Bryan et al. (1999) sugerem que erros de seqüenciamento são fatores significativos para geração de artefatos, sendo necessário o seqüenciamento de um fragmento várias vezes para se confirmar verdadeiras variações nucleotídicas, principalmente devido ao baixo nível de polimorfismo nas seqüências de DNA em trigo.

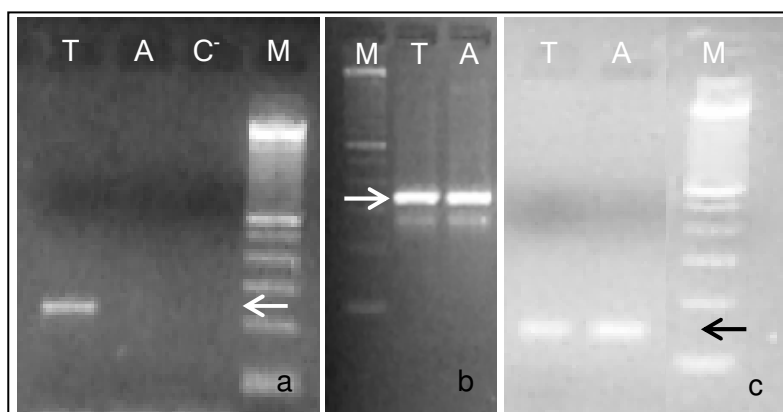


Figura 7. Perfil eletroforético dos fragmentos amplificados por PCR para os marcadores SNPs em a) fragmento de 230 pb do *SNP1230*, b) fragmento de 356 pb amplificado do *SNP1395* e c) fragmento de 150 pb do *SNP1117*. (T-Toropi, A - Anahuac e M - Marcador 100 bp).

Após a detecção do polimorfismo entre Toropi e Anahuac, a reação de amplificação foi realizada com toda população segregante para verificar a ligação com o gene de tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi. Foram avaliados quanto à presença



e ausência bem como a intensidade de fragmentos amplificados nas linhagens da população segregante, no entanto, nenhuma associação/ligação foi verificada.

### **3.4 Conversão de Marcadores: uma estratégia que vale a pena?**

Recente progresso na área de biologia molecular e genômica vegetal têm potencial para iniciar uma nova revolução verde (Dubcovsky, 2004), no entanto, é necessário que essa informação seja acessível aos melhoristas e essas descobertas sejam incorporadas em novos cultivares para alcançar seu potencial.

Segundo Dubcovsky (2004) a biotecnologia tem fornecido uma ferramenta adicional que não requer o uso de plantas transgênicas para revolucionar o melhoramento de plantas. Progresso na genética molecular tem resultado no desenvolvimento de marcas de DNA, que podem ser eficientemente usadas na seleção assistida por marcadores moleculares (SAMM) para desenvolvimento de cultivares (Paterson et al., 1991).

O sucesso do uso da SAMM requer marcadores ligados a características de interesse e que esses marcadores sejam de fácil utilização na rotina de programas de melhoramento. No entanto, marcadores mais elaborados como RFLP e AFLP são comumente descritos como ligados a características de interesse.

Nesse sentido, a conversão de marcadores moleculares é uma alternativa promissora para utilização desses marcadores em programas de melhoramento, principalmente para características grandemente influenciadas pelo ambiente (quantitativas). Diversos trabalhos na literatura relatam com sucesso a conversão de marcadores RFLP e AFLP em marcadores PCR-específicos (Lee & Penner, 1997; Bradeen & Simon, 1998; Parker & Langridge, 2000; Meksen et al., 2001; Murray et al., 2002; Inoue & Cai, 2004; Radisek et al., 2004; Xu & Ban, 2004; Matsui et al., 2004; Feng et al., 2005).

Em trigo, a maioria dos casos citados envolve a conversão de marcadores RFLP ligados a genes de resistência à doenças. Helguera et al. (2000) desenvolveram marcadores PCR específicos para o gene *Lr47* da ferrugem da folha em trigo com base na seqüência do marcador RFLP *Xabc465* ligado a esse gene. Os autores apontam que esse novo marcador facilitará a transferência do

gene *Lr47* para variedades comerciais, uma vez que exige menos DNA, é tecnicamente mais fácil e rápido de executar e tem um menor custo. Da-Silva (2002) converteu marcadores AFLP ligados à ferrugem da folha em trigo em marcadores PCR-específicos, *Trp-1*, e aponta que esse marcador possibilitará aos melhoristas o acompanhamento deste gene em cruzamentos de trigo. Xu & Ban (2004) converteram marcadores AFLP associados à resistência a fusarium em trigo a marcadores PCR específicos, podendo estes ser amplamente utilizados na SAMM. Ma et al. (2004b) desenvolveram marcadores baseados em PCR para o gene *Pm4a*, que confere resistência ao oídio em trigo, que podem ser uma opção mais econômica para SAMM para *Pm4a*.

A conversão de marcadores associados a genes que conferem tolerância ao  $Al^{3+}$  somente foi relatada em dois casos. Nesse trabalho, a conversão de marcadores RFLP a STS foi eficiente, porém, a ausência de polimorfismo restringe o seu uso na SAMM para tolerância ao  $Al^{3+}$ , na população em estudo. Esses dados são consistentes com o observado por Rodriguez-Milla & Gustafson (2001), Raman et al. (2005) e Ma et al. (2005). Rodriguez-Milla & Gustafson (2001) ao converterem o marcador RFLP *XBCD1230* a marcador *STS1230*, também relataram a perda do polimorfismo existente entre o genótipo BH1146 (tolerante) e Anahuac (sensível) após a conversão. No entanto, o mesmo marcador foi utilizado para amplificação em cevada, centeio, *Triticum tauschii* e arroz. A exceção de arroz, todos os outros apresentaram o mesmo fragmento ( $\pm 800$  pb) de BH1146 e Anahuac. Em arroz foi amplificado um fragmento de 664 pb, presente no cromossomo 3 que é sintênico ao grupo 4 de trigo. Esse fato abre a possibilidade de utilizar esse marcador para clonagem baseada em mapa, especialmente através do *screening* em bibliotecas de grandes insertos de espécies diplóides como centeio, arroz, cevada ou *T. tauschii* (Weng et al., 2000). Raman et al. (2005) ao utilizarem o marcador *STS1230* em cinco populações duplo-haplóides de trigo também não observaram polimorfismo. Ma et al. (2005) ao testarem o mesmo marcador na população de RILs derivada do cruzamento de Atlas 66 x Century também não detectaram polimorfismo.

Marcadores PCR específicos, *B1* e *B4*, foram desenvolvidos para o gene *Alt<sub>3</sub>* de centeio (Miftahudin et al., 2004). Esses marcadores estão flanqueando a

uma distância de aproximada de 0,4 cM de cada lado do gene *Alt<sub>3</sub>* e segundo os autores podem ser utilizados para facilitar o mapeamento de alta resolução do gene. Além disso, podem ser utilizados para seleção assistida em programas de melhoramento de centeio ou trigo para obter linhagens ou cultivares tolerantes ao  $Al^{3+}$ .

Apesar dos casos de sucesso de conversão de marcadores em trigo, Bryan et al. (1999) sugerem que os custos para conversão de RFLP a marcadores PCR específicos para trigo necessitam ser considerados caso a caso. Ferreira & Grattapaglia (1998) afirmam que o polimorfismo em cada loco convertido passa a depender essencialmente de variações no comprimento do fragmento amplificado, ou seja, exclusivamente de eventos de inserções e/ou deleções na região coberta pela PCR. Logo, como em trigo o número de eventos mutacionais é muito baixo (Bryan et al., 1999), levando a uma baixa taxa de polimorfismo em seqüências de DNA, questiona-se a utilidade da conversão de marcadores para detecção rotineira de polimorfismo em trigo (Penner et al., 1995).

Uma estratégia seria converter clones de RFLP genômicos, que podem gerar mais polimorfismos que clones de cDNA, devido a presença de introns que, como já discutido, apresentam altas taxas de rearranjo devido a menor pressão de seleção.

Mesmo que nem todos marcadores convertidos possam ser utilizados diretamente na SAMM em programas de melhoramento para uma determinada característica, a riqueza de informações que a conversão pode gerar já é de grande utilidade. Por exemplo, a conversão de marcadores ligados à características de interesse para utilização em outros cultivares permite inferir sobre as relações genéticas entre o cultivar de origem e o cultivar em estudo, sendo que o mesmo se aplica para se investigar as relações interespecíficas.

Além disso, marcadores convertidos podem ser testados quanto à ligação com outras características no programa de melhoramento. Limberger (2006) com base no marcador *STS1117*, projetou um marcador *SNP1117* para aveia, para mapear genes para tolerância ao  $Al^{3+}$ , no entanto, o marcador mostrou-se associado ao rendimento, podendo ser utilizado para seleção para essa característica em programas de melhoramento de aveia. Logo, os marcadores

convertidos podem ser testados quanto a ligação com outras características de interesse em programas de melhoramento de trigo, como, por exemplo, germinação na espiga, qualidade, eficiência no uso de fósforo nesta população e, até mesmo, para a tolerância ao  $Al^{3+}$  em outras populações que segreguem para essa característica.

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. 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. 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 & Gale, 2000). Baseado na existência da sintenia é possível usar dados de espécies filogeneticamente próximas para encurtar o tempo e o trabalho no desenvolvimento destes marcadores.

### **3.5 Mapeamento**

#### **3.5.1 Análises de SSR e STS**

Vinte e quatro marcadores SSRs e 3 marcadores STS foram testados nos progenitores para verificar existência de polimorfismos. Destes, somente 5 marcadores SSRs (*Xgdm129*, *Xbarc105*, *Xbarc288*, *Xbarc334* e *Xbarc1118*) e 1 marcador STS (*B4*) apresentaram polimorfismos consistentes entre Toropi e Anahuac, sendo utilizados para amplificação na população segregante. Os marcadores *Xgdm129*, *Xbarc334* e *Xbarc1118* não apresentaram polimorfismo em agarose, somente em poliacrilamida, conforme pode ser visto na Figura 8 para o marcador *Xgdm129*. As Figuras 9 e 10 apresentam os perfis eletroforéticos dos marcadores *Xbarc105* e *Xbarc288*, respectivamente, sendo que *Xbarc105* apresenta polimorfismo de tamanho e *Xbarc288* apresenta polimorfismo de presença e ausência.

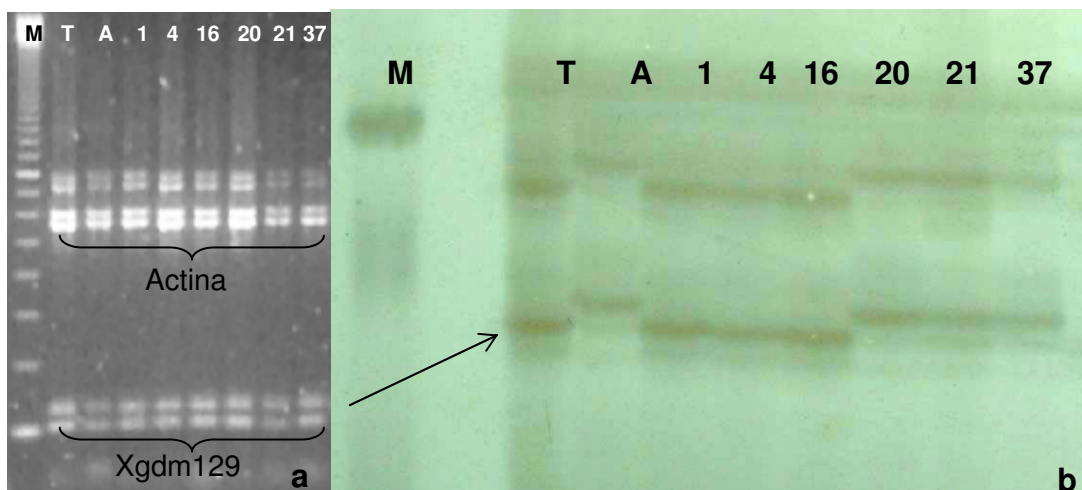


Figura 8. Perfil eletroforético do marcador *Xgdm129* em agarose (a) e em poliácridamida (b). Toropi (T), Anahuac (A), RILs tolerantes (1,4,16) e RILs sensíveis (20,21,37). (Marcador 100 bp).

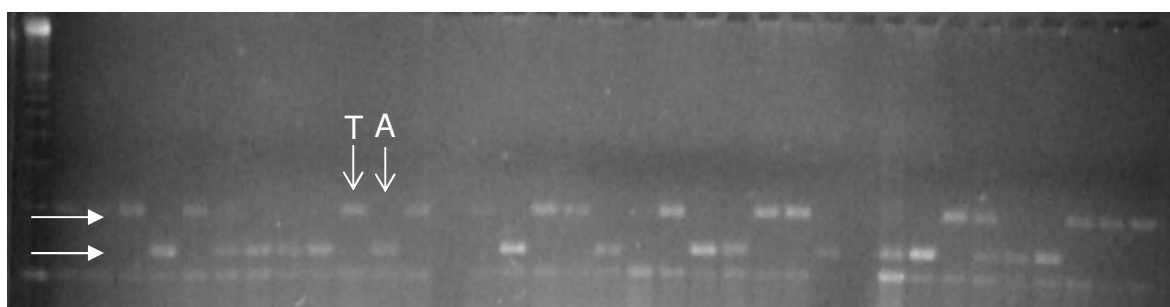


Figura 9. Perfil eletroforético do marcador *Xbarc105* Toropi (T), Anahuac (A). A seta indica os alelos amplificados de 139 pb e 200 pb pelo marcador. (Marcador 100 bp).

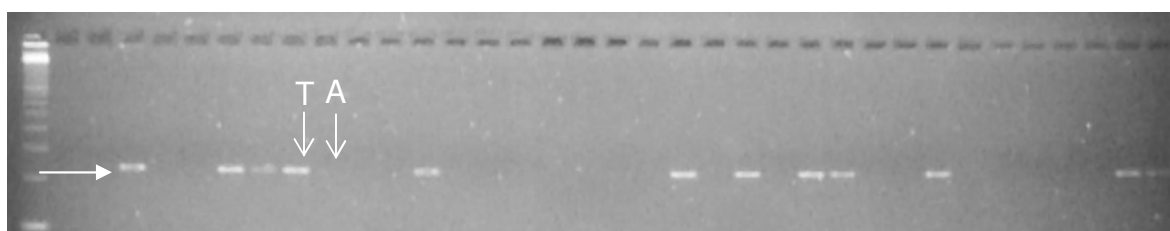


Figura 10. Perfil eletroforético do marcador *Xbarc288* Toropi (T), Anahuac (A). A seta indica os alelos amplificados de 240 pb pelo marcador. (Marcador 100 bp).

Dos marcadores selecionados do cromossomo 4D, 10 estão localizados no braço longo (4DL) (*Xgdm61*, *Xgdm125*, *Xgdm165*, *Xgdm194*, *Xgdm608*, *Xgdm609*, *Xwmc331*, *Xbarc48*, *Xbarc1069*, *Xbarc1148*), 11 no braço curto (4DS) (*Xgdm129*,

*Xwmc48*, *Xwmc52*, *Xbarc98*, *Xbarc105*, *Xbarc217*, *Xbarc225*, *Xbarc288*, *Xbarc308*, *Xbarc334* e *Xbarc1118*) e 3 não foram mapeados em nenhum dos braços (4D) (*Xgdm34*, *Xgdm40*, *Xbarc1145*). Todos os marcadores que apresentaram polimorfismo entre os progenitores estão localizados no cromossomo 4DS indicando que o gene que confere tolerância ao  $Al^{3+}$  está localizado nessa região. A localização do marcador *Xgdm129* no braço curto do cromossomo 4D pode ser visualizada na Figura 11.

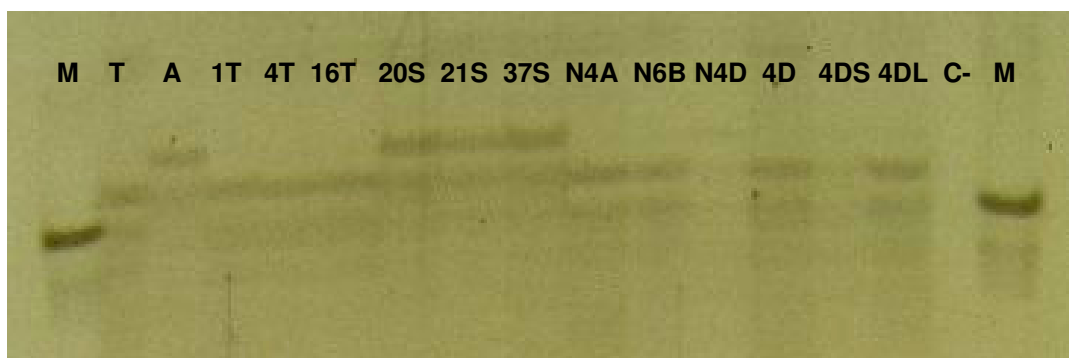


Figura 11. Localização do marcador SSR *Xgdm129* associado à tolerância ao  $Al^{3+}$  no braço curto do cromossomo 4D. T: Toropi, A: Anahuac, linhagens tolerantes: (1T, 4T, 16T) linhagens sensíveis: (20S, 21S, 37S), N4A: N4AT4D, N4D: N4DT4B, N6B: N6BT6D, 4D: linha *Chinese Spring*, 4DS: Ditelossômico para o braço curto do cromossomo 4D, 4DL: Ditelossômico para o braço longo do cromossomo, M: marcador 100pb.

Dos marcadores localizados no cromossomo 4DS, cinco (45%) foram polimórficos entre os progenitores. Da-Silva (2002) testando marcadores SSR do cromossomo 4D detectou similar nível de polimorfismo (55%), sugerindo ser um baixo nível, característico de espécies com genoma grande. Bryan et al. (1999) apontam que a baixa taxa de polimorfismo, aproximadamente 1 a cada 1000 pb, pode ser resultado do modo de evolução das espécies, sugerindo que muitos eventos de duplicações de regiões repetitivas contribuíram para o aumento do genoma.

Entre os marcadores STS, somente o marcador *B4* apresentou polimorfismo entre os progenitores. Esse marcador foi desenvolvido com base na seqüência de DNA de um clone de arroz sintênico à região contendo o gene *Alt3* de centeio e encontra-se a 0,4 cM do gene em centeio (Miftahudin et al., 2004).

Os autores sugerem que esse marcador possa ser utilizado para seleção assistida em programas de melhoramento de trigo ou centeio para obtenção de variedades tolerantes ao Al<sup>3+</sup>.

A análise de ligação dos marcadores SSRs e STS com o gene de tolerância ao Al<sup>3+</sup> em Toropi foi feita utilizando o programa Linkage, através do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Dos seis marcadores testados para ligação, somente três apresentaram associação conforme pode ser visto na Tabela 5.

Os marcadores *Xgdm129*, *Xbarc105* e *Xbarc334* estão associados ao gene de tolerância de Toropi, sendo que os três marcadores estão localizados no cromossomo 4DS, reforçando a hipótese de que este genótipo, BH1146 e Atlas 66 possuem genes distintos para essa característica.

Tabela 5. Análise de ligação dos marcadores SSRs e STS ao gene de tolerância ao Al<sup>3+</sup> através do teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ )

Marcador	$\chi^2$	Probabilidade	Recombinação (cM)	±SE
<i>B4</i>	1,88	0,17	42	0,06
<b><i>Xgdm129</i></b>	<b>23,18</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>23</b>	<b>0,04</b>
<b><i>Xbarc105</i></b>	<b>13,70</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>29</b>	<b>0,05</b>
<i>Xbarc288</i>	1,26	0,26	44	0,05
<b><i>Xbarc334</i></b>	<b>16,25</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>27</b>	<b>0,05</b>
<i>Xbarc1118</i>	<0,01	0,93	50	0,06

A Figura 12 apresenta um mapa comparativo para o cromossomo 4D, localizando os marcadores associados ao gene de Toropi (em azul) e os marcadores utilizados para o mapeamento (em vermelho). Barras azuis indicam a possível localização do gene em Toropi, que está muito próximo da região centromérica do cromossomo 4DS, estando associado aos marcadores *Xgdm129*, *Xbarc334* e *Xbarc105*.

No mapa construído com base na população de RILs W7984 x Opata85, o marcador *Xbarc105* foi localizado na região distal do cromossomo 4DS juntamente com o marcador *Xbarc1118* (Song et al., 2005). A associação deste com o gene de Toropi, indica que neste genótipo a região amplificada por este marcador está localizada próxima à região centromérica, sugerindo que ao longo do processo evolutivo rearranjos cromossômicos ocorreram nesse cromossomo.

O gene *Alt<sub>BH</sub>*, de BH1146, está localizado num intervalo delimitado pelos marcadores *Xgdm125* e *Xprs914*, estando distal ao marcador *Xgdm125* (Figura 13, cromossomo B, barra vermelha) (Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001).

Ma et al. (2005) mapearam um QTL para tolerância ao  $Al^{3+}$  no cultivar Atlas 66, utilizando uma população de 118 RILs derivada do cruzamento entre Atlas 66 x Century e 797 marcadores SSRs. Destes marcadores foram selecionados 131 que apresentaram polimorfismo entre os progenitores e foram testados nos grupos de linhagens tolerantes e sensíveis. Sete marcadores apresentaram uma banda polimórfica entre os grupos e foram testadas na população de RILs. Quatro destes marcadores demonstraram associação significativa com tolerância ao  $Al^{3+}$ , sendo que estes marcadores estão todos localizados no cromossomo 4DL. A análise de QTL baseada nos marcadores SSR revelou um QTL na região distal do braço do cromossomo 4DL, explicando 50% da variação fenotípica para tolerância ao  $Al^{3+}$ , cujo pico está entre os marcadores SSR *Xgdm125* e *Xwmc331*, numa região de aproximadamente 8,4 cM.

Raman et al. (2005) mapearam o gene *ALMT1*, de Atlas 66, utilizando marcadores SSR localizados no cromossomo 4DL e o marcador STS *ALMT1*, cinco populações de duplo-haplóides e linhagens de deleção para cromossomo 4D. O marcador *STSALMT1* foi polimórfico entre os progenitores das populações. De todos os marcadores SSR testados, somente os marcadores *Xgdm129*, *Xgwm129*, *Xgwm194*, *Xcfd23*, *Wmc331*, *Xgwm165*, *Wmc52*, *Wmc48* e *Xgwm1302* foram polimórficos e puderam ser utilizados para mapeamento. O marcador *Wmc331* foi altamente ligado à tolerância ao  $Al^{3+}$  (Xalt) nas populações “Diamondbird x Janz” e “Currawong x CD87”.



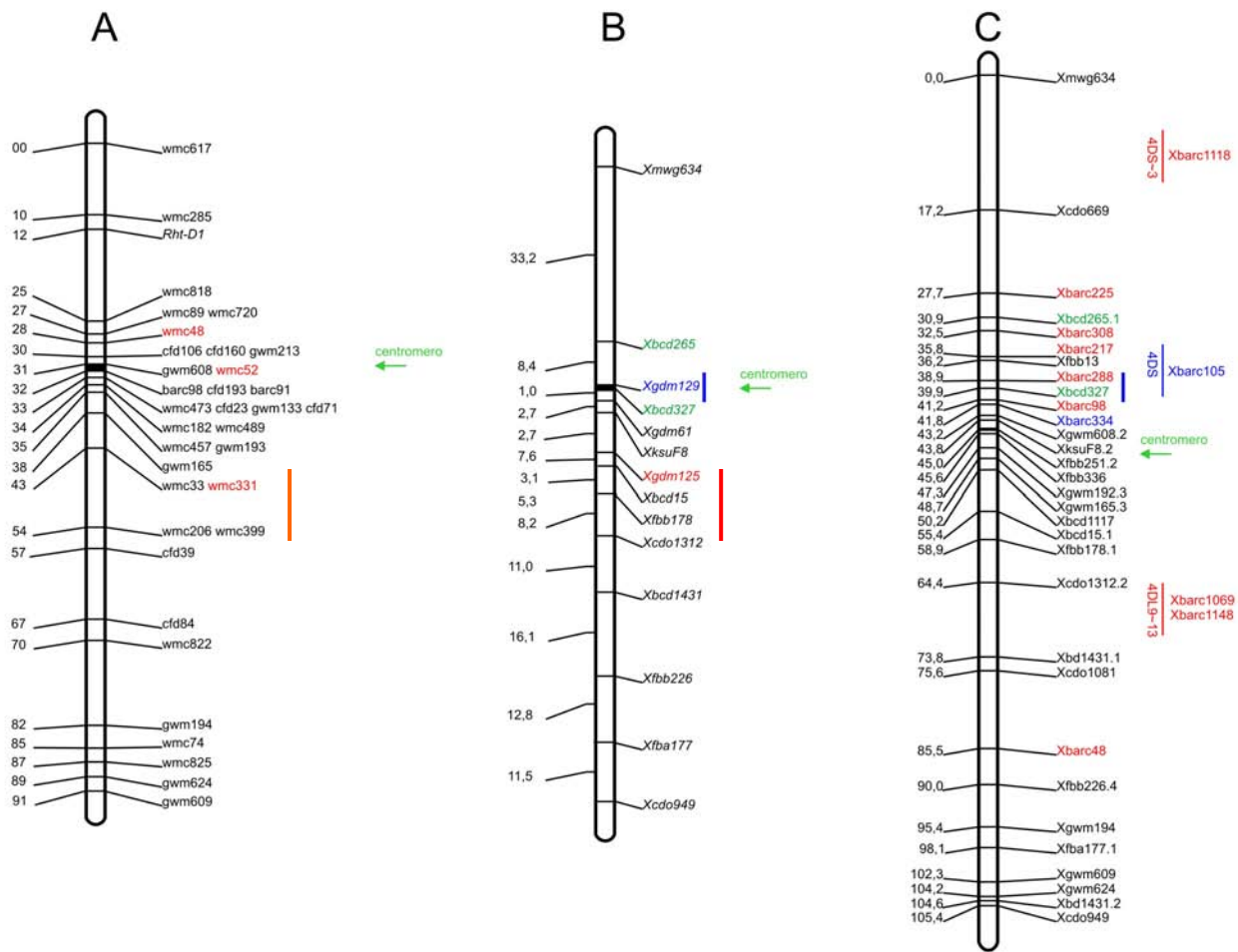


Figura 12. Mapas moleculares para o cromossomo 4D. Em vermelho marcadores utilizados, em azul marcadores associados ao gene de Toropi e em verde marcadores flanqueadores. Barras azuis gene de Toropi, barra vermelha gene *Alt<sub>BH</sub>*, barra laranja gene *ALMT1*. (Modificado de Somers et al., 2004 (a); Pestsova et al., 2000 (b); Song et al., 2005 (c)).

O marcador *Xgdm129* apresentou-se associado ao *Xalt* na população “Spica x Maringa” localizado a 22,4 cM e na população “Currawong x CD87”, só que nesta última apresentou desvio de segregação (110:51) não sendo considerado nas análises de ligação. Esse mesmo marcador apresenta-se associado ao gene de tolerância em Toropi a uma mesma distância da qual ele está do gene *Xalt* de Maringá, sugerindo que esses genótipos possam ter genes similares para tolerância. De Souza (1998) sugere que a tolerância do genótipo Maringá seja proveniente de PG1, mas também pode ser da mesma fonte de Toropi, pois Maringá descende do cruzamento de PG1 com uma linha irmã de Frontana que originou Toropi.

A criação de mapas genéticos baseados em marcadores de DNA é de extrema importância para descobrir a posição dos genes ou QTLs controlando características de relevância econômica. Song et al. (2005) apontam que os mesmos marcadores podem ser utilizados para incorporar genes e QTLs em cultivares elite via SAMM como também podem ser o ponto de partida para a clonagem baseada em mapa desses genes. Marcadores SSRs são importantes para a construção de mapas por serem consistentes, altamente polimórficos, facilmente visualizados e codominantes (Röder et al., 1995; Milach, 1998; Song et al., 2004). Microssatélites são abundantes em regiões pericentroméricas do DNA e raros em regiões de eucromatina (Areshchenkova & Ganal, 1999). Mais recentemente, Morgante et al. (2002) sugerem que microssatélites sejam abundantes em regiões transcritas e como a utilidade de marcadores genéticos para clonagem baseada em mapas e SAMM é dependente de sua proximidade com genes, é importante que se examine a distribuição de genes ou QTLs versus microssatélites (Song et al., 2005).

Sandhu & Gill (2002) propõem que 85% dos genes de trigo estejam localizados em menos de 10% das regiões dos cromossomos, distantes das regiões repetitivas e centroméricas. Keller & Feuillet (2000) sugerem que, em trigo, os genes estão organizados em “ilhas gênicas”, espaçados por grande quantidade de DNA repetitivo. A proximidade dos marcadores SSR a regiões contendo genes foi investigada por Song et al. (2005) e é consistente com a hipótese de Morgante et al. (2002), uma vez que os marcadores por eles

investigados estavam próximos a regiões contendo genes em todos os grupos de cromossomos homeólogos, à exceção do cromossomo 4. Li et al. (1999), utilizando sondas derivadas de genes de resistência à doença, mapearam 167 locos em todos os cromossomos de trigo, com exceção do cromossomo 4D.

O cromossomo 4D é um cromossomo interessante porque centraliza a maioria dos marcadores SSR na região pericentromérica como pode ser visto na Figura 12. Além disso, é o cromossomo que apresenta menor número de marcadores descritos (Röder et al., 1998; Pestsova et al., 2000; Gupta et al., 2004; Song et al., 2005).

No cromossomo 4D foram identificados genes que controlam seletivamente o transporte de  $K^+/Na^+$  em ambientes salinos (gene *Kna1*) (Dubcovsky et al., 1996), que controlam a sensibilidade a giberilina e o fenótipo anão (gene *Rht*) (Peng et al., 1999; Ellis et al., 2002), genes de resistência à ferrugem da folha (*Trp-1*) (Da-Silva, 2002) e genes para tolerância ao  $Al^{3+}$  (Riede & Anderson, 1996; Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001; Sasaki et al., 2004; Ma et al., 2005; Raman et al., 2005).

Os genes de importância para tolerância ao  $Al^{3+}$  foram mapeados no braço longo do cromossomo 4D e estão associados aos marcadores SSR *Xwmc331*, *Xgdm125* e *Xwmc52*. No entanto, a ausência de ligação entre os marcadores SSR associados a esses genes e o gene que confere tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi (Figura 12) sugere que esses genótipos utilizados para o mapeamento apresentem diferenças genéticas.

A ligação dos marcadores *Xgdm129*, *Xbarc334* e *Xbarc105* apóia a hipótese de que Toropi possui um gene diferente para tolerância localizado no braço curto do cromossomo 4D e/ou que tenha ocorrido rearranjos cromossômicos, como translocações, ao longo da evolução. Da-Silva (2002) mapeou o gene *Trp-1*, que confere resistência à ferrugem da folha em Toropi, também no braço curto do cromossomo 4D associado ao marcador *Xgdm129*, sugerindo a existência de uma “ilha gênica” nas proximidades do centrômero desse cromossomo em Toropi.

### 3.5.2 Análises de AFLP

Das 40 combinações de *primers* de AFLP testadas somente 24 geraram fragmentos polimórficos e com padrão de segregação consistente. A partir dessas 24 combinações de *primers* foram identificados 282 marcadores, média de 12,3 bandas polimórficas por combinação de *primers* testados.

As combinações que detectaram menor número de bandas polimórficas foram *PacaMcgg*, *PagtMaca* e *PatcMcta*, apresentando cinco bandas cada. A combinação que apresentou maior número de bandas polimórficas foi *PaaaMcta*, apresentando 25 bandas polimórficas.

Dos 282 marcadores AFLP, 59 (21%) apresentaram distorção da segregação pelo teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Barbosa (2002), detectou 243 marcadores AFLP para ferrugem da folha em aveia, sendo que destes 35 (14,4%) apresentaram distorção da segregação pelo teste do  $\chi^2$ . Portyanco et al. (2001) também encontraram cerca de 13% de marcadores apresentando distorção em sua população de mapeamento.

A Figura 13 apresenta gel de poliacrilamida demonstrando o perfil eletroforético do marcador AFLP *PaaaMcta*, salientando dois locos com segregação normal para o marcador.

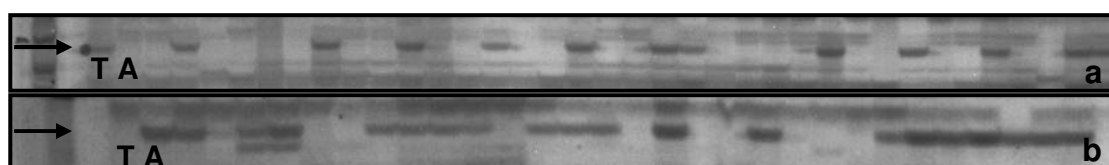


Figura 13. Perfil eletroforético do marcador AFLP *PaaaMcta*. Toropi (T), Anahuac (A). As setas indicam locos amplificados pelo marcador *PaaaMcta*, em associação (a) e em repulsão (b).

### 3.5.3 Construção do Mapa Molecular

O mapa molecular foi construído através de marcadores SSR e AFLP, utilizando 90 indivíduos da população do cruzamento Toropi x Anahuac, através do programa computacional Mapmaker, com LOD 4 e nível máximo de recombinação de 0,25. Foram utilizados para construção do mapa 223

marcadores, sendo que 150 foram distribuídos em grupos de ligação e 73 não foram ligados.

O mapa construído apresentou 17 grupos de ligação (Figura 14), sendo que grupos de ligação apresentaram de dois a 66 marcadores e variaram em tamanho de 0,0 cM a 1396,0 cM, com média de 117,8 cM em um mapa total de 3022,9 cM. Os grupos que concentraram o maior número de marcadores foram os grupo 1, com 66 marcadores e 1195,5 cM de extensão e o grupo 2, com 41 marcadores e 1396,0 cM de extensão. Os demais grupos apresentaram de 2 a 7 marcadores. O tamanho final do mapa foi de 3022,9 centiMorgans.

O grupo de ligação 17 foi composto exclusivamente por marcadores SSR mapeados no cromossomo 4DS de trigo (*Xgdm129*, *Xbarc334* e *Xbarc105*), indicando que esse cromossomo corresponde ao cromossomo 4D. Como os marcadores AFLP são de localização cromossômica desconhecida, não se pode fazer esse tipo de inferência para os outros cromossomos do mapa.

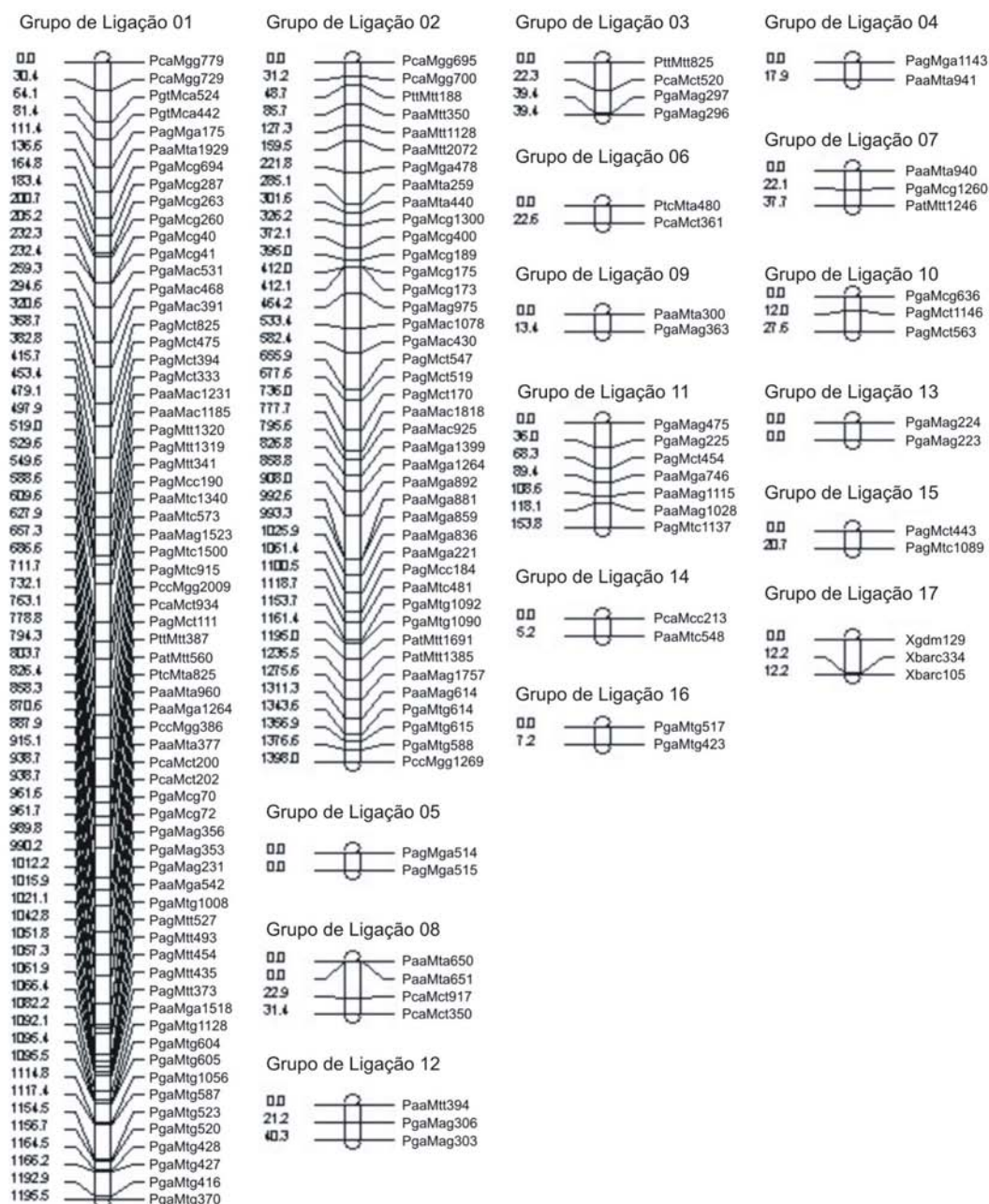


Figura 14. Mapa de ligação de trigo baseado na população F<sub>7</sub> Toropi x Anahuac. Distâncias no mapa são dadas em CentiMorgans. LOD4.

### 3.5.4 Detecção de QTLs associados à tolerância ao Al<sup>3+</sup>

A análise de marcador por ponto ou regressão (single analysis) detectou a presença de 29 QTLs no genoma (Tabela 6) associados as variáveis CRRP2, CRRP4 e CRRP6. Desses, onze estão associados a CRRP2, onze a CRRP4 e

sete a CRRP6. Os QTLs presentes no grupo de ligação 6 (marcador *PtcMta480*) e no cromossomo 17 (marcadores *Xgdm129*, *Xbarc334* e *Xbarc105*) apresentaram associação com a característica nas três doses avaliadas.

Tabela 6. QTLs significantes: resultados da análise marcador por ponto

Variável	QTL	Grupo	Ligação	Marcador	b1	LR	pr(F)
CRRP2	1	1		<i>PagMct394</i>	0.035	5.498	0.021*
CRRP2	2	1		<i>PagMtc915</i>	0,038	6.600	0.011*
CRRP2	3	1		<i>PagMtt373</i>	0,035	4.666	0.033*
CRRP2	4	1		<i>PgaMtg523</i>	0,030	4.056	0.047*
CRRP2	5	2		<i>PaaMtt350</i>	-0,032	4.011	0.048*
CRRP2	6	2		<i>PaaMag1757</i>	0,034	4.795	0.031*
CRRP2	7	6		<i>PtcMta480</i>	0,042	8.014	0.005**
CRRP2	8	11		<i>PaaMag1115</i>	0,036	6.159	0.014*
CRRP2	9	17		<i>Xgdm129</i>	0,055	15.134	0.000***
CRRP2	10	17		<i>Xbarc334</i>	0,053	13.818	0.000***
CRRP2	11	17		<i>Xbarc105</i>	0,051	12.611	0.000***
CRRP4	12	1		<i>PagMct394</i>	0.028	4.798	0.031*
CRRP4	13	1		<i>PagMtc915</i>	0.026	4.293	0.041*
CRRP4	14	1		<i>PccMgg386</i>	-0.028	4.886	0.029*
CRRP4	15	2		<i>PcaMgg700</i>	-0.04	4.512	0.036*
CRRP4	16	2		<i>PaaMtt1128</i>	-0.031	4.639	0.034*
CRRP4	17	2		<i>PgaMtg615</i>	-0.034	4.414	0.038*
CRRP4	18	6		<i>PtcMta480</i>	0.031	6.134	0.015*
CRRP4	19	11		<i>PaaMag1115</i>	0.028	5.184	0.025*
CRRP4	20	17		<i>Xgdm129</i>	0.051	19.590	0.000****
CRRP4	21	17		<i>Xbarc334</i>	0.046	14.797	0.000***
CRRP4	22	17		<i>Xbarc105</i>	0.046	15.518	0.000***
CRRP6	23	1		<i>PagMct394</i>	0.02	4.397	0.039*
CRRP6	24	1		<i>PccMgg386</i>	-0.023	5.506	0.021*
CRRP6	25	2		<i>PgaMtg615</i>	-0.025	4.028	0.048*
CRRP6	26	6		<i>PtcMta480</i>	0.021	4.928	0.029
CRRP6	27	17		<i>Xgdm129</i>	0.034	13.789	0.000***
CRRP6	28	17		<i>Xbarc334</i>	0.027	8.085	0.005**
CRRP6	29	17		<i>Xbarc105</i>	0.024	6.485	0.012*

A maioria dos QTLs detectados contribui de forma similar para a tolerância ao  $Al^{3+}$  (ver b1 da Tabela 6) sendo que os QTLs presentes no grupo de ligação 17 são os mais significativos para tolerância ao  $Al^{3+}$  (Figura 15). Esses QTLs correspondem a alelos favoráveis para o caráter, sendo que na presença desses há um aumento no crescimento da raiz principal.

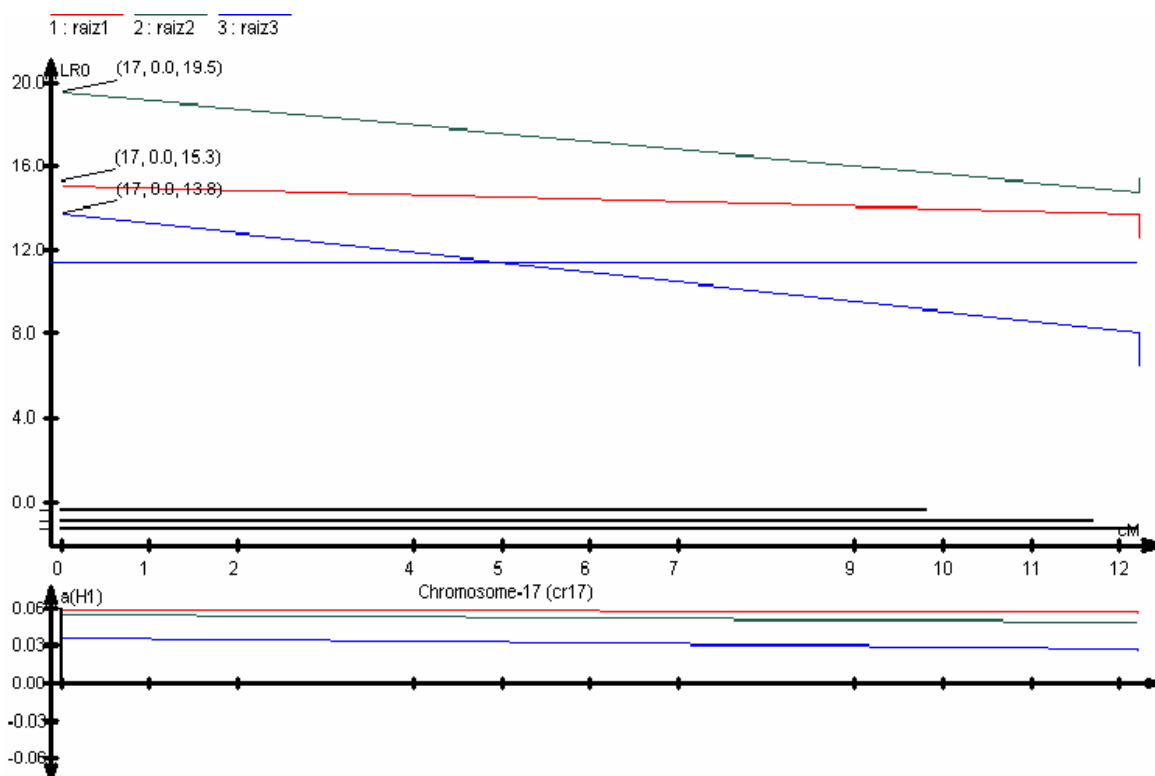


Figura 15. QTLs detectados por análise de marcador por ponto para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi localizado no grupo de ligação 17. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.

A análise de marcador por ponto faz uma varredura em todo genoma a procura dos QTLs que melhor explicam a variação fenotípica para a característica avaliada. Somente um marcador por vez é utilizado para mapear o QTL, sendo que seu efeito é subestimado e a posição do QTL não pode ser determinada. A análise por ponto pressupõe que se existe uma associação entre a presença do marcador e o valor da característica, então o QTL está ligado em associação àquele marcador (Wang et al., 2006). No entanto, análises mais sofisticadas como mapeamento por intervalo simples, mapeamento por intervalo composto e mapeamento por intervalo múltiplo precisam ser realizadas, pois análises individuais de marcadores (por ponto ou regressão) não controlam o erro tipo I (detecção de falsos QTLs positivos) (Hoekenga et al., 2003).

Análise de marcador por ponto foi utilizada para mapear QTLs para tolerância ao Al em *Arabidopsis*, sendo que superestimação de QTLs foi observada quando comparados aos QTLs detectados com análise por intervalo composto (Hoekenga et al., 2003). Os autores sugerem a utilização de análises



por intervalo, em especial composto, por ser mais conservativa na estimativa dos QTLs.

QTLs para tolerância ao  $Al^{3+}$  têm sido detectados por análise de mapeamento por intervalo simples e composto em diversas espécies (Nguyen et al., 2001, 2003; Magalhães et al., 2004; Ma et al., 2005; Wight et al., 2006).

A análise por intervalo simples é uma extensão da análise por ponto, sendo que se usa dois marcadores flanqueadores observados para construir um intervalo dentro do qual possa estar o QTL localizado. Já a análise de mapeamento por intervalo composto testa a presença de um só QTL em localizações específicas do genoma na presença do efeito de um outro QTL, através de coeficientes de regressão parciais para um grupo de marcadores (Bernardo, 2002). Ambas análises utilizam um valor mínimo (*threshold levels*) para aceitação do QTL como verdadeiro, controlando o erro tipo I (falsos positivos).

A análise de mapeamento por intervalo simples detectou 7 QTLs para as variáveis CRRP2, CRRP4 e CRRP6 (Tabela 7). A distribuição dos QTLs no mapa construído para essa população pode ser visualizado na Figura 16.

Tabela 7. QTLs significantes: resultados do mapeamento por intervalo simples

QTL	Variável	GL	Posição (cM)	Marcadores Flanqueadores	Efeito Aditivo	LOD	R <sup>2</sup>
1	CRRP2	2	183,48	<i>PaaMtt2072 - PagMga478</i>	0,1178	3,1	0,71
2	CRRP2	2	432,08	<i>PgaMcg173 - PgaMag975</i>	0,1173	2,6	0,69
3	CRRP2	2	616,38	<i>PgaMac430 - PagMct547</i>	0,1169	2,7	0,71
4	CRRP2	2	954,05	<i>PaaMga892 - PaaMga859</i>	0,1174	4,1	0,71
5	CRRP2	17	6,01	<i>Xgdm129 - Xbarc105</i>	0,0710	4,2	0,26
6	CRRP4	17	4,01	<i>Xgdm129 - Xbarc105</i>	0,058	4,7	0,29
7	CRRP6	17	2,01	<i>Xgdm129 - Xbarc105</i>	0,0369	3,1	0,20

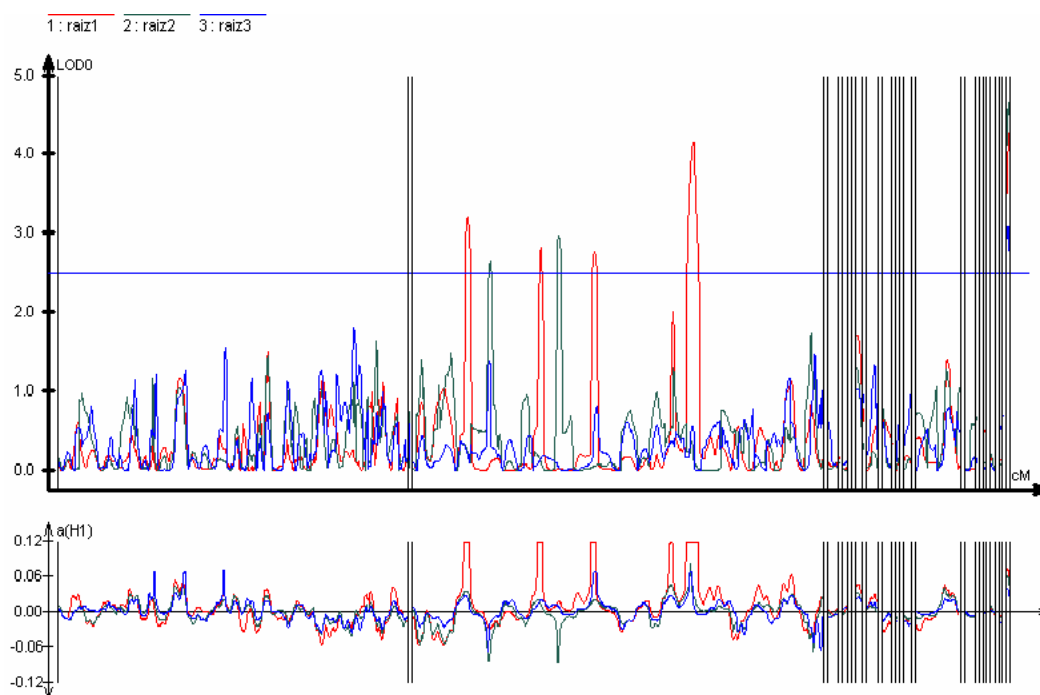


Figura 16. Distribuição dos QTLs detectados por mapeamento por intervalo simples para tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  no mapa de Toropi. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.

Para CRRP2 foram identificados cinco QTLs estando quatro presentes no grupo de ligação 2 e um no 17 (Figuras 17 e 18). Os QTLs do grupo de ligação 2 explicam cada um cerca de 70% da variação fenotípica para tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  nessa população medida por CRRP2. Já QTL 5 do grupo 17 é responsável por 26% da variação fenotípica.

O grupo 17 também apresentou QTLs para CRRP4 e CRRP6 que explicam 29% e 20%, respectivamente, da variação fenotípica para tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$ . A detecção desses QTLs no grupo 17 é consistente com os QTLs identificados nesse mesmo cromossomo pela análise de marcador por ponto.

O efeito de QTLs sobre determinada característica depende da distância de recombinação entre o QTL e o marcador e do efeito aditivo do gene (Bernardo, 2002). Como o grupo de ligação 2 é mais saturado que o grupo de ligação 17, a distância entre os marcadores e QTL são menores e, por consequência, o efeito do QTL no fenótipo é maior, o que justifica que os QTLs do 2 expliquem até 70% da variação fenotípica enquanto que os QTLs do grupo 17 explicam até 30% da variação. Além disso, o efeito aditivo do gene é maior para os QTLs do grupo 2.

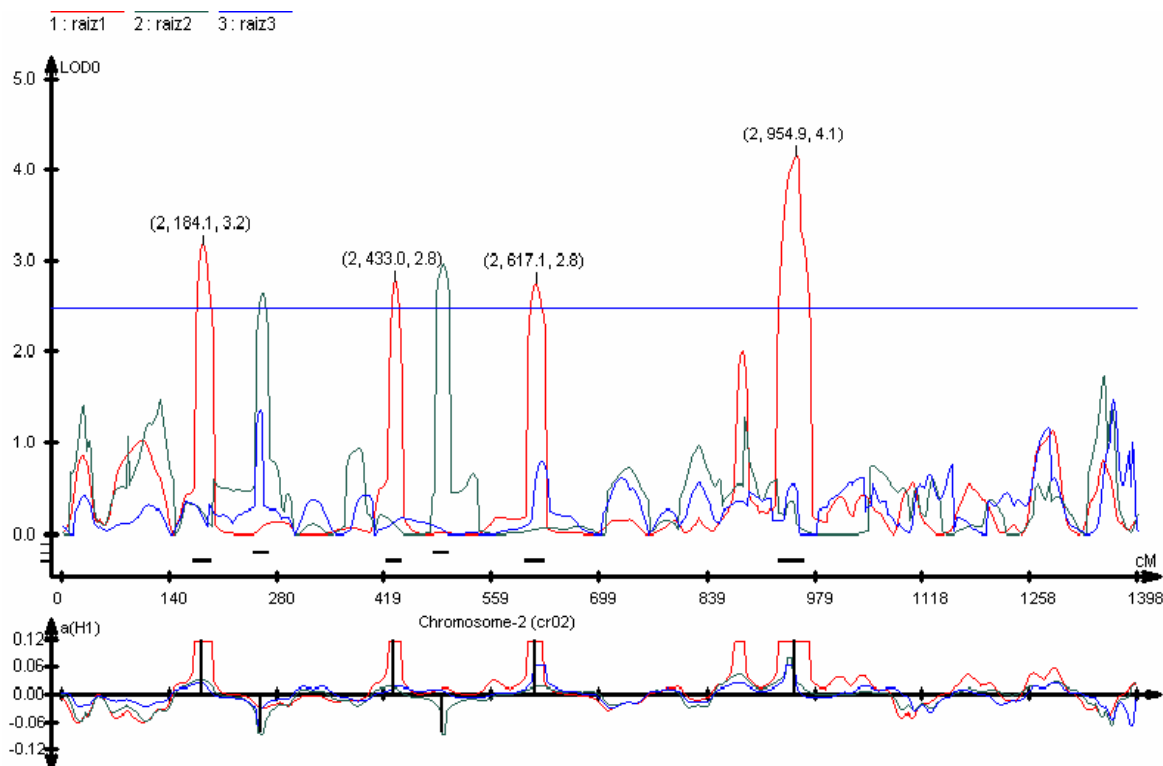


Figura 17. QTLs detectados por mapeamento por intervalo simples para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi localizado no grupo de ligação 2. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.

Observa-se a presença de dois outros QTLs no cromossomo 2 detectados para CRRP4 (pico verde), porém em Toropi esses QTLs possuem alelos desfavoráveis para tolerância ao  $Al^{3+}$ , que pode ser visto através do efeito aditivo, na parte inferior da Figura 17. Esses QTLs não são de interesse, pois sua presença leva a uma redução no crescimento da raiz principal sob estresse de alumínio.

A análise de mapeamento por intervalo composto detectou 11 QTLs para as variáveis CRRP2, CRRP4 e CRRP6 (Tabela 8). Observa-se que houve um aumento no número de QTLs para CRRP6 e uma redução do QTLs para CRRP2. Além disso, uma nova região contendo alelos favoráveis para a tolerância ao  $Al^{3+}$  foi detectada no cromossomo 6 do mapa construído.

A distribuição dos QTLs no genoma de Toropi pode ser visualizada na Figura 19.

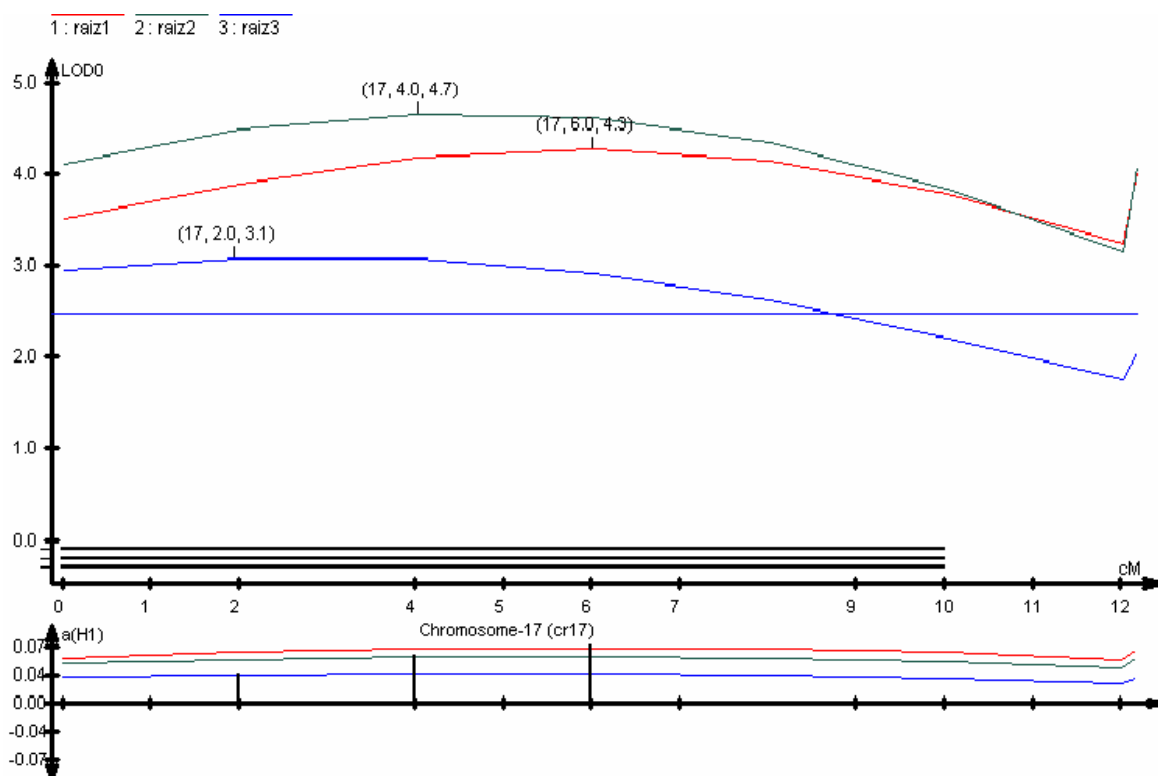


Figura 18. QTLs detectados por mapeamento por intervalo simples para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi localizado no grupo de ligação 17. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.

Tabela 8. QTLs significantes: resultados da análise de intervalo composto

QTL	Variável	Grupo de Ligação	Posição (cM)	Marcadores Flanqueadores	Aditividade	LOD	R <sup>2</sup>
1	CRRP2	6	4,01	<i>PtcMta480 - PaaMta300</i>	0,0570	3,4	0,16
2	CRRP2	17	2,01	<i>Xgdm129 - Xbarc105</i>	0,0640	5,0	0,22
3	CRRP4	6	0,01	<i>PtcMta480 - PaaMta300</i>	0,0393	2,7	0,11
4	CRRP4	17	4,01	<i>Xgdm129 - Xbarc105</i>	0,0506	3,9	0,21
7	CRRP6	1	110,4	<i>PgtMca442- PagMga175</i>	0,0019	2,8	0,18
8	CRRP6	1	1150,9	<i>PgaMtg587 - PgaMtg523</i>	0,0267	2,6	0,18
9	CRRP6	2	165,5	<i>PaaMtt2072 - PagMga478</i>	0,0187	4,5	0,10
10	CRRP6	6	8	<i>PtcMta480 - PaaMta300</i>	0,0219	3,0	0,10
11	CRRP6	17	2,01	<i>Xgdm129 - Xbarc105</i>	0,0397	4,1	0,22

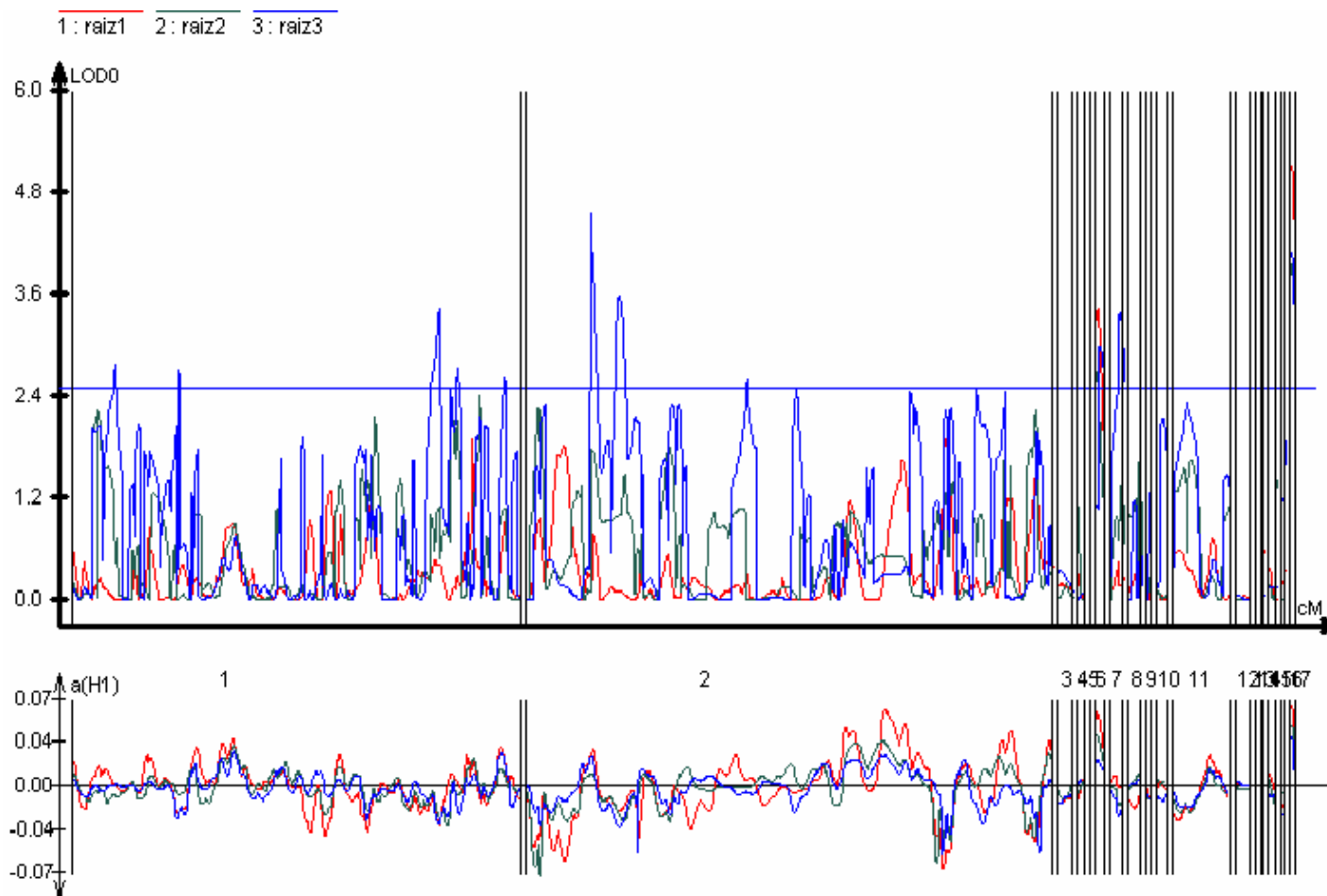


Figura 19. Distribuição dos QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  no mapa de Toropi. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.

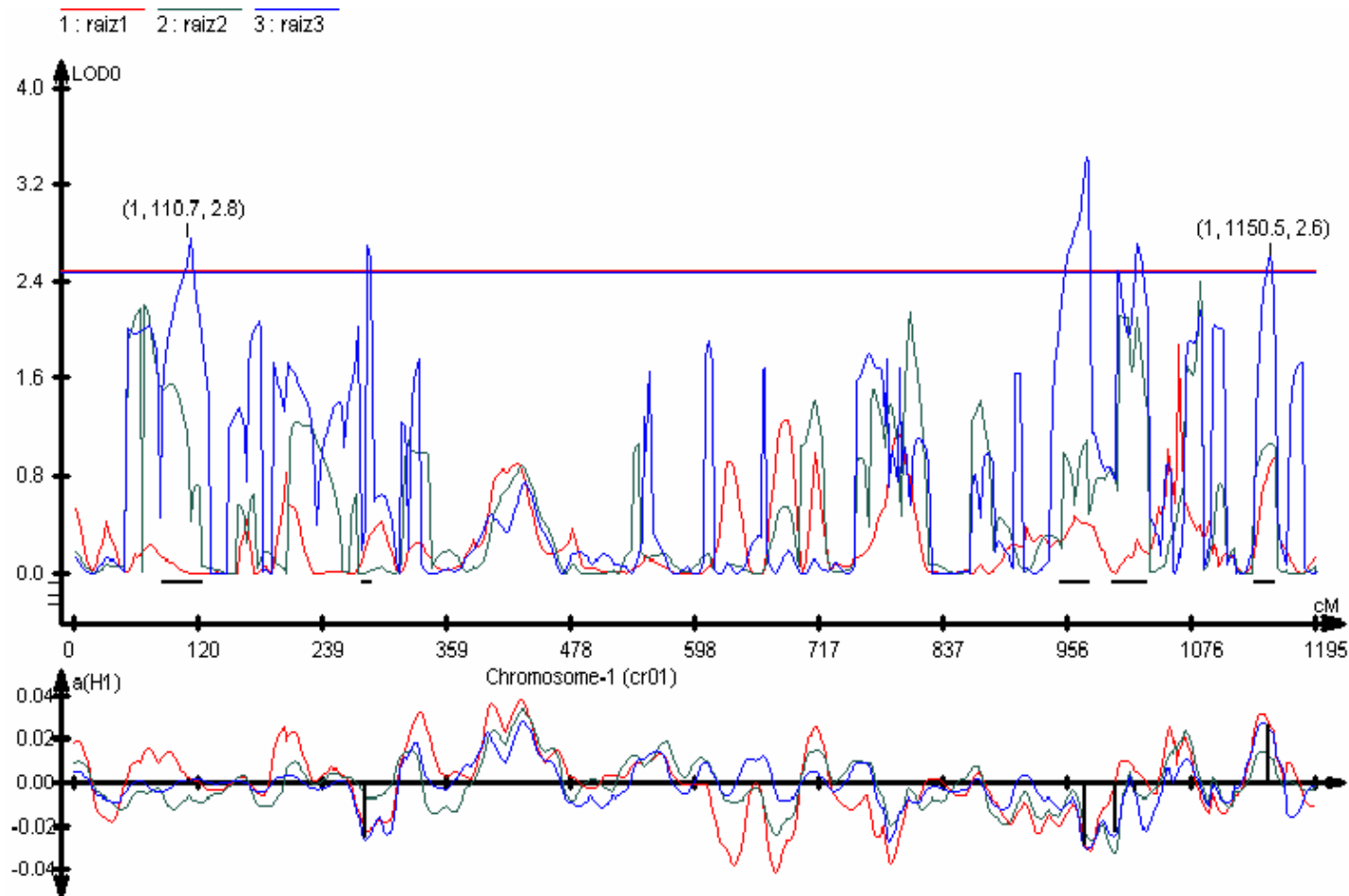


Figura 20. QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi localizado no grupo de ligação 1. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.

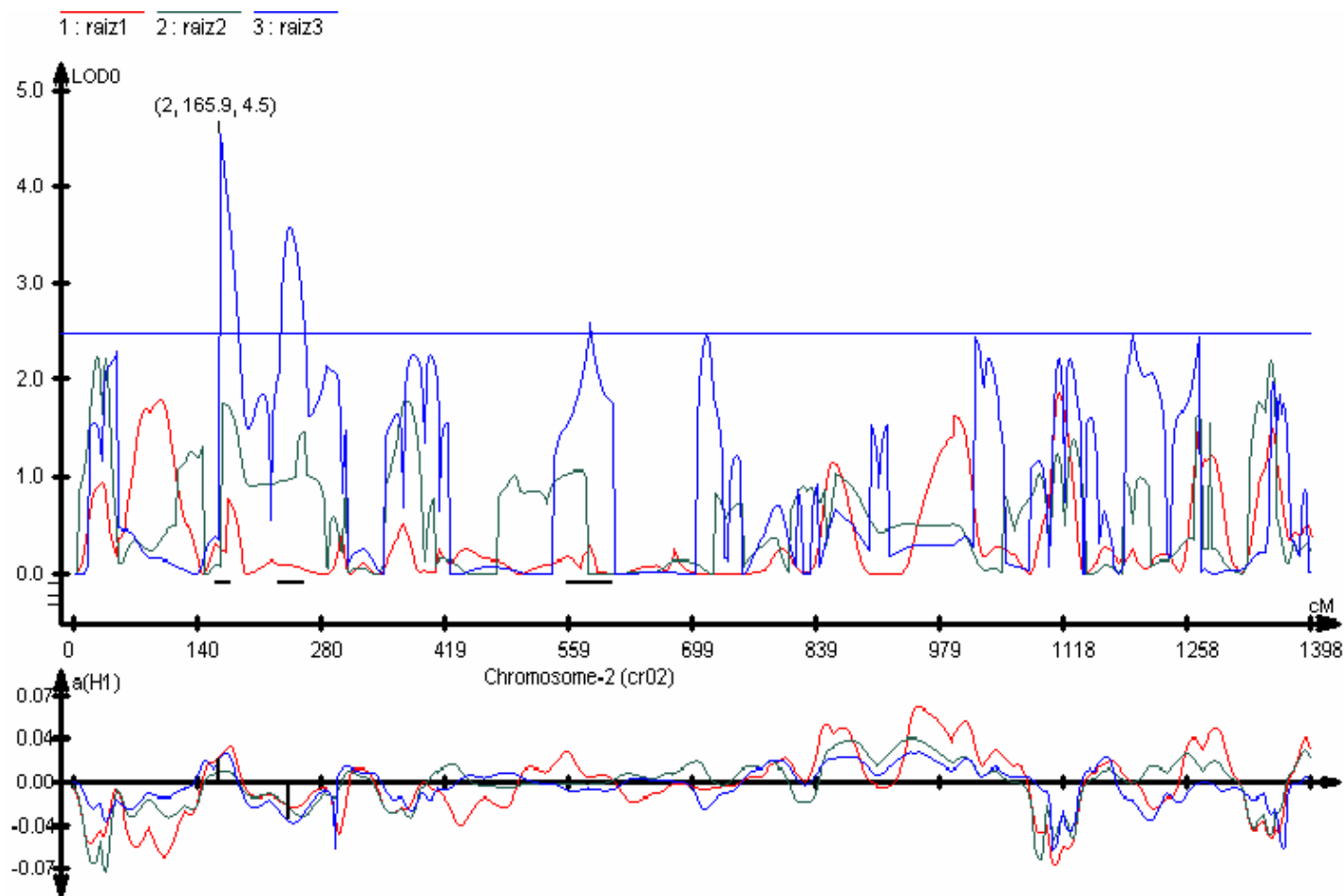


Figura 21. QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi localizado no grupo de ligação 2. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.

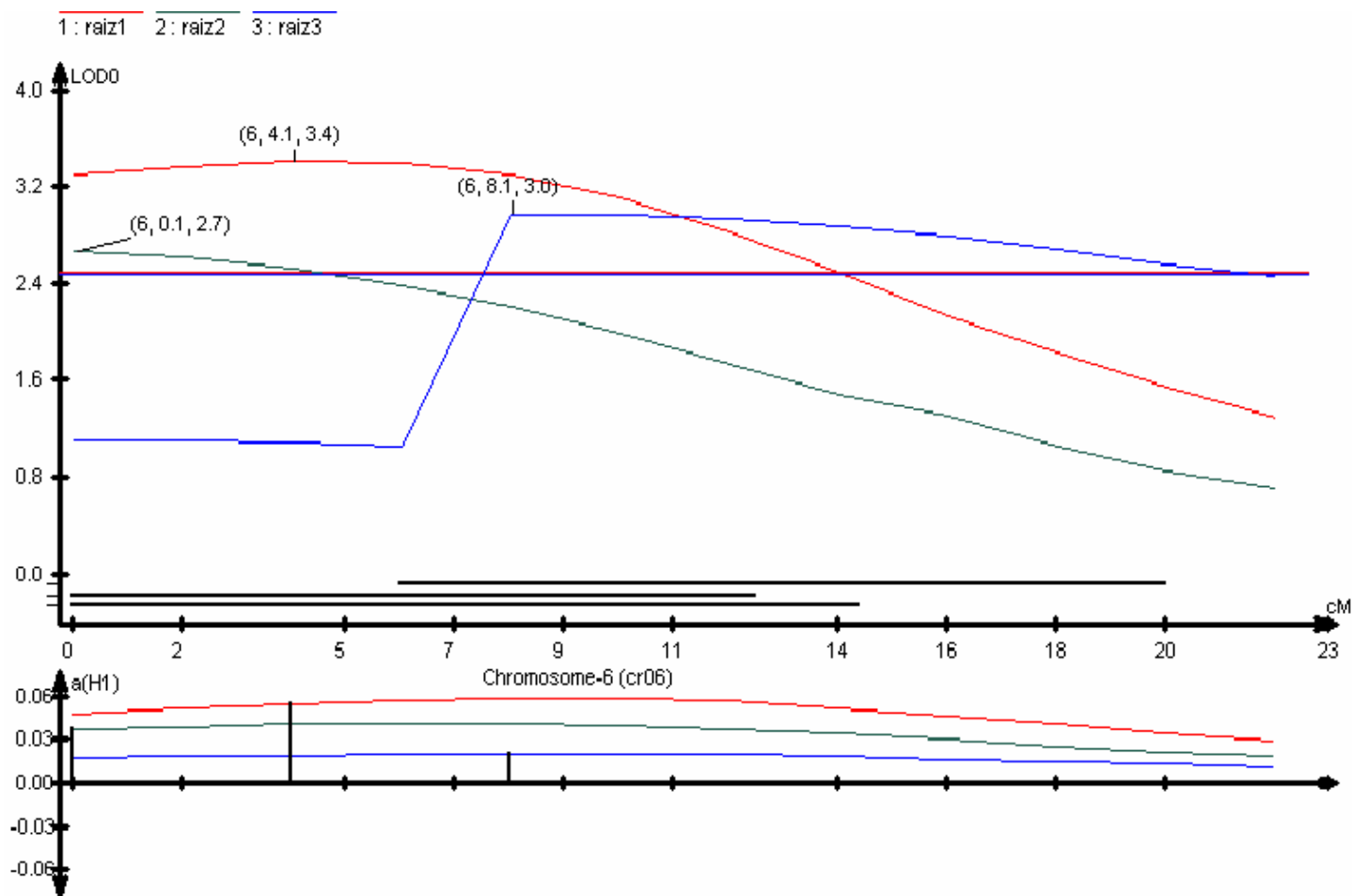


Figura 22. QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi localizado no grupo de ligação 6. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.



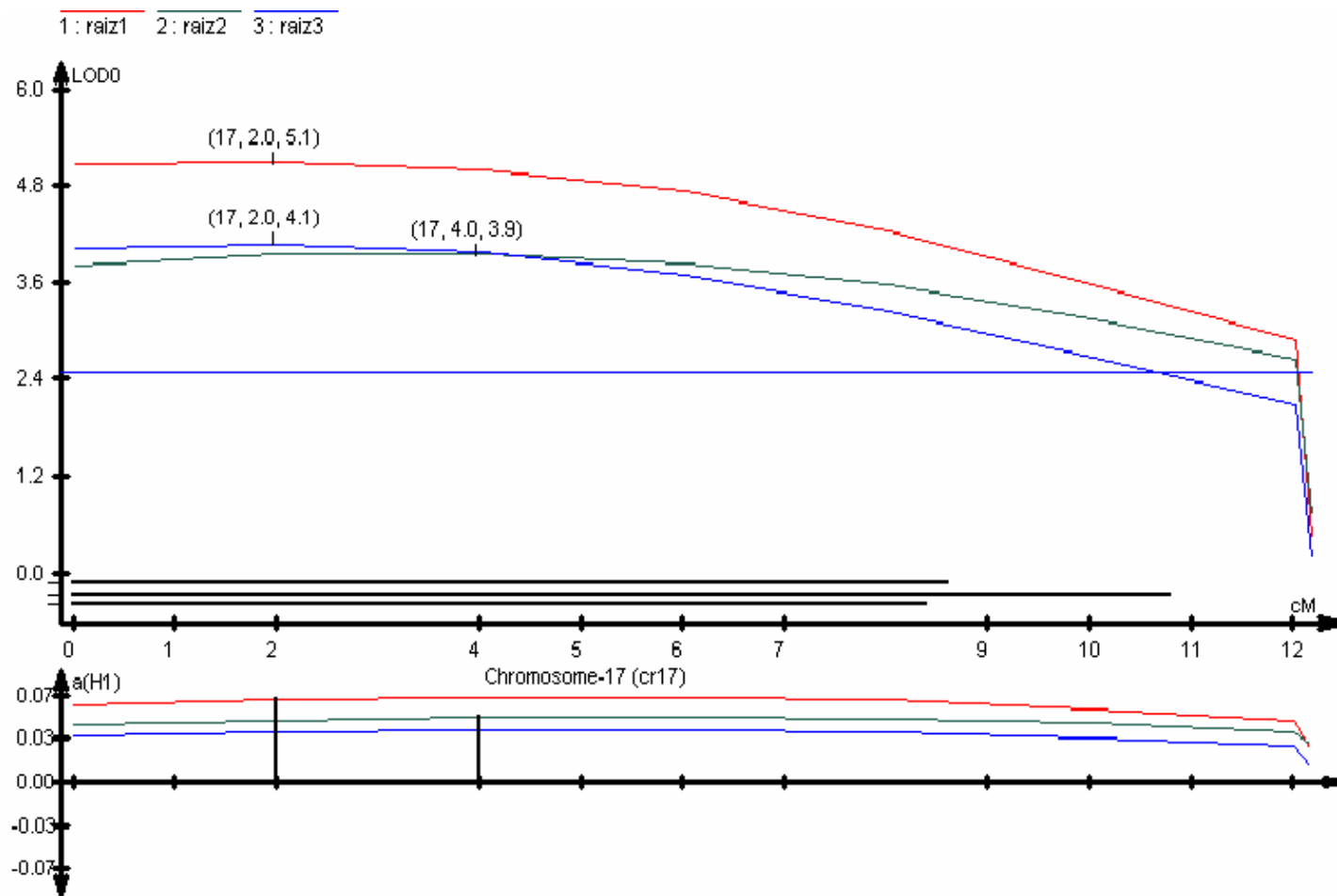


Figura 23. QTLs detectados por mapeamento por intervalo composto para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi localizado no grupo de ligação 17. Raiz 1: CRRP2, raiz 2: CRRP4, raiz 3: CRRP6. Barras horizontais correspondem aos QTLs. Efeito aditivo pode ser visualizado na parte inferior do gráfico.

A maioria das características agronomicamente importantes são governadas por vários genes conhecidos como QTLs. Price (2006) sugere que esses genes representam a grande maioria da diversidade genética funcional e que seriam os sítios preferenciais para seleção natural. Geralmente acredita-se que o mapeamento de QTLs não permite determinar precisamente a posição dos genes que governam uma característica poligênica no genoma, limitando sua aplicação tanto na seleção assistida por marcadores quanto na descoberta de genes (Price, 2006).

O ponto chave para a detecção de QTLs é ter uma população de mapeamento fenotipicamente bem caracterizada e suficientemente grande e/ou ter um mapa molecular saturado. Detectando-se os QTLs o próximo passo é identificar os genes candidatos e então tentar cloná-los, através de clonagem posicional (Salvi & Tuberosa, 2005; Price, 2006).

Diversos genes já foram clonados em plantas a partir da identificação de QTLs (Alpert et al., 1995; Joppa et al., 1997; Frary et al., 2000; El-Din El-Assal et al., 2001; Vagujfalvi et al., 2003; Yamanaka et al. 2005; Werner et al., 2005). Para a cultura do arroz, com o sequenciamento completo do genoma, a clonagem de QTLs torna-se mais fácil bem como a piramidização desses genes para o melhoramento (Ashikari & Matsuoka, 2006). QTLs para a tolerância ao  $Al^{3+}$  foram identificados em poucas espécies.

Em arábida dois QTLs explicando cerca de 40% da variação fenotípica observada entre RILs derivadas do cruzamento entre os ecótipos Landsberg erecta (sensível) e Columbia (tolerante), sendo que esses QTLs cosegregam com o mecanismo de tolerância caracterizado (Hoekenga et al., 2003, 2006). A natureza quantitativa desse caráter em arábida já havia sido sugerida por Kobayashi & Koyama (2002).

Para o milho sugere-se que o caráter seja de natureza quantitativa sob controle de poucos genes (Magnacava et al., 1987; Pandey & Gardner, 1992; Lima et al., 1995). Cinco QTLs foram mapeados nos cromossomos 2, 6 e 8 explicando aproximadamente 60% da variação fenotípica para tolerância ao  $Al^{3+}$  (Ninamango-Cardenas et al., 2003).

QTLs controlando a tolerância ao  $Al^{3+}$  em arroz já foram identificados nos cromossomos 1, 3 e 9. No cromossomo 1 foi detectado um QTL principal que responde por aproximadamente 25% da variação fenotípica (Wu et al., 2000; Ma et al., 2002; Nguyen et al., 2001, 2002, 2003). Um outro loco foi detectado no cromossomo 3 de arroz que é homeólogo ao cromossomo 4 das Triticeae (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2003), onde se encontram os maiores genes para tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo (*Alt<sub>BH</sub>*, *ALMT1*), cevada (*Alp*) e centeio (*Alt3*).

Quatro QTLs foram identificados controlando o caráter em aveia (*A. strigosa*), que juntos explicam 55% da variação para tolerância ao  $Al^{3+}$ . O maior QTL explica sozinho 39% da variação fenotípica e é possivelmente ortólogo aos genes encontrados nas Triticeae (Wight et al., 2006).

QTLs para tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo foram identificados no braço longo do cromossomo 4D (Ma et al., 2005; Raman et al., 2005). Um QTL respondendo por cerca de 50% da variação fenotípica foi mapeado utilizando marcadores SSR, estando o QTL flanqueado pelos marcadores *Xgdm125* e *Xwmc331* e localizado na região onde o gene *ALMT1* foi mapeado (Ma et al., 2005). Um QTL na mesma região foi mapeado por Raman et al. (2005), sendo que na população em estudo o QTL explica 75% do total da variação fenotípica para tolerância ao  $Al^{3+}$ .

Em Toropi detectamos a presença de QTLs em diversas regiões no genoma por vários tipos de análise de mapeamento. Interessantemente, a região presente no grupo de ligação 17 do mapa foi consistente em todas as análises e para as três variáveis analisadas. No entanto, a presença de outras regiões no genoma foi variável de acordo com o tipo de análise (Figura 24).

A região presente no grupo 1, estimada pela análise de ponto, no marcador *PgaMtg523* foi confirmada na análise por intervalo composto. O QTL está presente na região flanqueada pelos marcadores *PgaMtg587* - *PgaMtg523* na posição 1150,9 cM e explica 18% da variação fenotípica para tolerância ao  $Al^{3+}$  sob estresse de 222  $\mu$ M de Al.

Vários QTLs foram detectados no grupo de ligação 2 em todas as análises, no entanto, o QTL presente entre os marcadores *PaaMtt2072* - *PagMga478* foi consistente nas análises por intervalo simples e composto. Na análise de intervalo simples esse QTL explica cerca de 70% da variação fenotípica para CRRP2

enquanto que na análise por intervalo composto o QTL responde por 10% da variação para CRRP6.

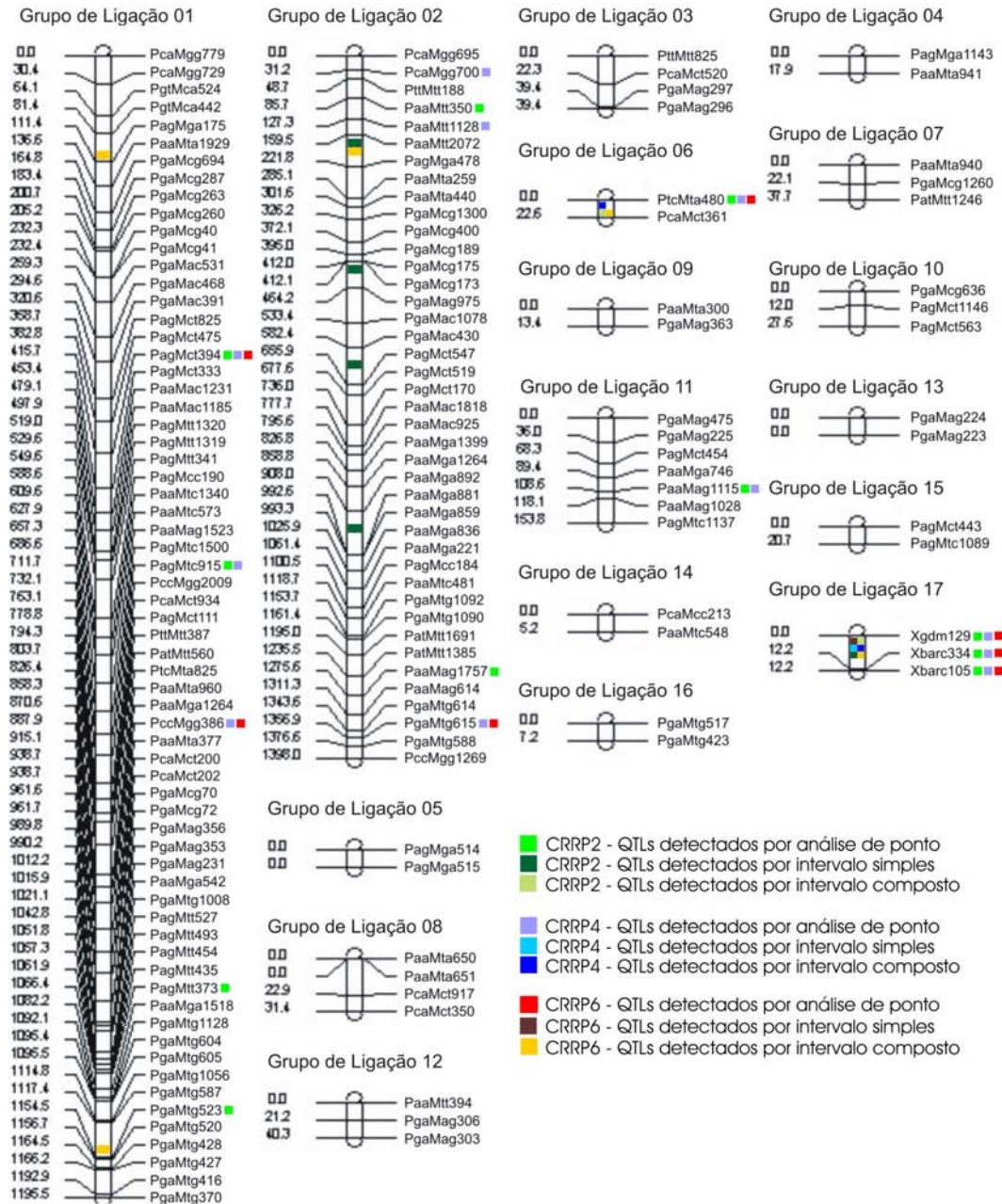


Figura 24. QTLs detectados para tolerância ao  $Al^{3+}$  na população de RILs  $F_7$  de Toropi x Anahuac através de análises de ponto, mapeamento por intervalo simples e composto.

O grupo de ligação 6 do mapa apresenta uma região interessante para tolerância ao  $Al^{3+}$ . QTLs foram identificados nas três análises, para as três

variáveis, sendo que na análise de intervalo simples o LOD foi menor que 2,5, por isso os dados não foram apresentados. O QTL está localizado no intervalo delimitado pelos marcadores *PtcMta480* - *PaaMta300* estando próximo ao marcador *PtcMta480* e explica de 10 a 16% da variação fenotípica (Tabela 8). A presença desse marcador pela análise de regressão favorece o crescimento da raiz principal sob estresse de alumínio, conferindo um incremento de 0,02 a 0,04 no crescimento relativo da raiz principal (Tabela 6).

De todos os QTLs identificados, o presente no grupo 17 foi consistente em todas as análises, sendo que essa região explica de 20 a 30% da variação fenotípica para tolerância ao  $Al^{3+}$  em todas as doses de estresse avaliadas e estimandas por CRRP2, CRRP4 e CRRP6 (Tabela 6, 7 e 8).

A presença de QTLs para tolerância ao  $Al^{3+}$  no grupo de ligação 17 do mapa genético, composto somente por marcadores SSR do cromossomo 4DS apóia a hipótese de que esse cromossomo contém uma região importante, pericentromérica, para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi. Além disso, a presença de QTLs em outros grupos de ligação aponta que existem outras regiões no genoma de Toropi que contribuem para tolerância ao  $Al^{3+}$ .

A precisa localização dos marcadores que flanqueiam os QTLs no genoma de trigo, através da utilização de linhagens nulitetrassômicas, poderá indicar onde esses QTLs realmente estão no genoma e permitir a clonagem desses genes. A saturação do mapa gerado com mais marcadores anônimos (AFLP) e com marcadores funcionais gerados a partir de seqüências expressas sob condição de estresse de  $Al^{3+}$  contribuirá para elucidação do controle genético dessa característica e dos mecanismos envolvidos na tolerância.

### **3.5.5 Mapeamento físico dos marcadores associados à tolerância ao $Al^{3+}$ em Toropi**

Linhagens nulitetrassômicas constituem-se numa excelente ferramenta para se mapear fisicamente marcadores anônimos, como AFLP. Um conjunto de 18 linhagens nulitetrassômicas (Tabela 4) foram utilizadas para mapear marcadores *PaaMga859* e *PaaMga221* identificados no grupo de ligação 2 (Figura 25), o qual apresentou maior número de QTLs para tolerância ao Al.

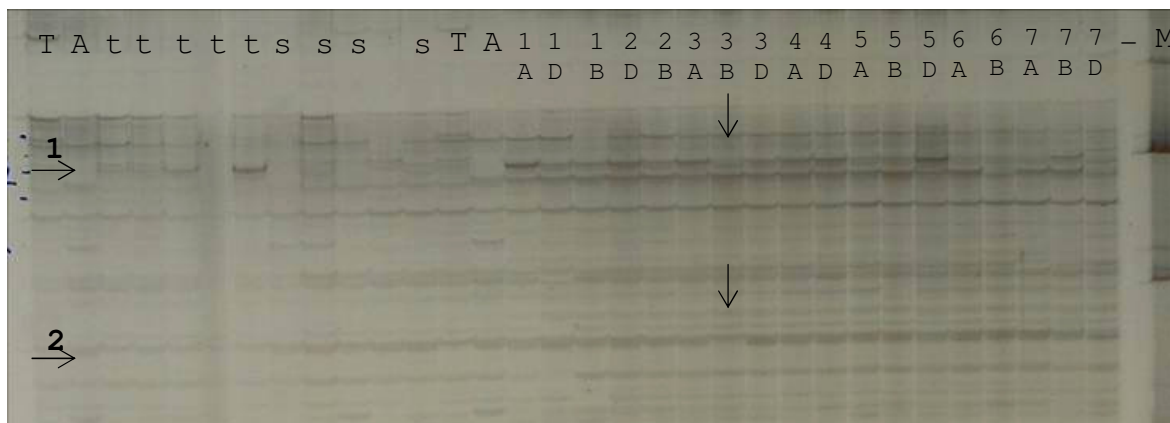


Figura 25. Localização dos marcadores presentes no grupo de ligação 2 de Toropi no genoma do trigo. 1 - marcador *PaaMga859*, 2 - marcador *PaaMga221* T: Toropi, A: Anahuac, t: linhagens tolerantes, s: linhagens sensíveis, 1A: N1AT1D, 1B: N1BT1D, 1D: N1DT1B, 2B: N2BT2D, 2D: N2DT2B, 3A: N3AT2D, 3B: N3BT3D, 3D: N3DT3B, 4A: N4AT4D, 4D: N4DT4B, 5A: N5AT5D, 5B: N5BT5D, 5D: N5DT5B, 6A: N6AT6D, 6B: N6BT6D, 7A: N7AT7D, 7B: N7BT7D, 7D: N7DT7B, M: marcador 100pb.

A ausência das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados pelos marcadores *PaaMga859* e *PaaMga221* no nulitetrassômico para o cromossomo 3B (N3BT3D) sugere que os QTLs presentes no grupo de ligação 2 correspondam a regiões presentes no cromossomo 3B de trigo.

### 3.5.6 Tolerância ao Al<sup>3+</sup> em Toropi: herança simples ou complexa?

A análise genética da tolerância ao Al<sup>3+</sup> em Toropi (Capítulo II) aponta que esse caráter é governado por gene de efeito maior nesse genótipo. No entanto, o mapeamento desse gene por análise de intervalo indicou que existem mais regiões no genoma (QTLs) contribuindo para tolerância ao Al<sup>3+</sup> em Toropi.

Uma região está consistentemente localizada no braço curto do cromossomo 4D, evidenciada tanto pelas análises de ligação dos marcadores SSRs com o caráter de interesse quanto pelas análises de intervalo simples e composto, que identificaram QTLs para o caráter no grupo de ligação 17, composto exclusivamente por marcadores SSR do cromossomo 4DS. Embora localizado em braço curto do cromossomo 4D, o gene de Toropi está no mesmo cromossomo para o qual foram descritos os genes *Alt<sub>BH</sub>*, *Alt2* e *ALMT1* de trigo (Riede & Anderson, 1996; Rodriguez-Milla & Gustafson, 2001; Sasaki et al., 2004; Ma et al., 2005; Raman et al., 2005).

A outra região identificada pelas análises de ponto e intervalo foi localizada no grupo de ligação 2. O mapeamento físico de dois dos marcadores presentes no QTL, *PaaMga859* e *PaaMga221*, através da amplificação em linhagens nulitetrassômicas, mapeou essa região no cromossomo 3B de trigo. Surpreendentemente, esse cromossomo corresponde ao cromossomo 1 de arroz, baseado no mapa consenso das gramíneas (Moore et al., 1995; Devos & Gale, 1997; Gale & Devos, 1998).

A tolerância ao  $Al^{3+}$  em arroz tem sido caracterizada por ser um caráter de natureza complexa, de natureza quantitativa (Wu et al., 2000; Ma et al., 2002; Nguyen et al., 2001, 2002, 2003). Nesses cinco trabalhos foram identificados 27 QTLs importantes para tolerância ao  $Al^{3+}$ , utilizando como parâmetro fenotípico o crescimento relativo da raiz principal. Esses QTLs foram mapeados nos cromossomos 1, 2, 3 e 9, sendo que somente a região presente no cromossomo 1 foi consistente para tolerância ao  $Al^{3+}$  nos cinco estudos e, em geral, explica grande parte de variação fenotípica. Recentemente, um loco para tolerância ao  $Al^{3+}$  em sorgo (*Alt<sub>SB</sub>*) foi mapeado por Magalhães et al. (2004) no cromossomo 3 que é homeólogo ao cromossomo 1 de arroz (Gale & Devos, 1998).

Baseado em estudos de mapeamento de genes para tolerância ao  $Al^{3+}$ , sugere-se a existência de duas regiões conservadas entre os cereais para tolerância ao  $Al^{3+}$ .

A primeira região corresponde ao cromossomo 4D das Triticeae (trigo, cevada e centeio). Os genes *Alp* de cevada, *Alt<sub>BH</sub>* e *AMT1* de trigo e *Alt<sub>3</sub>* de centeio para tolerância ao  $Al^{3+}$  foram todos mapeados no braço longo do cromossomo 4 (Figura 1), indicando esta região extremamente conservada e estes genes corresponderem a locos ortólogos. O gene de Toropi está mapeado no outro braço do cromossomo, perto do centrômero, sugerindo que rearranjos cromossômicos tenham ocorrido nesse genótipo. O cromossomo 4 das Triticeae é homeólogo ao cromossomo 3 de arroz (bloco de ligação 3C), que apresenta QTLs para tolerância ao  $Al^{3+}$ , apoiando a hipótese de conservação dessas seqüências entre as gramíneas (Gale & Devos, 1998). No entanto, o loco para tolerância ao  $Al^{3+}$  localizado no cromossomo 3, não é o mais importante para tolerância em

arroz e sim o loco presente no cromossomo 1, por explicar a maior parte da variação fenotípica da tolerância nas populações estudadas.

A segunda região corresponde ao cromossomo 1 de arroz que apresenta QTLs para tolerância ao  $Al^{3+}$  e é homeóloga ao cromossomo 3 de sorgo que contém o gene *Alt<sub>SB</sub>*. A identificação de QTLs para o gene de Toropi no cromossomo 3 de trigo, homeólogo também ao cromossomo 1, é consistente e é o primeiro relato na literatura dessa natureza para trigo.

Toropi definitivamente representa uma nova fonte de genes para a tolerância ao  $Al^{3+}$ , sendo que apresenta duas regiões importantes para esse caráter, demonstrando que nesse genótipo a tolerância é de natureza complexa. Tal pressuposição é consistente com o padrão de distribuição contínua para tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo e com os diversos mecanismos envolvidos na resposta ao  $Al^{3+}$ , o que implica no envolvimento de mais de um gene no mecanismo de tolerância. O próximo passo será investigar o papel dos genes que estão envolvidos nos mecanismos de tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi.

#### **4 Conclusões**

O mapeamento molecular dos genes que conferem tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi, indica que o gene maior está presente no braço curto do cromossomo 4D, associado ao marcador *Xgdm129* e corresponde ao QTL encontrado no grupo de ligação 17. A presença de outros genes modulando o grau de tolerância em Toropi foi confirmado pela detecção de outros QTLs localizados em outros locais do genoma. A presença de QTLs fisicamente localizados nos cromossomos 4D e 3B de trigo, indica que esse genótipo apresenta duas regiões conservadas para a tolerância ao  $Al^{3+}$  entre as gramíneas, uma correspondente ao cromossomo 4D das Triticeae e outra ao cromossomo 1 de arroz. A presença dessas duas regiões pode ser um fator chave para a tolerância diferenciada de Toropi.



## **CAPÍTULO IV**

**Identificação de genes induzidos por alumínio tóxico em trigo cultivar Toropi  
– novos mecanismos para um velho problema?**

**Tatiana Boff, Laize F. Espindula, Euclides Minella,  
Carla Andréa Delatorre, Sandra C. K. Milach**

## 1 Introdução

Os danos causados pelo  $Al^{3+}$  são observados numa série de processos celulares, especialmente a absorção de íons ( $K^+$ ,  $Ca^+$  e  $Mg^{2+}$ ); a síntese de calose; a peroxidação de lipídios e a via de transdução de sinais. Em resposta aos danos causados pelo  $Al^{3+}$ , consideráveis mudanças ocorrem no metabolismo normal e no controle da expressão de genes envolvidos em diversos processos celulares (Jiang et al., 2000).

Vários genes já foram identificados como regulados por  $Al^{3+}$  em diversas espécies (Tabela 3, Capítulo I), indicando o envolvimento de genes potencialmente importantes envolvidos no estresse causado pelo  $Al^{3+}$ . No entanto, o mecanismo molecular de tolerância em plantas permanece desconhecido. Estudos de expressão gênica podem auxiliar na identificação de genes candidatos para tolerância ao alumínio tóxico ( $Al^{3+}$ ) em trigo, bem como elucidar os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na resposta a esse estresse. Além disso, uma vez identificados, os genes candidatos podem ser explorados diretamente em programas de melhoramento através do desenvolvimento de marcadores funcionais.

Em trigo, estudos pioneiros de expressão gênica em resposta a estresses abióticos utilizaram técnicas de *screening* diferencial e diferencial *display*, limitando-se a identificação de um pequeno número de genes (Snowden et al., 1995; Cruz-Ortega et al., 1997). A utilização de técnicas que permitam verificar a expressão diferencial qualitativa e quantitativa de genes torna-se fundamental para se identificar os processos que representem o dano causado pelo  $Al^{3+}$ . Nesse sentido, a hibridização subtrativa por PCR é importante ferramenta para enriquecer e isolar seqüências diferencialmente expressas (Diatchenko et al., 1996). O enriquecimento cinético de seqüências com expressão diferencial, o baixo *background* e a abundância de cDNAs normalizados em uma biblioteca subtraída tornam o método atrativo para clonagem de cDNAs diferencialmente expressos para tolerância ao  $Al^{3+}$  (Xiao et al., 2005).

Sasaki et al. (2004) utilizando essa tecnologia identificaram o gene *ALMT1*, que é constitutivamente expresso, mas ativado por alumínio. Esse gene que

codifica um transportador de malato é capaz de conferir tolerância ao  $Al^{3+}$  em outras espécies de cereais como a cevada (Delhaize et al., 2004).

Genes relacionados à via de transdução de sinais, a estrutura e funcionamento da parede celular, a manutenção da estabilidade da membrana plasmática e ao transporte de íons foram identificados em trigo em resposta ao estresse de alumínio (Xiao et al., 2005). Os resultados obtidos evidenciam que a tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo envolve a ativação de uma complexa rede de sinalização e diversas rotas metabólicas.

O objetivo do presente estudo foi identificar genes candidatos associados à tolerância ao  $Al^{3+}$  no cultivar Toropi, visando identificar os mecanismos moleculares e fisiológicos que levam à tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Material Vegetal**

Plântulas do genótipo Toropi (Al-tolerante) foram cultivadas em solução nutritiva (Item 2.2, Capítulo II), em câmara de crescimento com temperatura controlada ( $25\pm 1^{\circ}C$ ) e 12 h de fotoperíodo. Ao atingirem 15 mm de comprimento de raiz, as plântulas foram submetidas ao estresse de alumínio pela adição de 74  $\mu M$  e 148  $\mu M$  de alumínio na forma de  $AlCl_3$ , na solução nutritiva com pH 4,0. No tratamento controle, as plântulas permaneceram em solução nutritiva sem adição de alumínio. Transcorrida 1 h de aplicação do estresse, os ápices radiculares foram cortados e imediatamente imersos em tubos falcon contendo nitrogênio líquido para coleta do tecido a ser utilizado no isolamento do RNA.

### **2.2 Construção da Biblioteca Subtraída**

O RNA total das raízes tratadas e controle foi isolado separadamente utilizando o “CONCERT™ Plant RNA Purification Reagent” (Invitrogen) de acordo com o protocolo fornecido. O mRNA foi purificado utilizando o sistema de purificação NucleoTrap® mRNA Mini Purification Kit (BD Biosciences Clontech). A síntese de cDNA foi feita utilizando “SMART™ cDNA Kits” (BD Biosciences Clontech).

Para identificação das seqüências diferencialmente expressas, foi empregada a técnica de hibridização subtrativa por PCR (Diatchenko et al., 1996; 1998), utilizando-se a tecnologia “PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit” (BD Biosciences Clontech), considerada uma das tecnologias mais eficientes para este tipo de análise. A técnica baseia-se na hibridização das amostras *tester*, neste caso as submetidas ao estresse, com as amostras *driver*, representadas pelo tratamento controle. Ao final dos ciclos de hibridizações, são amplificados somente fragmentos *tester* que não têm contrapartida no *pool* de fragmentos *driver*. Esses fragmentos foram clonados utilizando o “Topo TA Cloning Kit” (Invitrogen). Os fragmentos foram ligados no vetor pCR “2.1-TOPO” (Invitrogen), no qual o sítio de clonagem interrompe o gene *lacZ*. Em seguida, os vetores contendo os fragmentos foram inseridos em células competentes (*E. coli*, linhagem XL1) por eletroporação. As células foram crescidas por 16 h em placas de Petri contendo meio LB / ágar com ampicilina ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### **2.3 Seleção de Clones para Sequenciamento**

A análise de clones positivos foi feita conforme Item 2.3.3.1 do Capítulo III. No total foram obtidas 383 colônias, das quais foram selecionadas aleatoriamente 275 para o teste de clones positivos. Para seqüenciamento foram selecionados 209 clones, o qual foi realizado de acordo com protocolo descrito no Item 2.3.3.2 (Capítulo III).

### **2.4 Análise das Seqüências**

As seqüências obtidas foram analisadas utilizando o programa Chromas para verificar a qualidade do sequenciamento nos eletroferogramas. Das seqüências selecionadas foram retirados os segmentos de seqüências referentes ao primer utilizado para sequenciamento bem como os referentes aos adaptadores que são ligados nas seqüências diferencialmente expressas. A análise das seqüências foi feita utilizando ferramentas de bioinformática, como Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990), nas bases de dados de proteínas não redundantes do NCBI - *National Center Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e EMBL/EBI - *European Molecular*

*Biology Laboratory / European Bioinformatics Institute*  
(<http://www.ebi.ac.uk/services>).

Para predição de função e vias metabólicas foram utilizados os programas *Panther Classification System* (<http://www.pantherdb.org/gene>), *KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) e *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org/>). Para mapeamento *in silico* foi utilizada a base de dados de EST's (*Expressed Sequence Tag*) mapeadas de trigo do *GrainGenes2.0* (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>). O alinhamento das seqüências foi feito usando o programa *CLC Workbench2.0*.

## 2.5 Validação dos Experimentos de Hibridização Subtrativa

A validação dos experimentos de hibridização subtrativa foi realizada utilizando a técnica de macroarranjo. Na membrana de nitrocelulose foram fixados os clones obtidos na biblioteca de subtração (Tabela 1), de acordo com protocolo sugerido por Sambrook et al. (1989). O controle positivo foi cDNA de Toropi amplificado com primers para actina e como controle negativo foi usado DNA plamidial. O conjunto de clones selecionados e os controles foram fixados em três réplicas na membrana. Como sonda foi utilizado mRNA de Toropi submetido a 1 h de estresse com 74  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . A marcação dos mRNAs foi feita utilizando procedimento não radioativo através do "Kit Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System" (Amersham Bioscience). Esse sistema de marcação da sonda está baseado na ligação do mRNA a uma enzima fosfatase alcalina termoestável. Procedeu-se a hibridização da sonda com a membrana *overnight* a temperatura de 55°C. A detecção foi feita utilizando um sistema de quimioluminescência, onde ocorre a quebra do substrato dioxetano pela fosfatase alcalina. As membranas foram expostas a um filme de raio-x por 2 h inicialmente. A revelação do filme de raio-x foi feita utilizando solução reveladora e fixadora da Fuji Films. As demais exposições da membrana ao filme de raio-x foram feitas *overnight*.

A segunda estratégia utilizada para validar as seqüências diferencialmente expressas foi a amplificação do DNA dos progenitores, utilizando *primers* projetados para as seqüências com homologia a fatores de transcrição e

seqüências mapeadas *in silico* no cromossomo 4D de trigo. Os *primers* foram projetados utilizando o programa OligoPerfect™ Designer, da Invitrogen e sintetizados pela mesma empresa. A Tabela 2 apresenta a seqüência dos *primers*.

Tabela 1. Clones fixados na membrana de nitrocelulose para o experimento de macroarranjo

	1	2	3	4
A	AluTp9- Proteína Hipotética	AluTp15- Beta cetoacil ACP sintase	AluTp67- Gama glutamil cisteína sintetase	AluTp16- Corimato sintase
B	AluTp12- Quinesina	AluTp8- Enoil ACPp redutase	AluTp13- Fator de transcrição	AluTp100- Catepsina
C	AluTp13- Fator de transcrição	AluTp63- ATP sintase	AluTp71- Proteína de ligação a calmodulina	AluTp101- Alanina aminotransferase
D	AluTp4- Succinil-CoA ligase	AluTp24- Sem similaridade	AluTp14- Proteína quinase	AluTp92- Celulose sintase
E	AluTp64- Isocitrato Dehidrogenase	AluTp6- ATP sintase vacuolar	AluTp88- Proteína de resposta a patógeno	AluTp90- Dehidroquinato hidratase
F	AluTp10- Aconitase hidratase	AluTp7- Calreticulina	AluTp22- Focéina	AluTp108- Proteína atividade monoxigenase
G	AluTp11- Succinato dehidrogenase	AluTp37- Enzima Metabolizadora de ácidos graxos	AluTp78- Catalase	C <sup>+</sup> - Actina
H	AluTp67- Gama glutamil cisteína sintetase	AluTp44- Peroxidase	AluTp17- Caseína	C <sup>-</sup> - DNA plasmidial

Tabela 2. *Primers* projetados com base nas seqüências de cDNAs diferencialmente expressas reguladas pelo alumínio tóxico em Toropi

Nome	Seqüência (5' → 3')
AluTp7-F	CGGGGATGTTGTTCTTCTAC
AluTp7-R	ACCGCTATGACCAAGTTTCG
AluTp9-F	TGCAATCTGCTTTAACAAACACC
AluTp9-R	TTTTGATCATGCATACCGTG
AluTp10-F	GGTGCTGAGTATGGCAGTGG
AluTp10-R	GCTCGTATGTTGGGGGAATG
AluTp13-F	CAATGCTAGAGGAAGCAGTGG
AluTp13-R	CCCAGGAAATTCCAAGAAAAG
AluTp30-F	TGAGAAAATTTGGCGATTCC
AluTp30-R	CCAATGAAGTGCAAATGGTG
AluTp43-F	CCGAGGTACACATAGCACG
AluTp43-R	AATGACAAATTGCGTGACG
AluTp48-F	CAATCACTTTGCTGGGGAAC
AluTp48-R	TGAGGGACCAAGTTTTCCAC
AluTp59-F	TCAGGCGTGATTGGAGTATG
AluTp59-R	CATCCACTTGTTAGGGTCTCG
AluTp68-F	CGGACTGTTCTTTTGCTTCC
AluTp68-R	GTCAGATGTCGGATCCTCGT
AluTp83-F	CAGCGTGCTGTGTCAAAGTC
AluTp83-R	ACAAAGAAATGCGGTGCTTC

Para verificar a existência de polimorfismo entre Toropi e Anahuac, utilizou-se 25ng de DNA de cada progenitor para PCR com cada primer projetado. A reação de amplificação seguiu concentrações ideais para enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen),  $MgCl_2$  1,5 mM, dNTP 200  $\mu$ M, tampão da polimerase 1X, 1U de Taq DNA polimerase e 10  $\mu$ mol de cada primer em um volume final de 25  $\mu$ l. As amplificações foram conduzidas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc), com 30 ciclos de 94°C por 1', 55°C 1', 72°C 2' e extensão final a 72°C por 10'.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2%, tamponados com TBE 0,5 X, corados com brometo de etídio (8  $\mu$ l para 300 ml de gel), visualizados em transluminador UV. As imagens foram capturadas e digitalizadas através do aplicativo EDAS (Kodak Digital Science TM).

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Identificação de Genes Regulados pelo Alumínio Tóxico

Foram seqüenciados 209 clones, dos quais obteve-se 109 seqüências de boa qualidade. Os clones foram renomeados para AluTp (**Alumínio Toropi**), seguido do número de identificação da seqüência. As seqüências foram comparadas com seqüências depositadas no banco de dados de proteínas através do BLASTx (NCBI e EBI-EMBL).

A análise através do BLASTx indicou que a biblioteca subtraída apresenta baixo nível de redundância, sendo que dos 209 clones seqüenciados, 99 clones eram seqüências únicas, as quais foram agrupadas de acordo com sua atividade no metabolismo (Tabela 3). Esses clones representam um grande número de categorias funcionais que incluem metabolismo, crescimento e manutenção celular, transdução de sinais, resposta a estresses, regulação da transcrição e outros como indicado na Figura 1.

Dos 99 clones, 64 (65%) apresentaram similaridade com seqüências de proteínas do NCBI e/ou EBI-EMBL indicando ser o mesmo gene ou pertencer a mesma família gênica. Já 15 clones (15%) apresentaram similaridade com proteínas hipotéticas ou de função desconhecida. Outros 20 clones (20%) não apresentaram similaridade significativa com seqüências depositadas nos bancos de dados, podendo representar seqüências ainda não caracterizadas ou fragmentos tão curtos que não revelam qualquer similaridade significativa. Desses clones, 16 apresentaram tamanho de inserto entre 180 e 300 pb, o que poderia explicar a ausência de similaridade. No entanto, quatro clones (AluTp21, AluTp50, AluTp65 e AluTp68) apresentavam tamanho variando entre 420 e 766 pb, indicando ser essas seqüências ainda não caracterizadas por serem grandes o suficiente para detectar homologia com seqüências depositadas.

Na busca de informações para os clones correspondentes a proteínas hipotéticas e sem similaridade significativa, foram realizadas comparações contra os bancos de dados do GrainGenes 2.0, utilizando a opção EST's mapeadas de trigo, e também utilizando a base de dados de EST's do NCBI, através da função Blastn. Os resultados estão apresentados na Figura 2 e Tabela 4.



Tabela 3. Classificação dos cDNAs diferencialmente expressos do genótipo tolerante Toropi em resposta ao estresse de alumínio tóxico ( $Al^{3+}$ ) por 1 h

Clone	Descrição	Espécie	Nº Acesso	Escore	Identidade (%)	e-Value	Base Dados
<b>Transdução de Sinais</b>							
AluTp45	Proteína quinase BKIN12	<i>Hordeum vulgare</i>	Q40030	57	48	$8,1e^{-01}$	EMBL
AluTp14	Possível proteína quinase OSK	<i>Oryza sativa</i>	BAA36298.1	299	96	$3e^{-80}$	NCBI - EMBL
AluTp19	UMP/CMP quinase B	<i>Oryza sativa</i>	AAF23372.1	206	96	$3e^{-52}$	NCBI - EMBL
AluTp41	Possível receptor quinase 5	<i>Oryza sativa</i>	BAD33886.1	33.1	31	3,7	NCBI
AluTp42	Proteína quinase serine/treonine OSJNBa0070M12.8	<i>Oryza sativa</i>	XP_474430	62	79	$8e^{-09}$	NCBI - EMBL
AluTp62	Possível proteína fosfatase tipo-2C	<i>Oryza sativa</i>	BAD28017.1	353	89	$6e^{-96}$	NCBI - EMBL
AluTp71	Possível proteína de ligação à calmodulina OSJNBa0058G03.4	<i>Oryza sativa</i>	XP_472636	315	85	$8e^{-85}$	NCBI - EMBL
AluTp89	Proteína tipo fosfatase com domínio C-terminal	<i>Oryza sativa</i>	BAD82045.1	221	69	$3e^{-56}$	NCBI - EMBL
AluTp103	Possível UMP/CMP quinase A	<i>Oryza sativa</i>	BAD19510.1	161	96	$3,3e^{-10}$	NCBI - EMBL
AluTp17	Caseína quinase II alfa	<i>Triticum aestivum</i>	BAB59136.1	262	100	$3e^{-69}$	NCBI - EMBL
<b>Transportador de Membrana</b>							
AluTp5	Proteína expressa de membrana	<i>Oryza sativa</i>	ABA98250	363	91	$2,7e^{-100}$	NCBI - EMBL
<b>Respiração Celular</b>							
AluTp11	Succinato desidrogenase flavoproteína subunidade alfa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAA05025.1	68.2	87	$1e^{-10}$	NCBI - EMBL
AluTp26	Piruvato decarboxilase LTA2 - subunidade e2 plastidial	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_189215.1	198	85	$1e^{-64}$	NCBI - EMBL
AluTp48	Ubiquinol-citochrome-c redutase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_190841.1	48.1	80	$3e^{-04}$	NCBI
AluTp37	Enzime metabolizadora de hidroxiperoxidos de ácidos graxos	<i>Cucumis melo</i>	Q8L5M6	58	45	$1,3e^{-01}$	EMBL
AluTp4	Possível succinil-CoA ligase (GDP-forming) cadeia beta	<i>Oryza sativa</i>	XP_466806.1	163	95	$2e^{-67}$	NCBI
AluTp43	Proteína contendo domínio tipo ATP-ase com região de ligação TP	<i>Oryza sativa</i>	BAD88048.1	68.6	73	$8e^{-11}$	NCBI - EMBL
AluTp63	Possível ATP sintase cadeia delta	<i>Oryza sativa</i>	BAD37612.1	94.7	83	$6,5e^{-30}$	NCBI - EMBL
AluTp64	NADP-especifica isocitrato desidrogenase (EC 1.1.1.42).	<i>Oryza sativa</i>	NP_917313.1	305	88	$2e^{-81}$	NCBI - EMBL
AluTp108	Proteína OSJNBb0072N21.3	<i>Oryza sativa</i>	CAD39837.2	188	84	$3,6e^{-12}$	NCBI - EMBL
AluTp10	Possível aconitase hidratase 1	<i>Sorghum bicolor</i>	ABE77202.1	211	96	$2e^{-87}$	NCBI - EMBL
AluTp6	ATP sintase vacuolar subunidade E	<i>Triticum aestivum</i>	ABC70183.1	190	97	$2e^{-47}$	NCBI - EMBL
AluTp29	Dihidrolipoamide S-acetiltransferase (EC 2.3.1.12).	<i>Zea mays</i>	AAD46491	282	90	$5e^{-75}$	NCBI - EMBL

Tabela 3. Continuação ...

Clone	Descrição	Espécie	Nº Acesso	Escore	Identidade (%)	e-Value	Base Dados
<b>Síntese, Processamento e Degradação de Proteínas</b>							
AluTp97	Possível proteína ribossomal citoplasmática S15a	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM14312.1	44.3	100	2e <sup>-03</sup>	NCBI - EMBL
AluTp47	Possível proteína L2 ribossomal	<i>Eucalyptus globulos</i>	Q6KC73	43	100	5,2	EMBL
AluTp52	Possível proteína ribossomal subunidade pequena	<i>Oryza sativa</i>	AAT85310.1	81,3	67	2e <sup>-14</sup>	NCBI - EMBL
AluTp61	Proteína tipo pirrolidone carboxil peptidase	<i>Oryza sativa</i>	XP_479284.1	227	94	1e <sup>-58</sup>	NCBI - EMBL
AluTp69	Fator de alongação G mitocondrial	<i>Oryza sativa</i>	AAK53868.1	330	93	2e <sup>-89</sup>	NCBI - EMBL
AluTp99	Possível proteína fator de tradução Sui1	<i>Oryza sativa</i>	XP_475493.1	145	92	4e <sup>-34</sup>	NCBI - EMBL
AluTp109	Possível fator de iniciação de tradução P0684C02.19	<i>Oryza sativa</i>	BAD53005.1	208	95	3,5e <sup>-15</sup>	NCBI - EMBL
AluTp54	Fator de iniciação de tradução	<i>Triticum aestivum</i>	AAM34279.1	45.8	100	6e <sup>-54</sup>	NCBI - EMBL
AluTp7	Proteína tipo calreticulina	<i>Triticum aestivum</i>	AY836753	302	91	1,4e <sup>-30</sup>	EMBL
AluTp74	Fator de iniciação de tradução subunidade 2 beta	<i>Triticum aestivum</i>	IF2B	857	99	5,9e <sup>-84</sup>	EMBL-NCBI
AluTp100	Catepsina B	<i>Triticum aestivum</i>	CAA46811.1	190	94	8e <sup>-13</sup>	NCBI - EMBL
<b>Metabolismo de Lipídeos</b>							
AluTp15	beta-cetoacil-ACP sintase	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA84022.1	164	96	1,3e <sup>-09</sup>	NCBI - EMBL
AluTp8	Possível enoil-ACP redutase	<i>Oryza sativa</i>	XP_481639.1	102	91	7e <sup>-21</sup>	NCBI - EMBL
AluTp77	Possível serina palmitoiltransferase	<i>Oryza sativa</i>	NP_920251.1	181	80	2e <sup>-44</sup>	NCBI - EMBL
<b>Metabolismo de Carboidratos</b>							
AluTp35	Aldose 1-epimerase	<i>Oryza sativa</i>	XP_474188	298	94	9e <sup>-80</sup>	NCBI
AluTp92	Possível proteína tipo celulose sintase OsCsIE1	<i>Oryza sativa</i>	BAD46391.1	162	67	5e <sup>-39</sup>	NCBI - EMBL
AluTp58	Sintase amido solúvel	<i>Triticum aestivum</i>	AAB02197	76.3	100	1e <sup>-12</sup>	NCBI
<b>Resposta a Estresse Oxidativo</b>							
AluTp44	Possível peroxidase classe III	<i>Oryza sativa</i>	XP_479280.1	58.5	74	8e <sup>-08</sup>	
AluTp67	Gama-glutamilcisteine sintetase (EC 6.3.2.2)	<i>Triticum aestivum</i>	AAW58147.1	267	99	4e <sup>-70</sup>	NCBI - EMBL
AluTp78	Catalase CAT-2 (EC 1.11.1.6)	<i>Zea mayz</i>	A55092	61.6	100	1e <sup>-08</sup>	NCBI
<b>Proteínas de Resistência à Doença</b>							
AluTp22	Possível proteína família Mob1/foceína	<i>Oryza sativa</i>	AAT76373.1	125	82	4e <sup>-28</sup>	NCBI - EMBL
AluTp46	Proteína LRR ( <i>Leucine-rich repeat</i> )	<i>Oryza sativa</i>	Q5VQP7	69	53	6e <sup>-05</sup>	EMBL
AluTp84	Possível proteína contendo domínio NB-ARC	<i>Oryza sativa</i>	ABA94738	108	48	2e <sup>-22</sup>	NCBI - EMBL
AluTp88	Possível sds22+ OSJNBb0035N08.27	<i>Oryza sativa</i>	XP_464782.1	226	88	4e <sup>-58</sup>	NCBI - EMBL

Tabela 3. Continuação ...

Clone	Descrição	Espécie	Nº Acesso	Escore	Identidade (%)	e-Value	Base Dados
<b>Metabolismo de Aminoácidos</b>							
AluTp101	Alanina aminotransferase (EC 2.6.1.2)	<i>Hordeum vulgare</i>	CAA81231.1	125	93	4e <sup>-28</sup>	NCBI - EMBL
AluTp85	Possível beta-alanina sintase	<i>Oryza sativa</i>	XP_478118.1	363	96	1e <sup>-99</sup>	NCBI - EMBL
<b>Fatores de Transcrição</b>							
AluTp13	Proteína tipo fator de transcrição (bHLH)	<i>Oryza sativa</i>	XP_478937.1	85.9	74	5e <sup>-16</sup>	NCBI - EMBL
<b>Metabolismo de Compostos Secundários</b>							
AluTp16	Possível corimato sintase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAG50662.1	137	70	1e <sup>-31</sup>	NCBI - EMBL
AluTp90	Possível 3-dehidroquinato desidratase	<i>Oryza sativa</i>	NP_918759.1	153	88	5e <sup>-36</sup>	NCBI - EMBL
<b>Divisão Celular e Citoesqueleto</b>							
AluTp12	Proteína quinesina cadeia pesada	<i>Oryza sativa</i>	AAO72695.1	127	75	3e <sup>-28</sup>	NCBI - EMBL
AluTp95	Actina	<i>Vitis vinifera</i>	Q5I6Y3	70	81	1,6e <sup>-01</sup>	EMBL
<b>Trafico de Vesículas</b>							
AluTp40	Proteína de transporte CEF	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAC16574	39.7	30	8,4e <sup>-02</sup>	NCBI
AluTp2	Possível fator de ribosilação ADP	<i>Oryza sativa</i>	NP_922901.1	231	97	7e <sup>-60</sup>	NCBI - EMBL
<b>Topologia, Transcrição e Replicação de DNA</b>							
AluTp59	DNA polimerase subunidade catalítica alfa	<i>Oryza sativa</i>	O48653	307	91	2e <sup>-82</sup>	NCBI - EMBL
AluTp83	Proteína OJ1066_B03.125 do gene DNA topoisomerase I	<i>Oryza sativa</i>	XP_507134.1	273	86	4e <sup>-72</sup>	NCBI - EMBL
<b>Outras Categorias</b>							
AluTp98	Possível canal mecânico sensível	<i>Natronomonas pharaonis</i>	Q3IPM1	87	33	1,1	NCBI - EMBL
AluTp18	Possível proteína contendo domínio ACT	<i>Oryza sativa</i>	ABA95833.1	98.2	100	1e <sup>-19</sup>	NCBI - EMBL
AluTp55	Possível proteína <i>zinc-finger</i>	<i>Oryza sativa</i>	AAS98500.1	37	35	2,9e <sup>-01</sup>	NCBI - EMBL
AluTp72	Proteína associada ao desenvolvimento de nódulos	<i>Oryza sativa</i>	NP_922205.1	151	79	2e <sup>-35</sup>	NCBI - EMBL
AluTp73	Possível proteína relacionada ao amadurecimento	<i>Triticum aestivum</i>	CAE54280	43.5	98	1e <sup>-05</sup>	NCBI - EMBL

Tabela 3. Continuação ...

Clone	Descrição	Espécie	Nº Acesso	Escore	Identidade (%)	e-Value	Base Dados
<b>Proteína Hipotética</b>							
AluTp27	Proteína hipotética	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9LGZ9	162	96	3,4e <sup>-10</sup>	EMBL
AluTp30	Proteína hipotética	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_198754	87	67	7e <sup>-16</sup>	NCBI – EMBL
AluTp57	Proteína hipotética	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q1PEQ2	52	64	5,3	EMBL
AluTp81	Proteína hipotética P1 clone:MUD21	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAB08624.1	52.4	30	2e <sup>-05</sup>	NCBI – EMBL
AluTp9	Proteína hipotética OSJNBa0004I20.3	<i>Oryza sativa</i>	AP000616	121	83	1e <sup>-05</sup>	EMBL
AluTp23	Proteína hipotética B1123e10.104.	<i>Oryza sativa</i>	Q84PR1	80	72	6,8e <sup>-05</sup>	EMBL
AluTp31	Proteína hipotética P0026H03.7	<i>Oryza sativa</i>	P0026H03.7	115	44	5,5e <sup>-05</sup>	EMBL
AluTp32	Proteína hipotética OSJNBa0051D19.4	<i>Oryza sativa</i>	Q9FWV7	696	96	6,7e <sup>-67</sup>	EMBL
AluTp34	Proteína hipotética B1136H02.30.	<i>Oryza sativa</i>	Q6ePW4	179	68	3,1e <sup>-15</sup>	EMBL
AluTp36	Proteína hipotética LOC_Os12g39540	<i>Oryza sativa</i>	ABA99724	127	49	1e <sup>-28</sup>	NCBI
AluTp38	OSJNBa0006B20.20	<i>Oryza sativa</i>	XP_472597	216	86	2e <sup>-55</sup>	NCBI
AluTp39	Proteína hipotética	<i>Oryza sativa</i>	Q6H744	114	38	3,2e <sup>-05</sup>	EMBL
AluTp53	Proteína hipotética	<i>Oryza sativa</i>	AAT44152.1	129	75	8e <sup>-29</sup>	NCBI – EMBL
AluTp66	Proteína hipotética B1136H02.30	<i>Oryza sativa</i>	BAD29306	140	64	1,1e <sup>-07</sup>	EMBL
AluTp75	Proteína expressa	<i>Oryza sativa</i>	ABA99948.1	98,2	70	1e <sup>-19</sup>	NCBI – EMBL
AluTp102	Proteína hpotética	<i>Oryza sativa</i>	AAP12922.1	31	38	1,4	EMBL
<b>Sem Similaridade Significativa</b>							
AluTp21							NCBI - EMBL
AluTp24							NCBI - EMBL
AluTp25							NCBI - EMBL
AluTp28							NCBI - EMBL
AluTp49							NCBI - EMBL
AluTp50							NCBI - EMBL
AluTp56							NCBI - EMBL
AluTp65							NCBI - EMBL
AluTp68							NCBI - EMBL
AluTp70							NCBI - EMBL
AluTp76							NCBI - EMBL

Tabela 3. Continuação ...

Clone	Descrição	Espécie	Nº Acesso	Score	Identidade (%)	e-Value	Base Dados
<b>Sem Similaridade Significativa</b>							
AluTp82							NCBI - EMBL
AluTp86							NCBI - EMBL
AluTp87							NCBI - EMBL
AluTp91							NCBI - EMBL
AluTp96							NCBI - EMBL
AluTp104							NCBI - EMBL
AluTp105							NCBI - EMBL
AluTp106							NCBI - EMBL
AluTp107							NCBI - EMBL

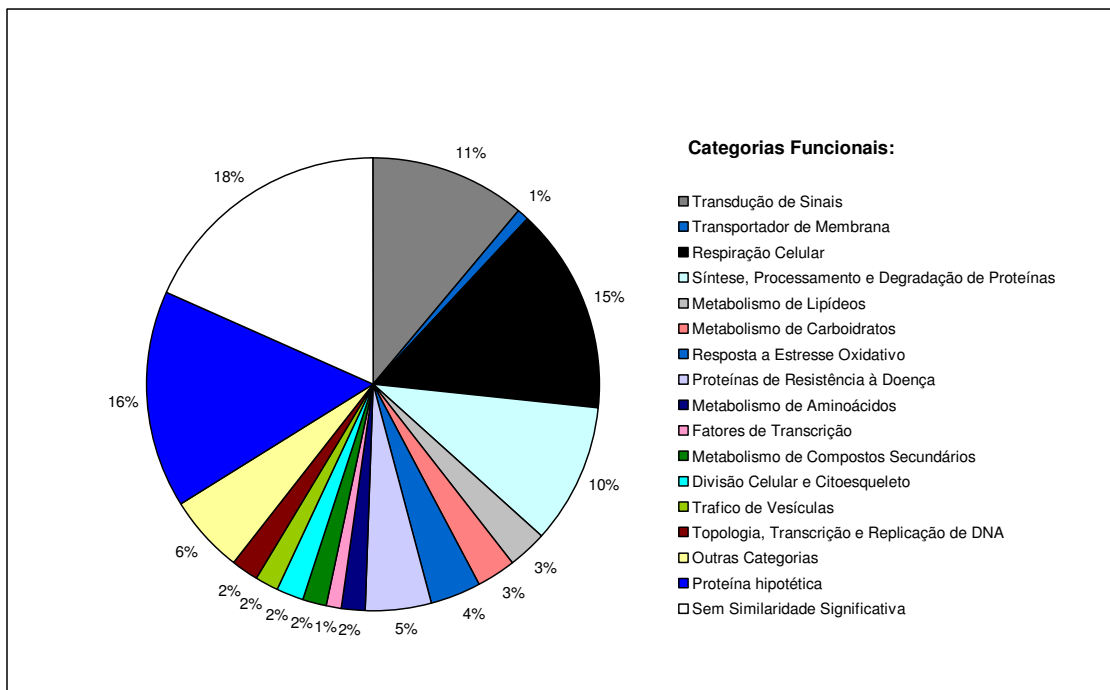


Figura 1. Classificação funcional dos cDNAs de trigo regulados pelo alumínio com similaridade com seqüências dos bancos de dados do NCBI e do EMBL-EBI, utilizando BLASTx e Blast-wu.

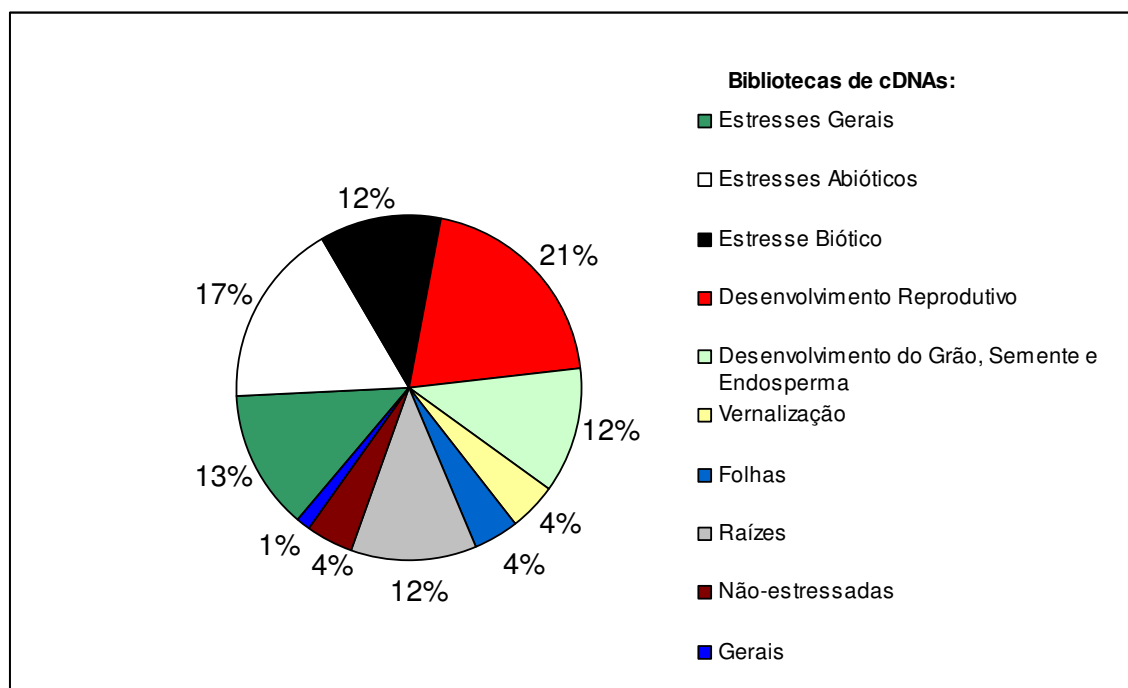


Figura 2. Classificação dos cDNAs pertencentes as categorias Proteína Hipotética e Sem Similaridade Significativa a partir da comparação com seqüências de ESTs dos bancos de dados do GrainGenes2.0 e do NCBI, utilizando Blastn.

Tabela 4. Classificação dos cDNAs diferencialmente expressos por Toropi em resposta ao estresse de alumínio

Clone	Categoria: Proteínas Hipotéticas / Descrição	Espécie	Acesso	e-Value	Base de Dados
AluTp9	Biblioteca de cDNA de ápice reprodutivo precoce cDNA de espigas em resposta a frio	<i>Triticum momococcum</i>	BG607344	0,88	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CK208155	4e <sup>-146</sup>	NCBI-ESTs
AluTp23	Biblioteca de cDNA de ápice reprodutivo precoce cDNA clone whyf22d24 espiga em florescimento precoce	<i>Triticum monococcum</i>	BG606926	2,1	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	BJ321774	7e <sup>-57</sup>	NCBI-ESTs
AluTp27	Biblioteca de cDNA de folha bandeira estressada por calor mRNA derivado de arroz, possível histona deacetilase	<i>Triticum aestivum</i>	BE591764	1,8	Graingenes
		<i>Oryza sativa</i>	CF317082	8e <sup>-04</sup>	NCBI-ESTs
AluTp30	Biblioteca de cDNA de ápice reprodutivo precoce cDNA em resposta a estresse abiótico	<i>Triticum aestivum</i>	BG312734	0,11	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CV759398	0,0	NCBI-ESTs
AluTp31	Biblioteca de cDNA de endosperma cDNA expresso no desenvolvimento das sementes	<i>Triticum aestivum</i>	BE424194	0,006	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	BQ238737	0,011	NCBI-ESTs
AluTp32	Biblioteca de cDNA ramos de plântulas não estressadas cDNA em resposta a estresse por frio	<i>Triticum aestivum</i>	BE425918	0,0	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ639743.1	0,0	NCBI-ESTs
AluTp34	Biblioteca de cDNA espigas em pre-antese Biblioteca de cDNA ramos de plântulas não estressadas	<i>Triticum aestivum</i>	BE637813	2e <sup>-72</sup>	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	BE426320	0,87	Graingenes
AluTp36	cDNA clone wpi1s.pk005.g10 folha	<i>Triticum aestivum</i>	CA735907	1e <sup>-170</sup>	NCBI-ESTs
AluTp38	Biblioteca de cDNA de folhas estressadas por seca cDNA clone wre1n.pk171.d6 raiz	<i>Triticum aestivum</i>	BF478852	0,84	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CA652798	0,0	NCBI-ESTs
AluTp39	Biblioteca de cDNA ramos de plântulas não estressadas cDNA clone rwhrd8m08 raízes em resposta a estresse	<i>Triticum aestivum</i>	BE489692	0,72	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ585996	2e <sup>-64</sup>	NCBI-ESTs
AluTp53	Biblioteca de cDNA folhas estressadas por seca cDNA de raízes em resposta a estresse por frio e calor	<i>Triticum aestivum</i>	BF478852	0,39	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CK201183	0,0	NCBI-ESTs
AluTp57	Biblioteca de cDNA normalizada de raízes de plantas estioladas	<i>Triticum aestivum</i>	BE405060	0,18	Graingenes
AluTp66	Biblioteca de cDNA de espigas inoculadas com <i>Fusarium graminearum</i> cDNA induzido por frio similar a nitrato redutase	<i>Triticum aestivum</i>	BM138339	1,7	Graingenes
		<i>Poncirus trifoliolata</i>	CX065948	0,0	NCBI-ESTs
AluTp75	Biblioteca de cDNA de espigas inoculadas com <i>Fusarium graminearum</i> cDNA clone whrd16d16 em resposta a estresses	<i>Triticum aestivum</i>	BM140321	0,12	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ689005	2e <sup>-106</sup>	NCBI-ESTs
AluTp81	Biblioteca de cDNA espigas em pre-antese cDNA de semente clone rwhms11d0 em resposta a estresses	<i>Triticum aestivum</i>	BF201688	0,44	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ565773	0,0	NCBI-ESTs
AluTp102	Biblioteca de cDNA normalizada de raízes de plantas estioladas cDNA de grãos clone G608103D23	<i>Triticum aestivum</i>	BE443754	1e <sup>-04</sup>	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CD916862	2e <sup>-56</sup>	NCBI-ESTs

Tabela 4. Continuação ...

Clone	Categoria: Sem Identidade Significativa / Descrição	Espécie	Acesso	e-Value	Base de Dados
AluTp21	Biblioteca de cDNA de endosperma	<i>Triticum aestivum</i>	BE498110	1,4	GrainGenes
AluTp24	Biblioteca de cDNA de ápice reprodutivo precoce cDNA de raiz (Du Pont)	<i>Triticum momococcum</i>	BG314232	1,3	GrainGenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CA645341	2e <sup>-40</sup>	NCBI-ESTs
AluTp25	Biblioteca de cDNA espigas e sementes Biblioteca de cDNA de folha (DuPont)	<i>Triticum aestivum</i>	BG262272	0,50	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CA659610	4e <sup>-15</sup>	NCBI-ESTs
AluTp28	Biblioteca de cDNA de coroa vernalizada cDNA clone WHE0807_D01_H01 de coroa vernalizada	<i>Triticum aestivum</i>	BE518044	1,7	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	BE518196	3e <sup>-65</sup>	NCBI-ESTs
AluTp49	Biblioteca de cDNA de espigas inoculadas com <i>Fusarium graminearum</i> Biblioteca de cDNA de ramos em resposta a frio	<i>Triticum aestivum</i>	BM140321	0,026	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ692991	6e <sup>-168</sup>	NCBI-ESTs
AluTp50	Biblioteca de cDNA de espigas inoculadas com <i>Fusarium graminearum</i> Biblioteca de cDNA de espigas inoculadas com <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	BM140321	0,24	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	BQ903666	0,0	NCBI-ESTs
AluTp56	Biblioteca de cDNA normalizada de raízes de plantas estioladas	<i>Triticum aestivum</i>	BE442869	0,16	Graingenes
AluTp65	Biblioteca de cDNA de ápice reprodutivo precoce Biblioteca de cDNA de folha (DuPont)	<i>Triticum monococcum</i>	BG314157	0,075	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CA686570	0,0	NCBI-ESTs
AluTp68	Biblioteca de cDNA de bainha estressada por salinidade cDNA clone rwhcs6f21 em resposta a estresses	<i>Triticum aestivum</i>	BG313790	0,44	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ522486	8e <sup>-04</sup>	NCBI-ESTs
AluTp70	Biblioteca de cDNA espigas em pre-antese cDNA clone rwhsd13b11 em resposta a dessecação	<i>Triticum aestivum</i>	BF483648	0,66	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ592512	4e <sup>-102</sup>	NCBI-ESTs
AluTp76	Biblioteca de cDNA de endosperma cDNA clone rwhvd19i08 em respostas a estresses	<i>Triticum aestivum</i>	BE422909	0,46	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ614217	3e <sup>-105</sup>	NCBI-ESTs
AluTp82	Biblioteca de cDNA de espigas inoculadas com <i>Fusarium graminearum</i> cDNA de semente clone rwhms4b03 em resposta estresse	<i>Triticum aestivum</i>	BM140321	0,18	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	CJ569269	2e <sup>-116</sup>	NCBI-ESTs
AluTp86	Biblioteca de cDNA de antera Biblioteca de cDNA de endosperma	<i>Secale cereale</i>	BF145937	0,32	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	BE423506	0,32	Graingenes
AluTp87	Biblioteca de cDNA de espigas inoculadas com <i>Fusarium graminearum</i> cDNA clone OA_b3D01 em resposta a infecção por patógeno	<i>Triticum aestivum</i>	BM140321	0,098	Graingenes
		<i>Triticum aestivum</i>	AJ888705	3e <sup>-86</sup>	NCBI-ESTs



Tabela 4. Continuação ...

Clone	Categoria: Sem Identidade Significativa / Descrição	Espécie	Acesso	e-Value	Base de Dados
AluTp91	Biblioteca de cDNA de endosperma	<i>Triticum aestivum</i>	BE422909	0,46	Graingenes
	cDNA clone rwhvd19i08 em respostas a estresses	<i>Triticum aestivum</i>	CJ614217	3e <sup>-105</sup>	NCBI-ESTs
AluTp96	Biblioteca de cDNA antera	<i>Aegilops spetoides</i>	BG274119	0,043	Graingenes
	cDNA clone rwhi13c08 em resposta a estresses	<i>Triticum aestivum</i>	CJ535058	6e <sup>-98</sup>	NCBI-ESTs
AluTp104	Biblioteca de cDNA de ápice reprodutivo precoce	<i>Triticum monococcum</i>	BG607866	4e <sup>-64</sup>	Graingenes
	cDNA clone rwhvs5d10 em resposta a estresses	<i>Triticum aestivum</i>	CJ625743	7e <sup>-144</sup>	NCBI-ESTs
AluTp105	Biblioteca de cDNA espigas em pre-antese	<i>Triticum aestivum</i>	BE498371	0,49	Graingenes
	cDNA clone AZO2122D08 raízes	<i>Triticum aestivum</i>	CD873032	5e <sup>-107</sup>	NCBI-ESTs
AluTp106	Biblioteca de cDNA de coroa vernalizada	<i>Triticum aestivum</i>	BE518044	1,5	Graingenes
	Biblioteca de cDNA normalizada de raízes de plantas estioladas	<i>Triticum aestivum</i>	BE405483	1,5	Graingenes
	Clone RP-232 - raiz	<i>Triticum aestivum</i>	CV522526	1e <sup>-05</sup>	NCBI-ESTs
AluTp107	Biblioteca de cDNA espigas em pre-antese	<i>Triticum aestivum</i>	BF483648	0,66	Graingenes
	Biblioteca de cDNA de raízes estressadas por salinidade	<i>Triticum aestivum</i>	BQ744412	1e <sup>-99</sup>	NCBI-ESTs

De acordo com a Tabela 4, a maioria dos cDNAs corresponderam a cDNAs de bibliotecas construídas em resposta a estresses. Cerca de 17% apresentaram similaridade com seqüências depositadas em resposta a estresses abióticos (Figura 2). Embora 12% dos clones tenham apresentado similaridade com cDNAs de raízes, em sua maioria de plantas estioladas, nenhum dos clones apresentou similaridade com cDNAs de raízes em resposta ao Al<sup>3+</sup>.

### **3.2 Mapeamento *in silico*: onde estão esses genes nesse vasto genoma?**

As seqüências foram mapeados *in silico* no genoma do trigo através da comparação com a base de dados de EST's mapeadas de trigo do GrainGenes2.0 (Tabela 5, Figura 3).

Todas as seqüências foram mapeadas, havendo uma cobertura completa do genoma. Os cromossomos 1 (B e D), 4 (A, B e D) e 5 (A, B e D) foram os que concentraram um maior número de seqüências. Interessantemente os cromossomos 4 apresentam seqüências em posições invertidas. As seqüências AluTp59, AluTp77 e AluTp83 foram mapeadas no braço curto do cromossomo 4A (4AS) e no braço longo dos cromossomos 4B e 4D (4BL e 4DL). Já as seqüências AluTp48, AluTp68 e AluTp84 foram mapeadas no 4AL e no 4BS e 4DS. Isso sugere que ao longo da evolução processos de rearranjos cromossomais nas regiões referentes a essas seqüências possam ter ocorrido.

Algumas seqüências parecem ser exclusivas de determinados cromossomos/genomas enquanto outras parecem representar famílias gênicas, pois aparecem em mais de um cromossomo/genoma e em cromossomos distintos. Algumas seqüências não foram incluídas no mapa por apresentarem localização em mais de um cromossomo com igual valor de *e* (*e*-value), como por exemplo as seqüências referentes aos clones AluTp89, AluTp45, AluTp5 e AluTp64 (Tabela 5). O *e*-value é um valor que indica a probabilidade daquele evento não ter ocorrido por acaso, nesse caso a similaridade entre a seqüência de um clone e uma seqüência de EST's já mapeada no genoma do trigo. Logo seqüências mapeadas em mais de um cromossomo, com o mesmo valor de *e*, não poderiam ser consideradas no mapeamento *in silico*.

Tabela 5. Mapeamento *in silico* das seqüências induzidas por Al<sup>3+</sup> em Toropi

Clone	Cromossomos	Nº Acesso	Escore	e-Value
AluTp2	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,19
AluTp4	6AL 6BL 6DL	BE404354	133	1e <sup>-31</sup>
AluTp5	4BL 5AS 5BL 5DL	BF291333	32,2	0,44
AluTp5	3AL 3BL 3DL	BE445203	32,2	0,44
AluTp6	3AL 3BL 3DL	BE403201	565	1e <sup>-162</sup>
AluTp7	2BS 2DS	BE636951	34,2	0,11
AluTp7	5AL 5BL 5DL	BE590684	34,2	0,11
AluTp8	2AS 2BS 7DS	BG275095	30,2	0,96
AluTp9	3DS 5BL 5DS 7DL	BG607344	30,2	1
AluTp10	4DL 5AL	BE443205	472	e <sup>-133</sup>
AluTp11	4AL 7AS 7DS	BE489999	34,2	0,052
AluTp12	5AS 5BL 5DL	BG263528	32,2	0,31
AluTp12	1BL 4AL 7AS 7DS	BE604523	32,2	0,31
AluTp13	4BL	BE426474	34,2	0,058
AluTp14	3BL 3DL	BE606723	58	5e <sup>-09</sup>
AluTp15	2AS 2BS 2DS	BE498252	597	e <sup>-171</sup>
AluTp16	4AL 5BL 5DL	BF474862	32,2	0,17
AluTp16	4BL	BE590745	32,2	0,17
AluTp17	2AL	BE498566	597	e <sup>-171</sup>
AluTp18	3DL	BF485029	30,2	0,78
AluTp18	5AS 5BS	BE445181	30,2	0,78
AluTp18	7AL 7BL 7DL	BE442755	30,2	0,78
AluTp19	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,2
AluTp21	2BL 2DL 6BS 7BS	BE498110	30,2	1,4
AluTp21	2AL	BE444293	30,2	1,4
AluTp22	5AL	BE499592	36,2	0,014
AluTp23	1AL 1BL 1DL	BG606926	28,2	2,1
AluTp23	7AS	BF474337	28,2	2,1
AluTp24	6BL 6DS	BG314232	28,2	1,3
AluTp24	7AS 7BS 7DS	BE518044	28,2	1,3
AluTp25	2BS 2DS	BG262272	30,2	0,5
AluTp25	6BS 6DS	BF483025	30,2	0,5
AluTp26	3AL 3BL 5BL 5DL 7BL	BE607065	91,7	5e <sup>-19</sup>
AluTp27	2BS	BE591764	30,2	1,8
AluTp28	7AS 7BS 7DS	BE518044	28,2	1,7
AluTp29	7AS 7DS	BE443535	204	4e <sup>-53</sup>
AluTp30	4DL	BG312734	34,2	0,11
AluTp31	2AL 3BL 6AS 6BS 6DS	BE424194	38,2	0,006
AluTp32	1AL 1DL 5BL	BE425918	698	0
AluTp33	1AL 1BL 1DL	BF473109	268	2e <sup>-72</sup>
AluTp34	3BS	BE637813	32,2	0,35
AluTp35	6AS 6BS 6DS	BF428701	58	6e <sup>-09</sup>
AluTp36	2AL 2BL 2DL	BE426320	30,2	0,87
AluTp37	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,12
AluTp37	2AS 2BS 2DS	BE422835	32,2	0,12
AluTp38	4AL 6BL 7BL	BF478852	30,2	0,84

Tabela 5. Continuação ...

Clone	Cromossomos	Nº Acesso	Escore	e-Value
AluTp38	7AL	BE495644	30,2	0,84
AluTp39	1BL 1DS	BE489692	30,2	0,72
AluTp39	2AL 2BS	BE446609	30,2	0,72
AluTp40	4BL 4DL 5AL	BE494765	36,2	0,022
AluTp41	2BL 4BL	BG605035	322	0,17
AluTp42	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,19
AluTp43	7BS 7DS	BF483549	34,2	0,056
AluTp44	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,19
AluTp45	3DS	BM137369	28,2	1,8
AluTp45	1AS	BE637310	28,2	1,8
AluTp46	2BS	BF474133	34,2	0,038
AluTp47	4AL 7DS	BE499255	30,2	1,1
AluTp48	4AL 4BS 4DS	BE591356	34,2	0,099
AluTp49	1BL 1DL	BM140321	36,2	0,026
AluTp50	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,24
AluTp52	6BS	BG606650	32,2	0,34
AluTp52	1BS 1DS	BE494541	32,2	0,34
AluTp53	2AS 2BS 2DS	BE605065	32,2	0,39
AluTp54	2BS 2DS	BE500240	416	$e^{-117}$
AluTp55	3AL	BM137912	30,2	1,1
AluTp55	2AL 2BL 5BL	BG604426	30,2	1,1
AluTp56	4AS	BE442869	322	0,16
AluTp57	5AL 5BL 5DL 7BS	BE405060	32,2	0,18
AluTp58	7BS	BG607242	280	$1e^{-75}$
AluTp59	4AS 4BL 4DL	BG263213	32,2	0,32
AluTp59	6AL 6DL	BE426594	32,2	0,32
AluTp61	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,21
AluTp62	6DS	BG263145	890	0
AluTp63	6AL 6BL 6DL	BE497888	167	$7e^{-42}$
AluTp64	1AS 1DS	BM138275	30,2	1,7
AluTp64	1DL 7DS	BG608208	30,2	1,7
AluTp65	1AL 1BL 1DL	BG314157	34,2	0,075
AluTp66	6BS	BM138339	30,2	1,7
AluTp66	2AS 2BS 2DS 7DS	BE406923	30,2	1,7
AluTp67	1BS	BE445121	815	0
AluTp68	4AL 4BS 4DS	BG313790	32,2	0,44
AluTp69	7BL	BE638002	30,2	1,2
AluTp69	3BS	BE499387	30,2	1,2
AluTp70	6AS 6BS 7AL 7DL	BF483648	30,2	0,66
AluTp71	4BL 5AL	BF291651	32,2	0,34
AluTp72	4AL 7AS 7DS	BF473059	32,2	0,32
AluTp73	1DS 6BL	BE498802	32,2	0,11
AluTp74	4BL 4DL	BE495116	428	$e^{-120}$
AluTp75	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,12
AluTp75	2AS 2BS 2DS	BE422835	32,2	0,12
AluTp76	5BL 5DL	BE422909	30,2	0,46

Tabela 5. Continuação ...

<b>Clone</b>	<b>Cromossomos</b>	<b>Nº Acesso</b>	<b>Escore</b>	<b>e-Value</b>
AluTp77	4AS 4BL 4DL	BM138075	452	$e^{-127}$
AluTp78	3AL 3DL	BE495766	34,2	0,036
AluTp79	5AS 5BS 5DS	BE606723	36,2	0,025
AluTp80	3BL 3DL	BE606723	107	$1e^{-23}$
AluTp81	1BL	BF201688	32	0,44
AluTp82	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,18
AluTp83	4AS 4BL 4DL	BE604985	32,2	0,45
AluTp84	5AS 5BS 5DS	BE606654	36,2	0,029
AluTp85	4AL 4BS 4DS	BE498699	36,2	0,02
AluTp86	5AL 5BL	BF145937	30,2	0,32
AluTp86	1BS 1DS	BE423506	30,2	0,32
AluTp87	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,098
AluTp88	4AS 4DS	BG604493	34,2	0,078
AluTp88	6DL	BE443437	34,2	0,078
AluTp89	1DL	BE445475	32,2	0,46
AluTp89	4AL 4BL 4DL	BE403881	32,2	0,46
AluTp90	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,34
AluTp91	5BL 5DL	BE422909	30,2	0,46
AluTp92	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,26
AluTp95	5AL 5BL 5DL	BF483771	30,2	0,5
AluTp96	3BL	BG274119	34,2	0,043
AluTp97	5AL 5BL 5DL	BE496112	432	$e^{-122}$
AluTp98	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,21
AluTp99	1AL 1BL 1DL	BF200980	505	$e^{-144}$
AluTp100	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,13
AluTp101	5BL	BF484088	34,2	0,037
AluTp102	4AS	BE443754	42,1	0,0001
AluTp103	1BL 1DL	BM140321	32,2	0,2
AluTp104	5AS 5BS 5DS	BG607866	240	$4e^{-64}$
AluTp105	2BS 2DS 6AL	BE498371	30,2	0,49
AluTp106	7AS 7BS 7DS	BE518044	28,2	1,5
AluTp106	7DS	BE405483	28,2	1,5
AluTp107	6AS 6BS 7AL 7DL	BF483648	30,2	0,66
AluTp108	4BL	BE426474	34,2	0,058
AluTp109	1AL 1BL 1DL	BF200980	125	$1e^{-29}$

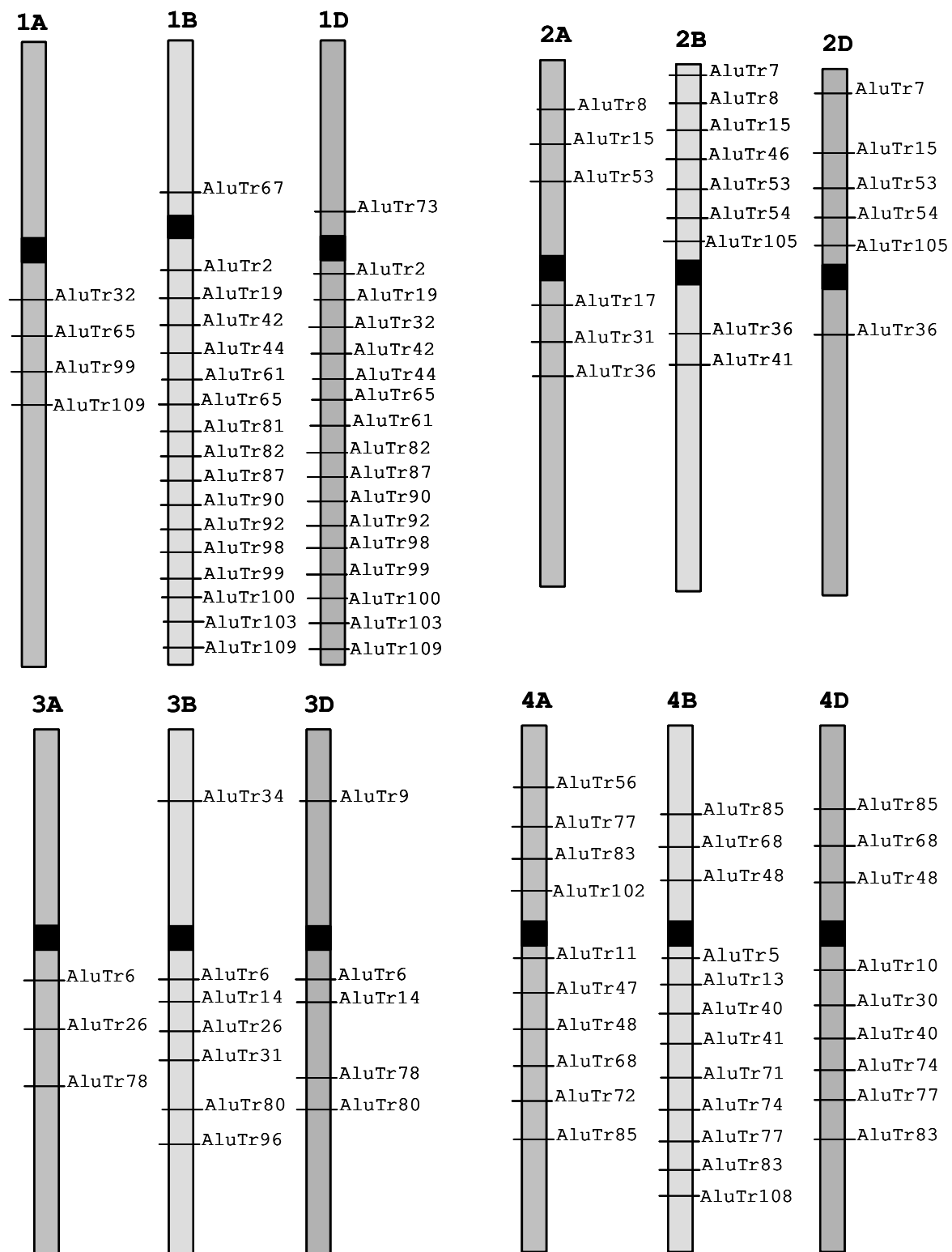


Figura 3. Mapeamento *in silico* das seqüências diferencialmente expressas utilizando a base de dados de EST's mapeadas de trigo do GrainGenes 2.0 – representação gráfica.

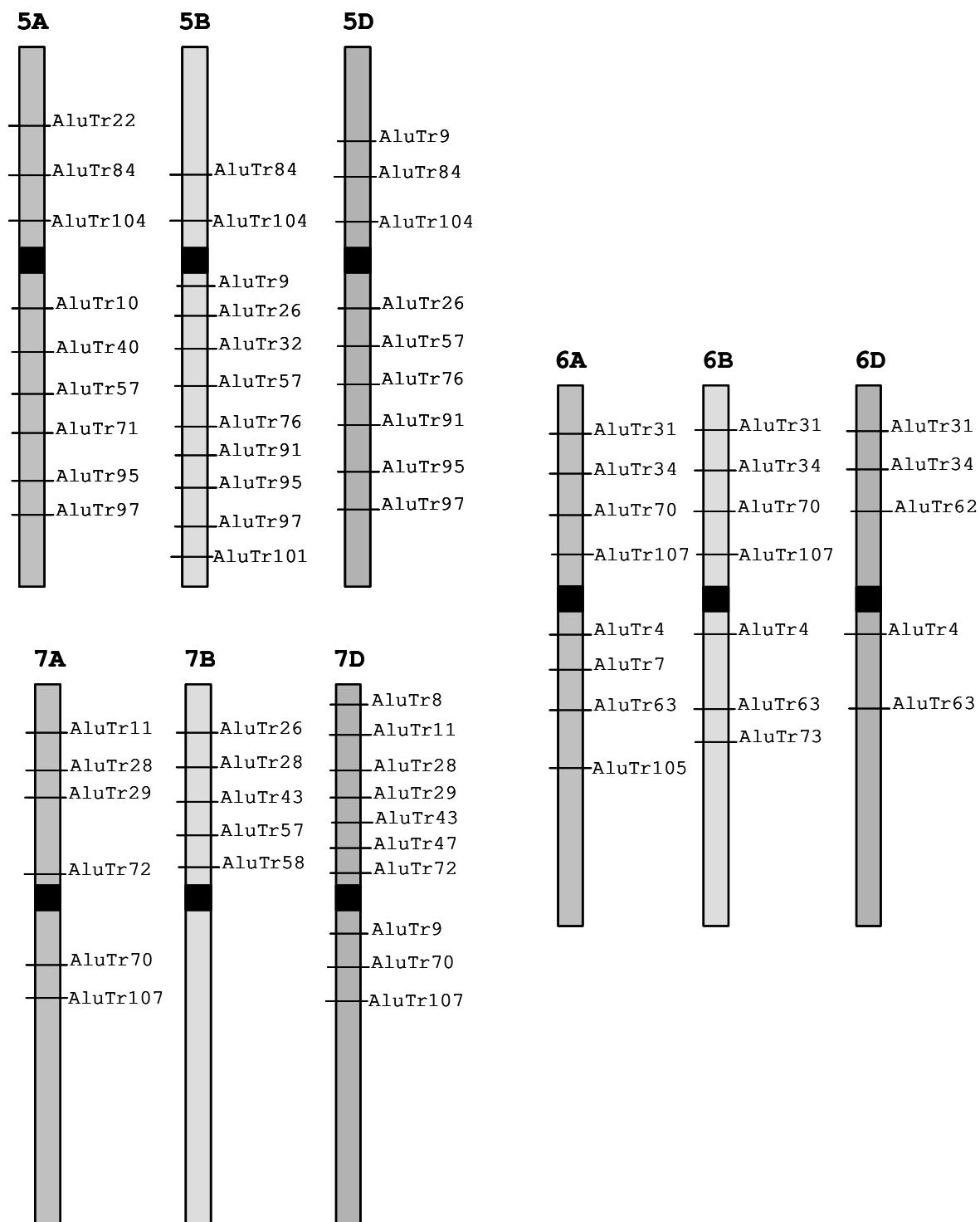


Figura 3. Continuação...

### **3.3 Genes induzidos por alumínio tóxico: a maquinaria fisiológica modificando-se para tolerar o estresse**

#### **3.3.1 Ativando enzimas do Ciclo do Ácido Cítrico**

O papel chave dos ácidos orgânicos para tolerância ao alumínio tóxico em cereais tem sido proposto em vários trabalhos (Delhaize et al., 1993; Carver & Ownby, 1995, Delhaize & Ryan, 1995). Das oito enzimas que fazem parte do ciclo, quatro foram identificadas como diferencialmente expressas nesse trabalho: succinil-CoA ligase, aconitase, succinato desidrogenase e NADP-especifica isocitrato desidrogenase, sendo que essa última foi encontrada duas vezes na biblioteca. Interessantemente, a maior parte dos trabalhos investigando genes induzidos ou regulados por alumínio, não identificou genes relacionados diretamente à biossíntese de ácidos orgânicos, como pode ser visto na Tabela 3 do Capítulo I. Uma hipótese é que as técnicas utilizadas não tenham sido sensíveis o suficiente para detectar pequenas mudanças no padrão de expressão dessas enzimas ou que o tempo de exposição ao alumínio tóxico não tenha sido adequado para se detectar essas diferenças. Ou até mesmo, conforme propõem Xiao et al. (2005), que não ocorra uma alteração na taxa de síntese, mas simplesmente uma ativação de um transportador de ácidos orgânicos. No entanto, é necessário que ocorra um aumento na taxa de síntese desses ácidos para se ter quantidade suficiente para ser exudado e para manter o funcionamento normal do metabolismo.

Outra clara evidência é a expressão diferencial da piruvato decarboxilase, que cataliza a conversão do piruvato a acetil-CoA, que por sua vez entra no ciclo para formação dos ácidos orgânicos.

É provável que ocorra a ativação de um transportador, de um canal aniônico para ácidos orgânicos (Ma et al., 2000) ou do gene *ALMT1* (Sasaki et al., 2004), no entanto, nenhum clone apresentou similaridade com seqüências desse gene. O clone AluTp6 codifica para uma proteína expressa de membrana em arroz e que em *Arabidopsis thaliana* corresponde a um transportador de ácidos dicarboxílicos, tipo simporte (sódio:dicarboxilato). Esse mesmo transportador foi identificado sob estresse de  $Al^{3+}$  em *Arabidopsis* (Hoekenga et al., 2003).



Uma possibilidade é que esse clone induzido por alumínio represente um transportador de ácidos dicarboxílicos como malato. E nesse caso, esteja ocorrendo ao mesmo tempo um aumento na síntese de ácidos orgânicos induzidos por alumínio e a ativação de um transportador desses compostos. No entanto, esse não deve ser o mecanismo principal para tolerância de Toropi, pois em solução hidropônica os ácidos orgânicos liberados no meio não seriam suficientes para quelar Al. (TIRAR)

### 3.3.2 Reforçando a Parede Celular e a Membrana Plasmática

Além do investimento na biossíntese de ácidos orgânicos como mecanismo de tolerância ou evitamento, sugere-se que ocorra um reforço da parede celular para tolerar os efeitos nocivos do  $Al^{3+}$ . Genes relacionados à biossíntese de celulose e lignina (clones AluTp92, AluTp16 e AluTp90) e a biossíntese de lipídios de membrana (AluTp8, AluTp37 e AluTp15) foram identificados como induzidos por alumínio.

Sugere-se que o alumínio possa se ligar rapidamente à parede celular das células das raízes quando aplicado externamente (Delhaize et al., 1993). Conforme descrito no Capítulo I, o  $Al^{3+}$  pode interagir fortemente com a superfície carregada negativamente da membrana plasmática e também ligar-se aos grupos carboxílicos negativamente carregados da matriz péctica da parede celular, reduzindo o fluxo de água e nutrientes minerais (Pritchard et al., 1994).

A expressão diferencial do gene celulose sintase *OsCslE1* (AluTp92), envolvida na elongação da celulose, pelo genótipo Toropi pode aumentar a tolerância por promover uma melhora das funções da parede como extensibilidade e permeabilidade, além de aumentar o fluxo de água e nutrientes minerais. A expressão diferencial desse gene em resposta ao alumínio foi encontrada por Xiao et al. (2005), que sugerem ser a maior expressão desse gene o fator primordial para o crescimento das raízes de trigo tolerante sob o estresse, por ser essa enzima responsável por promover a elongação celular.

Genes envolvidos na biossíntese de lignina foram identificados em resposta a estresses abióticos (Díaz et al., 2001; Mao et al., 2004). Nesse trabalho, foram identificados três clones AluTp16 (corismato sintase) AluTp90 (3-

dehidroquinato desidratase) e AluTp44 (peroxidase classe III) possivelmente envolvidos na biossíntese de ligninas.

Em plantas, a biossíntese de compostos fenólicos, através de aminoácidos aromáticos, inicia-se através da via do chiquimato/arogenato. Fenilalanina, tirosina e triptofano são os aminoácidos aromáticos formados nessa via e são utilizados para síntese de proteínas ou convertidos a metabólitos secundários tais como lignina ou fitoalexinas, através do metabolismo de fenilpropanóides (Weaver & Hermann, 1997).

Além dos aminoácidos aromáticos, as peroxidases estão diretamente envolvidas na biossíntese de lignina através de álcoois cinamóis e têm sido estudadas em diferentes tecidos e órgãos em relação a diferentes processos fisiológicos como formação de raízes, iniciação floral, abscisão e em resposta a estresses em geral (Gaspar et al., 1985). Peroxidases já foram descritas como induzidas por estresse de cobre (Díaz et al., 2001), alumínio (Richards et al., 1998; Rodriguez-Milla et al., 2002) e mercúrio (Sävenstrand & Strid, 2004). A expressão diferencial do gene da peroxidase (clone AluTp44) foi detectada neste trabalho e sua importância na tolerância pode estar relacionada tanto com a detoxificação de  $H_2O_2$  bem como com a biossíntese de lignina.

Lignina é o principal componente estrutural das paredes celulares das plantas. Vários estresses abióticos e bióticos podem induzir a deposição de lignina nas paredes celulares. Sasaki et al. (1996) indicaram que a inibição do crescimento radicular está diretamente correlacionada com a deposição de lignina em variedades tolerantes e sensíveis ao  $Al^{3+}$ , sendo mais acumulada pelas variedades sensíveis. Tabuchi & Matsumoto (2001) sugerem que o  $Al^{3+}$  modifica o metabolismo dos componentes da parede celular, fazendo com que ela torne-se grossa e rígida, reforçando a parede e prevenindo o contato do  $Al^{3+}$  com a membrana plasmática. Entretanto, isto também pode resultar na redução da alongação celular e do crescimento radicular.

Tais sintomas foram visualizados nas linhagens recombinantes Toropi x Anahuac (Capítulo 2), sendo que as linhagens sensíveis apresentavam fenótipo de raízes menores e grossas, enquanto que as linhagens tolerantes apresentavam raízes maiores e com alguns pontos de engrossamento. Isso pode

ser um indicativo de que o gene da peroxidase possa estar sendo expresso em maior nível nas linhagens sensíveis e sendo seu produto gênico utilizado para catalisar a oxidação de precursores de lignina para formação desta. A deposição de lignina em resposta ao estresse pode influenciar no crescimento da planta. O aumento da lignificação diminui a plasticidade da parede celular e conseqüentemente reduz a elongação celular, refletindo, macroscopicamente, em plantas que apresentam estatura menor sob estresse de  $Al^{3+}$ . No entanto, a expressão diferencial do gene que codifica para peroxidase no genótipo tolerante Toropi juntamente com a expressão do gene da celulose sintase, sugere que as peroxidases, nesse caso, possam atuar eficientemente tanto na detoxificação das espécies reativas de oxigênio quanto no processo de lignificação, o que permite um reforço da parede celular. O crescimento normal das raízes das linhagens tolerantes é justificado pela indução da expressão do gene que codifica para celulose sintase.

Além disso, a expressão diferencial de genes da rota de biossíntese de ácidos graxos (AluTp8 – enoil ACP redutase; AluT15 – beta cetoacil ACP sintase), sugere que ocorra uma ativação de genes envolvidos na biossíntese de lipídios de membrana. Interessantemente, Ohlrogge & Browse (1995) sugerem que além da enzima acetyl-CoA carboxylase (ACCase) como ponto de controle do ciclo, outras enzimas podem ser limitantes da taxa de síntese, entre elas as enzimas de condensação em particular, beta cetoacil ACP sintase. O fato dessa enzima ter sido identificada como induzida pelo  $Al^{3+}$  reforça a idéia de que essa rota metabólica tenha um papel significativo na tolerância. Também pode significar que o contato com o  $Al^{3+}$  causou dano nas membranas e há necessidade de reparo. Reparo rápido e eficiente que pode auxiliar na tolerância.

A superfície da membrana plasmática e a parede celular são consideradas os maiores alvos da toxicidade do  $Al^{3+}$  devido à ligação dos íons de  $Al^{3+}$  com ligantes doadores de oxigênio, como grupamentos carboxilatos e fosfatos (Yamamoto et al., 2001). A ligação dos íons de  $Al^{3+}$  à membrana plasmática pode deixar a membrana mais rígida, pode causar a peroxidação dos lipídios e aumentar a permeabilidade pelo aumento da taxa de fosfatidilcolina:fosfatidiletanolamina (Lindberg & Griffiths, 1993). Isso sugere que o

metabolismo da membrana plasmática pode ser significativamente alterado durante o estresse de  $Al^{3+}$ . A expressão simultânea de genes que codificam para proteínas detoxificadoras de espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen species*) pode ter papel fundamental na manutenção da estabilidade, estrutura e funcionamento da membrana plasmática.

### 3.3.3 Driblando as espécies reativas de oxigênio

Tolerância ao  $Al^{3+}$  requer uma efetiva regulação de genes envolvidos na detoxificação de ROS, pois um dos mecanismos envolvidos na toxicidade do  $Al^{3+}$  é o estresse oxidativo gerado pela peroxidação dos lipídios (Kochian, 1995; Kochian et al., 2005). Peroxidação de lipídios é amplamente definida como a deterioração oxidativa dos lipídios polinsaturados e pode ocorrer por três mecanismos: auto-oxidação; foto-oxidação e por catálise enzimática via lipo ou ciclo-oxigenases (Taylor et al., 2004).

As principais enzimas de plantas detoxificadoras de ROS são superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase e glutathione peroxidase e juntamente com moléculas antioxidantes como ácido ascórbico e glutathione, fornecem às células uma maquinaria eficiente de detoxificação de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (Mittler et al., 2004). Em diversas espécies, genes codificantes dessas enzimas induzidos por  $Al^{3+}$  têm sido relatados na literatura (Ezaki et al., 2000; Drummond et al., 2001; Rodriguez-Milla et al., 2002; Mao et al., 2004; Cançado et al., 2005; Xiao et al., 2005).

Nesse trabalho, a expressão diferencial de três genes envolvidos no mecanismo antioxidante foi identificada (clones AluTp44, AluTp67 e AluTp78). O papel das peroxidases (clone AluTp44) já foi discutido acima, sendo que especial atenção será dada aos genes que codificam catalase (clone AluTp78) e glutathione (clone AluTp67).

A glutathione é um composto de baixo peso molecular, solúvel em água, que tem papel importante na sinalização dos níveis de ROS gerados por diversos estresses (May et al., 1998; Noctor & Foyer, 1998). A biossíntese de glutathione ocorre via  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetase (clone AluTp67) e glutathione sintetase.

A expressão diferencial da  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetase em resposta ao  $Al^{3+}$  ocorre provavelmente para prevenir a peroxidação dos lipídios de membrana

pelos íons de alumínio (Ezaki et al., 1995). Segundo Yamamoto et al. (2001), a peroxidação de lipídios é um dos sinais primários da toxicidade do  $Al^{3+}$ .

Uma outra possibilidade, é que a enzima  $\gamma$ -glutamyl-cisteína sintetase esteja envolvida na formação de fitoquelatinas, que se ligam a metais no citosol, formando um complexo que é seqüestrado no vacúolo (Rauser, 1995; Cobbett, 2000; Xiang & Oliver, 1998). Fitoquelatinas são reconhecidas como quelantes de metais pesados como mercúrio e arsênico (Li et al., 2006a) e cádmio (Weber et al., 2006), mas o seu papel na tolerância ao alumínio ainda não foi relatado.

Catalase é uma enzima localizada principalmente nos peroxissomos e funciona como um dreno celular de compostos de peróxido de hidrogênio, degradando este a oxigênio e água. Sugere-se que o  $Al^{3+}$  afete o funcionamento da mitocôndria, levando a produção de ROS (Yamamoto et al., 2002) e que ative também a expressão de outros genes que são induzidos por estresse oxidativo, como o gene da catalase (Richards et al., 1998; Ezaki et al., 2000). Além disso, Cançado et al. (2005) propõe que o  $Al^{3+}$  atue indiretamente como um agente oxidativo, induzindo a inibição do crescimento das raízes e a morte celular.

A indução de enzimas envolvidas na detoxificação de ROS reforça a idéia de que o  $Al^{3+}$  aumente o estresse oxidativo, mas o papel da produção de ROS na toxicidade do  $Al^{3+}$  ainda precisa ser esclarecido. Pode-se sugerir que as ROS atuem como moléculas sinalizadoras e funcionem como sensores do estresse. Segundo Mittler et al. (2004), a maioria dos estresses abióticos e bióticos rompem a homeostase celular, resultando na produção de ROS, que por sua vez ativam fatores de transcrição sensíveis ao estado redox e outras moléculas sensoras, que ativam diferentes rotas de defesa às ROS, regulando a taxa de ROS nas células. De acordo com esses autores, esse ciclo básico de metabolismo de ROS mantém o nível *steady-state* de ROS nas células e previne seus efeitos danosos.

### **3.3.4 Percebendo e Transmitindo: genes envolvidos na sinalização e na cascata de transdução**

A complexa regulação da expressão gênica e das várias rotas metabólicas em resposta à toxicidade do alumínio pressupõe a ativação de genes responsáveis pela transdução de sinais. Vários genes de *Toropi* identificados nesse trabalho em resposta ao  $Al^{3+}$  apresentaram similaridade a genes envolvidos

na via de transdução de sinais, como proteínas quinases, proteínas fosfatases e proteínas de ligação à calmodulina (Tabela 3).

Sabe-se que quando expostas a estresses bióticos e abióticos, as plantas desencadeiam uma rede de sinalização mediada por proteínas quinases e fosfatases que tendem a regular o *status* de fosforilação das enzimas alterando a atividade destas. A ativação de genes que codificam para proteínas envolvidas na cascata de transdução de sinais em resposta ao  $Al^{3+}$  parece ser um mecanismo básico em diversas espécies sob esse mesmo tipo de estresse (Kochian, 1995; Drummond et al., 2001; Rodriguez-Milla et al., 2002; Mao et al., 2004; Xiao et al., 2005).

Uma hipótese interessante é a sinalização mediada por ROS. Mittler et al. (2004) propõem que as ROS atuem como moléculas sinalizadoras nas plantas e, que ao longo da evolução, as plantas foram capazes de desenvolver um controle refinado sobre a toxicidade das ROS, podendo agora ter papel crucial como moléculas sinalizadoras. Enquanto que a sinalização por  $Ca^{2+}$  é predominantemente controlada por seus níveis de liberação e armazenamento, a sinalização por ROS é controlada por sua produção e detoxificação. Mittler et al. (2004) sugerem que diversos sinais ambientais e do desenvolvimento alimentam a rede de sinalização por ROS e alteram a homeostase dessas moléculas em compartimentos celulares específicos ou de maneira geral. Essa alteração na homeostase é percebida por diferentes proteínas, enzimas ou receptores e modulam diferentes rotas de desenvolvimento, metabolismos e defesa.

A indução de genes envolvidos na detoxificação de ROS no presente trabalho (Tabela 3) indica que o  $Al^{3+}$  possa estar causando alterações no metabolismo que gerem a produção de ROS, conforme já discutido, mas também sugere que essas alterações possam estar sinalizando o estresse. A maioria dos estresses bióticos e abióticos altera o balanço metabólico das células, resultando no aumento da produção de ROS. Mittler et al. (2004) sugerem a existência de um ciclo básico de metabolismo de ROS (Figura 4) para manter o nível *steady-state* de ROS baixo nas células.

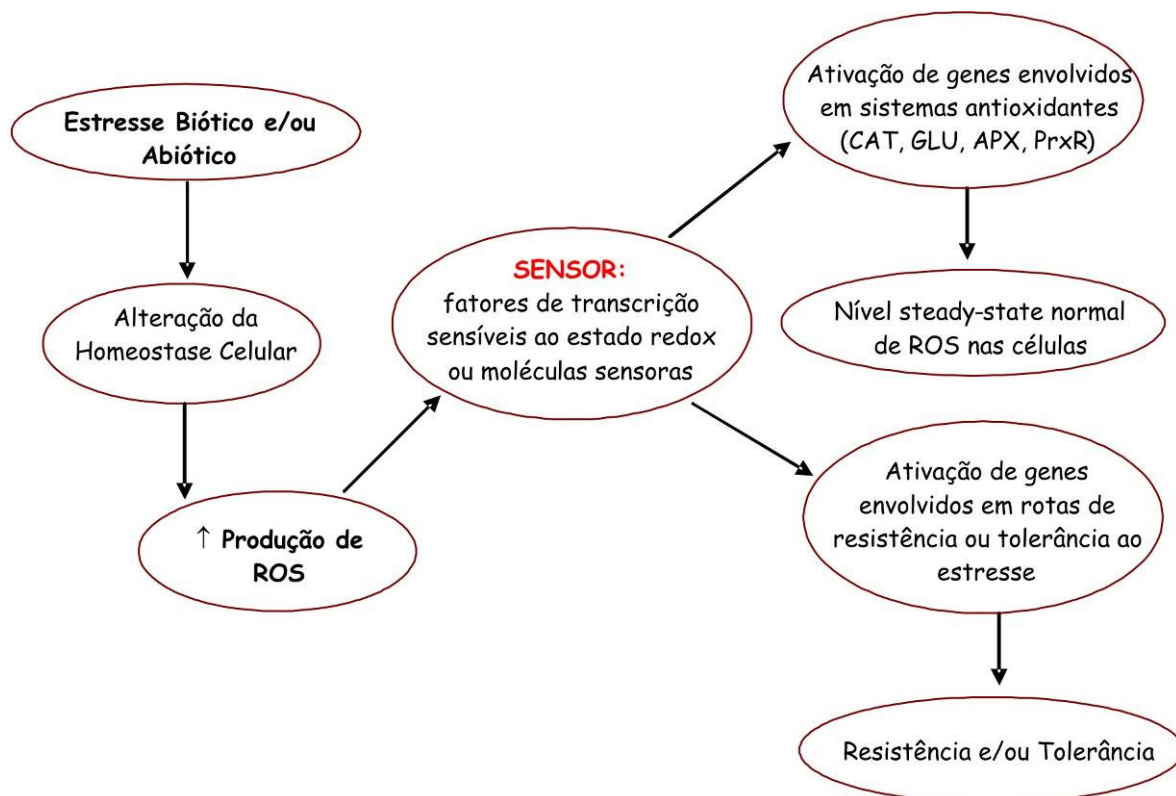


Figura 4. Ciclo básico do metabolismo de ROS em resposta a estresses bióticos e abióticos.

Após a percepção do sinal, a cascata de transdução de sinais envolve  $\text{Ca}^{2+}$  e proteínas dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , como calmodulina (clone AluTp71); ativação de proteínas G e ativação de fosfolipídeos. Além desses, Mittler et al. (2004) sugerem um papel fundamental da proteína quinase serina/treonina na sinalização de ROS e ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno. O clone AluTp42 codifica uma provável proteína quinase serina/treonina, reforçando a hipótese de que ROS tem um papel mais importante na sinalização do estresse causado pelo  $\text{Al}^{3+}$  do que como resultado do estresse *per se*.

Além dessas proteínas, lipídios podem estar atuando na cascata de transdução. Worrall et al. (2003), propõem que esfingolipídeos tenham um papel na sinalização em plantas. A expressão diferencial do gene serina palmitoil transferase (clone AluTp77), a enzima chave do metabolismo de esfingolipídeos (Hanada, 2003), pode reforçar essa hipótese. Esfingolipídeos em animais e leveduras têm um papel importante na sinalização celular em diferentes processos como crescimento, proliferação celular, respostas a estresses e

apoptose, sendo também componentes de microdomínios de membrana (Spiegel & Milstein, 2002; Ledeen & Wu, 2006).

Pouco se sabe sobre a função dos esfingolipídeos em plantas, mas estudos recentes apontam um papel importante na sinalização. Por exemplo, esfingosina-1-fosfato está envolvida no fechamento das células-guarda mediado por  $\text{Ca}^{2+}$  além de estar envolvida na morte celular programada (PCD) (Worrall et al., 2003). A toxina fúngica fumonisina induz PCD através de um processo que envolve o desbalanço no metabolismo de esfingolipídeos, mas o mecanismo através do qual isso ocorre ainda não é claro (Asai et al., 2000). Mutantes defeituosos de *Arabidopsis* para *sphingosine transfer protein* apresentam PCD suportando o papel dos esfingolipídeos no controle da morte celular em plantas (Brodersen et al., 2002; Liang et al., 2003).

O papel dos esfingolipídeos como sinalizadores ainda precisa ser melhor elucidado em plantas e, em especial na tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$ , pois além disso, os esfingolipídeos podem atuar conferindo estabilidade às membranas, como ocorre em processos de aclimação à seca e tolerância ao frio (Sperling & Heinz, 2003, Dunn et al., 2004).

### **3.3.5 Um estímulo, várias respostas: indução de genes envolvidos em diversos processos metabólicos**

#### **3.3.5.1 Genes que codificam ATPases e V-ATPases**

A indução de genes que codificam ATPases foi significativa, pois dos 12 genes envolvidos na respiração celular, 3 corresponderam a ATPases, sendo que a seqüência correspondente ao clone AluTp63 foi a que mais vezes apareceu na biblioteca (quatro vezes entre as 209 seqüências). Kochian et al. (2005) sugerem que o  $\text{Al}^{3+}$  possa inibir significativamente a atividade das ATPases- $\text{H}^+$  da membrana, impedindo a formação e a manutenção do gradiente trans-membrana de  $\text{H}^+$ . A inibição da atividade de ATPases- $\text{H}^+$  e o rompimento do gradiente de prótons por  $\text{Al}^{3+}$  tem sido reportado tanto *in vitro* como em raízes intactas de várias espécies de plantas (Ahn et al., 2001; Ryan et al., 1992).

Em Toropi parece que essa hipótese não se aplica. A indução de genes que codificam para ATPases sugere que Toropi tenha um mecanismo de proteção dessas bombas, permitindo que o gradiente de  $\text{H}^+$  seja mantido, garantindo o



transporte secundário de íons. Dessa forma, o *status* iônico e a homeostase de íons nas células das raízes estaria garantido. É possível também que a inibição de ATPases possa ter sido percebida devido a modificações na polarização da membrana e por conseqüência ter induzido este gene para tentar compensar a menor atividade de ATPases.

A expressão diferencial de genes envolvidos na fosforilação oxidativa, ubiquinol-citochrome-c redutase (clone AluTp48) e duas proteínas com atividade monooxigenases (clones AluTp37 e AluTp108), sugerem que a respiração celular seja uma das vias metabólicas mais afetadas pelo estresse de  $Al^{3+}$ . A regulação de vários componentes desse processo se justifica pelo status de ATP necessário para manter o funcionamento normal dos demais processos celulares sob condições de estresse e também pelo fato do principal mecanismo de tolerância ao  $Al^{3+}$  envolver a exudação de ácidos orgânicos.

Interessantemente, uma ATPase vacuolar foi também identificada (clone AluTp6). Bombas de prótons na membrana vacuolar atuam tanto energizando a membrana para o transporte mediado por carregadores como mantendo um baixo pH no lúmen vacuolar necessário para a manutenção de proteases, fosfatases e nucleotídeos (Buchanan et al., 2000).

O vacúolo é uma organela celular bastante interessante, principalmente no que diz respeito a sua capacidade de seqüestrar uma variedade de compostos secundários no seu interior. Além disso, compostos xenobióticos e íons tóxicos podem ser eficientemente detoxificados por seqüestro vacuolar.

Sódio em níveis tóxicos é armazenado no vacúolo garantindo a tolerância a salinidade em tomate (Zhang & Blumwald, 2001), em arábida (Apse et al., 1999) e em soja (Li et al., 2006b), assim como tolerância a zinco em arábida (Elbaz et al., 2006).

No mecanismo de detoxificação interna do  $Al^{3+}$  sugere-se que o  $Al^{3+}$  seja quelado por ácidos orgânicos no interior celular e posteriormente seqüestrado no vacúolo através de transportadores ainda não conhecidos (Ma et al., 2001; Kochian et al., 2004). No entanto, o transporte desses complexos e de outros compostos para o interior vacuolar não é passivo e sim diretamente dependente de ATP, o que justificaria a ativação de uma ATPase vacuolar (Beyenbach &

Wieczorek, 2006). A expressão diferencial de ATPase vacuolar foi demonstrada uma única vez em resposta ao estresse de  $Al^{3+}$  em trigo (Tabela 3 do Capítulo I).

Hamilton et al. (2001) investigaram a indução de ATPase vacuolar e ATP sintase mitocondrial por alumínio em um cultivar (PT471) de trigo tolerante ao  $Al^{3+}$ . Para confirmar a indução dessas proteínas por Al, foram analisados atividade e nível de transcritos das proteínas, concluindo-se que ambas são induzidas pelo estresse de maneira dose dependente. Ainda a ATPase vacuolar responde especificamente ao estresse por  $Al^{3+}$ , sendo que o ATP necessário para manter o balanço energético dentro da célula é fornecido pela ATPsintase mitocondrial. A hipótese de que a bomba vacuolar possa estar mediando algum mecanismo de detoxificação interna de  $Al^{3+}$  em Toropi, necessita maiores investigações para suportar essa hipótese.

### **3.3.5.2 Genes que codificam para proteínas sinalizadoras de cálcio**

Outro gene interessante identificado nesse trabalho é o que codifica uma calreticulina. Calreticulina é a única proteína residente no lúmen do retículo endoplasmático, organela que tem papel crítico na síntese e *chaperoning* de proteínas secretadas e associadas à membrana. Segundo Michalak et al. (1999), calreticulinas atuam principalmente na regulação da homeostase de  $Ca^{2+}$  e como chaperonas. Sugerem também que essa proteína é extremamente versátil, participando da síntese de uma variedade de moléculas, incluindo canais aniônicos, receptores de superfície, integrinas e transportadores.

A sua indução em resposta ao  $Al^{3+}$  em Toropi sugere que a maquinaria celular possa estar investindo na ativação da transcrição de genes que codificam transportadores de membrana, especialmente em transportadores de ácidos orgânicos como mecanismo de tolerância.

Por outro lado, por ser uma proteína diretamente envolvida com a manutenção dos níveis de  $Ca^{2+}$ , pode ser que essa proteína esteja envolvida na cascata de transdução de sinais. Seu papel na via de transdução de sinais na tolerância ao frio em arroz já foi proposto, sugerindo que atue nesse processo como uma fosfoproteína que interage com proteínas quinases induzidas pelo frio (Li et al., 2003).

Como integrante da cascata de transdução de sinais em resposta ao Al, Sivaguru et al. (2000) sugerem que proteínas calreticulinas sejam responsáveis por aumentar os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante o estresse de Al, induzindo a formação de calose, o fechamento dos plasmodesmas e reduzindo o transporte simplástico intercelular.

### **3.3.5.3 Genes que codificam fatores de ribosilação ADP**

Fatores de ribosilação ADP, do inglês ARFs, são pequenas GTPases que regulam o tráfego de vesículas, recrutando proteínas de periferia; regulam o metabolismo de fosfolipídeos e a estrutura de actina nas superfícies de membranas (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006). ARFs já foram também encontradas como diferencialmente reguladas por estresse por metais.

Minglin et al. (2005) identificaram 19 genes diferencialmente expressos em respostas a estresse causado por cádmio em *Brassica juncea*, entre esses, genes que codificam ARFs. Os resultados sugerem que ARFs podem ter um papel regulador no combate aos múltiplos estresses impostos pela acumulação de Cd na planta. Recentemente, Zuk et al. (2003) sugerem que ARFs possam regular a capacidade antioxidante em batatas transgênicas.

*Arabidopsis* transgênica superexpressando o gene ARF apresentou dominância apical reduzida, raízes primárias curtas e um aumento no número de raízes adventícias (efeitos de auxina), sugerindo que proteínas ARFs possam mediar o crescimento das raízes de plantas por regulação dos níveis de auxina (Zhuang et al., 2005).

A expressão diferencial de ARFs em resposta ao  $\text{Al}^{3+}$  foi identificada em aveia, quando submetidas ao estresse por  $\text{Al}^{3+}$  por 1 h (Limberger, 2006). Nesse trabalho também foram identificados genes de actina com expressão diferencial, sugerindo que ARFs tenham um papel importante na tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  em aveia, tanto na mediação do crescimento radicular quanto na ativação de genes de actina.

Em Toropi foi identificado um gene com expressão diferencial que codifica uma proteína do tipo ARFs (clone AluTp2). No mecanismo de tolerância ao  $\text{Al}^{3+}$  em Toropi, proteínas ARFs podem ter um papel importante em vários processos. ARFs podem estar atuando no tráfego de vesículas conjuntamente com proteínas

do tipo Sec24 de *Arabidopsis* (Clone AluTp40), que ao serem superexpressas em leveduras, aumentam a taxa de sobrevivência dessas sob estresse oxidativo (Belles-Boix et al., 2000). ARFs podem estar regulando as superfícies das membranas por alterar estrutura de actina e também podem estar envolvidos na regulação do crescimento de raízes, mediado ou não por auxinas.

ARFs também exercem regulação sobre o metabolismo de fosfolipídeos, os principais componentes da membrana plasmática, que por sua vez são alvos importantes do alumínio tóxico. Sob estresse de alumínio, as plantas sofrem limitação de fósforo, logo é esperado que ocorram alterações na rota de biossíntese de fosfolipídeos e que ocorra uma regulação desse processo envolvendo proteínas ARFs.

#### **3.3.5.4 Genes que codificam proteínas envolvidas no citoesqueleto**

Genes envolvidos na manutenção do citoesqueleto foram representados pelos clones AluTp95, que codifica para actina e AluTp12, para proteínas do tipo quinesinas. Kochian et al. (2005) sugerem que devido ao papel central dos componentes do citoesqueleto na divisão e expansão celular no crescimento das raízes, esses possam ser um dos principais alvos citosólicos do  $Al^{3+}$ . O  $Al^{3+}$  pode romper a dinâmica do citoesqueleto por interação direta com componentes do citoesqueleto (microtúbulos e filamentos de actina) ou indiretamente via alteração na cascata de sinalização, mais precisamente nos níveis de  $Ca^{2+}$  que estão envolvidos na estabilidade do citoesqueleto (Kochian et al., 2005).

A actina está diretamente envolvida na formação do citoesqueleto e a expressão diferencial do gene que codifica actina em resposta ao  $Al^{3+}$  foi verificada em aveia (Limberger, 2006). Sugere-se que o  $Al^{3+}$  induza significativamente um aumento na tensão dos filamentos de actina em células radiculares de soja (Grabski & Schindler, 1995), podendo causar mudanças na estrutura celular e na morfologia das raízes estressadas.

Quinesinas têm papel crucial na reorganização dos microtúbulos em plantas (Liu & Lee, 2001; Preuss et al., 2004) e a exposição ao  $Al^{3+}$  pode romper tanto a organização dos microtúbulos quanto dos microfilamentos nas células das raízes (Sasaki et al., 1997; Sivaguru et al., 2003). Sugere-se também que as

quinesinas possam atuar como proteínas de ligação a calmodulina (Reddy et al., 1996) atuando na sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ .

A indução desses genes pelo  $\text{Al}^{3+}$  em Toropi reflete no fenótipo apresentado por esse cultivar sob estresse: raízes morfológicamente inalteradas como resultado da manutenção dos componentes do citoesqueleto radicular, que garantem o crescimento das raízes através da divisão e expansão celular.

#### **3.3.5.5 Genes que codificam proteínas envolvidas em resposta a estresses bióticos**

Alguns genes expressos diferencialmente por Toropi na presença de  $\text{Al}^{3+}$  apresentaram similaridade com genes relacionados a mecanismos de defesa ativados em resposta a patógenos (Tabela 3). A indução dessa categoria de genes por  $\text{Al}^{3+}$  tem sido relatada na literatura (Snowden & Gardner, 1993; Hamel et al., 1998; Richards et al., 1998; Drummond et al., 2001; Rodriguez-Milla et al., 2002; Mao et al., 2004)

A ativação de proteínas de resistência à doença contendo domínios do tipo LRR e NB-ARC sugerem que o  $\text{Al}^{3+}$  possa atuar como um elicitador da cascata de transdução de sinais relacionado à patogênese (Hamel et al., 1998).

Atualmente, sugere-se que as plantas apresentem mecanismos de defesa contra estresses bióticos mediado por metais (Poschenrieder et al., 2006). A base do mecanismo molecular seria que estresses bióticos e abióticos (metais) compartilhariam vias de percepção e de transdução de sinais e vias metabólicas na resposta ao estresse.

Poschenrieder et al. (2006) propõem que exista interação metabólica nas repostas a esses estresses (Figura 5). Vias que levam a formação de compostos secundários, rota do ácido chiquímico e o metabolismo de enxofre, exercem papel chave nesse processo, uma vez que os compostos produzidos podem tanto atuar na resposta contra patógenos quanto na quelação de metais.

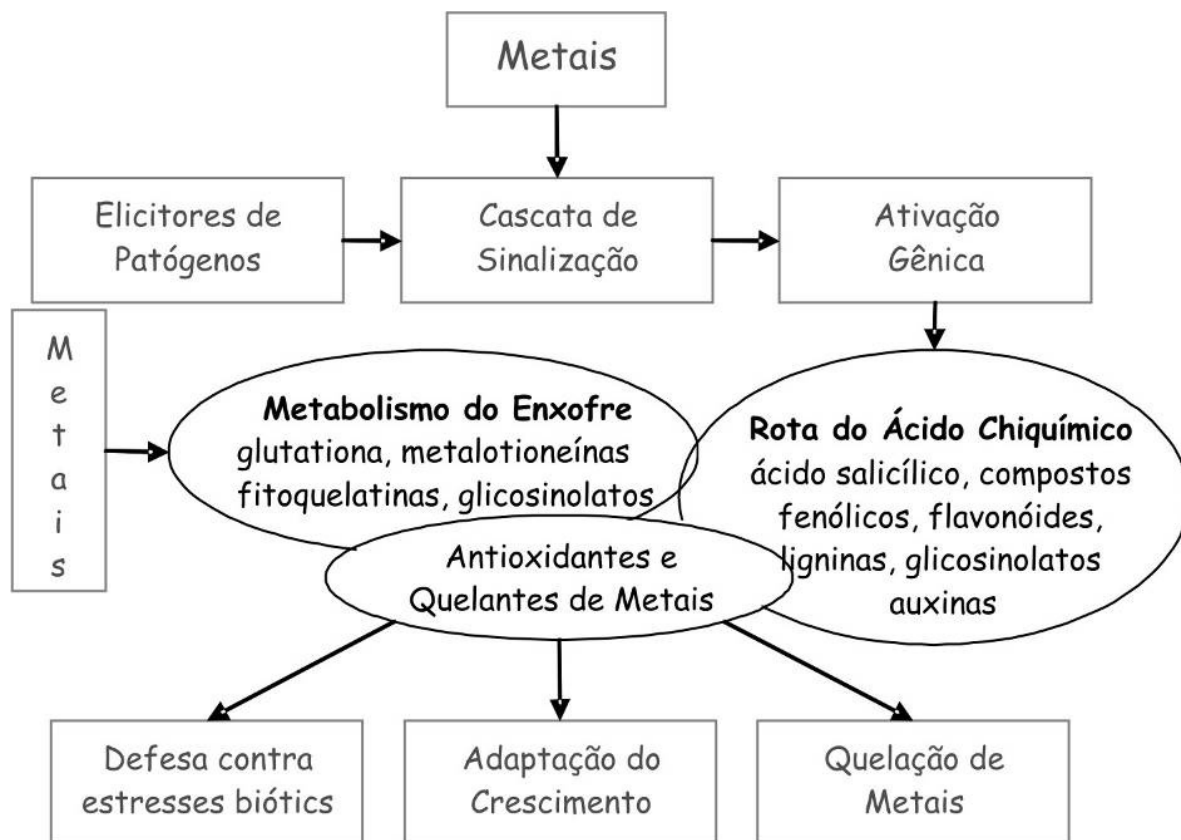


Figura 5. Interações metabólicas entre estresses abióticos e bióticos. (Modificado de Poschenrieder et al., 2006).

A indução de genes envolvidos na rota do chiquimato em resposta a infecção pelo fungo *Puccinia triticina*, causador da ferrugem da folha em trigo, em Toropi (Da-Silva, dados não publicados) e também nesse trabalho por  $Al^{3+}$  reforçam essa hipótese de mecanismos comuns para diferentes estresses.

### 3.3.5.6 Genes que codificam proteínas envolvidas...

Prolongada exposição ao  $Al^{3+}$  pode levar a interação desse com diversos processos celulares básicos (Kochian et al., 2005). Como o trigo, dentre os cereais, é a espécie mais sensível ao  $Al^{3+}$  depois da cevada, pode ser que a exposição por 1 h a esse estresse seja suficiente para ativar genes relacionados a esses processos.

Biossíntese de proteínas; estrutura ribossomal e biogênese; biossíntese de aminoácidos; proteólise e peptidólise; transcrição e replicação de DNA correspondem aos processos celulares básicos para os quais Toropi apresenta ativação de genes sob estresse de  $Al^{3+}$ . No entanto, pela natureza desses

processos pode-se sugerir que eles sejam ativados em resposta a estresses múltiplos e não exclusivamente em resposta a estresse por alumínio.

### **3.3.5.7 Que proteínas são codificadas?**

Genes de Toropi que apresentam similaridade com proteínas hipotéticas ou que não apresentam similaridade significativa com outras proteínas já descritas (Tabela 3), refletem o nível de conhecimento a respeito dos mecanismos de tolerância: sabe-se muito sobre pouco. A falta de informação sobre a função desses genes e das interrelações das proteínas por eles codificados demonstra como ainda estamos longe de decifrar o complexo mecanismo que leva a tolerância ao alumínio tóxico nas plantas e, em especial, os genes responsáveis por desencadear o processo.

A existência desses genes pode refletir mecanismos de resposta espécie-específica ou que exista uma alta divergência genética nos mecanismos de resposta entre as espécies (Drummond et al., 2001). Até mesmo pode ser responsável pelas diferenças quanto ao nível de tolerância que existem entre genótipos de uma mesma espécie.

A análise mais detalhada dos clones que correspondem a genes classificados nessas categorias (Tabela 3), demonstra que todos os clones apresentam similaridade com seqüências de cDNAs expressos, em sua maioria, por trigo e sob algum tipo de estresse.

Para alguns clones com similaridade à proteínas hipotéticas, as informações contidas na descrição das seqüências permitem sugerir uma possível função, como por exemplo: AluTp27 pode codificar para uma histona H5, AluTp30 está relacionado a proteínas de ligação a calmodulina, AluTp32 pode codificar proteínas do tipo hidrolase, AluTp9, AluTp31 e AluTp39 podem codificar fatores de transcrição, AluTp102 codificar proteínas de membrana e AluTp75 proteínas envolvidas na via secretória.

A análise das seqüências dos clones sem similaridade significativa (Tabela 3) em programas específicos para identificação de motivos indica que vários clones possuem seqüências ricas em cisteína (AluTp68, AluTp70, AluTp82, AluTp87, AluTp96, AluTp105 e AluTp107). Sabe-se que metalotioneínas e fitoquelatinas correspondem a uma classe de peptídeos ligantes, ricos em

cisteínas, envolvidos na detoxificação de metais (Cobbett, 2000). Tais clones podem corresponder a proteínas dessa natureza reforçando o papel dessas na detoxificação de metais.

A caracterização da seqüência completa dos clones se faz necessária para que esses cDNAs possam ser utilizados em estudos de expressão *in vivo*, seja por transgenia ou por silenciamento via RNA de interferência, a fim de se comprovar seus papéis no mecanismo de tolerância ao alumínio tóxico em trigo.

#### **3.3.5.8 Clone AluTp13: codifica o possível gene “gatilho”?**

O clone AluTp13 apresentou similaridade com o gene que codifica proteína com atividade de fator de transcrição do tipo bHLH (do inglês, *basic Helix-Loop-Helix*). Esse é o primeiro estudo demonstrando a expressão desse gene induzido por  $Al^{3+}$ .

Proteínas bHLH pertencem a uma grande família de fatores de transcrição, que têm papel importante na proliferação, determinação e diferenciação celular em animais, plantas e leveduras (Ledent & Vervoort, 2001).

Em cereais, pouco se conhece sobre a família bHLH. Em arábido, sugere-se que essa família seja composta de 133 genes, sendo que, no mínimo, já foi detectada a expressão de 113 deles (Bailey et al., 2003; Heim et al., 2003).

Fatores de transcrição do tipo bHLH foram identificados regulando diversas respostas a estresses em plantas. O gene *OsbHLH1* foi identificado como especificamente induzido nas raízes de plântulas de arroz por frio (Wang et al., 2003). Tratamentos com NaCl, PEG e ABA não induziram a expressão desse gene. A proteína OsbHLH foi localizada no núcleo e sua capacidade de ativar a transcrição gênica comprovada por gene repórter em levedura. Esses experimentos suportam a hipótese de que esse gene possa estar atuando como um fator de transcrição na via de transdução de sinais ativada pelo estresse causado por frio (Wang et al., 2003).

Fatores de transcrição do tipo bHLH mediando resposta a luminosidade foram identificados em Arabidopsis, sendo que nesses casos atuam como repressores da via de transdução de sinais do fitocromo (Duek & Fankhauser, 2005; Penfield et al., 2005), mas são ativadores de genes em mecanismos de resposta a seca e ácido abscísico (Abe et al., 1997).



De acordo com a análise do Blast, o clone AluTp13 apresenta similaridade significativa com 9 seqüências que codificam fatores de transcrição do tipo bHLH ( $e\text{-value} < 0e^{-10}$ ) (Figura 6 e Figura 7). A comparação dessas seqüências com a expressa por Toropi indica que há similaridade maior da seqüência de Toropi com seqüências de arroz. No entanto, o alinhamento dessas seqüências indica que a seqüência de AluTp13 apresenta identidade alta, variando entre 68% e 84%, com o final das seqüências depositadas nos bancos de dados.

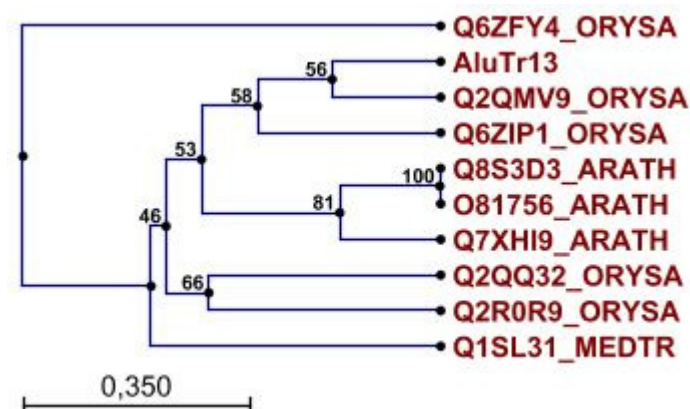


Figura 6. Dendrograma do Bootstrapping da seqüência AluTp13 de trigo e outros fatores de transcrição bHLH de arroz (acessos Q6ZIP1, Q2R0R9, Q2QQ32, Q6ZFY4, Q2QMV), arábida (acessos Q7XHI9, O81756 e Q8S3D3) e alfafa (acessos Q1SL31).

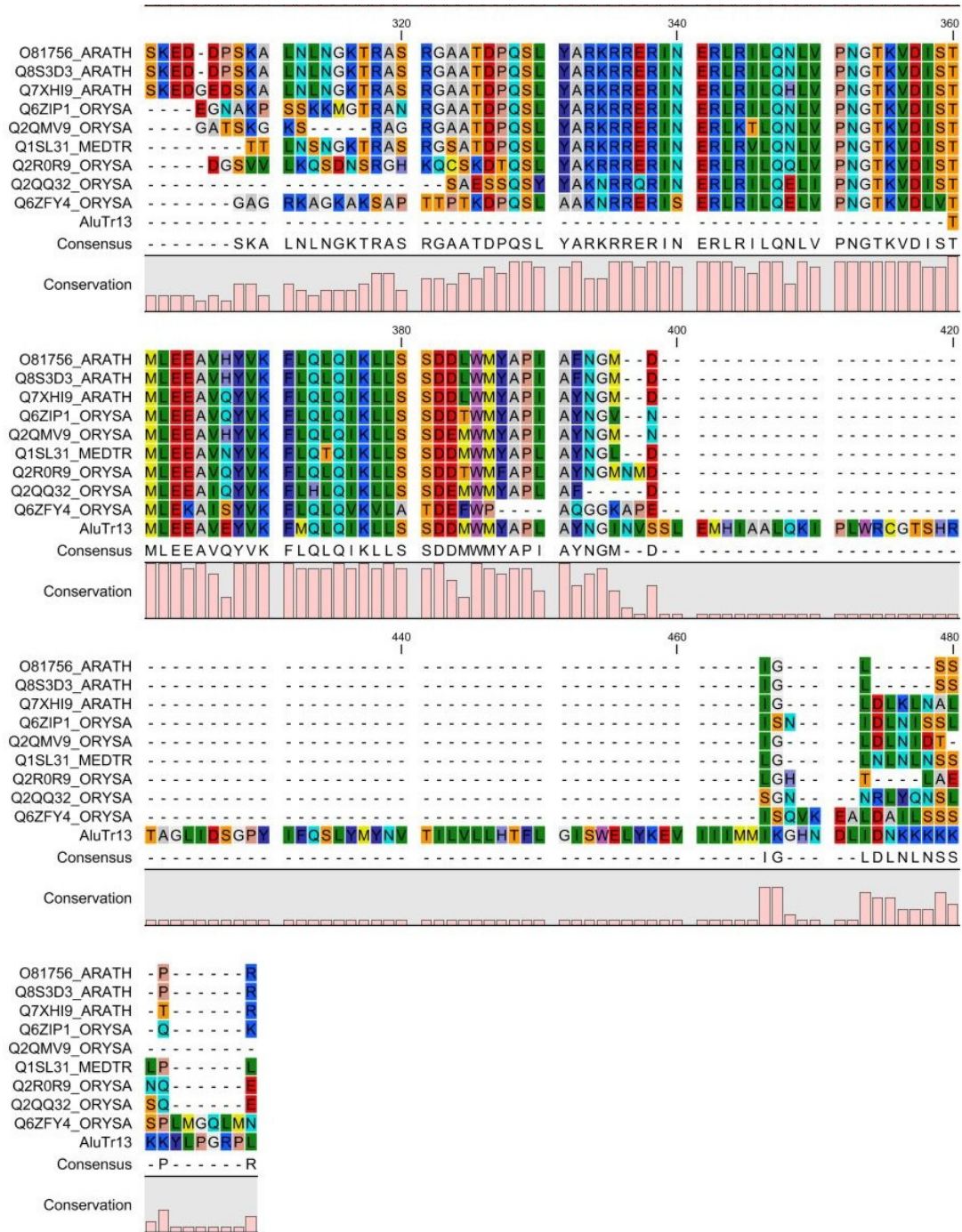


Figura 7. Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos de AluTp13 de trigo com as seqüências de fatores de transcrição bHLH de arroz (acessos Q6ZIP1, Q2R0R9, Q2QQ32, Q6ZFY4, Q2QMV), arabidopsis (Q7XHI9, O81756 e Q8S3D3) e alfafa (Q1SL31).

O papel desse grupo de proteínas em mecanismos de tolerância ao alumínio ainda não foi proposto. Na literatura, ainda não há relatos de genes que codificam para fatores de transcrição em resposta ao  $Al^{3+}$  (Tabela 3 do Capítulo I). A maioria dos genes identificados correspondem a genes envolvidos em processos

fisiológicos já descritos como sendo alvo da toxicidade do  $Al^{3+}$  ou processos que levam a tolerância, no entanto, nada se sabe sobre qual seria o “gene gatilho”. Nesse sentido, a seqüência expressa por Toropi pode ser considerada como o gene candidato para ativação dos mecanismos de respostas ao  $Al^{3+}$ . Estudos de expressão através de northern e/ou PCR em tempo real bem como a obtenção da seqüência completa desse gene para estudos de expressão in vivo é de fundamental importância para se avaliar o papel dessa classe de fatores de transcrição na tolerância ao  $Al^{3+}$ .

### **3.4 Genes induzidos por alumínio tóxico em Toropi: quais são realmente diferentemente expressos?**

Para confirmação da expressão diferencial desses genes foram realizados experimentos preliminares de macroarranjo, utilizando marcação não radioativa. No entanto, os resultados não foram satisfatórios. As razões para isso podem ser falhas na execução da técnica, uma vez que essa não é rotineiramente utilizada, sendo esse trabalho pioneiro na utilização dessa técnica no laboratório.

O resultado preliminar do macroarranjo utilizando como sonda mRNA de Toropi exposto a  $74 \mu M$  de  $Al^{3+}$  por 1 h está apresentado na Figura 8.

De acordo com os sinais apresentados, ocorre uma indução considerável da expressão dos clones AluTp12 e AluTp63, que apresentam similaridade com os genes que codificam para proteína do tipo quinesina e para bombas do tipo  $H^+$ -ATPase. Embora esses resultados não sejam conclusivos, uma vez que não apresentou repetibilidade e nem sinal referente ao controle positivo (gene da actina), pode-se sugerir que, em 1 h de exposição ao estresse de  $Al^{3+}$ , ocorra uma ativação de genes envolvidos na manutenção do citoesqueleto (AluTp12) e na produção de ATP (AluTp63).

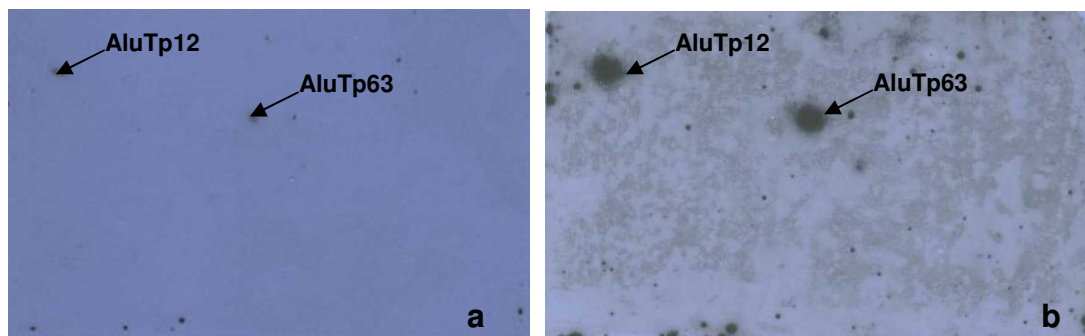


Figura 8. Macroarranjos de cDNAs de Toropi sob estresse de alumínio. Em (a) exposição por 2 h e em (b) exposição da mesma membrana por 18 h.

É importante salientar que o clone AluTp12 apresentou similaridade também com uma proteína hipotética de arabis (At3g12020/T21B14\_118), cuja função molecular é de atividade de fator de transcrição (base de dados EBI/EMBL, Q8GYK5, e-value  $1.7e^{-14}$ ). Confirmando-se os resultados do macroarranjo, obter a seqüência completa desse clone para expressão desse gene será importante para inferir sobre o seu real papel nos processos biológicos e no mecanismo de tolerância ao alumínio tóxico em Toropi.

### 3.5 De seqüências diferencialmente expressas a marcadores funcionais para tolerância ao $Al^{3+}$

Resultados preliminares revelaram polimorfismos entre Toropi e Anahuac para os *primers* AluTp9, AluTp43 e AluTp30. Para os *primers* AluTp59, AluTp83, AluTp07, AluTp10 e AluTp48 não foi obtido polimorfismo entre os progenitores. Já para AluTp13 e AluTp68 não foi atingida uma condição de PCR para amplificação de fragmentos (Figura 9).

A ausência de polimorfismo entre os progenitores para AluTp59, AluTp83, AluTp07, AluTp10 e AluTp48 pode indicar que, se realmente associadas à tolerância ao  $Al^{3+}$ , as diferenças existentes entre os progenitores podem estar na região promotora ou na região regulatória onde ligam-se os *enhancers* dessas seqüências. Outras possibilidades são que as diferenças sejam devidas à expressão diferencial de fatores de transcrição ou que existam áreas mutadas que não estão na região de amplificação dos *primers*, que resultarão na ausência de polimorfismos. Já para AluTp13 e AluTp68 novos testes de combinação de temperatura de pareamento e número de ciclos terão de ser feitos para se buscar a amplificação dos fragmentos.

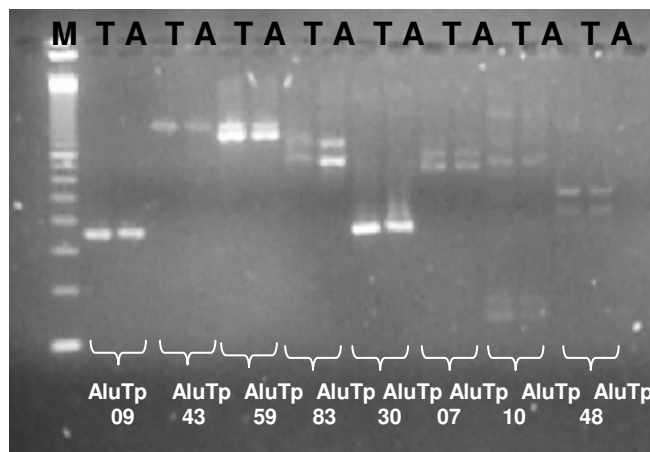


Figura 9. Perfil eletroforético dos marcadores desenvolvidos com base nas seqüências diferencialmente expressas. T: Toropi, A: Anahuac, M: Marcador 100 pb.

Marcadores funcionais, desenvolvidos com base em seqüências expressas, representam uma estratégia alternativa à utilização de marcadores anônimos (aqueles que evidenciam diferenças de DNA não necessariamente em regiões gênicas) (Andersen & Lübberstedt, 2003; Milach, 2004). A presença de polimorfismo para AluTp9, AluTp43 e AluTp30 indica que esses marcadores podem ser utilizados como marcadores funcionais para tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo. No entanto, para avaliação na população segregante e confirmação da associação com o gene de tolerância ao  $Al^{3+}$  de Toropi, os fragmentos amplificados terão que ser separados em gel de poliacrilamida devido a pequena diferença existente entre o tamanho dos fragmentos.

#### 4 Tolerância ao $Al^{3+}$ em Toropi: em busca de genes candidatos

##### 4.1 QTLs, Seqüências Diferencialmente Expressas e Mapeamento *in silico*

Várias regiões no genoma foram identificadas no mapeamento molecular utilizando marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Capítulo III), em especial QTLs que estão localizados nos cromossomos 3B e 4DS e explicam grande parte da variação fenotípica para essa característica. Já a análise de expressão diferencial revelou que são muitas as seqüências reguladas pelo alumínio, mapeadas em todo genoma do trigo, através do mapeamento *in silico*. A grande questão agora é

descobrir quais dessas seqüências poderiam corresponder aos genes localizados nos QTLs mapeados nos cromossomo 3B e 4DS.

Interessantemente, no cromossomo 3 (A,B,D) foram mapeadas *in silico* seqüências que podem estar diretamente associadas aos mecanismos de tolerância como, por exemplo, AluTp6 que codifica para uma ATPase vacuolar bem como AluTp9 que codifica para um possível fator de transcrição.

Já no cromossomo 4 (A,B,D) foram mapeadas *in silico* seqüências que codificam para enzimas do metabolismo de esfingolípídeos (AluTp77), de ácidos orgânicos (AluTp11, AluTp10) e para o fator de transcrição bHLH (AluTp13), indicando ser esse cromossomo realmente importante para tolerância ao  $Al^{3+}$ .

O mapeamento dessas seqüências utilizando linhagens nulitetrassômicas indicará onde essas seqüências estão realmente localizadas nos cromossomos de trigo. No entanto, o mapeamento *in silico* fornece um indicativo da localização dessas seqüências no genoma de Toropi. As seqüências diferencialmente expressas foram mapeadas através da comparação com seqüências de ESTs mapeadas no genoma de trigo, no Graingenes, utilizando linhagens nulitetrassômicas de Chinese Spring, um genótipo diferente de Toropi. Rearranjos cromossômicos nesses dois genótipos podem ter ocorrido ao longo da evolução, o que pressupõe que seqüências localizadas em um dado cromossomo de Chinese Spring não necessariamente estejam na mesma posição em Toropi.

Considerando a localização dos QTLs e o mapeamento *in silico* é possível que o gene candidato por conferir a tolerância ao  $Al^{3+}$  seja o fator de transcrição bHLH.

#### **4.2 Tolerância ao alumínio em Toropi: novos mecanismos para um velho problema?**

Toropi representa uma importante fonte de genes para tolerância ao alumínio, no entanto, os mecanismos que levam à tolerância parecem ser os mesmos previamente descritos para a maioria das espécies, incluindo os cereais.

A indução de genes que codificam para enzimas envolvidas na rota de síntese de ácidos orgânicos é mais uma evidência do papel central desses compostos na tolerância ao  $Al^{3+}$ . A expressão diferencial de quatro das oito

enzimas do ciclo fazem desse estudo um referencial, pois não há nenhum relato dessa natureza na literatura.

A ativação de mecanismos básicos e esperados na tolerância ao  $Al^{3+}$  que levam a uma resposta efetiva contra o estresse é apresentada por Toropi. Ativação de genes envolvidos na biossíntese de lipídios, na biossíntese de compostos secundários, na biossíntese de componentes de parede celular e citoesqueleto, na cascata de transdução de sinais foi verificada, indicando que Toropi apresenta um complexo mecanismo de defesa contra esse estresse.

A ativação de um gene que possivelmente codifica um fator de transcrição do tipo bHLH e pelo seu papel chave na resposta a diversos estresses conforme demonstrado, sugere que esse seja o gene candidato para ativação dos processos fisiológicos que levam a tolerância ao alumínio tóxico em Toropi. No entanto, o estudo mais detalhado do papel desse gene é necessário para caracterizá-lo como chave.

## **5 Conclusões**

A tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi é resultado da ativação de uma complexa rede de genes, possivelmente ativada pelo fator de transcrição bHLH. É possível que esse fator de transcrição corresponda ao gene maior de Toropi e seja o gatilho para uma cascata de resposta ao estresse de  $Al^{3+}$  que envolve vias de sinalização e metabólicas complexas. Esses genes de resposta ao estresse de trigo fornecem uma visão sobre o mecanismo de tolerância ao  $Al^{3+}$  em plantas.

## **CAPÍTULO V**

### **Tolerância ao alumínio Tóxico em Toropi: montando o quebra-cabeça**

#### **Considerações Finais**



Melhoramento genético para tolerância ao alumínio tóxico tem sido importante em programas de melhoramento para várias culturas, principalmente para o trigo. Ao longo dos anos, a importância dos genótipos brasileiros como fonte de genes para tolerância ao  $Al^{3+}$  foi reconhecida mundialmente, sendo a variabilidade genética existente considerada um “presente da natureza”. Entre os genótipos brasileiros amplamente estudados cita-se BH1146 e Frondoso, progenitor de Atlas 66. No entanto, diversas avaliações para esse caráter realizadas, tanto em condições de solo quanto em solução nutritiva, realizadas na EMBRAPA Trigo identificaram diversos outros materiais com comportamento diferenciado na presença de  $Al^{3+}$ , entre eles Toropi, um genótipo antigo cultivado no RS.

Toropi, quando avaliado em solução nutritiva contendo alumínio em diversas concentrações, tem apresentado um comportamento estável, mantendo o crescimento das raízes à medida que se aumentam as doses até se alcançar o limite biológico da espécie. A pergunta que surgiu foi: será que Toropi apresenta um novo gene ou uma fonte adicional para tolerância ao alumínio tóxico em trigo?

Para responder essa pergunta, as bases genéticas da tolerância ao  $Al^{3+}$  de Toropi foram investigadas primeiramente através da avaliação do fenótipo de uma população segregante derivada do cruzamento entre Toropi por Anahuac, onde a fonte de genes para o caráter foi Toropi. A avaliação quanto à tolerância em doses crescentes de  $Al^{3+}$ , revelou consistentemente que o caráter em Toropi é governado por um gene principal, capaz de discriminar a população em dois grandes grupos, as linhagens tolerantes e sensíveis. Para investigar se esse gene é diferente daquele presente em BH1146, avaliou-se uma população segregante derivada do cruzamento entre essas duas possíveis fontes de tolerância, Toropi e BH1146. O aparecimento de linhagens segregantes sensíveis confirma que esses dois genótipos apresentam genes distintos controlando a tolerância ao  $Al^{3+}$ . Logo, Toropi é uma fonte adicional entre as já caracterizadas geneticamente nesta espécie, em especial a presente em BH1146, sendo que a tolerância de Toropi provavelmente provém de Frontana e a de BH1146 de Polyssú. No entanto, um paradoxo continuava a ser resolvido: como um caráter de herança simples apresenta distribuição de frequência contínua, de linhagens altamente tolerantes

a linhagens altamente sensíveis, quando exposto ao  $Al^{3+}$ ? Tal fato indica que além desse gene principal, existem outros genes distribuídos no genoma modulando o nível da tolerância.

O mapeamento molecular do gene de Toropi através de marcadores moleculares revelou que o caráter é realmente governado por um gene de efeito maior, como já havia sido proposto para a espécie. O gene que controla a tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi (*AltTp*), está localizado no braço curto do cromossomo 4D, diferentemente do proposto para BH1146 e Altas 66. A análise de mapeamento molecular, indicou a existência de diversos QTLs para o caráter, sendo o principal QTL presente em todas análises para todas as doses avaliadas localizado no cromossomo 4DS. Além desse gene, outros genes estão presentes e correspondem aos demais QTLs localizados principalmente no grupo de ligação 2, fisicamente localizado no cromossomo 3B de trigo. A presença de vários QTLs é consistente com a distribuição contínua das freqüências, indicando que a variação no nível de tolerância das linhagens recombinantes depende da presença de alelos favoráveis.

A utilização de estratégias eficientes como o uso de estoques citogenéticos aliados ao mapeamento molecular via marcadores permitiu identificar que Toropi apresenta duas regiões no genoma extremamente conservadas para a tolerância ao alumínio tóxico entre as gramíneas. A primeira corresponde ao cromossomo 4D das Triticeae, onde estão localizados os genes *Alt<sub>BH</sub>* e *ALMT1* de trigo, *Alp* de cevada e *Alt3* de centeio, e a segunda corresponde ao cromossomo 1 de arroz que concentra o maior número de QTLs para o caráter nessa espécie e que apresenta colinearidade com o gene *Alt<sub>SB</sub>* de sorgum. A presença dessas duas regiões é o que provavelmente confere a tolerância diferenciada apresentada por Toropi.

A presença de um gene maior e de outros QTLs para tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi indica que o caráter é tão geneticamente como fisiologicamente complexo. A análise de expressão gênica sob estresse de alumínio indica que a tolerância em Toropi é possivelmente resultado da ativação de um gene desencadeador do processo de “resgate” e da ação conjunta de vários genes buscando socorrer os danos causados pelo  $Al^{3+}$ .

Da ativação do gene desencadeador, nesse caso, um possível fator de transcrição bHLH, até ativação dos mecanismos de resposta vários componentes celulares são envolvidos incluindo diferentes enzimas, transportadores, receptores associados a membrana e outras moléculas de transdução de sinais. Logo, é razoável especular que a variação contínua para tolerância ao Al em trigo envolva um grande número de genes associados com diferentes aspectos do metabolismo, como síntese de ácidos orgânicos, de enzimas antioxidantes, de lipídios de membrana, ativação de transportadores e moléculas sinalizadoras. Juntos esses genes atuam limitando a ação e penetração do  $Al^{3+}$  bem como mantendo o metabolismo da planta.

A pergunta que permanece é: como identificar e juntar as diferentes peças da maquinaria molecular? A presença de uma distribuição contínua associada à identificação de várias regiões do genoma controlando o caráter e a expressão diferencial de vários genes, indica que a tolerância ao  $Al^{3+}$  em Toropi é mais complexa do que fora proposto para trigo. A saturação do mapa molecular de Toropi com mais marcadores, principalmente com marcadores funcionais derivados das seqüências diferencialmente expressas, permitirá a identificação de marcadores mais próximos aos QTLs já identificados ou até mesmo a identificação de genes candidatos. O mapeamento de QTLs é o primeiro passo para a clonagem posicional de genes controlando características complexas, nesse caso, genes responsáveis pelas diferenças quanto à tolerância ao  $Al^{3+}$  em trigo.

## Referência Bibliográficas

ABE, H.; YAMASAKI, A.; FUJII, H. et al. Convenient transformation of benzyl alcohol into its corresponding selenide using the selenolate anion-aluminum chloride combination system. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 44: 2223-2226, 1996.

AHN, S. J.; SIVAGURU, M.; OSAWA, H.; et al. Aluminum inhibits the H<sup>+</sup>-ATPase activity by permanently altering the plasma membrane surface potentials in squash roots. **Plant Physiology**, 126: 1381-1390, 2001.

ALAM, S.M. Influence of aluminum on plant growth and mineral nutrition of barley. **Communications In Soil Science And Plant Analysis**, 12: 121-138, 1981.

ALPERT, K. B.; GRANDILLO, S.; SD TANKSLEY, S.D. fw-2.2: A major QTL controlling fruit weight is common to both red-fruited and green-fruited tomato species. **Theoretical and Applied Genetics**, 91: 994-1000, 1995.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 215: 403-410, 1990.

ANDERSEN, J. R.; LÜBBERSTEDT, T. Functional markers in plants. **Trends and Plant Science**, 8: 554-560, 2003.

ANIOL, A. Induction of aluminum tolerance in wheat seedlings by low doses of aluminum in nutrition solution. **Plant Physiology**, 76: 551-555, 1984.

ANIOL, A.; GUSTAFSON, J. P. Chromosome location of genes controlling aluminum tolerance in wheat, rye and triticale. **Canadian Journal of Genetics and Cytology**, 26: 701-705, 1984.

APSE, M. P.; AHARON, G. S.; SNEDDEN, W. A. et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in Arabidopsis. **Science**, 285: 1256-1258, 1999.

ARESHCHENKOVA, T.; GANAL, M. W. Long tomato microsatellites are predominantly associated with centromeric regions. **Genome**, 42: 536-544, 1999.

ASAI, T., STONE, J. M., HEARD, J. E. et al. Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. **Plant Cell**, 12: 1823-1835, 2000.

ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. Identification, isolation and pyramiding of quantitative trait loci for rice breeding. **Trends in Plant Science**, 2006 (*in press*).

AVILA, C. M.; NADAL, S.; MORENO, M. T. et al. Development of a simple PCR-based marker for the determination of growth habit in *Vicia faba* L. using a candidate gene approach. **Molecular Breeding**, 17: 185-190, 2006.

BAIER, A. C.; SOMERS, D. J.; GUSTAFSON, J. P. Aluminum tolerance in wheat: correlating hydroponic evaluations with field and soil performances. **Plant Breeding**, 114: 291-296, 1995.

BAILEY, M. S.; WILSON, N. T.; ROBERTS, C. et al. Structures, stabilities and ordering in Ni-Al nanoalloy clusters. **European Physical Journal**, 25: 41-55, 2003.

BARBOSA, M. M. **Genética e mapeamento molecular da resistência parcial à ferrugem da folha da aveia (*Avena sativa* L.)**. 2002. 115 f. Tese (Doutorado) em Fitotecnia – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanism of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, 48: 75-92, 2002.

BEALES, J.; LAURIE, D. A.; DEVOS, K. M. Allelic variation at the linked AP1 and PhyC loci in hexaploid wheat is associated but not perfectly correlated with vernalization response. **Theoretical and Applied Genetics**, 110: 1099-1107, 2005.

BECKMAN, I. Cultivation and breeding of wheat (*Triticum vulgare* Vill.) in the South of Brazil. **Proceedings of Workshop on Plant Adaptation to Mineral Stress in Problem Soils**, 409-416, 1976.

BELLES-BOIX, E.; BABIYCHUK, E.; MONTAGU, M. V. et al. CEF, a Sec24 homologue of *Arabidopsis thaliana*, enhances the survival of yeast under oxidative stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, 51: 1761-1762, 2000.

BERNARDO, R. **Breeding for quantitative traits in plants**. Ed. Stemma, Minnessota, 2002, 368p.

BEYENBACH, K. W.; WIECZOREK, H. The V-type H<sup>+</sup> ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **Journal of Experimental Biology**, 209: 577-589, 2006.

BRADEEN, J. M.; SIMON, P. W. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y-2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. **Theoretical and Applied Genetics**, 97: 960-967, 1998.

BRODERSEN, P.; PETERSEN, M.; PIKE, H. M. et al. Knockout of *Arabidopsis accelerated-cell-death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. **Genes & Development**, 16: 490-502, 2002.

BROSCHÉ, M.; STRID, A. Cloning, expression, and molecular characterization of a small pea gene family regulated by low levels of ultraviolet B radiation and other stresses. **Plant Physiology**, 121: 479-487, 1999.

BROWNLEADER, M. D.; MCNALLY, P. E.; DAVIES, G. E. A. et al. Elicitor-induced extensin insolubilization in suspension-cultured tomato cells, **Phytochemistry**, 46: 1-9, 1997.

BRYAN, G. J.; STEPHENSON, P.; COLLINS, A. et al. Low levels of DNA sequence variation among adapted genotypes of hexaploid wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 99: 192-198, 1999.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Ed. American Society of Plant Physiologists, 2001, 1367p.

BUNDOCK, P. C.; CROSS, M. J.; SHAPTER, F. M. et al. Robust allele-specific polymerase chain reaction markers developed for single nucleotide polymorphisms in expressed barley sequences. **Theoretical and Applied Genetics**, 112: 358-365, 2006.

CAMARGO, C. E. O. Inheritance of tolerance to aluminum toxicity in wheat. **Bragantia**, 40: 33-45, 1981.

CAMARGO, C. E. O. Melhoramento de trigo. VI: Hereditariedade de tolerância a três concentrações de alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, 40: 279-291, 1984.

CAMARGO, C.E.; FELÍCIO, J.C. Tolerância de cultivares de trigo, triticale e centeio em diferentes níveis de alumínio em solução nutritiva. **Bragantia**, 43: 9-16, 1984.

CAMPBELL, L. G.; LAFEVER, H. N. Heritability of aluminum tolerance in wheat. **Cereal Research Communications**, 9: 281-287, 1981.

CANÇADO, G. M. A.; DE ROSA, V. E.; FERNANDEZ, J. H. et al. Glutathione S-transferase and aluminum toxicity in maize. **Functional Plant Biology**, 32: 1045-1055, 2005.

CARVER, B. F.; OWNBY, J. D. Acid soil tolerance in wheat. **Advances in Agronomy**, 54:117-173, 1995.

COBBETT, C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, 123: 825-832, 2000.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 27 de jun. 2006.

CRUZ-ORTEGA, R.; CUSHMAN, J. C.; OWNBY, J. D. cDNA clones encoding 1,3- $\beta$ -glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots. **Plant Physiology**, 114: 1453-1460, 1997.

D'SOUZA-SCHOREY, C.; CHAVRIER, P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 7: 347-358, 2006.

Da-SILVA, P. R. **Identificação e conversão de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem da folha em trigo**. 2002. 64 f. Dissertação (Mestrado) em Biologia celular e Molecular – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

DE SOUZA, C. N. A. Classification of Brazilian wheat cultivars for aluminium toxicity in acid soils. **Plant Breeding**, 117: 217-221, 1998.

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

DELHAIZE, E.; CRAIG, S. BEATON, C. D. et al. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, 103: 685–693, 1993b.

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

DELHAIZE, E.; RYAN, P. R.; HEBB, D. M. et al. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 101: 15249-15254, 2004.

DEVOS, K. M.; GALE, M. D. Comparative genetics in the grasses. **Plant Molecular Biology**, 35: 3-15, 1997.

DEVOS, K.M.; GALE, M. D. Genome relationships: The grass model in current research. **Plant Cell**, 12: 637-646, 2000.

DIATCHENKO, L.; LAU, Y. F. C.; CAMPBELL, P. A. et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 93: 6025-6030, 1996.

DIATCHENKO, L.; LUKYANOV, S.; LAU, Y. F. C. et al. Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes. **Methods In Enzymology**, 303: 349-380, 1998.

DIAZ, J.; BERNAL, A.; POMAR, F. et al. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. **Plant Science**, 161: 179-188, 2001.

DRUMMOND, R. D.; GUIMARÃES, C. T.; FELIX, J. et al. Prospecting sugarcane genes involved in aluminum tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, 24: 221-230, 2001.

DUBCOVSKY, J.; MARIA, G. S.; EPSTEIN, E. et al. Mapping of the  $K^+/Na^+$  discrimination locus *Kna1* in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 92: 448-454, 1996.

DUBCOVSKY J. Marker-assisted selection in public breeding programs: The wheat experience. **Crop Science**, 44: 1895-1898, 2004.

DUEK, P. D.; FANKHAUSER, C. bHLH class transcription factors take centre stage in phytochrome signaling. **Trends In Plant Science**, 10: 51-54, 2005.

DUNN, T. M.; LYNCH, D. V.; MICHAELSON, L. V. et al. A Post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, 93: 483-497, 2004.

DVORAK, J.; LUO, M.C.; Z.-L. YANG, Z.L. Genetic evidence on the origin of *T. aestivum* L., In: **The Origins of Agriculture and the Domestication of Crop Plants in the Near East**, Ed. A. DAMANIA. ICARDA, Aleppo, Syria, 1998, p. 235-251.

ELBAZ, B.; SHOSHANI-KNAANI, N.; DAVID-ASSAEL, O. et al. High expression in leaves of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* of *AhMHX*, a homolog of an *Arabidopsis thaliana* vacuolar metal/proton exchanger. **Plant Cell and Environment**, 29: 1179-1190, 2006.

EL-DIN EL-ASSAL, S.; ALONSO-BLANCO, C.; AJM PEETERS, A.J.M. et al. A QTL for flowering time in *Arabidopsis* reveals a novel allele of CRY2. **Nature Genetics**, 29: 435-440, 2001.

ELLIS, M. H.; SPIELMEYER, W.; GALE, K. R. et al. "Perfect" markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 105: 1038-1042, 2002.

EZAKI, B.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Cloning and sequencing of the cDNAs induced by aluminum treatment and Pi starvation in cultured tobacco cells. **Physiologia Plantarum**, 93: 11-18, 1995.

EZAKI, B.; GARDNER, R. C.; EZAKI, Y. et al. Expression of aluminium-induced genes in transgenic *Arabidopsis* plants can ameliorate aluminium stress and/or oxidative stress. **Plant Physiology**, 122: 657-665, 2000.

FAO - **Statistical Databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 27 de jun. 2006.

FEDERIZZI, L. C.; PACHECO, M. T.; SANDRA, C. K. M. Melhoria de Plantas: genética aplicada à agricultura. In: **genética para que te quero?** Org. Sacchet, A.M.O.F. - Porto Alegre, Ed. Universidade, 1999, p.105-120.

FENG, C. D.; STEWART, J. M. D.; ZHANG, J. F. STS markers linked to the Rf(1) fertility restorer gene of cotton. **Theoretical and Applied Genetics**, 110: 237-243, 2005.

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

FOY, C.D.; ARMIGER, W.H.; BRIGGLE, L. et al. Aluminum tolerance of wheat and barley varieties. **Agronomy Journal**, 57: 413-417, 1965.

FOY, C.D. The physiology of plant adaptation to mineral stress. **Iowa State Journal Research**, 57: 355-391, 1983.

FOY, C. D. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In Adams F. (ed.) Soil acidity and liming, 2<sup>a</sup>ed., **American Society Agronomy**, Madison, p.57-97, 1984.

FOY, C. D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils. **Soil Science Plant Analysis**, 19: 959-987, 1988.

FOY, C. D.; SILVA, A. R. Tolerances of wheat germplasm to acid subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, 14: 1277-1295, 1991.

FRARY, A. NESBITT, T.C.; GRANDILLO, S. et al. fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. **Science**, 289: 85-88, 2000.

GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 95: 1971-1974, 1998.

GALLEGO, F. J.; BENITO, C. Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 95: 393-399, 1997.



GALLEGO, F. J.; CALLES, B.; BENITO, C. Molecular markers linked to the aluminium tolerance gene Alt1 in rye (*Secale cereale* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 97: 1104-1109, 1998.

GARVIN, D.F.; CARVER, B.F. Role of the genotype in tolerance to acidity and aluminum toxicity. In: Rengel, Z. (ed.), **Handbook of soil acidity**, Marcel Dekker, New York, p. 387-406, 2003.

GASPAR, T.; PENEL, C.; CASTILLO, F. J. et al. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, 64: 418-423, 1985.

GRABSKI, S.; SCHINDLER, M. Aluminum induces rigor within the actin network of soybean cells. **Plant Physiology**, 108: 897-901, 1995.

GUPTA, P. K.; BALYAN, H. S.; EDWARDS, K. J. et al. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 105: 413-422, 2002.

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

HAMILTON, C. A.; GOOD, A. G.; TAYLOR, G. J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase in an aluminum-resistant cultivar of wheat. **Plant Physiology**, 125: 2068-2077, 2001.

HANADA, K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1632: 16-30, 2003.

HARGROVE, W. L.; THOMAS, G. W. Extraction of aluminum from aluminum organic-matter in relation to titratable acidity. **Soil Science Society of America Journal**, 48: 1458-1460, 1984.

HAYASHI, K.; HASHIMOTO, N.; DAIGEN, M. et al. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the Piz locus. **Theoretical and Applied Genetics**, 108: 1212-1220, 2004.

HEIM, M. A.; JAKOBY, M.; WERBER, M. et al. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. **Molecular Biology and Evolution**, 20: 735-747, 2003.

HELGUERA, M.; KHAN, I. A.; DUBCOVSKY, J. Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene Lr47. **Theoretical and Applied Genetics**, 100: 1137-1143, 2000.

HOEKENGA, O. A.; VISION, T. J.; SHAFF, J. E. et al. Identification and Characterization of Aluminum Tolerance Loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* x *Columbia*) by Quantitative Trait Locus Mapping. A Physiologically Simple But Genetically Complex Trait. **Plant Physiology**, 132: 36-948, 2003.

HOEKENGA, O. A.; MARON, L. G.; PINEROS, M. A. et al. From the Cover: *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for

aluminum tolerance in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 103: 738-9743, 2006.

HOYT, E. **Conserving the wild relatives of crops**. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, Delaware, 52p. 1992.

INOUE, M.; CAI, H. W. Sequence analysis and conversion of genomic RFLP markers to STS and SSR markers in Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). **Breeding Science**, 54: 245-251, 2004.

ISHIKAWA, S.; WAGATSUMA, T.; SASAKI, R. et al. Comparison of the amount of citric and malic acids in AI media of seven plant species and two cultivars each in five plant species. **Soil Science and Plant Nutrition**, 46: 751-758, 2000.

JIANG, H. P.; KANG, D. C.; ALEXANDRE, D. et al. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 97: 12684-12689, 2000.

JOPPA, L. R. DU, C.; HART, G.E. et al. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. **Crop Science**, 37: 1586-1589, 1997.

KELLER, B.; FEUILLET, C. Colinearity and gene density in grass genomes. **Trends in Plant Science**, 5: 246-251, 2000.

KERRIDGE, P. C.; KRONSTAD, W. E. Evidence of genetic resistance to aluminum toxicity in wheat (*Triticum aestivum* Vill., host). **Agronomy Journal**, 60: 710-711, 1968.

KOBAYASHI, Y.; KOYAMA, H. QTL Analysis of AI Tolerance in Recombinant Inbred Lines of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, 43:1526-1533, 2002.

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

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, 55: 459-493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; PINEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, 247: 109-119, 2005.

KOLLMEIER, M.; DIETRICH, P.; BAUER, C. S. et al. Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. **Plant Physiology**, 126: 397-410, 2001

KONIECZNY, A.; AUSUBEL, F. M. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using codominant ecotype-specific pcr-based markers. **Plant Journal**, 4: 403-410, 1993.

KONISHI, S.; IZAWA, T.; LIN, S. Y. et al. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication. **Science**, 312: 1392-1396, 2006.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annual Eugenetics**, [s.l], 12: 172-175, 1944.

LAGOS, M. B.; FERNANDES, M. I. M.; CAMARGO, C. E. D. et al. Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat (*Triticum-aestivum* L.). **Revista Brasileira de Genética**, 14: 1011-1020, 1991.

LANDER, E. S. et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural population. **Genomics**, 1: 174-181, 1987.

LARSEN, P. B.; GEISLER, M. J. B.; JONES, C. A. et al. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. **Plant Journal**, 41: 353-363, 2005.

LEDEEN, R. W.; WU, G. Sphingolipids of the nucleus and their role in nuclear signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006, *in press*.

LEDENT, V.; VERVOORT, M. The basic helix-loop-helix protein family: Comparative genomics and phylogenetic analysis. **Genome Research**, 11: 754-770, 2001.

LEE, S. J.; PENNER, G. A. The conversion of RFLP markers to allele specific amplicons linked to QTLs governing malting quality in barley. **Molecular Breeding**, 3: 457-462, 1997.

LI, W. L.; FARIS, J. D.; CHITTOOR, J. M. et al. Genomic mapping of defense response genes in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 98: 226-233, 1999.

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

LI, Z. J.; ONODERA, H.; UGAKI, M. et al Characterization of calreticulin as a phosphoprotein interacting with cold-induced protein kinase in rice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 26: 256-261, 2003.

LI, Y. J.; DANKHER, O.P.; CARREIRA, L. et al. The shoot-specific expression of gamma-glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. **Plant Physiology**, 141: 288-298, 2006a.

LI, W. Y. F.; WONG, F. L.; TSAI, S. N. et al. Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. **Plant Cell Environ**, 29: 1122-1137, 2006b.

LIANG, H.; YAO, N.; SONG, L. T. et al. Ceramides modulate programmed cell death in plants. **Genes & Development**, 17: 2636-2641, 2003.

LIMA, M.; MIRANDA FILHO J. B.; FURLANI, P.R. Diallel cross among inbred lines of maize differing in aluminum tolerance. **Brazilian Journal of Genetics**, 4: 579-584, 1995.

LIMBERGER, E. **Identificação de genes responsivos ao alumínio tóxico em aveia branca (*Avena sativa* L.)**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado) em Fitotecnia – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LINDBERG, S.; GRIFFITHS, G. Aluminum effects on ATPase activity and lipid composition of plasma membranes in sugar beet roots. **Journal Of Experimental Botany**, 44: 1543-1550, 1993.

LIU, B.; LEE, Y. R. J. Kinesin-related proteins in plant cytokinesis. **Journal of Plant Growth Regulation**, 20: 141-150, 2001.

LUO, M. C.; DVORAK, J. Molecular mapping of an aluminum tolerance locus on chromosome 4D of Chinese Spring wheat. **Euphytica**, 91: 31-35, 1996.

MA, J. F.; HIRADATE, S.; NOMOTO, K. et al. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea - Identification of Al form in the leaves. **Plant Physiology**, 113: 1033-1039, 1997.

MA, J. F.; HIRADATE, S.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat - II. Oxalic acid detoxifies aluminum internally. **Plant Physiology**, 117: 753-759, 1998.

MA, J. F.; TAKETA, S.; YANG, Z. M. Aluminum tolerance genes on the short arm of chromosome 3R are linked to organic acid release in triticale. **Plant Physiology**, 122: 687-694, 2000.

MA, J. F.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E. Aluminum tolerance in plants and the complexing role organic acids. **Trends in Plant Science**, 6: 273-278, 2001.

MA, J. F.; SHEN, R. F.; ZHAO, Z. Q. et al. Response of rice to Al stress and identification of quantitative trait loci for Al tolerance. **Plant and Cell Physiology**, 43: 652-659, 2002.

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

MA, J. F.; NAGAO, S.; SATO, K. et al. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. **Journal of Experimental Botany**, 55: 1335-1341, 2004.

MA, Z. Q.; WEI, J. B.; CHENG, S. H. PCR-based markers for the powdery mildew resistance gene Pm4a in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 109: 140-145, 2004.

MA, H. X.; BAI, G. H.; CARVER, B. F. et al. Molecular mapping of a quantitative trait locus for aluminum tolerance in wheat cultivar Atlas 66. **Theoretical and Applied Genetics**, 112: 51-57, 2005.

MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y. et al. Comparative Mapping of a Major Aluminum Tolerance Gene in Sorghum and Other Species in the Poaceae. **Genetics**, 167: 1905-1914, 2004.

MAGNACAVA, R.; GARDNER, C. O.; CLARK, R. B. Evaluation of inbred maize lines for aluminum in nutrient solution. In: H.W. Gabelman & B.C. Loughman (Eds.), **Genetics Aspects of Plant Mineral Nutrition**, pp. 255-265. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht.1987.

MAO, C. Z.; YI, K.; YANG, L. et al. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. **Journal of Experimental Botany**, 55, 137-143, 2004.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 27 de jun. 2006.

MARIANO, E.D.; ARRUDA, J.R.; MENOSSI, M. Metabolism and Root Exudation of Organic Acid Anions under Aluminium Stress. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17: 157-172, 2005.

MATOS, M.; CAMACHO, M. V.; PEREZ-FLORES, V. et al. A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. **Theoretical and Applied Genetics**, 111: 360-369, 2005.

MATSUI, K.; KIRYU, Y.; KOMATSUDA, T. et al. Identification of AFLP makers linked to non-seed shattering locus (*sht1*) in buckwheat and conversion to STS markers for marker-assisted selection. **Genome**, 47: 469-474, 2004.

MAY, M. J.; VERNOUX, T.; LEAVER, C. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. **Journal of Experimental Botany**, 49: 649-667, 1998.

MEKSEM, K.; RUBEN, E.; HYTEN, D. et al. Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. **Molecular Genetics and Genomics**, 265: 207-214, 2001.

MICHALAK, M.; CORBETT, E. F.; MESAELI, N. et al. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. **Biochemical Journal**, 344: 281-292, 1999.

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

MIFTAHUDIN, T.; SCOLES, G. J.; GUSTAFSON, J. P. Development of PCR-based codominant markers flanking the *Alt3* gene in rye. **Genome**, 47: 231-238, 2004.

MIFTAHUDIN, T.; CHIKMAWATI, T.; ROSS, K. et al. Targeting the aluminum tolerance gene *Alt3* region in rye, using rice/rye micro-colinearity. **Theoretical and Applied Genetics**, 110: 906-913, 2005.

MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre, Departamento de Plantas de Lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998. 140p.

MILACH, S. C. K. Seleção assistida por marcadores moleculares em plantas: mito ou realidade? In: **Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia**, 24. Pelotas, RS, 2004.

MINELLA, E. **Aluminum tolerance in barley: inheritance, chromosome location, genetic relation of source of diverse origins**. PhD thesis, Cornell University of Ithaca, NY, USA, 70p, 1989.

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

MINELLA, E.; SORRELLS, M. E. Inheritance and chromosome location of *Alp*, a gene controlling aluminum tolerance in "Dayton" barley. **Plant Breeding**, 116: 465-469, 1997.

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

MINGLIN, L.; ZHANG, Y. X.; CHAI, T. Y. Identification of genes up-regulated in response to Cd exposure, in *Brassica juncea* L. **Gene**, 363: 151-158, 2005.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, 9: 490-498, 2004.

MOORE, G.; FOOTE, T.; HELENTJARIS, T. et al. Was there a single ancestral cereal chromosome. **Trends in Genetics**, 11: 81-82, 1995.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with non repetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, 30:194–200, 2002.

MURRAY, J.; LARSEN, J. MICHAELS, T.E. et al. Identification of putative genes in bean (*Phaseolus vulgaris*) genomic (Bng) RFLP clones and their conversion to STSs. **Genome**, 45: 1013-1024, 2002.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular-weight plant dna. **Nucleic Acids Research**, 8: 4321-4325, 1980.

NAVA, I. C.; DELATORRE, C. A.; DUARTE, I. T. D. L. et al. Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena sativa* L.). **Euphytica**, 148: 353-358, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 1172 p.

NGUYEN, V. T.; BUROW, M. D.; NGUYEN, H. T. et al. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 102: 1002-1010, 2001.

NGUYEN, V. T.; NGUYEN, B. D.; SARKARUNG, S. et al. Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. **Molecular Genetics and Genomics**, 267: 772-780, 2002.

NGUYEN, B. D.; BRAR, D. S.; BUI, B. C.; et al. Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from the new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 106: 583-593, 2003.

NINAMANGO-CARDENAS, FE, GUIMARAES, CT, MARTINS, PR, et al. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, 130: 223-232, 2003.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 49: 249-279, 1998.

OHLROGGE, J.; BROWSE, J. Lipid biosynthesis. **Plant Cell**, 7: 957-970, 1995.

OLIVEIRA, P. H.; FEDERIZZI, L. C. ; MILACH, S. C. K. et al. Inheritance in oat (*Avena sativa* L.) of tolerance to soil aluminum toxicity. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 5: 301-308, 2005.

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

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

PAPERNIK, L.A.; BETHEA, A.S.; SINGLETON T.E. et al. Mechanistic basis of Al sensitivity in the ditelosomic lines of Chinese Spring wheat. **Planta**, 212: 829-834, 2001.

PARKER, G. D.; LANGRIDGE, P. Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Molecular Breeding**, 6: 169-174, 2000.

PATERSON, A. H.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. DNA Markers In Plant Improvement. **Advances in Agronomy**, 46: 39-90, 1991.

PELLET, D. M.; GRUNES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Organic-acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L). **Planta**, 196: 788-795, 1995.

PENFIELD, S.; JOSSE, E.M.; KANNANGARA, R. et al. Cold and Light Control Seed Germination through the bHLH Transcription Factor SPATULA. **Current Biology**, 15:1998–2006, 2005.

PENG, J. R.; RICHARDS, D. E.; HARTLEY, N. M. et al. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. **Nature**, 400: 256-261, 1999.

PENNER, G. A.; CLARKE, J.; BEZTE, L. J. et al. Identification of RAPD markers linked to a gene governing cadmium uptake in durum-wheat. **Genome**, 38: 543-547, 1995.

PESTSOVA, E.; GANAL, M.W.; RODER, M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of breed wheat. **Genome**, 43: 689-697, 2000.

PIAO, Z. Y.; DENG, Y. Q.; CHOI, S. R. et al. SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to Plasmodiophora brassicae in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp pekinensis). **Theoretical and Applied Genetics**, 108: 1458-1465, 2004.

PORTYANCO, V. A.; HOFFMAN, M. L.; HOLLAND, J. B. A linkage map of heploid oat based on grass anchor DNA clones and its relationship to the other oat maps. **Genome**, 44:249-265, 2001.

POSCHENRIEDER, C.; TOLRA, R.; BARCELO, J. Can metals defend plants against biotic stress? **Trends in Plant Science**, 11: 288-295, 2006.

PREUSS, M. L.; KOVAR, D. R.; LEE, Y. R. J. et al. A plant-specific kinesin binds to actin microfilaments and interacts with cortical microtubules in cotton fibers. **Plant Physiology**, 136: 3945-3955, 2004.

PRICE, A. H. Price Believe it or not, QTLs are accurate! **Trends in Plant Science**, 11: 1360-1385, 2006.

- PRITCHARD, J. The control of cell expansion in roots. **New Phytologist**, 127: 3-26, 1994.
- RADISEK, S.; JAKSE, J.; JAVORNIK, B. Development of pathotype-specific SCAR markers for detection of *Verticillium albo-atrum* isolates from Hop. **Plant Disease**, 88: 1115-1122, 2004.
- RAFALSKI, J. A. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. **Plant Science**, 162: 329-333, 2002.
- RAGLAND, M.; SOLIMAN, K. M. Sali5-4a (accession no. U64866) and Sali 3-2 (accession no. U89693): two genes induced by aluminum in soybean roots (PGR 97-071). **Plant Physiology**, 114: 395, 1997.
- RAMAN, H.; ZHANG, K.; CAKIR, M. et al. Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, 48: 781-791, 2005.
- RAO, I.M.; ZEIGLES, R.S.; Vera, R. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crops. **Bioscience**, 43: 454-465, 1993.
- RAUSER, W. E. Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and function. **Plant Physiology**, 109, 1141-1149, 1995.
- REDDY, A. S. N.; NARASIMHULU, S. B.; SAFADI, F. et al. A plant kinesin heavy chain-like protein is a calmodulin-binding protein. **Plant Journal**, 10: 9-21, 1996.
- RHUE, R.D.; CROGAN, C.O.; STOCKMEYER, E.W. et al. Genetic control of aluminum tolerance in corn. **Crop Science**, 18: 1063-1067, 1978.
- RICHARDS, K. D.; GARDNER, R. C. The effect of aluminum treatment on wheat roots - expression of heat-shock, histone and SHH genes. **Plant Science**, 98: 37-45, 1994.
- RICHARDS, K. D.; SNOWDEN, K. C.; GARDNER, R. C. WALI6 and WALI7 - genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L) roots. **Plant Physiology**, 105: 1455-1456, 1994.
- RICHARDS, K. D.; SCHOTT, E. J.; SHARMA, Y. K. et al. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 116: 409-418, 1998.
- RIEDE, C. R.; ANDERSON, J. A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. **Crop Science**, 36: 905-909, 1996.
- RODER, M. S.; PLASCHKE, J.; KONIG, S. U. et al. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. **Molecular & General Genetics**, 246: 327-333, 1995.
- RÖDER, M. S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K. et al. A microsatellite map of Wheat. **Genetics**, 149: 2007-2023, 1998.
- RODRIGUEZ-MILLA, M. A.; GUSTAFSON, J. P. Genetic and physical characterization of chromosome 4DL in wheat. **Genome**, 44: 883-892, 2001.



RODRIGUEZ-MILLA, M. A.; BUTLER, E.; HUETE, A. R. et al. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminum stress in rye. **Plant Physiology**, 130: 1706-1716, 2002.

ROSTOKS, N.; MUDIE, S.; CARDLE, L. et al. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. **Molecular Genetics and Genomics**, 274: 515-527, 2005.

RYAN, P. R.; SHA, J. E. KOCHIAN, L. V. Aluminum toxicity in roots. Correlation among ionic currents, ion fluxes, and root elongation in aluminum-sensitive and aluminum tolerant wheat cultivars. **Plant Physiology**, 99: 1193-1200, 1992.

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P. J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, 196: 103-110, 1995a.

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**, 22: 531-536, 1995b.

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

SAKA, N.; TSUJI, T.; TOYAMA, T. et al. Development of cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers linked to a green rice leafhopper resistance gene, Grh3(t). **Plant Breeding**, 125: 140-143, 2006.

SALVI, S.; TUBEROSA, R. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. **Trends in Plant Science**, 10: 297-304, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**, 2nd edn. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York. 1989.

SANCHES-CHACÓN, C. D.; FEDERIZZI, L. C.; MILACH, S. C. K. et al. Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35: 1797-1808, 2000.

SANDHU, D.; GILL, K. S. Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. **Plant Physiology**, 128: 803-811, 2002.

SAS – Institute Statistical Analysis System. User's guide. Version 6.4. ed., North Caroline: 1989. 846 p.

SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Aluminum inhibits growth and stability of cortical microtubules in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Soil Science And Plant Nutrition**, 43: 469-472, 1997.

SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. **Physiologia Plantarum**, 96, 193-198, 1996.

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

SAVENSTRAND, H.; BROSCHE, M.; ANGEHAGEN, M. et al. Molecular markers for ozone stress isolated by suppression subtractive hybridization: specificity of gene expression and identification of a novel stress-regulated gene. **Plant Cell and Environment**, 23(7): 689-700, 2000.

SAVENSTRAND, H.; STRID A. Six genes strongly regulated by mercury in *Pisum sativum* roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42: 135-142, 2004.

SHAH, M. M.; YEN, Y.; GILL, K. S. et al. Comparisons of RFLP and PCR-based markers to detect polymorphism between wheat cultivars. **Euphytica**, 114: 135-142, 2000.

SIVAGURU, M.; FUJIWARA, T.; SAMAJ, J. et al. Aluminum-induced 1 $\rightarrow$ 3 $\beta$ -D-glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. **Plant Physiology**, 124: 991-1006, 2000.

SIVAGURU, M.; PIKE, S.; GASSMANN, W. et al. Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane: Evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor. **Plant and Cell Physiology**, 44: 667-675, 2003.

SNOWDEN, K. C.; GARDNER, R. C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. **Plant Physiology**, 103: 855-861, 1993.

SNOWDEN, K. C.; RICHARDS, K. D.; GARDNER, R. C. Aluminum-Induced Genes (Induction by Toxic Metals, Low Calcium, and Wounding and Pattern of Expression in Root Tips). **Plant Physiology**, 107:341-348, 1995.

SOMERS, D. J.; BRIGGS, K. G.; GUSTAFSON, J. P. Aluminum stress and protein synthesis in near isogenic lines of *Triticum aestivum* differing in aluminum tolerance. **Physiologia Plantarum**, 97: 694-700, 1996.

SOMERS, D. J.; GUSTAFSON, J. P. The expression of aluminum stress induced polypeptides in a population segregating for aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, 38: 1213-1220, 1995.

SOMERS, D. J.; ZHOU, Z.; BEBELI, P. J. et al. Repetitive, genome-specific probes in wheat (*Triticum aestivum*) L em Thell amplified with minisatellite core sequences. **Theoretical and Applied Genetics**, 93: 982-989, 1996.

SOMERS, D. J.; ISAAC, P.; EDWARDS, K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) **Theoretical and Applied Genetics**, 109: 1105-1114, 2004.

SONG, Q. J.; MAREK, L. F.; SHOEMAKER, R. C. et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, 109: 122-128, 2004.

SONG, Q. J.; SHI, J. R.; SINGH, S. et al. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, 110: 550-560, 2005.

SPERLING, P.; HEINZ, E. Plant sphingolipids: structural diversity, biosynthesis, first genes and functions. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1632: 1-15, 2003.

SPIEGEL, S.; MILSTEIN, S. Sphingosine-1-phosphate, a key signalling molecule. **Journal of Biological Chemistry**, 277: 25851-25854, 2002.

STEEL, R. D. G.; TORRIE, J. L. **Principles and procedures of statistical**. New York: McGraw-Hill, 1980. 418p.

SUITER, K. A.; WENDEL, J. F.; CASE, J. S. Linkage-1 - A Pascal computer-program for the detection and analysis of genetic-linkage. **Journal of Heredity**, 74: 203-204, 1983.

TABUCHI, A.; MATSUMOTO, H. Changes in cell-wall properties of wheat (*Triticum aestivum*) roots during aluminium-induced growth inhibition. **Physiologia Plantarum**, 112: 353-358, 2001.

TANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KOCHIAN, L. V. et al. Identification of RFLP markers linked to the barley aluminum tolerance gene *Alp*. **Crop Science**, 40: 778-782, 2000.

TAYLOR, N. L.; DAY, D. A.; MILLAR, A. H. Targets of stress-induced oxidative damage in plant mitochondria and their impact on cell carbon/nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, 55: 1-10, 2004.

THRO, A. M.; PARROTT, W.; UDALL, J. A. et al. This issue in crop science - Symposium on genomics and plant breeding: The experience of the initiative for future agricultural and food systems – Introduction. **Crop Science**, 44: 1893-1893, 2004

TYRKA, M.; BLASZCZYK, L.; CHELKOWSKI, J. et al. Development of the single nucleotide polymorphism marker of the wheat Lr1 leaf rust resistance gene. **Cellular & Molecular Biology Letters**, 9: 879-889, 2004.

VAGUJFALVI, A.; GALIBA, G.; CATTIVELLI, L. et al. The cold-regulated transcriptional activator Cbf3 is linked to the frost-tolerance locus Fr-A2 on wheat chromosome 5A. **Molecular Genetics and Genomics**, 269: 60-67, 2003.

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

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, 23: 4407-4414, 1995.

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

WANG, S., BASTEN, C. J.; ZENG, Z. B. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>), 2006.

WANG, Y. J.; ZHANG, Z. G.; HE, X. J. et al. A rice transcription factor OsbHLH1 is involved in cold stress response. **Theoretical and Applied Genetics**, 107: 1402-1409, 2003.

WATANABE, T.; OSAKI, M.; TADANO, T. Al uptake kinetics in roots of *Melastoma malabathricum* L. - an Al accumulator plant. **Plant and Soil**, 231: 283-291, 2001.

WEAVER, L. M.; HERRMANN, K. M. Dynamics of the shikimate pathway in plants. **Trends In Plant Science**, 2: 346-351, 1997.

WEBER, M.; TRAMPCZYNSKA, A.; CLEMENS, S. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd<sup>2+</sup>-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. **Plant Cell and Environment**, 29: 950-963, 2006.

WEILAND, J. J.; YU, M. H. A cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet. **Crop Science**, 43: 1814-1818, 2003.

WENG, Y.; TULEEN, N. A.; HART, G. E. Extended physical maps and a consensus physical map of the homoeologous group-6 chromosomes of wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). **Theoretical and Applied Genetics**, 100: 519-527, 2000.

WERNER, J.D.; BOREVITZ, J.O.; WARTHMAN, N. et al. Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an FLM deletion as a cause for natural flowering-time variation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 102: 2460-2465, 2005.

WIGHT, C. P.; KIBITE, S.; TINKER, N. A. et al. Identification of molecular markers for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. **Theoretical And Applied Genetics**, 112: 222-231, 2006.

WORRALL, D.; NG, C. K. Y.; HETHERINGTON, A. M. Sphingolipids, new players in plant signaling. **Trends in Plant Science**, 8: 317-320, 2003.

WU, P.; LIAO, C. Y.; HU, B. ET AL. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. **Theoretical and Applied Genetics**, 100: 1295-1303, 2000.

XIANG, C.; OLIVER, D. J. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 10: 1539-1550, 1998.

XIANG, T. H.; WANG, L. L.; PANG, J. L. et al. Development of SNP marker and CAPS marker linked to ACC synthase gene in different sexual phenotypes of cucumber. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 33: 362-367, 2006.

XIAO, K.; BAI, G. H.; CARVER, B. F. Nylon filter arrays reveal differential expression of expressed sequence tags in wheat roots under aluminum stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, 47: 839-848, 2005.

XU, D. H.; BAN, T. Conversion of AFLP markers associated with FHB resistance in wheat into STS markers with an extension-AFLP method. **Genome**, 47: 660-665, 2004.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is a nearly symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. **Plant Physiology**, 125: 199-208, 2001.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; DEVI, S. R. et al. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, 128: 63-72, 2002.

- YAMANAKA, N.; WATANABE, S.; TODA, K. et al. Fine mapping of the FT1 locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a recombinant inbred line. **Theoretical and Applied Genetics**, 110: 634-639, 2005.
- YANG, Z. M.; SIVAGURU, M.; HORST, W. J. et al. Aluminium tolerance is achieved by exudation of citric acid from roots of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, 110: 72-77, 2000.
- YU, L. H.; UMEDA, M.; LIU, J. Y. et al. A novel MT gene of rice plants is strongly expressed in the node portion of the stem. **Gene**, 206: 29-35, 1998.
- ZHANG, H. X.; BLUMWALD, E. Transgenic salt tolerant tomato plants accumulate salt in the foliage but not in the fruits. **Nature Biotechnology**, 19: 765-768, 2001.
- ZHAO, Z.Q.; MA, J. F.; SATO, K. et al. Differential Al resistance and citrate secretion in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Planta**, 217: 794-800, 2003.
- ZHUANG, X.; XU, Y.; CHONG, K. et al. *OsAGAP*, an *ARF-GAP* from rice, regulates root development mediated by auxin in *Arabidopsis*. **Plant Cell and Environment**, 28: 147-156, 2005.
- ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. Continuous secretion of organic acids is related to aluminium resistance during relatively long-term exposure to aluminium stress. **Physiologia Plantarum**, 103: 209-214, 1998.
- ZUK, M.; PRESCHA, A.; KEPCZYNSKI, J. et al. ADP ribosylation factor regulates metabolism and antioxidant capacity of transgenic potato tubers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51: 288-294, 2003.

## Curriculum Vitae - CNPq

---

### Dados Pessoais

Nome: Tatiana Boff

Nascimento: 27/11/1976 - Porto Alegre/RS - Brasil

Endereço Profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia  
Av. Bento Gonçalves, 7712. Lab. de Biotecnologia, sala 15 .Agronomia - Porto Alegre  
91501-970, RS - Brasil

Telefone: 051 33167451 email: tatianaboff@cbiot.ufrgs.br, tatianaboff@terra.com.br

---

### Formação Acadêmica/Titulação

#### 2002 – 2006

Doutorado em Biologia Celular e Molecular – Biotecnologia Vegetal

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Título: Identificação e Caracterização Molecular de Genes Associados à Tolerância ao Alumínio em Trigo

Orientador: Sandra Cristina Kothe Milach

Co-Orientadores: Luiz Carlos Federizzi (UFRGS) e Euclides Minella(Embrapa Trigo)

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

#### 2000 - 2002

Mestrado em Zootecnia – Melhoramento Genético de Plantas Forrageiras

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Título: Comportamento meiótico e fertilidade do pólen em espécies de Leucaena Bentham (Leguminosae – Mimosoidae, Ano de obtenção: 2002

Orientador: Maria Teresa Schifino-Wittmann

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

#### 1995 - 1999

Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

### Formação complementar

**2004-** Curso de curta duração em Genômica Funcional de Plantas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil – 30hrs/aula.

**2003-** Curso de curta duração em Seqüenciamento e Análise de Genomas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil – 80hrs/aula.

**2001-** Curso de curta duração em Bandeamento Cromossômico e Hibridização in situ em.

Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil.

---

### Prêmios e Títulos

1998- Destaque no X Salão de Iniciação Científica, UFRGS.

---

### Artigos completos publicados em periódicos

1. BOFF, T., SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Segmental allopolyploidy and paleopolyploidy in species of *Leucaena* Benth: evidence from meiotic behaviour analysis. **Hereditas**. Lund: , v.138, p.27 - 35, 2003.
2. BOFF, T., SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Pollen fertility and meiotic behaviour in accessions and species of *Leucaena*. **Tropical Grasslands**, v.36, n.1, p.54 - 58, 2002.
3. SCHIFINO-WITTMANN, M. T., CARDOSO, M. B., BOFF, T. Chromosome numbers of *Leucaena* species: filling the gap and discovering a new tetraploid species. **Leucnet News**. Oxford:, v.6, p.10 - 12, 1999.

### Capítulos de livros publicados

1. MILACH, S.C.K.; BARBOSA, M.M.; LEMONS E SILVA, C.F. ; BOFF, T., DA SILVA, P.R.; FEDERIZZI, L.C. Mapeamento de Características Agronômicas de Interesse de Cereais de Inverno In: **Atualização em Técnicas Celulares e Moleculares Aplicadas ao Melhoramento Genético Vegetal** Passo Fundo Embrapa Trigo, 2003, p. 217-240.
2. SCHIFINO-WITTMANN, M. T., CARDOSO, M. B., BOFF, T., SIMIONI, C. Chromosome number and unreduced gametics in species of *Leucaena* Benth. (Leguminosae) - New contributions for the taxonomy, evolutionary studies and genetic breeding of the genus. In: **Cytogenetics Studies of Forest Trees and Shrubs – Review, Present Status and Outlook on the Future** ed.Zloven : Arbora, 2000, p. 181-190.

### Trabalhos completos publicados em anais de evento

1. BOFF, T., Espindula, L.F., Minella, E., Voss, M., Federizzi, L.C., Milach, S.C.K Bases Genéticas da Tolerância ao Alumínio Tóxico no Genótipo Toropi de Trigo In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal e XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife. **Anais do X Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal XII Congresso Latino Americano de Fisiologia Vegetal**. Campinas - SP: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2005.
2. Espindula, L.F., BOFF, T., Minella, E., Federizzi, L.C., Milach, S.C.K. Caracterização Molecular e Genética da Tolerância ao Alumínio Tóxico no Genótipo de Trigo Toropi In: X Congresso Brasileiro de Fisiologia vegetal XII Congresso e Latino Americano de Fisiologia Vegetal, 2005, Recife. **Anais do X Congresso Brasileiro de Fisiologia vegetal XII Congresso latino Americano de Fisiologia Vegetal**. Campinas-SP: Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2005.
3. Limberger, E., Nava, I.C., BOFF, T., Federizzi, L.C., Milach, S.C.K.; Delatorre, C. A. Análise de Ligação do Marcador SNP1117 com a Tolerância ao Alumínio em Aveia In: XXV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia,, 2005, Ponta Grossa - PR. **Anais da XXV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia - Resultados Experimentais**. , 2005. p.135.
4. Limberger, E., Milach,S.C.K., BOFF, T., Da Silva, P.R. Em busca de variações nucleotídicas associadas a tolerância ao alumínio em aveia. In: XXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, 2005, Pelotas. Trabalho premiado. **Anais da XXIV Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia**. Pelotas: UFPEL, 2004.p. 557.
5. BOFF, T., Yanaka, F. Y., Montardo, D. P., Dallagnol, M. Populações selecionadas de alfafa avaliadas para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. In: XVIII Reunião do Grupo Técnico em Forrageiras do Cone Sul – Zona Campos Dinâmica da Vegetação em Ecossistemas Pastoris.,

2000, Guarapuava, Paraná. **Anais da XVIII Reunião do Grupo Técnico em Forrageiras do Cone Sul – Zona Campos**. , 2000. p.198 – 200.

---

### Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

1. Guerra, D., Da Silva, P.R., BOFF, T., Milach, S.K., Federizzi, L.C. Perfil Molecular da Cultivar de Aveia Branca URS-GUAPA In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Gramado. **Anais do 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005.
2. BOFF, T., Espindula, L.F., Minella, E., Voss, M., Milach, S.C.K. Toropi e BH1146 Diferem Geneticamente quanto à Tolerância ao Alumínio em Trigo In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Gramado. **Anais do 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005.
3. Espindula, L.F., BOFF, T., Milach, S.C.K., Minella, E. Uso de um Marcador Molecular do Tipo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) no Estudo da Tolerância ao Alumínio em Trigo ( cv. Toropi) In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Gramado. **Anais 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2005.
4. Da Silva, P.R., Comparsi, F.P., BOFF, T., Brammer, S.P., Milach, S.C.K. FOURTY-TWO NEW RESISTANCE GENE ANALOGS IN HEXAPLOID WHEAT In: Plant & Animal Genomes XII Conference, 2004, San Diego. **Proceedings Plant & Animal Genome XII Conference**. , 2004. [http://www.intlpag.org/12/abstracts/P5c\\_PAG12\\_446.html](http://www.intlpag.org/12/abstracts/P5c_PAG12_446.html)
5. Espindula, L.F., BOFF, T., Minella, E., Federizzi, L.C., Milach, S.C.K. Identificação de Marcadores Moleculares do Tipo SNP's (Single Nucleotide Polymorphism) Associados à Tolerância ao Alumínio em Trigo In: XVI Salão de Iniciação Científica e XIII Feira Iniciação Científica, 2004, Porto Alegre. **Anais do XVI Salão de Iniciação Científica**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 387.
6. Espindula, L.F., BOFF, T., Minella, E., Milach, S.C.K. Identificação de Variações Nucleotídicas em Sequências Associadas à Tolerância ao Alumínio Tóxico em Trigo In: XV Salão de Iniciação Científica e XII Feira de Iniciação Científica, 2003, Porto Alegre. **Anais do XV Salão de Iniciação Científica**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. p.194.
7. BOFF, T., SILVA, L. C., SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Comportamento Meiótico em Espécies Diplóides e Tetraplóides de Leucaena: Evidências de Paleopoliploidia e aloploidia segmentar In: 48º Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia. **48º Congresso Nacional de Genética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2002.
8. SILVA, L. C., BOFF, T., SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Fertilidade do pólen em acessos e espécies de Leucaena Benth. In: XIII Salão de Iniciação, Promoção da Reitoria de Pesquisa, PROPESQ-UFRGS, 2002, Porto Alegre. **Anais do XIII Salão de Iniciação**. Porto Alegre: PROPESQ-UFRGS, 2002. p.113 - 114
9. BOFF, T., SILVA, L. C., SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Análise de meiose e estimativa da viabilidade do pólen de espécies de Leucaena Benth. In: 47º Congresso Nacional de Genética, 2001, Águas de Lindóia, SP. **Anais do 47º Congresso Nacional de Genética**. Ribeirão Preto - SP: SBG - Sociedade Brasileira de Genética, 2001.
10. CAVALCANTE, H. C., BOFF, T., DORNELLES, A. L. C., OLIVEIRA, J. R. P. Análise citogenética de oito genótipos de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). In: XV Congresso Brasileiro de Fruticultura, 1998, Poços de Caldas, MG. **Anais do XV Congresso Brasileiro de Fruticultura**. SBF - Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1998. p.52 - 52



11. SCHIFINO-WITTMANN, M. T., SIMIONI, C., CARDOSO, M. B., BOFF, T. Cytogenetics of a germplasm collection of the genus *Leucaena* Benth. In: IUFRO Cytogenetics Working Party Conference "Cytogenetics studies of forest trees and shrubs - review, present status and outlook on the future", 1998, Graz. **IUFRO Cytogenetics Working Party Conference**. , 1998. p.27.
12. BOFF, T., CARDOSO, M. B., SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação do número cromossômico em espécies de *Leucaena* Benth. (Leguminosae) In: X Salão de Iniciação Científica, PROPESQ-UFRGS, 1998, Porto Alegre. **Anais X Salão de Iniciação Científica, PROPESQ-UFRGS**. Porto Alegre: UFRGS - PROPESQ, 1998. p.87 - 87
13. CARDOSO, M. B., BOFF, T., SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Determinação do número cromossômico em uma coleção de germoplasma de espécies de *Leucaena* (Leguminosae). In: 44<sup>o</sup> Congresso Nacional de Genética, 1998, Águas de Lindóia. **Anais do 44<sup>o</sup> Congresso Nacional de Genética**. Ribeirão Preto: SBG - Sociedade Brasileira de Genética, 1998. p.163 -
14. BOFF, T., MARINHO, J., SILVA, J., ERDTMANN, B., HEUSER, V., FREITAS, T. O. R. Avaliação do efeito mutagênico do carvão sobre eritrócitos de roedores nativos. In: VIII Salão de Iniciação Científica, PROPESQ - UFRGS,, 1996, Porto Alegre. **Anais do VIII Salão de Iniciação Científica, PROPESQ - UFRGS**,. Porto Alegre: UFRGS, 1996. p.170.
15. HEUSER, V., BOFF, T., MARINHO, J., SILVA, J., ERDTMANN, B., FREITAS, T. O. R. O uso de roedores nativos para avaliação genotóxica de regiões carboníferas do Rio Grande do Sul (RS). In: Salão de Iniciação Científica de Ciências Biomédicas da PUCRS. Mostra de Metodologia do Ensino de Biologia: II Mostra de Embriologia Animal,, 1996, Porto Alegre, RS. **Anais do Salão de Iniciação Científica de Ciências Biomédicas da PUCRS**.. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica, 1996. p.22 - 23

---

### Orientações concluídas - Iniciação científica

1. Laize Fraga Espindula. **Identificação de Marcadores Moleculares do Tipo SNP'S (single Nucleotide Polymorphism) Associados à Tolerância ao Alumínio em Trigo**. 2004. Iniciação científica (Fauldade Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Laize Fraga Espindula. **Identificação de Variações Nucleotídicas em Sequências Associadas à Tolerância ao Alumínio Tóxico em Trigo**. 2003. Iniciação científica (Fauldade Agronomia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

---

### Estágios Iniciação Científica e Monitoria

1. Bolsista Propesq, Departamento de Zoologia, Laboratório de Entomologia (UFRGS), sob orientação do Professor Dr. Gilson R. P. Moreira, de 04/1996 a 07/1996.
2. Bolsista de Iniciação Científica (CNPq), Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética (UFRGS), sob orientação do Professor Dr. Thales O. R. Freitas, de 08/1996 a 04/1997.
3. Bolsista de Iniciação Científica (CNPq), Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometerologia, Laboratório de Citogenética (UFRGS), sob orientação da Professora Dra. Maria Teresa Schifino-Wittmann, de 05/1997 a 01/2000.
4. Bolsista pesquisadora da Fundação Pró-Sementes, no projeto "Variabilidade entre acessos de aveia preta identificada por marcadores moleculares", financiado pela FAPERGS. Abril a Julho/2002.

5. Monitora do curso: Atualização em melhoramento de plantas: Aplicação de marcadores moleculares. 2002 (Didática – 20hrs/aula).

6. Monitora da disciplina: AGR07003- Citogenética e Biotecnologia aplicadas ao melhoramento. 03 créditos, oferecida no Departamento de Plantas de Lavoura, Faculdade de Agronomia, UFRGS. (Didática – 20hrs/aula).

---