

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

IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS À TOLERÂNCIA AO
ALUMÍNIO EM AVEIA HEXAPLÓIDE

Adriano de Bernardi Schneider
Bacharel em Ciências Biológicas (PUCRS)

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

Porto Alegre (RS), Brasil.
Julho de 2012

ADRIANO DE BERNARDI SCHNEIDER
Bacharel em Ciências Biológicas - PUC/RS

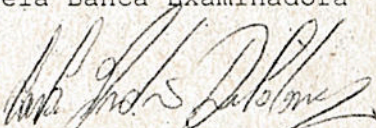
DISSERTAÇÃO

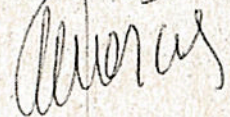
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

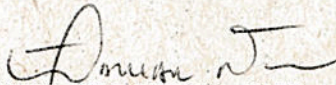
MESTRE EM FITOTECNIA

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

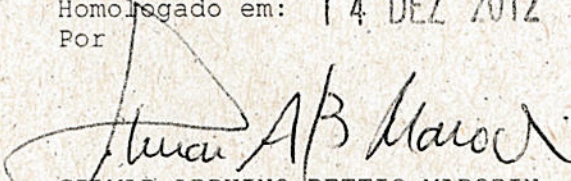
Aprovado em: 31.07.2012
Pela Banca Examinadora


CARLA ANDRÉA DELATORRE
Orientadora - PPG Fitotecnia


MARCELO GRAVINA DE MORAES
PPG Fitotecnia


ITAMAR CRISTIANO NAVA
Dep. Plantas de Lavoura

Homologado em: 14 DEZ 2012
Por


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

“Nós somos feitos de poeira de estrelas.”
Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Helena Beatriz de Bernardi Schneider e Luis Antonio Mascarello Schneider, pelo apoio incondicional durante todas as etapas de meu aprendizado.

A minha avó Maria Magaly Velloso Wetzel, por me ajudar a trilhar este caminho.

A minha amiga e orientadora Carla Andréa Delatorre, pelos conselhos e por me guiar desde o início em minha carreira científica.

Aos pesquisadores Emerson Limberger, Emir Islamovic, Eric Jackson, Itamar Cristiano Nava, Luiz Carlos Federizzi, Marcelo Teixeira Pacheco e Pedro Scheeren, os quais tornaram possível este trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, alunos de iniciação científica e aos laboratoristas Fábio Berndt e Robert Campbell, que me apoiaram na realização deste trabalho.

Ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, à Praire Oat Growers Association do Canadá e à CAPES, pelo apoio financeiro.

IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS À TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO EM AVEIA HEXAPLÓIDE¹

Autor: Adriano de Bernardi Schneider
Orientadora: Carla Andréa Delatorre

RESUMO

Solos ácidos causam redução do rendimento de plantas de lavoura, tanto pela redução da disponibilidade de nutrientes como pela presença de elementos tóxicos, como o alumínio (Al) na sua forma mais reativa. A combinação entre estes dois fatores tem consequências graves para a planta, tais como a redução do crescimento de raízes e da produção de biomassa. A aveia possui tolerância ao Al quando comparada com trigo e cevada, porém há considerável variação dentro da espécie. Os mecanismos de tolerância ao Al em aveia ainda não foram elucidados. Na família Poaceae, tanto mecanismos de exclusão quanto de detoxificação foram identificados, e vários genes associados à tolerância ao Al. Os objetivos deste trabalho foram: identificar QTLs associados à tolerância ao Al a partir da fenotipagem a campo e em hidroponia de uma população segregante e sequências com homologia a genes associados a tolerância ao Al em outras espécies. Foi gerado um mapa genético para a população oriunda do cruzamento de UFRGS17 e UFRGS930598, aonde foram encontrados três QTLs associados à tolerância ao Al em hidroponia, explicando 64% da variação fenotípica. Não foram identificados QTLs para tolerância ao Al a campo. Sequência homóloga ao gene *ALMT1* foi identificada, sendo predita a existência de cinco íntrons e seis exons e uma proteína com seis domínios transmembrana no alelo identificado em UFRGS 17. Em UFRGS 930598, o primeiro exon e parte do primeiro intron não foram obtidos. Também foi identificado parcialmente uma sequência homóloga ao gene *STOP1* com 89% de similaridade a sequência de *Brachypodium distachyon*.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (87 p.) Julho, 2012.

IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENES FOR ALUMINUM TOLERANCE IN HEXAPLOID OAT¹

Author: Adriano de Bernardi Schneider
Adviser: Carla Andréa Delatorre

ABSTRACT

Acid soils reduce crop yield, not only by affecting nutrient availability, but also by increasing the presence of toxic element forms, such as aluminum (Al), in its most reactive form. The combination of these two factors has negative consequences to the plant, for example reduction in root growth and biomass production. Oats are considered Al tolerant if compared to wheat and barley, but there is a large variation inside the species. In poaceae, mechanisms related to exclusion as well as to detoxification have been identified and several genes have been associated to Al tolerance. This study aimed to identify QTLs associated to Al tolerance using field and hydroponic phenotyping of a recombinant inbred population, and identify sequences with homology to genes associated to Al tolerance in other species. Three QTLs associated to hydroponic Al tolerance were identified in the map generated to UFRGS 17 x UFRGS 930598 population, explaining 64% of the phenotypic variation. A sequence similar to the *ALMT1* gene was identified. The UFRGS 17 allele was predicted to contain five introns and six exons and to code a protein with six transmembrane domains. In UFRGS 930598, the first predicted exon and part of the first intron were not cloned. A sequence similar to the *STOP1* gene was partially identified with 89 % of homology to the *Brachypodium distachyon* homologous sequence.

¹Master of Science dissertation in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (87 p.) July, 2012.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 A cultura da aveia e sua produção.....	3
2.2 Interações no solo: o Alumínio	6
2.3 Alumínio: do solo à planta	8
2.3.1 Alumínio: da planta à mesa.....	12
2.4 Genes envolvidos na tolerância ao alumínio em plantas.....	13
2.5 Genética da tolerância ao Al em aveia	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Material vegetal	23
3.2 Mapeamento e identificação de QTLs	23
3.2.1 Fenotipagem.....	23
3.2.2 Cariotipagem	26
3.2.3 Genotipagem	26
3.2.4 Mapeamento.....	29
3.2.5 Identificação de QTLs associados à tolerância ao alumínio	30
3.3 Análise de genes candidatos	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 Mapeamento e identificação de QTL para tolerância ao alumínio.....	34
4.1.1 Análise fenotípica	34
4.1.2 Mapeamento genético	41
4.1.3 Análise de QTL	46
4.2 Identificação de genes	52
4.2.1 Os genes <i>ALMT1</i> e <i>STOP1</i> em aveia	53
4.2.2 Árvore filogenética dos genes <i>ALMT1</i> e <i>STOP1</i>	60
4.2.3 Estrutura e sequência proteica.....	63
5 CONCLUSÕES.....	68
6 PERSPECTIVAS	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
8 APENDICE.....	78
9 VITA.....	87

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Genes responsáveis pela tolerância ao alumínio em diversas espécies.....	14
2. Parentais UFRGS17 e UFRGS 930598 utilizados no estudo de tolerância ao alumínio e suas genealogias.....	23
3. Iniciadores utilizados para prospecção de genes de tolerância ao alumínio em aveia hexaplóide.....	32
4. Segregação para o caráter tolerância ao alumínio a campo na população UFRGS 17 x UFRGS 930598 e teste qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates.....	36
5. Correlação de Pearson para o escore a campo em suas três avaliações, recrescimento de raiz em hidroponia e emergência.....	38
6. Distribuição dos marcadores e tamanho dos grupos de ligação do mapa da população UFRGS 17 x UFRGS 930598.....	45
7. QTLs identificados para tolerância ao alumínio na população UFRGS 17 x UFRGS 930598.....	48
8. Marcadores na região dos QTLs e o melhor resultado obtido via BLAST no NCBI.....	50
9. Comparação de sequências de cDNA dos genes de tolerância ao alumínio e o banco de ESTs de aveia.....	52
10. Estrutura do gene <i>ALMT1</i> em <i>Avena sativa</i> na cultivar UFRGS 17..	55
11. Comparação de sequências de proteína do gene <i>ALMT1</i> de outras espécies com a sequência predita do genótipo UFRGS 17 de aveia.....	61
12. Comparação de sequências de cDNA do gene <i>STOP1</i> de outras espécies com a sequência parcial predita do genótipo UFRGS 17 de aveia.....	61
13. Regiões identificadas como hélices transmembranas da proteína predita de <i>ALMT1</i> no genótipo UFRGS 17 de aveia.....	65

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Produção de aveia no Brasil nos últimos 51 anos.....	5
2. Atividade relativa dos íons de Al em diferentes pH's.....	7
3. Plano esquemático da disposição dos genótipos no experimento de tolerância ao alumínio a campo.....	25
4. Distribuição dos escores de campo para tolerância ao Al na população F6 do cruzamento UFRGS17 e UFRGS 930598.....	35
5. Distribuição do recrescimento da raiz primária de UFRGS 17, UFRGS 930598 e população F6 segregante.....	37
6. Regressão e dispersão dos dados da avaliação da tolerância ao Al a campo da população UFRGS 17 x UFRGS 930598 em comparação com a avaliação do recrescimento da raiz primária em hidroponia.....	38
7. Regressão e dispersão dos dados de escore de Al a campo da população UFRGS 17 x UFRGS 930598 de acordo com nível de emergência.....	40
8. Mapa genético da população UFRGS 17 x UFRGS 930598.....	42
9. Cromossomos 7C, 13A e 19A de aveia e QTLs para tolerância ao alumínio baseados em avaliação do recrescimento de raiz em hidroponia.....	49
10. Comparação da estrutura predita do gene ALMT1 na cultivar UFRGS 17 e sequência parcial de UFRGS 930598 de aveia.....	56
11. Alinhamento da sequência do gene ALMT1 de trigo (BAD10882.1) com as sequências preditas para os genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598.....	57
12. Alinhamento entre as sequências nucleotídicas do gene STOP1 de UFRGS 930598 e UFRGS 17.....	59
13. Árvore filogenética do gene ALMT1 em gramíneas através da análise comparativa de sequência proteica.....	62
14. Árvore filogenética do gene STOP1 baseada nos melhores escores de BLAST com a sequência parcial de aveia.....	63
15. Sequência predita da proteína ALMT1 em UFRGS 17 de acordo com hidrofobicidade em escala de azul (hidrofílicas) a vermelho (hidrofóbicas).....	64
16. Estrutura secundária predita e localização da proteína codificada pelo gene ALMT1 do genótipo UFRGS17 de aveia pelo aplicativo Phyre 2.....	65
17. Estrutura terciária predita pelo aplicativo Phyre2 da proteína ALMT1 em aveia.....	66

1 INTRODUÇÃO

Os solos ácidos são responsáveis pela diminuição do crescimento das plantas e, no caso de espécies cultivadas, do rendimento final dos produtos de interesse pelo homem. Uma das razões da redução de produção foliar e de grãos é a presença do alumínio (Al) nas suas formas tóxicas, em especial do Al trivalente (Al^{3+}), o qual age como quelante de elementos essenciais para a planta como o fósforo, além de competir com o cálcio pelos mesmos sítios de ligação, promovendo redução de crescimento, estresse oxidativo e morte celular em raízes de genótipos sensíveis.

São considerados solos ácidos aqueles que apresentam pH inferior a 5,5, sendo que 30% do solo terrestre que não está sob gelo, encontra-se nesta zona, totalizando cerca de 3950 milhões de hectares. No Brasil, 70% do solo apresenta acidez.

O Al em pH superior a 5,5 apresenta-se em formas menos tóxicas às plantas, pois está ligado a pelo menos um radical hidroxila. A adição de carbonato de cálcio (CaCO_3), através da calagem, é a solução mais utilizada para a correção do pH e, conseqüente, detoxificação do solo. Contudo, a atual utilização no Brasil do sistema de semeadura direta como forma de plantio, no qual não há o revolvimento do solo (o que não permite que a calagem reduza o pH do solo uniformemente), propicia que o nível de acidez

permaneça maior em camadas mais profundas, gerando um gradiente de pH que reduzirá a zona na qual a raiz terá um crescimento ótimo no solo. Este fato, associado a ocorrência de seca, por exemplo, poderá fazer com que as plantas que não possuem acesso a camadas mais profundas do solo, por não tolerarem os níveis de Al^{3+} , apresentem estresse hídrico.

Os mecanismos de tolerância ao Al em plantas são divididos em mecanismos de exclusão e de detoxificação. Os mecanismos mais comuns relacionam-se a secreção de ácidos orgânicos na rizosfera, porém outros mecanismos relacionados à redução do estresse oxidativo, manutenção da estrutura da parede celular, membrana e citoesqueleto ou aprisionamento interno dos íons também têm sido relatados. Desta forma, estudos acerca da resposta ao estresse, no âmbito de alterações estruturais, produção de substâncias para a detoxificação, expressão gênica e do estresse oxidativo são de grande necessidade para um maior entendimento da tolerância ou sensibilidade ao alumínio tóxico.

Este trabalho teve como objetivos principais identificar em aveia hexaplóide (*Avena sativa* L.) lócos associados à tolerância ao Al, bem como sequências com homologia a genes associados à tolerância em outras espécies.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura da aveia e sua produção

O gênero *Avena* é pertencente à família Poaceae e possui cerca de 70 espécies, das quais poucas são cultivadas. As principais espécies cultivadas no mundo são *Avena sativa* e *Avena byzantina*, popularmente chamadas de aveia branca e vermelha (ou amarela), respectivamente. A aveia branca é um cereal de inverno e primavera, autógama, com baixa taxa de fecundação cruzada, a qual possui origem na região do Oriente Médio, tendo sido domesticada no norte da Europa (Suttie & Reynolds, 2004).

O gênero *Avena sp.* possui desde espécies com genoma diplóide, como *Avena strigosa*, até espécies com genoma com maior redundância, como a espécie cultivada *Avena sativa*. Esta possui genoma hexaplóide ($2n = 6x = 42$), sendo o mesmo considerado o maior genoma entre os cereais cultivados. Considera-se que a variabilidade das espécies cultivadas é grande, quando comparada com outras espécies, isto devido ao tamanho do genoma (Ladizinsky, 1970). O genoma de aveia branca é alohexaplóide, constituído a partir de três genomas: AACCCDD, originário de três ancestrais diplóides (Thomas, 1992).

A utilização da aveia, hoje, concentra-se na produção de grãos para consumo humano ou forragem e silagem para alimentação animal (Suttie &

Reynolds, 2004). A aveia possui em sua composição todas as vitaminas do complexo B, vitamina E e nove minerais: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn. Quando comparada aos demais cereais, possui a maior concentração de proteínas (cerca de 20 %), possuindo também fibras solúveis (cerca de 6%). As fibras da aveia possuem propriedades únicas que contribuem para a redução do colesterol de baixa densidade (LDL) e manutenção do de alta densidade (HDL), chegando a reduzir entre 10 a 15 % os níveis em indivíduos hipercolesterolêmicos, gerando redução do risco de doenças cardíacas. As fibras ainda atuam na regulação dos níveis de glicose. Estudos indicam que o consumo diário de aveia também pode atuar contra o câncer de cólon. O cereal ainda contém compostos secundários, tais como tocoferol e avenantramidas, os quais possuem propriedades antioxidantes (Burnette *et al.*, 1992; Peterson, 1992).

A aveia branca é cultivada em diversas regiões do mundo, em áreas de clima temperado e úmido, sendo produzida principalmente pelos Estados Unidos da América, Canadá e Rússia (FAOStat, 2012) e, na América do Sul principalmente na Argentina, Uruguai e no Brasil, sendo a região sul do Brasil a maior produtora. O banco de germoplasma brasileiro teve origem nos programas de melhoramento norte americanos e australianos, tendo seu posterior melhoramento sido feito nos programas nacionais (Federizzi, 2002).

A produção de grãos de aveia no Brasil tem tido um acréscimo considerável nas últimas décadas (FIGURA 1), contrariamente à tendência de queda na produção mundial. Este aumento de produção tem origem em diversos fatores como a consolidação do sistema de plantio direto,

disponibilidade de cultivares adaptados com elevado rendimento de grãos, industrialização dos grãos, popularização dos benefícios à saúde humana associados ao consumo de aveia e ao uso de aveia branca para alimentação equina.

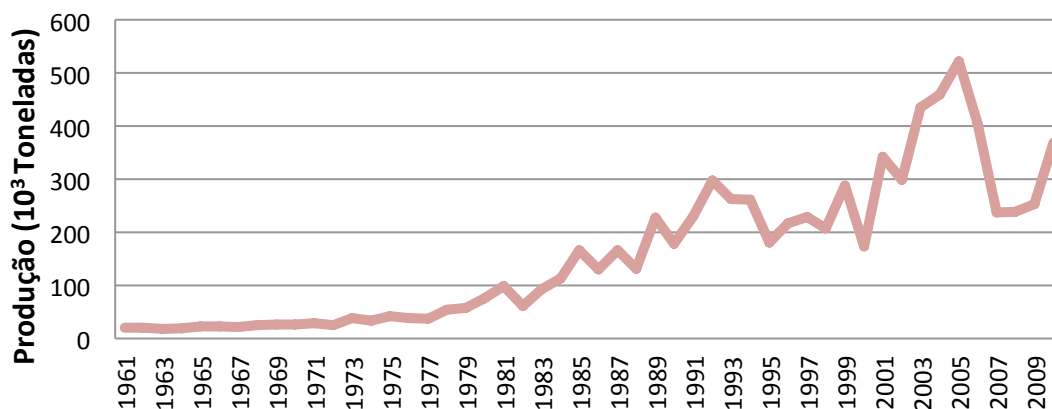


FIGURA 1. Produção de aveia no Brasil nos últimos 51 anos. (FAOStat, 2012)

No ano de 1979, a produção de aveia no Brasil foi de cerca de 50 mil toneladas. Em 1995 a produção subiu para cerca de 200 mil toneladas em cerca de 150 mil hectares. Já em 2005, a área de cultivo no Brasil era de aproximadamente 360 mil hectares, havendo uma produção de cerca de 500 mil toneladas (FAOStat, 2012). Após este aumento considerável de produção nos últimos anos, houve um decréscimo em área cultivada e consequente produção a partir de 2006, relacionado à competição, em termos financeiros, da cultura da aveia com a do trigo, a qual fez com que o produtor rural desse preferência para cultura de maior retorno financeiro. No entanto, esta queda durou pouco tempo e, atualmente, a produção de aveia no Brasil encontra-se em um patamar elevado quando comparada com a de outros países.

A produção nacional de aveia possui as maiores áreas plantadas ao sul do país, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, apesar desta ser a região com maior produção dentre os países do MERCOSUL, os rendimentos de grãos ainda podem ser superiores aos atuais. Este incremento pode vir a partir da solução de diversos problemas relacionados à pressão de doenças como a ferrugem, inconstância climática, e condições edáficas, como solos ácidos com alto nível de alumínio (Al).

2.2 Interações no solo: o Alumínio

Solos ácidos são limitantes para produção de plantas de lavoura, sendo que os mesmos correspondem à cerca de metade dos solos agricultáveis no mundo (Kochian *et al.*, 2005). Solos ácidos estão presentes principalmente em regiões de clima tropical e subtropical úmidos, sendo caracterizados por possuírem excesso de H^+ , Mn^{2+} e Al^{3+} e deficiências de Ca^{2+} , Mg^{2+} e PO_4^{3-} (Panda & Matsumoto, 2007).

O Al é o metal mais abundante na crosta terrestre, representando 8,1% da mesma, como elemento químico é o terceiro mais abundante. Se apresenta em diversas formas não fitotóxicas, como alumínio silicatos e precipitados (Panda *et al.*, 2009), no entanto, quando presente na forma Al^{3+} apresenta alto nível de fitotoxicidade às plantas. A acidez do solo disponibiliza o Al na forma trivalente, como pode ser observado na figura 2, no qual pHs entre 3,5 e 5 apresentam atividade relativa elevada de Al^{3+} tornando regiões com Al e pH nesta faixa inaptas ao plantio não somente devido ao baixo pH, mas também à atividade fitotóxica deste íon. A atividade relativa de outras formas aumenta de acordo com o aumento do pH, com consequente redução do Al^{3+} , estas apresentam baixa toxidez à planta, e por

isto uma das soluções para evitar o estresse causado por Al é o aumento do pH através da calagem. (Kinraide, 1991; Ma *et al.*, 2001; Rossiello & Netto, 2006).

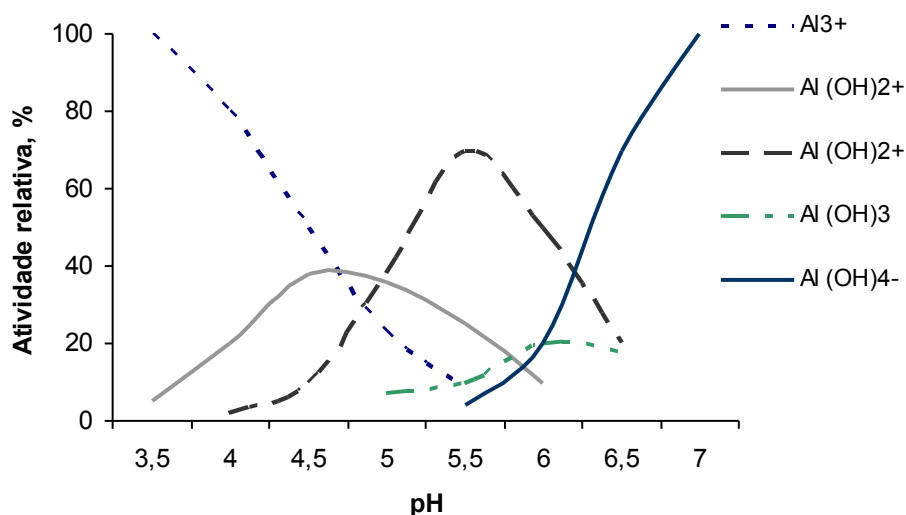


FIGURA 2 . Atividade relativa dos íons de Al em diferentes pH's. (Rossiello & Netto, 2006)

Cerca de 70 % dos solos brasileiros são considerados ácidos. Diversas regiões não permitem o cultivo de espécies sensíveis ao Al, como, por exemplo, a cevada, cereal considerado sensível a este íon. A presença de Al em concentrações micromolares, porém em nível suficientemente tóxico às plantas é, provavelmente, o principal fator limitante ao crescimento vegetal nestes solos (Kamprath & Foy, 1985; Uexküll & Mutert, 1995).

A presença do Al no solo não necessariamente acarreta na fitotoxicidade do solo. Como foi dito anteriormente, a associação do baixo pH do solo com a presença do Al causa este problema. Contudo, o Al tem a capacidade de formar diversos complexos no solo com ligantes tanto orgânicos como inorgânicos, como fosfatos, sulfatos, fluoretos, ácidos orgânicos, proteínas e lipídios. Estas ligações reduzem a toxidez do solo,

porém, ao mesmo tempo em que diminuem a quantidade de Al^{3+} livre, geram empobrecimento do solo por reduzir o acesso das plantas aos nutrientes (Delhaize & Ryan, 1995; Panda & Matsumoto, 2007).

2.3 Alumínio: do solo à planta

A presença do Al no solo, somado a níveis elevados de acidez, promove à rizosfera uma região fitotóxica, a qual atua diretamente no sistema radicular das plantas (Ryan *et al.*, 1993). Espera-se que os principais mecanismos de tolerância ao Al estejam localizados nesta região, mais especificamente no ápice da raiz, que é a região mais sensível por não possuir tecido maduro e uma fina camada de parede celular (Kochian *et al.*, 2005). No entanto, estudos demonstram que em algumas plantas, o Al é translocado para parte aérea, aonde é isolado em vacúolos e até cloroplastos não causando dano aos aparatos celulares (Andrade *et al.*, 2011).

A forma exata de como o Al causa toxidez na planta não é conhecida. Supõem-se que a toxidez de Al seja causada através de duas maneiras: a primeira, pela toxidez *per se*, ou seja, pela reatividade do Al^{3+} , o que causa danos intra e extracelulares na planta, podendo levar a desorganização celular e até a morte. A segunda maneira é através da indisponibilização de nutrientes essenciais como o fósforo, através da redução de acesso aos nutrientes no solo pela complexação com o Al.

O principal alvo de ação do Al é a raiz, sendo o principal sintoma a inibição do crescimento radicular com simultânea indução de síntese de β -1,3-glicana (calose), a qual é uma resposta inespecífica, com o objetivo de bloquear o contínuo dano à região atingida (Barcelo & Poschenrieder, 2002).

Como o Al é muito reativo, existem vários compartimentos e estruturas celulares que poderiam ser alvos de danos provocados pelo mesmo. Entre os principais inclui-se a parede celular, a superfície da membrana plasmática, o citoesqueleto e o núcleo (Kochian *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 1993).

Várias são as consequências destes danos em nível estrutural. Foi observado que a presença do Al induz a produção de fosfolipases, as quais agem sobre a membrana plasmática, tornando-a mais permeável ao Al (Zhao *et al.*, 2011). Outros efeitos também ocorrem, como a interferência no transporte de cálcio, devido ao deslocamento do mesmo pelo Al, prejudicando a formação do citoesqueleto, bem como causando desarranjo das pectinas da parede celular (Panda & Matsumoto, 2007). Este desarranjo estrutural, por sua vez, pode alterar a atividade meiótica e mitótica, assim como promover esterilidade do pólen. Estudos em arroz sugerem que o Al possui efeitos carcinogênicos a planta, tendo a exposição do mesmo causado diversas aberrações cromossômicas e redução na quantidade de DNA nuclear (Mohanty *et al.*, 2004).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio e superóxido, também é induzida pelo Al. Estudos indicam que a inibição do crescimento da raiz é provavelmente causada por efeitos advindos da produção de EROs, os quais são: a peroxidação de lipídeos, dano ao DNA, interferência na mitose, e consequente morte celular (Meriga *et al.*, 2004; Mohanty *et al.*, 2004; Simonovicová *et al.*, 2004; Tamás *et al.*, 2005).

A tolerância ao estresse por Al é regulada por diversos genes, dependendo da espécie, sendo devida a mecanismos apoplásticos e/ou simplásticos. Os apoplásticos correspondem a permeabilidade seletiva das membranas, indução de uma barreira de pH na rizosfera e a liberação de compostos quelantes (Kochian *et al.*, 2005). E os simplásticos, através de ácidos orgânicos, proteínas, e outros ligantes que internamente reduzem a toxidez através da complexação com o Al, da acumulação do íon no vacúolo e da ativação de enzimas envolvidas na redução do estresse oxidativo (Kochian *et al.*, 2004).

Estudos em plantas hiperacumuladoras de Al, como a espécie nativa do cerrado *Qualea grandiflora* Mart., demonstram que plantas podem acumular Al na parte aérea, mais especificamente em regiões como vacúolo e cloroplasto, sendo a razão do acúmulo no cloroplasto ainda não esclarecida (Andrade *et al.*, 2011). No entanto, a maioria dos estudos têm focado nas raízes e suas respostas para isolar o Al na raiz ou mesmo evitar a entrada dele no tecido.

A produção de calose pelas plantas é dependente da presença de cálcio. Sugere-se que a presença do Al na superfície da membrana possa, por deslocamento, aumentar a quantidade de cálcio na célula, estimulando a síntese de calose. Esta síntese, rapidamente ativada pela exposição ao Al, é considerada uma resposta não específica, relacionada geralmente ao dano. No entanto, pode gerar o bloqueio de vasos ou plasmodesmos, o que limita o transporte intra e extracelular, reduzindo a entrada do Al pois não há mais transporte. Contudo, esta redução de entrada do alumínio acaba tendo por

consequência morte da célula pois a mesma fica isolada (Sivaguru *et al.*, 2000).

Respostas inespecíficas a estresse também podem ser geradas a partir do metabolismo oxidativo através de EROs. EROs são continuamente produzidas nos cloroplastos, mitocôndria e peroxissomos, sendo sua produção e remoção altamente controladas (Apel & Hirt, 2004). Entretanto, no caso do estresse por Al, a produção destes também pode promover a tolerância através da produção de lignina, a qual é polimerizada via peróxido de hidrogênio. A lignina por sua vez protege a célula do Al, por ligar-se a este, reduzindo o contato com a membrana plasmática (Xue *et al.*, 2008).

As respostas inespecíficas ao estresse demonstram a tentativa da planta em manter a homeostase da célula a qualquer custo. Por outro lado, genes e rotas metabólicas específicas para a tolerância ao Al têm sido propostos na última década. Pode ser visto na literatura duas estratégias específicas, através das quais a planta tolera o estresse. Uma estratégia é a produção de proteínas transportadoras que se ligam ao Al, reduzindo sua concentração próximo a membrana, sendo o íon internamente translocado para o vacúolo ou outro local de armazenamento e detoxificação. Convém salientar que devido ao pH citoplasmático ser próximo da neutralidade, a reatividade do Al é reduzida quando este é internalizado. Outra estratégia observada é a secreção de ácidos orgânicos pelas raízes e produção de mucilagem, as quais tentam deter o Al antes do mesmo atingir o citoplasma. A secreção de ácidos orgânicos relacionada ao estresse com Al é observada em várias espécies, que aparentemente apresentam um ou dois

mecanismos distintos, através da secreção de citrato e/ou malato (Liu *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2001). A produção de mucilagem, por sua vez, gera uma camada protetora na raiz, e é induzida na presença de Al, o que indica que a planta tenta produzir este composto para evitar o contato do ápice radical com a toxidez do solo (Watanabe *et al.*, 2008).

2.3.1 Alumínio: da planta à mesa

Estudos na área da nutrição e medicina vem sendo realizados desde a década de 70 sobre os efeitos do Al sobre animais, sendo analisados os níveis de absorção dos mesmos. Estudos da década de 70 consideravam que o nível de Al absorvido pelas pessoas não era prejudicial, e que não havia problema deste íon nas quantidades em que a sociedade estava sendo exposta (Sorenson *et al.*, 1974). A opinião desde então veio mudando acerca do efeito e dos níveis que o Al tem sido consumido. Atualmente, estudos indicam que o Al tem sido consumido em doses superiores àquelas no passado, sendo estes níveis superiores aos considerados seguros para consumo humano, inclusive na formula de alimentos infantis (Burrell & Exley, 2010; Exley, 2011; Ogimoto *et al.*, 2012).

O Al pode estar relacionado com diversas doenças de cunho neurodegenerativo, sendo o efeito em geral visualizado em pessoas mais velhas, as quais acumularam ao longo dos anos o metal no cérebro. O acúmulo deste, acaba colaborando com o aparecimento de graves problemas de saúde, como a doença de Alzheimer, a doença de Guam, Parkinson, epilepsia, disfunção de aprendizagem e memória, dentre outros (Cui *et al.*, 2012; Zatta *et al.*, 2002). Estudos em diversas espécies têm sido conduzidos com o intuito de entender melhor estas doenças e também o

efeito do Al no cérebro humano (Exley, 1999). Neste ano, foram relatados estudos em ratos, onde a ingestão de água contaminada com o metal afetaram a aprendizagem e a memória através de impacto na transdução de sinais, alterando as vias metabólicas e reduzindo o peso de cérebros, os potenciais de ação da região do hipocampo, assim como níveis de expressão de RNA e proteínas no cérebro (Cui *et al.*, 2012). Desta forma, torna-se importante identificar os mecanismos de tolerância ao Al em plantas, especialmente os que não permitam sua translocação para órgãos comestíveis.

2.4 Genes envolvidos na tolerância ao alumínio em plantas

A tolerância ao Al tem sido estudada em diversas espécies, desde hiperacumuladoras deste metal a espécies que possuem mecanismos de exclusão. Estes estudos têm sido realizados através de análises fisiológicas, e nas últimas duas décadas, ao nível molecular, sendo que vários genes foram identificados (Tabela 1). Além da identificação de genes, o estudo do transcriptoma tem servido como uma ferramenta para diferenciação de genótipos, podendo gerar marcadores moleculares que poderão servir como auxiliares na seleção de plantas e também na identificação de mecanismos de tolerância.

TABELA 1. Genes responsáveis pela tolerância ao alumínio em diversas espécies.

Gene	Função	Organismo
<i>ALMT1</i>	Transportador de malato	<i>Triticum aestivum</i>
<i>MATE1</i>	Transportador de citrato	<i>Zea mays</i> e <i>Secale cereale</i>
<i>MATE2</i>	Transportador de citrato	<i>Zea mays</i> e <i>Secale cereale</i>
<i>ALS1</i>	Transportador ABC	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>ALS3</i>	Transportador ABC	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>STAR1</i>	Transportador ABC	<i>Oryza sativa</i>
<i>STAR2</i>	Transportador ABC	<i>Oryza sativa</i>
<i>STOP1</i>	Fator de transcrição	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>ART1</i>	Fator de transcrição	<i>Oryza sativa</i>
<i>Nrat1</i>	Transportador de alumínio	<i>Oryza sativa</i>
<i>PTrx</i>	Produtor de tioredoxina	<i>Phalaris coerulescens</i>
<i>PLDys</i>	Fosfolipase Dys	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Em trigo, a genética da tolerância ao Al é atribuída a poucos genes de efeito maior. Duas linhagens isogênicas, sensível e tolerante ao Al, diferiram em um único loco dominante, denominado *Alt1* (Delhaize *et al.*, 1993). O loco *Alt1* em trigo foi posteriormente associado a um gene que codifica um transportador de malato, *ALMT1* (*Aluminum Malate Transporter 1*), localizado na membrana plasmática, e responsável por transportar malato para o apoplasto, aonde o malato atua como agente quelante do Al, detoxificando a rizosfera. Este gene foi introduzido através de técnicas de transgenia em linhagens de cevada, arroz e tabaco, propiciando maior exsudação de malato e, conseqüentemente, maior tolerância ao Al. Este fato, somado ao gene co-segregar com o loco *Alt1*, levou a crer que o mesmo seria o gene *ALMT1* ou seriam dois genes ligados (Sasaki *et al.*, 2004).

Dentre os cereais, cevada é uma das espécies que possui menor tolerância ao Al, sendo o plantio da mesma restrito a áreas aonde o mesmo está indisponível. Com o intuito de aumentar o nível de tolerância desta

espécie, este gene foi transferido de trigo para cevada, o que resultou em um aumento significativo na tolerância da mesma (Delhaize *et al.*, 2004). Em *arabidopsis*, este mesmo gene foi identificado como essencial, no entanto, não considerado o principal gene para tolerância ao Al na espécie, o que indica que possivelmente exista mais de um mecanismo de tolerância nesta espécie (Hoekenga *et al.*, 2006).

Análises transcricionais foram realizadas em linhagens isogênicas de trigo contrastando na tolerância ao Al sob estresse de Al. Como resultado, a expressão do gene *ALMT1* mostrou-se superior na linhagem tolerante, o que comprova que a diferença no nível de expressão está relacionada diretamente ao nível de tolerância. No entanto, não somente a expressão deste gene foi alterada entre as linhagens, mas também a de outros genes, o que indica que a tolerância é resultante da ação de mais genes, tendo este como principal (Guo *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2004). O gene *ALMT1* também foi associado ao loco *Alt4* em centeio, considerado dentre os cereais, o mais tolerante ao metal (Collins *et al.*, 2008). Estes estudos com o gene *ALMT1* sugerem que o mecanismo de tolerância ao Al através da exsudação de malato, é um dos principais nos cereais.

Não somente a exsudação de malato, mas a de citrato, também pode estar envolvida na detoxificação do Al, e conseqüente tolerância. Em milho, a comparação do nível de exsudação dos ácidos orgânicos, malato e citrato, entre cultivares sensíveis e tolerantes indicou a produção de malato sendo constitutiva, ou seja, não induzida pela presença de Al^{3+} . No entanto, a secreção de citrato foi induzível pela presença de Al^{3+} . A secreção de citrato é considerada como o principal mecanismo de tolerância em milho, porém, a

tolerância em milho é considerada um caráter complexo, regulado por vários genes (Pineros *et al.*, 2002; Pineros *et al.*, 2005).

Em 2007, genes da família de extrusão de compostos tóxicos e múltiplas drogas (*MATE - Multidrug And Toxic compound Extrusion*) foram identificados como responsáveis pela secreção de citrato e pela tolerância ao Al em sorgo (Magalhaes *et al.*, 2007). Dois genes membros distintos da família MATE foram identificados como potencialmente responsáveis por dois QTLs de grande importância em milho. O gene *ZmMATE1* é um transportador de citrato e *ZmMATE2* foi citado como um gene que pode estar envolvido em um novo mecanismo de tolerância (Maron *et al.*, 2010). Em centeio, dois genes da mesma família foram identificados, sendo um envolvido no efluxo de citrato no xilema para translocação de ferro das raízes para a parte aérea e o outro responsável pela tolerância ao Al. Isto indica que, possivelmente, o centeio possui dois mecanismos de tolerância ao Al (Yokosho *et al.*, 2010). Em arábida foi identificado o gene *AtMATE*, o qual, assim como os descritos em outras espécies, é responsável pela tolerância ao Al através da exsudação de citrato nas raízes. Os genes *AtALMT1* e *AtMATE* são independente, pois mutações em um deles não afeta a tolerância, em arábida, sendo que o gene *AtALMT1* confere maior tolerância do que o gene *AtMATE* (Liu *et al.*, 2009).

Outros genes, não relacionados à exsudação de ácidos orgânicos, também foram identificados envolvidos na tolerância ao Al. A partir da análise de mutantes em arábida, foram descobertos dois mutantes, *als1-1* e *als3-1*, sensíveis a Al. Estes mutantes possuíam alteração nos genes *ALS1 (aluminum sensitivity 1)* e *ALS3 (aluminum sensitivity 3)*, tornando-os

silenciados. O gene *ALS1* (At5g39040) codifica um transportador tipo ABC (*ATP-Binding Cassette*). A localização da expressão é primariamente no ápice da raiz e no sistema vascular de toda planta. Análises intracelulares de expressão indicaram que estas proteínas estão localizadas na membrana vacuolar de células da raiz. Estes resultados indicam que o gene *ALS1* pode ser importante para o movimento intracelular, provavelmente sendo responsável por movimentar o Al quelado, estando relacionado ao mecanismo de detoxificação através do sequestro do Al para o vacúolo (Larsen *et al.*, 2007).

O gene *ALS3* foi também identificado como um transportador ABC, porém com funções distintas do gene *ALS1*. Análises de expressão revelaram que o mesmo é expresso em todos os órgãos examinados e que a sua expressão é aumentada em raízes de acordo com o nível de Al ao qual as raízes são expostas. A expressão do mesmo se dá primariamente em hidatódios da folha e no floema da planta. Análises de imunolocalização indicam que a proteína se acumula na membrana plasmática. Aparentemente, a proteína deste gene é requerida para a tolerância ao Al e sua função pode ser redistribuir o Al acumulado, longe de tecidos sensíveis, com o objetivo de proteger o crescimento das raízes dos efeitos tóxicos do Al (Larsen *et al.*, 2005).

Outros transportadores ABC também foram encontrados em arroz, como é o caso dos genes *STAR1* (*Sensitive To Al Rhizotoxicity 1*) e *STAR2* (*Sensitive To Al Rhizotoxicity 2*), que em conjunto formam um complexo proteico similar a um transportador ABC, sendo associados à tolerância ao Al. O gene *STAR1* codifica um domínio de ligação nucleotídica, enquanto

STAR2 codifica um domínio transmembrana de um transportador ABC. A perda de função de qualquer um dos dois genes resulta no aumento da sensibilidade a toxicidade por Al. Ambos os genes foram expressos principalmente em raízes, e induzidos especificamente na presença de Al³⁺. A expressão destes foi avaliada em células da epiderme de cebola, protoplasto de arroz e leveduras, sendo observado que ambos os genes interagem, formando um complexo que se localiza na membrana do complexo de golgi de todas as células da raiz, exceto na camada da epiderme da zona madura. Sua expressão gera o transporte específico de UDP-glicose, e esta pode ser utilizada para modificar a parede celular, mascarando os sítios de ligação do Al e conseqüentemente aumentando a tolerância ao Al em arroz (Huang *et al.*, 2009).

O gene *STAR2* do arroz é homólogo ao gene *ALS3* em arábida, indicando semelhança entre os dois mecanismos de tolerância ao Al nestas espécies. Em 2010, foi identificado um homólogo do gene *STAR1* de arroz em arábida, sendo que sua mutação resultou no aumento de sensibilidade em raízes de arábida ao metal. Sugere-se que este ortólogo atue de forma semelhante em arábida, interagindo com o gene *ALS3* (Huang *et al.*, 2010).

O fator de transcrição *STOP1* (*Sensitive To Proton rhizotoxicity 1*), que codifica uma proteína Cisteína-2-Histidina-2 tipo dedo de zinco, foi identificado em arábida através de um mutante sensível ao Al e à acidez. Foi observado que este gene possui relação com a regulação do gene *AtALMT1*, visto que a ausência do mesmo resulta no decréscimo de exsudação de malato e diminuição da expressão de *ALMT1*. Porém, *ALMT1*

não possui relação com a tolerância a acidez, o que leva a crer que *STOP1* também regula outros genes (Iuchi *et al.*, 2007).

A partir de uma análise comparativa, pode-se observar que outras espécies como arroz e milho possuem homólogos ao *STOP1* que contém a sequência de aminoácidos conservada no domínio dedo de zinco. Em arroz, foi observado um grande número de genes homólogos ao *STOP1*, o que pode explicar a maior tolerância à acidez em arroz do que em arábida (Iuchi *et al.*, 2008). Em arábida, linhagens com o gene *ALS3* também foram identificadas como sensíveis quando *STOP1* teve perda de função, assim como outro gene, o *CLB-INTERACTING PROTEIN KINASE23*, uma proteína quinase responsável por regular o transporte de potássio e sulfato, o que confirma que este fator de transcrição está relacionado não apenas à regulação da toxicidade ao Al, mas também a homeostase de prótons (Sawaki *et al.*, 2009).

Outro gene responsável por regular diversos genes relacionados à tolerância ao Al foi identificado em arroz, o gene *ART1* (*Aluminum Resistance Transcription Factor1*), um fator de transcrição dedo de zinco. O efeito da mutação deste gene em outros genes responsáveis pela tolerância ao Al foi avaliado através de microarranjos. A expressão dos genes *STAR1* e *STAR2* foi reduzida, o que indica que o gene *ART1* está envolvido na regulação da tolerância ao Al em arroz (Yamaji *et al.*, 2009). Mais recentemente foi identificado o elemento *cis* de atuação do gene *ART1*, sendo este elemento encontrado na região promotora do gene *STAR1*, e em 29 dos 31 genes regulados por *ART1*, confirmando mais uma vez a

importância do mesmo para promoção da tolerância em arroz (Tsutsui *et al.*, 2011).

Além destes, outro gene regulado pelo fator de transcrição *ART1* é o gene *Nrat1* (*Nramp aluminum transporter 1*), pertencente à família de proteínas *Nramp* (*natural resistance-associated macrophage protein*). Este foi identificado como um transportador de Al^{3+} localizado na membrana plasmática, que é requerido para um passo anterior ao final de desintoxicação do Al através do sequestro do mesmo em vacúolos em arroz. Quando mutado, este gene resultou na diminuição da absorção de Al, aumento da ligação do mesmo à parede celular e aumento da sensibilidade ao Al. No entanto, sua ausência não afetou a tolerância a outros metais (Xia *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo causado pelo Al também é citado como um dos graves problemas desencadeados pela toxidez do mesmo nas plantas. No entanto, as plantas produzem antioxidantes que minimizam este estresse. O gene *PTrx* (*Phalaris coerulescens thioredoxin gene*), o qual codifica um gene de tioredoxina, considerado atuar como antioxidante, foi introduzido em cevada. Foi observado que a expressão deste gene aumentou a resistência das raízes durante a germinação, o que indica que provavelmente o mesmo poderia ser utilizado para reduzir a toxicidade de solos ácidos com Al para cevada (Li *et al.*, 2010). Outro estudo em *arabidopsis* avaliou a supressão da fosfolipase *Dys* (*PLDys*) na tolerância ao Al. Esta enzima é induzida pelo estresse ao Al e contribui para alteração de lipídeos da membrana. A supressão do gene que codifica esta enzima, tanto através do uso de RNA de interferência quanto através de mutação, resultou em um aumento da

tolerância ao AI, o que indica que as PLDys desempenham um papel na modulação da membrana lipídica sob estresse de AI e que a alta atividade das mesmas regula negativamente a tolerância (Zhao *et al.*, 2011).

2.5 Genética da tolerância ao AI em aveia

A genética da tolerância ao AI em aveia tem sido explorada em poucas populações de aveia, havendo trabalhos que citam a tolerância como monogênica (Wagner *et al.*, 2001; Nava *et al.*, 2006) e outros como controlada por poucos genes com múltiplos alelos (Oliveira *et al.*, 2005).

A análise de uma população de aveia segregante para a tolerância ao AI, não encontrou relação entre caracteres de interesse agrônômico e o nível de tolerância das linhagens, o que indica que para o melhoramento de plantas, a inserção do gene de tolerância ao AI não traz consigo qualquer prejuízo ao rendimento (Nava *et al.*, 2006).

Em *Avena strigosa*, espécie diplóide, foram identificados quatro QTLs associados à tolerância ao AI a partir de um mapa desenvolvido com marcadores de polimorfismos de comprimentos de fragmentos restritos (*RFLP*), polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados (*AFLP*) e região amplificada a partir de sequências caracterizadas (*SCAR*). Dentre estes QTLs, um deles foi responsável por explicar 39% da variação total e o mesmo considerado ortólogo ao principal gene encontrado em Triticeae, *ALMT1*. Um segundo QTL foi considerado ortólogo ao gene *Alm2* em milho, e os outros dois QTLs foram associados a marcadores anônimos. Juntos, os QTLs explicaram 55% da variação fenotípica (Wight *et al.*, 2006).

Uma população F₂, originada de dois genótipos de aveia com base genética distinta, UFRGS17 e UPF91AI100-1-4, considerados tolerantes a

AI, foi comparada para determinar se a tolerância era conferida pelo mesmo gene ou por genes diferentes. Através da análise de recrescimento de raiz e comparação da frequência de distribuição, foi considerado que ambos possuem a tolerância conferida pelo mesmo gene, reforçando mais uma vez a idéia de que a tolerância ao AI em aveia é devido a um gene de maior efeito (Castilhos *et al.*, 2011). No entanto, até o presente momento, nenhum gene relacionado à tolerância ao AI foi descrito em aveia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As avaliações fenotípicas e moleculares foram realizadas em uma população de 157 linhagens recombinantes (F_6) de aveia hexaplóide derivada do cruzamento entre os genitores UFRGS 17 (tolerante ao Al) e UFRGS 930598 (sensível ao Al) (Nava, 2005; Limberger, 2006). A genealogia dos genótipos parentais está apresentada na TABELA 2.

TABELA 2. Parentais UFRGS 17 e UFRGS 930598 utilizados no estudo de tolerância ao alumínio e suas genealogias.

Genótipos	Resposta ao Al	Genealogia
UFRGS 17	Tolerante	COR ² /CTZ ³ /PENDEK/ME1563//76-29-76-23/75-28/CI833
UFRGS 930598	Sensível	UFRGS15/UFRGS881920

3.2 Mapeamento e identificação de QTLs

3.2.1 Fenotipagem

A análise fenotípica da tolerância ao Al das linhagens baseou-se nos dados de recrescimento após exposição ao Al (740 μ M de Al na forma de Al_2SO_4) obtidos em hidroponia por Nava (2005) e nos dados obtidos no ensaio a campo.

Para comparação entre os dados fenotípicos, foi utilizada a correlação de Pearson, e, assumindo um modelo linear, foi traçada a reta da regressão e gráfico de dispersão.

No ensaio a campo, a população de 157 linhagens recombinantes e os genótipos parentais UFRGS 17 e UFRGS 930598 foram avaliados quanto ao crestamento no Centro Nacional de Pesquisa de Trigo – CNPT/Embrapa, localizado no município de Passo Fundo, RS, o qual está situado a 28°15' latitude Sul e 52°24' longitude Oeste, a 687 metros acima do nível do mar e possui clima subtropical úmido. O solo foi previamente adubado, no dia 21 de maio de 2010, com 250 kg/ha na fórmula 5-12-24, e no dia 9 de setembro de 2010 foram aplicados 100 kg/ha de uréia. A população foi semeada no dia 21 de julho de 2010, em blocos casualizados, com três repetições (FIGURA 3). Cada unidade experimental consistiu de uma linha de 3 metros de comprimento, sendo cada linha espaçada 0,2 m, e semeada à densidade de 300 sementes por metro quadrado.

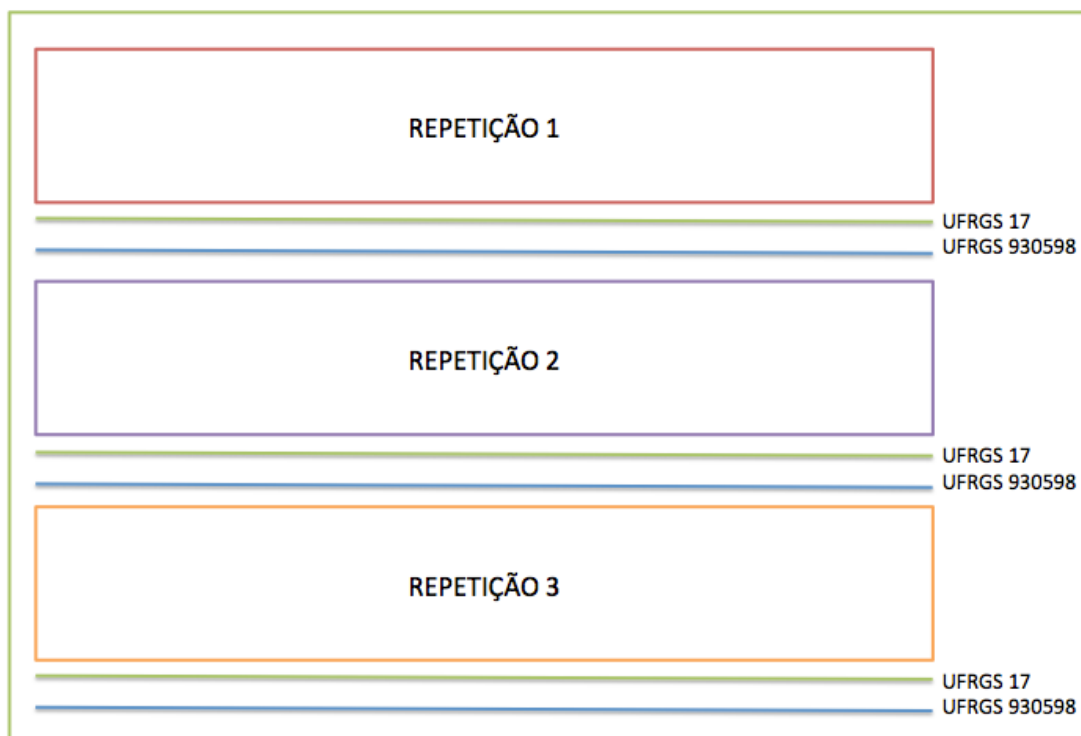


FIGURA 3. Plano esquemático da disposição dos genótipos no experimento de tolerância ao alumínio a campo.

As plantas foram avaliadas quanto a emergência no campo uma vez, recebendo escore de 1 a 5, sendo 1 baixa emergência e 5 emergência de todos indivíduos. O crestamento foi avaliado três vezes no campo, 30, 60 e 90 dias após o plantio, baseado no crescimento de cada linhagem em comparação aos pais. As linhagens receberam notas de 0 a 9, sendo 0 a 3 inicialmente consideradas sensíveis, 4 a 6 intermediárias e 7 a 9 tolerantes. As linhagens foram reclassificadas em dois grupos (tolerante e sensível) de acordo com a distribuição dos pais dentro do experimento. A média entre as três avaliações foi considerada para a análise de caracteres quantitativos.

Esta mesma média foi utilizada para testar a hipótese da presença de um gene principal para tolerância ao Al. Para testar esta hipótese foi utilizado o teste Qui-quadrado, sendo aplicada a correção de Yates. Esta correção foi necessária porque a distribuição Qui-quadrado é uma

distribuição contínua e foi aplicada a dados discretos. Esta é utilizada somente quando o número de graus de liberdade é um. Foi também avaliada a herdabilidade ampla através da fórmula $h^2 = Vg/Vg+Ve$, aonde h^2 = herdabilidade no sentido amplo, Vg = variância do genótipo e Ve = variância do erro.

O solo foi analisado em seis diferentes pontos, sendo três pontos em cada extremo (superior e inferior) da área experimental e três no meio, para checar a distribuição do Al.

3.2.2 Cariotipagem

Os genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598 foram cariotipados pelo Dr. Eric Jellen na Brigham Young University, em Provo, Utah – USA. A técnica utilizada foi a coloração de bandas C, para qual foi utilizado o corante de Wright's, para comparação dos cromossomos entre ambos genótipos. Esta técnica permite a identificação dos 21 cromossomos somáticos de aveia hexaplóide (Jellen *et al.*, 1993). As imagens das células do embrião coradas foram capturadas digitalmente e usadas para construir o cariótipo dos genótipos e encontram-se no apêndice deste trabalho.

3.2.3 Genotipagem

As sementes da cultivar UFRGS 17 e da linhagem UFRGS 930598 e das linhagens recombinantes foram descascadas, desinfestadas em solução com água sanitária e água destilada (30 % v/v) somados a 0,5% do volume total de Tween 20, por 1 minuto, sendo enxaguadas em água destilada 5 vezes por 30 segundos. As mesmas foram semeadas em papel germinador, os quais foram umedecidos com água destilada, dobrados e acondicionados

em Becker contendo água destilada. O mesmo foi transferido para câmara de crescimento a 21°C no escuro, para diminuir a produção de clorofila e parede celular e facilitar a extração do DNA. Durante a germinação, as sementes foram constantemente mantidas com umidade, através da reposição diária de água destilada. Após sete dias, as plântulas foram coletadas em tubos Falcon, congeladas e liofilizadas para posterior extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada através do protocolo de extração de DNA vegetal para DArT, fornecido pela Diversity Arrays Technology Pty Ltd. As plântulas coletadas nos tubos Falcon foram transferidas para tubos de 2 ml, adicionadas bolas de metal aos tubos e estes foram transferidos para um agitador de placas para maceração. A extração consistiu na transferência de 1 g de tecido para novos tubos de 2 ml, procedendo com a adição de 1 ml de um tampão de extração por tubo (0,15 M sorbitol, 0,12 M Tris-HCl pH 8,0, 23 mM EDTA pH 8,0, 0,83 M NaCl, 0,83% N-Lauroylsarcosina, 0,8% p/v CTAB, 0,5% p/v Bissulfito de sódio e 2% p/v PVP) a 65°C por 1 h, para suspensão do tecido, sendo os tubos invertidos a cada 20 minutos. Após este passo, foram resfriados os tubos durante 5 minutos em temperatura ambiente e a extração se procedeu com a adição de 1 ml de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo os mesmos misturados em agitador orbital por 30 min e centrifugado a 10.000 x g por 20 min. Após a centrifugação, foram coletados os sobrenadantes e transferidos para novos tubos de 2 ml, nos quais foi adicionado isopropanol no mesmo volume que o líquido coletado. Os tubos foram invertidos 10 vezes para provocar a precipitação dos ácidos nucleicos. A partir daí foram centrifugados a 10.000 x g por 30 min e depois descartado

o sobrenadante, sobrando apenas um *pellet* de DNA. O *pellet* foi lavado com 2 ml etanol 70 % por um minuto e descartado, após, repetiu-se o mesmo procedimento com etanol 90 %, deixando o tubo depois por 12 h invertido em papel toalha para secar o *pellet*. O DNA foi então diluído em 250 µl TE (Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) e 1 µl foi utilizado para quantificação no espectrofotômetro Nanodrop.

Os marcadores utilizados para a genotipagem foram marcadores de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), gerados a partir da plataforma Illumina (*GoldenGate Oligonucleotide Assay*). Foram selecionados 960 marcadores, os quais foram os mais polimórficos no painel de diversidade de aveia. Este painel é composto por diversas cultivares de aveia com o objetivo de abranger a maior diversidade possível dentro do genoma de aveia hexaplóide, para permitir o uso destes marcadores em um número maior de populações.

Estes marcadores foram adaptados para a tecnologia da empresa Fluidigm, sendo, para cada marcador, desenhados quatro diferentes iniciadores. Três iniciadores “diretos” e um iniciador “reverso”. Dois iniciadores “diretos” possuem em uma extremidade o polimorfismo e na outra extremidade uma cauda específica para ligação a um fluoróforo da química KASPar. O outro iniciador “direto” e o “reverso” são sequências simples comuns a ambos os pais.

Para genotipagem, foram primeiramente realizadas reações de PCR para normalização e amplificação das sequências alvo dos iniciadores (STA), na qual foram utilizados apenas os iniciadores simples, os quais não incluem o nucleotídeo polimórfico. Esta etapa não é sempre necessária,

porém em genomas complexos como o de aveia, é interessante o uso desta metodologia para aumentar o sucesso da reação seguinte através da multiplicação das sequências alvo. O produto da reação STA foi utilizado para as reações da plataforma Fluidigm.

Para a genotipagem, foi utilizado o Sistema EP1 da Plataforma Fluidigm. O Sistema EP1, com arranjos dinâmicos IFCs 96.96, é especialmente adequado para aplicações que requerem a análise de um número elevado de amostras e marcadores. Cada placa de arranjo dinâmico possui 96 poços para DNA e 96 para adição da química TaqMan ou KASPar junto aos marcadores, gerando no final, um total de 9.216 reações de PCR.

A química utilizada nos arranjos dinâmicos foi a química KASPar (Kbiosciences), a qual consiste em um *mastermix* de ingredientes para uma reação PCR mais dois fluoróforos que se ligam a sequências específicas quando amplificadas. No caso, um fluoróforo se liga a um alelo específico do marcador com o polimorfismo, e outro fluoróforo ao outro alelo específico, se presente, sendo liberadas diferentes fluorescências, que posteriormente foram lidas pelo leitor de placas do sistema EP1, diferenciando dois alelos e possíveis heterozigotos. Os dados então foram compilados em uma matriz, a qual foi utilizada para a produção do mapa de ligação.

3.2.4 Mapeamento

O mapa genético de ligação foi construído a partir do programa computacional de mapeamento molecular MapMaker (Lander *et al.*, 1987). O mapa foi construído utilizando as informações de localização dos marcadores no cromossomo a partir do mapa consenso de aveia (Jackson, E., comunicação pessoal). O mapa consenso de aveia foi obtido a partir de

linhagens monossômicas e neste sabe-se a localização dos marcadores quanto aos cromossomos, mas a distribuição destes dentro dos cromossomos foi feita a partir de distâncias genéticas. O mapa gerado pelo programa MapMaker foi desenhado através do programa MapChart (Voorrips, 2002).

3.2.5 Identificação de QTLs associados à tolerância ao alumínio

Para a identificação de locos associados a caracteres quantitativos (QTLs) foi utilizado o programa MQTL (Tinker & Mather, 1995). A análise de QTLs foi realizada utilizando a estratégia de mapeamento por intervalo composto simplificado (sCIM). O limiar (LOD) para consideração de QTLs como verdadeiros, evitando falso positivos, foi estimado baseado na análise de 10000 permutações ao acaso.

3.3 Análise de genes candidatos

Para a análise de genes candidatos, foram selecionados genes relacionados à tolerância ao Al preferencialmente de outras poaceas, pela proximidade filogenética destas com aveia. Os genes selecionados foram *STOP1*, *STAR1* e *STAR2* de arroz, *ALMT1* de trigo, *MATE1* e *MATE2* de centeio e milho. Além dos genes descritos acima e provenientes de poaceas, os genes *ART1*, *ALS1* e *ALS3* de *Arabidopsis thaliana* também foram incluídos neste estudo. Sequências destes genes de diferentes espécies foram obtidas através do banco de dados do NCBI, e comparadas através da ferramenta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) com o banco de dados de sequências expressas (EST) de aveia do Ministério da Agricultura dos Estados Unidos (USDA). As sequências obtidas foram alinhadas e

comparadas através do programa Geneious (Drummond *et al.*, 2011); para as regiões conservadas entre os genótipos de aveia e as sequências do NCBI foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores. Foram avaliados os parâmetros de identidade entre as sequências, melhor esperança (*e-value*), e a cobertura do gene que as sequências de EST cobrem.

Para todos os genes, exceto o gene *ART1*, iniciadores foram desenhados baseados nas regiões conservadas entre mais de uma espécie, a partir do programa Batch Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), tendo de 15 a 20 nucleotídeos e conteúdo de G/C de 50 a 60 % (TABELA 3). Não foram desenhados iniciadores para o gene *ART1* devido ao mesmo não possuir uma grande cobertura de ESTs e quando estas foram alinhadas, não foram observadas regiões conservadas o suficiente para o desenho de iniciadores.

As reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em termocicladores (Applied Biosystems), sendo utilizadas as enzimas Taq Polimerase e Phusion Taq Polimerase (New England BioLabs). As reações foram realizadas em três passos, sendo o primeiro a desnaturação das amostras por cinco minutos na temperatura de 92-96°C (dependendo da enzima utilizada), o segundo passo sendo 40 ciclos de desnaturação (92-96°C por 60 seg), associação dos iniciadores (50-65°C dependendo do conjunto de iniciadores por 30 seg) e extensão dos mesmos pela Taq polimerase (72°C por 30 seg) e o terceiro passo, uma última extensão por 10 minutos a 72°C.

TABELA 3. Iniciadores utilizados para prospecção de genes de tolerância ao alumínio em aveia hexaplóide.

Gene	Nome	Sequência	Direção
<i>STOP1</i>	NS_F2	TGGAAATCTCCATGCAAGC	Direto
<i>STOP1</i>	NS_F6	CTGGCTCTATGCTTCCTTCG	Direto
<i>STOP1</i>	NS_F5	AGCCAAGTTGTTGGTGGTTC	Direto
<i>STOP1</i>	NS_R5	CCATGTGAAGAGCAGGTGTG	Reverso
<i>STOP1</i>	NS_R6	GGAACCTCCTGTGCTCCTTG	Reverso
<i>STOP1</i>	NS_F1	CGATAAGTAGCATGAGAAGAGG	Direto
<i>ALMT1</i>	FA_F2	CAGATCAGAGCGAGCGTAGG	Direto
<i>ALMT1</i>	FA_R2	GAAGATGGCGAGCAGAATG	Reverso
<i>ALMT1</i>	FA_R1	ACGAAGATGGCGAGCAGAAT	Reverso
<i>ALMT1</i>	BA_F2	GCTTTGGAGAAAAGGCTTCC	Direto
<i>ALMT1</i>	BA_R1	GCCTCTTTGTCAACTCTGAATG	Reverso
<i>ALMT1</i>	BA_F1	TGCTTTGGAGAAAAGGCTTC	Direto
<i>ALMT1</i>	RALTM_1266	CACACATTCGCGATATCCTTC	Reverso
<i>ALMT1</i>	RALTM_1392	TTACTCCGCACATTGAATAAC	Reverso
<i>ALMT1</i>	RATLM_496	CGTACTTGGCCTTGATCTCCGG	Reverso
<i>ALMT1</i>	RATLM_965	GTGATGACATATGAAGCAAGAGC	Reverso
<i>ALMT1</i>	AL F4 Barley	ATGGAGGTTGATCACC	Direto
<i>ALMT1</i>	AL F5 Barley	CGAGACGACGGCCGG	Direto
<i>STAR2</i>	STAR2F1	ATGGCGAGCATGGC	Direto
<i>STAR2</i>	STAR2F2	TGGCGAGCATGGCGGCGCT	Direto
<i>STAR2</i>	STAR2F3	GTCTGCTGGTGGTGGTGAAT	Direto
<i>STAR2</i>	STAR2F4	GTGAATCAGGTGGAC	Direto
<i>STAR2</i>	STAR2F5	CGAGGCCGAGATGCTCTAC	Direto
<i>STAR2</i>	STAR2F6	GTCACCATGTTCTGCTCGT	Direto
<i>STAR2</i>	STAR2R1	CTAGTCGGTGAAAACAGAGTC	Reverso
<i>STAR2</i>	STAR2R2	TCGGTGAAAACAGAGTCTTCG	Reverso
<i>STAR2</i>	STAR2R3	AGATCAGACCCACCGTCTG	Reverso
<i>STAR2</i>	STAR2R4	TCCTCGTGGAGCTTCTTCAT	Reverso
<i>STAR2</i>	STAR2R5	CATGAAGAGGTAGGCGAGCA	Reverso
<i>STAR1</i>	STAR1F1	CCGGATTCCTCACTTCGAT	Direto
<i>STAR1</i>	STAR1R1	TCAGCTGAGCTCCAGGAAG	Reverso
<i>STAR1</i>	STAR1F2	TCACCTTCGTCTTCTCTCG	Direto
<i>STAR1</i>	STAR1R2	GACGAGGCACACCAGGTC	Reverso
<i>STAR1</i>	STAR1F3	GATGACACCAGGGAGCATCT	Direto
<i>STAR1</i>	STAR1R3	GCTCATCCAGCAGGAGCAC	Reverso
<i>STAR1</i>	STAR1F4	GGTGGTGATGGGCGTCAT	Direto
<i>STAR1</i>	STAR1R4	GGAAGAGCATGCCGACCTTG	Reverso
<i>STAR1</i>	STAR1F5	CTACCCGCCATGTTTCGAC	Direto
<i>MATE2</i>	MATE2R1	TCATTCTTGGCCTGTTAACA	Reverso
<i>MATE2</i>	MATE2F1	GCGAGAGCAAGCTGGAGAG	Direto
<i>MATE2</i>	MATE2F4	ACGTCGGCTGCTACTACGTC	Direto
<i>MATE2</i>	MATE2R4	CGTAGTAGCAGCCGACGTT	Reverso
<i>MATE2</i>	MATE2R5	GCGTTGAACCAATGAAAT	Reverso
<i>MATE2</i>	MATE2R6	CGTCGACATGGACATGAGGT	Reverso
<i>MATE1</i>	MATE1F3	TTGGCCACATAGGTCCAGTT	Direto
<i>MATE1</i>	MATE1R3	AAGCTAACCGTTGATTGGT	Reverso
<i>MATE1</i>	MATE1F4	GCTTGTCTTGTGTGCAAAACC	Direto
<i>MATE1</i>	MATE1R4	CCATAAGAGTATGGCTGCAATGA	Reverso
<i>MATE1</i>	MATE1F5	TCCTAGGCTTCATGGGTGTG	Direto
<i>MATE1</i>	MATE1R5	ATTGATTGCATCTCCAACCA	Reverso
<i>MATE1</i>	MATE1R6	TTTCACACCCATGAAGCCTA	Reverso

As reações de PCR foram analisadas em gel de agarose 1%. As bandas com tamanho esperado foram isoladas através do kit de extração de gel QIAquick (QIAGEN). As sequências extraídas foram inseridas em plasmídeos através do kit QuickClean II Plasmid Miniprep (GenScript) e clonadas através do kit StrataClone Blunt PCR Cloning (Stratagene) em *E. Coli*. As colônias transformadas então foram isoladas, purificadas e enviadas para sequenciamento.

A análise comparativa das sequências obtidas a partir do sequenciamento foi realizada com auxílio do aplicativo computacional Geneious (Drummond *et al.*, 2011). Para predição dos locais de *splicing* nas sequências gênicas foi utilizado o servidor “*NetPlantGene*” (Hebsgaard *et al.* 1996). A partir do aplicativo Geneious foram comparadas as sequências de cDNA e proteína preditas e formadas árvores de distância filogenética entre as sequências obtidas e os genes já descritos na literatura. As árvores de distância filogenética foram construídas pelo método “*Neighbor-Joining*” e UPGMA e o modelo de distância genética utilizado foi o de Tamura-Nei. A partir do aplicativo Phyre 2 foram analisadas as sequências proteicas preditas, sendo utilizado o método intensivo para análise das sequências e produção de modelos proteicos com estrutura secundária e terciária (Kelley & Sternberg, 2009).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mapeamento e identificação de QTL para tolerância ao alumínio

4.1.1 Análise fenotípica

A partir dos resultados de análise de solo pôde-se observar pouca variação nos pontos avaliados (Apêndice 1). No entanto, convém ressaltar que, como a disponibilidade do Al é dependente de outros elementos que variam significativamente em pequenas distâncias no solo, como o fósforo, é possível a ocorrência de disponibilidades variáveis de Al ao longo do campo. Estas variações têm sido empecilho na avaliação a campo da tolerância ao Al.

Esperava-se com oito classes separar a população em três categorias, sensíveis, intermediárias e tolerantes. No entanto, apesar da distribuição fenotípica dos pais ter sido distinta, esta foi muito ampla, sendo o pai sensível encontrado nas classes 1 a 5, com média na classe 3 e o pai tolerante nas classes 6 a 8, com média na classe 7. Assim, apenas duas classes puderam ser formadas, sensíveis até classe 5, e tolerantes a partir da classe 6 (FIGURA 4). Esta amplitude de resposta observada nos genótipos parentais poderia ser explicada por variações na disponibilidade

de fósforo e de outros elementos do solo que afetam a atividade do Al. Porém esta variação tem sido comumente observada não só a campo, mas também em hidroponia onde as condições são muito mais controladas (Nava et al., 2006; Castilhos et al., 2011). As razões não são conhecidas, mas sugere-se que a penetrância e expressividade do gene responsável pela tolerância seja incompleta e grande a interação do caráter com o ambiente.

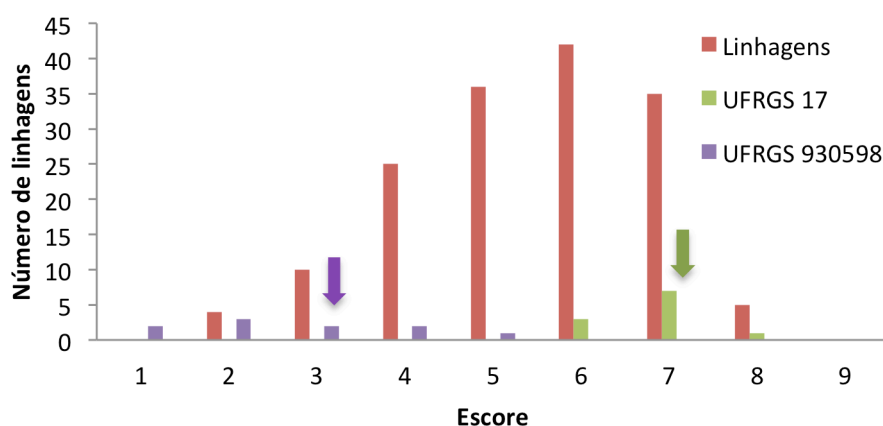


FIGURA 4. Distribuição dos escores de campo para tolerância ao Al na população F6 do cruzamento UFRGS 17 X UFRGS 930598. Flechas indicam a média do respectivo parental. Passo Fundo, 2010.

Para testar a hipótese de um único gene responsável pela tolerância, os genótipos foram divididos em duas classes, a primeira englobando as classes 1 a 5, nas quais encontra-se a distribuição do genótipo UFRGS 930598, sendo esta classe denominada “sensível”, e a segunda englobando as classes 6 a 9, nas quais encontra-se a distribuição do genótipo UFRGS 17, sendo esta classe denominada “tolerante” (TABELA 4). A partir destes dados foi realizado o teste qui-quadrado (χ^2), com correção de Yates, para testar a hipótese dos dados estarem segregando para um gene, sendo a frequência esperada 1:1.

TABELA 4. Segregação para o caráter tolerância ao alumínio a campo na população UFRGS 17 x UFRGS 930598 e teste qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates. Passo Fundo, 2010.

	Fenótipo	Freq. Observada	Proporção	Freq. Esperada	χ^2	p
1 a 5	Sensível	75	1	78.5		
6 a 9	Tolerante	82	1	78.5		
	Total	157	2	157	0.2293	0.6320

O teste qui-quadrado (χ^2) resultou em não significativo, comprovando que a frequência observada foi igual a frequência esperada, o que sugere que o caráter tolerância ao Al a campo é governado por um gene. Este resultado corrobora os obtidos com outras populações, a campo e laboratório, onde a tolerância ao Al mostrou-se um caráter monogênico (Nava *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2005; Sánchez-Chacón *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2001).

No experimento em hidroponia realizado por Nava (2005), os genótipos foram divididos em classes de 0,3 cm cada, e os indivíduos que se encontravam abaixo de 0,6 cm de recrescimento de raiz após a exposição ao Al foram considerados sensíveis e, acima, tolerantes (FIGURA 5). E, a hipótese de um gene principal também foi aceita.

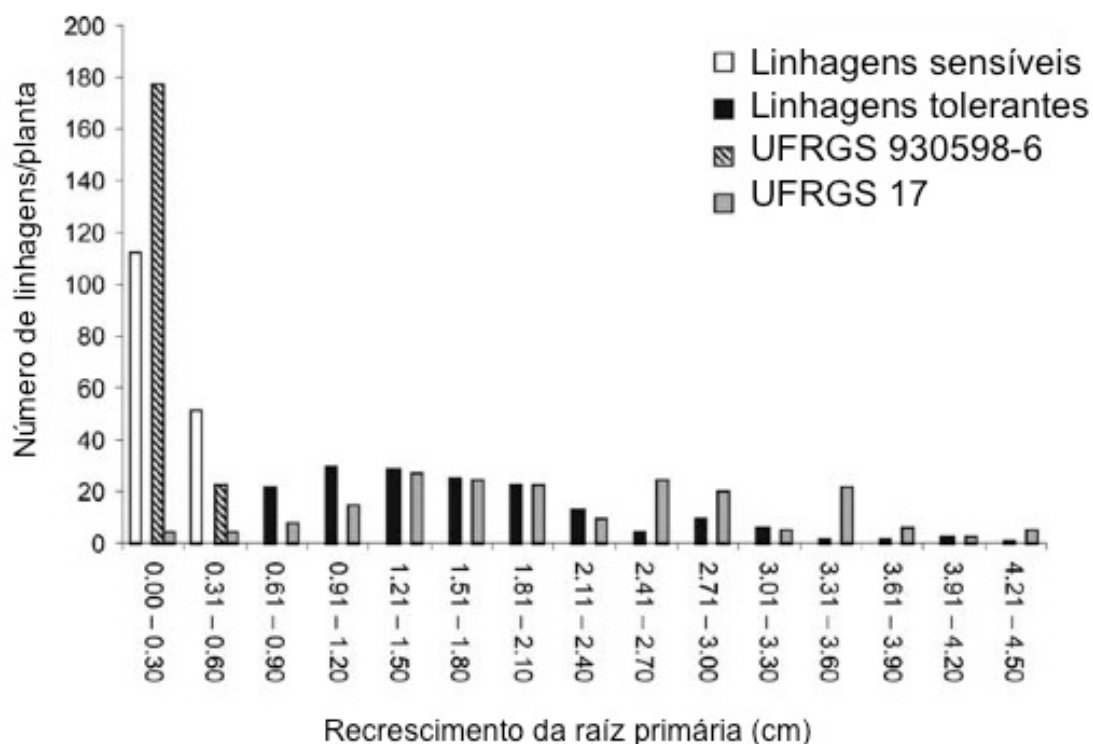


FIGURA 5. Distribuição do recrescimento da raiz primária de UFRGS 17, UFRGS 930598 e população F6 segregante (Nava *et al.*, 2006).

Foi avaliada a correlação entre os dados fenotípicos obtidos a campo e os obtidos em hidroponia por Nava (2005) (TABELA 5). Houve correlação positiva entre os dados de hidroponia e campo. Esta correlação (0,22) foi baixa devido a interferência da taxa de emergência na primeira avaliação a campo. Quando se comparou as diferentes observações no tempo, foi observado que conforme a avaliação distanciava-se da emergência, ocorria redução no valor da correlação com a emergência e aumento da correlação da avaliação no campo com os dados hidropônicos, indicando que a emergência teve efeito significativo, gerando confundimento no escore para tolerância ao Al a campo.

TABELA 5. Correlação de Pearson para o escore a campo em suas três avaliações, recrescimento de raiz em hidroponia e emergência.

	Hidroponia	Emergência	Campo 1	Campo 2	Campo 3
Emergência	-0.09416 ^{NS}				
Campo 1	0.07298 ^{NS}	0.73665*			
Campo 2	0.22761*	0.67726*	0.78666*		
Campo 3	0.30482*	0.57180*	0.63957*	0.83519*	
Média Campo	0.22980*	0.71825*	0.86321*	0.95603*	0.91940*

NS = Não significativo

* = Significativo ao nível de 1%

Também foi avaliada a dispersão e calculada a reta para regressão dos dados (FIGURA 6). O escore a campo diferiu as linhagens consideradas sensíveis na hidroponia em várias classes (1 a 8), o que reduziu a correlação, as linhagens consideradas tolerantes na hidroponia foram classificadas no campo entre as classes quatro e oito.

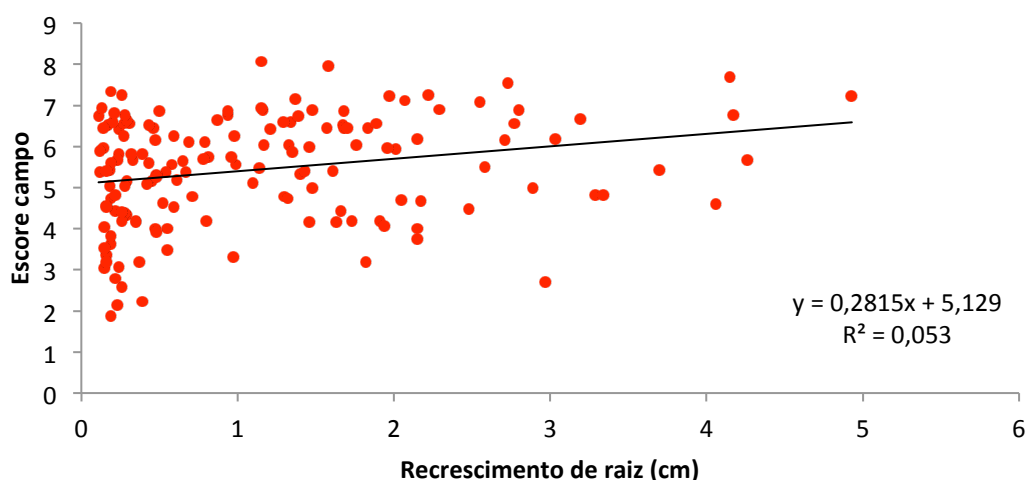


FIGURA 6. Regressão e dispersão dos dados da avaliação da tolerância ao Al a campo da população UFRGS 17 x UFRGS 930598 em comparação com a avaliação do recrescimento da raiz primária em hidroponia.

Mesmo considerando a terceira avaliação para comparar com os dados de hidroponia, a correlação permaneceu baixa, 0,30. Este resultado pode ser explicado pela subjetividade da avaliação a campo, a qual avaliou o

crestamento, ou seja, a resposta da planta não somente ao Al, mas ao ferro e outros minerais no solo. Além disso, é conhecida a falta de homogeneidade do solo em relação a disponibilidade de Al. Sendo assim, quando é dada a nota à planta, a mesma é dada considerando vigor, área foliar e estatura, podendo haver confundimento. A medição de outras características comumente afetadas pelo Al, como altura de planta no florescimento, afilhamento e rendimento, teriam tornado a avaliação de campo menos empírica e dependente do avaliador, possivelmente aumentando a correlação com os dados de hidroponia. No entanto, estas análises demandam maior mão-de-obra e condução das plantas por um período mais longo. Além disso, quando realizada a análise de recrescimento da raiz, não é necessariamente avaliado apenas a tolerância ao Al, mas também o estresse por ausência de fósforo. Contudo, este método aparenta ser mais preciso na fenotipagem da tolerância ao Al, visto que é observado diretamente o local principal de ação do Al, a raiz.

Também foi avaliada a dispersão entre os dados de escore médios a campo e emergência, sendo calculada uma regressão linear para os dados (FIGURA 7). Observa-se que quanto maior o escore dado para tolerância ao Al, melhor o nível de emergência. Estes resultados podem ser analisados a partir de dois diferentes pontos de vista. O primeiro, como citado anteriormente, sugere que problemas de emergência causados por sementes com baixa viabilidade resultaram em uma avaliação errônea, na qual foi dada nota para o vigor da semente e não necessariamente para tolerância ao Al.

Em contraponto, foram realizadas três avaliações a campo, em diferentes estágios de crescimento, com o intuito de reduzir este erro. Além disto, a não emergência da plântula, ou emergência tardia, pode se dever à própria presença do Al no solo, que retardou o desenvolvimento da plântula.

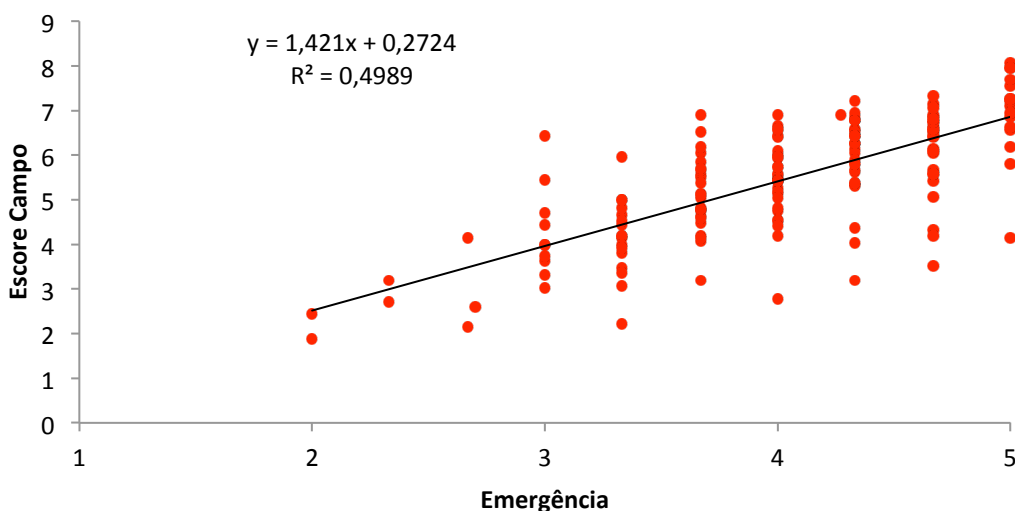


FIGURA 7. Regressão e dispersão dos dados de escore de Al a campo da população UFRGS 17 x UFRGS 930598 de acordo com nível de emergência. Emergência na escala de 1 = baixa a 5 = alta.

Também foi avaliada a herdabilidade do caráter no sentido amplo, sendo 56 % da variação fenotípica explicada pelo genótipo, indicando que há uma forte influência do ambiente sobre o caráter, o que explica a variação encontrada nos genitores. Estudos prévios encontraram herdabilidade de 72% para o recrescimento da raiz para a mesma população (Oliveira *et al.*, 2005), indicando que a influência do ambiente é importante para a tolerância ao Al, e que resultados obtidos em laboratório geram uma resposta mais precisa do que a campo.

4.1.2 Mapeamento genético

Dos 960 marcadores testados, 145 marcadores foram identificados como polimórficos para a população UFRGS17 x UFRGS 930598. A partir destes 145 marcadores polimórficos, foi gerado um mapa genético baseado no mapa consenso de aveia (FIGURA 8). O mapa foi gerado a partir da análise dos marcadores no software MapMaker, no qual foram descartados da análise 29 marcadores com frequência de distribuição distorcida, resultando em um mapa com 116 marcadores localizados em 19 grupos de ligação, que abrangem 15 dos 21 cromossomos de aveia (TABELA 6). Os marcadores foram divididos em grupos de ligação que correspondem aos seus respectivos cromossomos no mapa consenso, sendo a distância entre eles calculada através do software de mapeamento. Os grupos de ligação gerados foram identificados nos cromossomos 1C, 3C, 4C, 5C, 6C, 7C, 8A, 9D, 11A, 12D, 13A, 14D, 16A, 19A, e 20D. A ausência de marcadores nos demais cromossomos indica a necessidade de aumentar o número de marcadores utilizados para aumentar a resolução do mapa nesta população, provendo maior informação genotípica que poderá ser utilizada para a busca de caracteres quantitativos no futuro. Neste ano, foi desenvolvido um chip para plataforma Illumina com seis mil marcadores SNP (Jackson, E., comunicação pessoal), os quais provavelmente se utilizados nesta população aumentarão a cobertura do mapa e a própria resolução dentro de cada cromossomo, permitindo também um mapeamento mais fino e eliminação de falsos QTLs. Convém ressaltar o baixo polimorfismo entre os genótipos parentais, pois apenas 12% dos marcadores testados foi informativo.

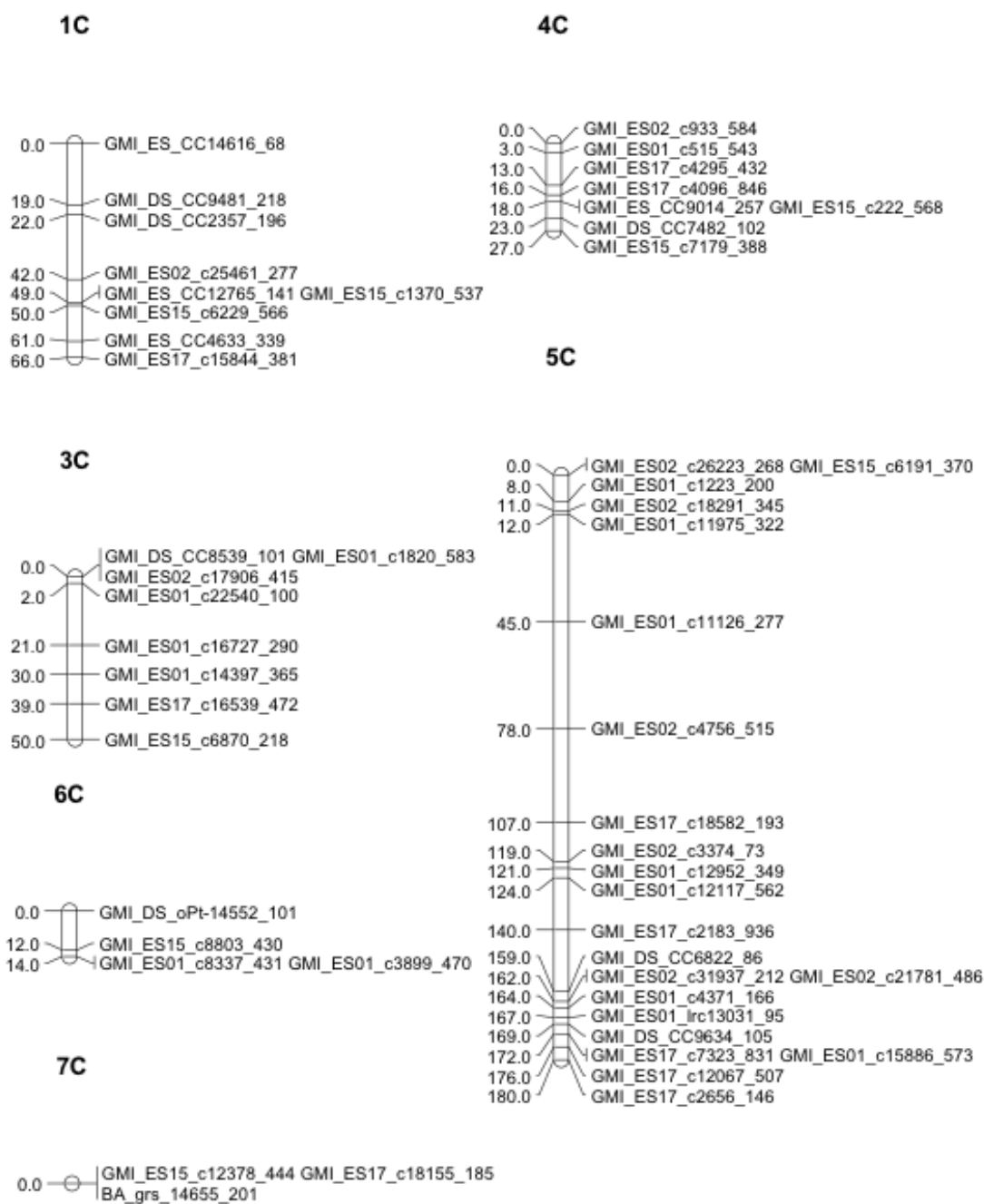
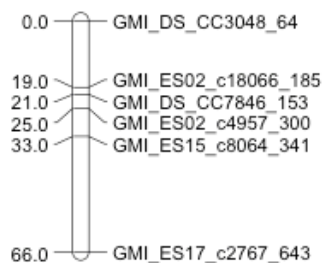
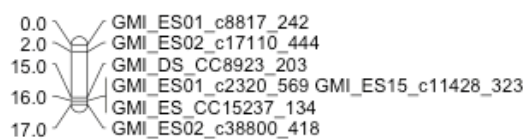
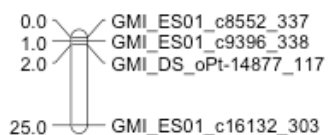
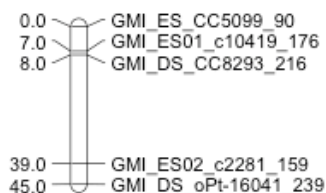
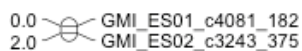
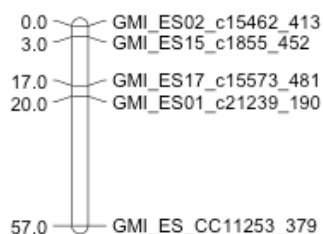
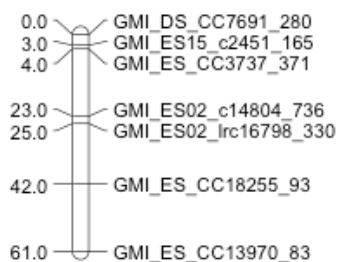


FIGURA 8. Mapa genético da população UFRGS 17 x UFRGS 930598.

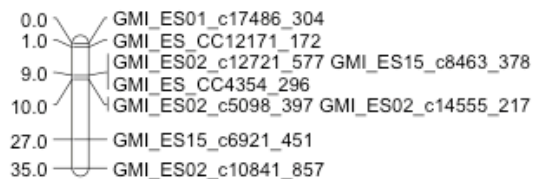
7C-2**8A****9D****11A****11A-2****12D**

continuação FIGURA 8. Mapa genético da população UFRGS 17 x UFRGS 930598.

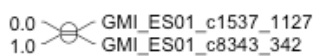
13A



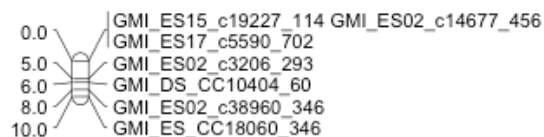
14D



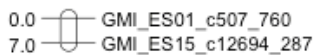
14D-2



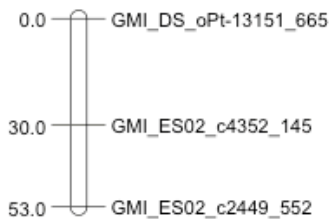
16A



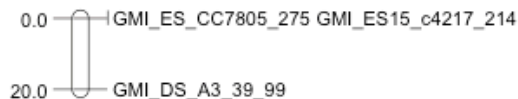
19A



19A-2



20D



continuação FIGURA 8. Mapa genético da população UFRGS 17 x UFRGS 930598.

TABELA 6. Distribuição dos marcadores e tamanho dos grupos de ligação do mapa da população UFRGS 17 x UFRGS 930598.

Grupo de Ligação	Cromossomo	Marcadores	Tamanho (cM)
1	1C	9	66
2	3C	8	50
3	4C	8	27
4	5C	22	180
5	6C	4	14
6	7C	3	0
7	7C-2*	6	66
8	8A	7	17
9	9D	4	25
10	11A	5	45
11	11A-2*	2	2
12	12D	5	57
13	13A	7	61
14	14D	9	35
15	14D-2*	2	1
16	16A	7	10
17	19A	2	7
18	19A-2*	3	53
19	20D	3	20

*Outra região do mesmo cromossomo, distante geneticamente da anterior.

O mapa consenso é considerado um mapa físico-genético, pois foi gerado com a utilização de marcadores que foram comparados em linhagens monossômicas, o que permitiu que os marcadores tivessem correspondência direta aos cromossomos, porém a localização dentro do mesmo permanece genética, pois o genoma de aveia ainda não foi sequenciado.

O número reduzido de marcadores obtidos pode ser explicado pelo fato do genoma ser hexaplóide, o que propicia um maior número de sequências genômicas as quais os marcadores podem se ligar, resultando na amplificação de um mesmo marcador em duas regiões diferentes, o que torna impraticável o uso destes para o mapeamento. Outra explicação para o baixo número é que durante o desenvolvimento de marcadores SNP, foi

utilizado um painel de diversidade, aonde foram avaliadas para os mesmos marcadores, genótipos com considerada distância genética, para que os marcadores fossem válidos em mais de uma população (Jackson, E., comunicação pessoal). No entanto, este painel foi desenvolvido com genótipos da América do Norte, o que, mesmo com os genótipos brasileiros possuindo ancestralidade norte americana, pode ter acarretado na não validação de muitos marcadores polimórficos para esta população. Além disso, os parentais advém do mesmo banco de germoplasma, possuindo ancestrais em comum, ou seja, era esperada semelhança entre eles.

4.1.3 Análise de QTL

A partir da análise conjunta dos dados fenotípicos da hidroponia e genotípicos pelo software MQTL foram identificados 3 QTLs para o caráter tolerância ao AI explicando um total de 64 % da variação fenotípica observada, sendo os mesmos consistentes nas duas repetições do experimento e na média dos mesmos. Com os dados fenotípicos de campo não foram encontrados QTLs.

Os QTLs identificados para tolerância ao AI localizaram-se nos cromossomos 7C, 13A e 19A (TABELA 7). No cromossomo 7C, foi encontrado um QTL explicando cerca de 21 % da variação fenotípica. O pico do QTL se localiza em 0 cM, possuindo 3 marcadores na região do QTL e sendo o marcador BA_grs_14655_201 o mais próximo ao pico com LOD 3,72. Este cromossomo apresentou apenas 3 marcadores, os quais estão sobrepostos, com maior distância entre os marcadores de 0.4 cM. O QTL localizado no cromossomo 13A explicou 21 % da variação fenotípica, sendo o pico encontrado na região de 1-4.1 cM. Este obteve LOD de 3,81 e 3

marcadores localizaram-se na região do QTL, sendo o marcador GMI_ES15_c2451_165 o mais próximo ao pico. O marcador GMI_ES02_c4352_145, explicando 23 % da variação fenotípica foi o único identificado na região de 12-53 cM do QTL no cromossomo 19A, possuindo LOD de 4,71. Nesta região do cromossomo 19A foram identificados apenas três marcadores, bastante distanciados entre si, o que dificulta o posicionamento deste (FIGURA 9).

Considerando que o caráter tolerância ao AI deve-se a um único gene, poderia-se supor que apenas um QTL deveria ser identificado, no entanto, o recrescimento da raiz não é uma característica discreta e provavelmente é influenciada por outros genes. Locos envolvidos em diferenças na taxa de crescimento de raízes entre os genitores também podem ter sido identificados, além daqueles relacionados à resposta à deficiência de fósforo. Como o mapa não foi capaz de abranger todos os cromossomos de aveia é possível que outros QTLs, até com maior importância, sejam identificados futuramente quando o mapa estiver mais saturado. Convém ressaltar que a identificação de QTLs baseia-se em análises estatísticas que buscam relacionar o fenótipo com os marcadores presentes e seu posicionamento relativo (também definido estatisticamente).

TABELA 7. QTLs identificados para tolerância ao alumínio na população UFRGS 17 x UFRGS 930598. Hidroponia 1 e 2 = repetições; Hidroponia média = média de Hidroponia 1 e 2.

QTL	Marcador	Score	Efeito		Limiar (LOD)	Intervalo (cM)	Pico do QTL (cM)	Pico do QTL (LOD)	Cromossomo
			Aditivo	Carácter					
1	GMI_DS_CC7691_280	2,57	0,88	Hidroponia 1	2,68	0-1	1	2,70	13A
2	GMI_ES15_c12378_444	3,28	0,92	Hidroponia 1	2,68	0	0	3,63	7C
2	GMI_ES17_c18155_185	3,52	0,94	Hidroponia 1	2,68	0	0	3,63	7C
2	BA_grs_14655_201	3,63	0,92	Hidroponia 1	2,68	0	0	3,63	7C
3	GMI_ES02_c4352_145	3,76	1,02	Hidroponia 1	2,68	13-50	25-27	4,49	19A
1	GMI_DS_CC7691_280	2,75	0,79	Hidroponia 2	2,68	0-16,9	3,1	3,81	13A
1	GMI_ES15_c2451_165	3,81	0,93	Hidroponia 2	2,68	0-16,9	3,1	3,81	13A
1	GMI_ES_CC3737_371	3,06	0,87	Hidroponia 2	2,68	0-16,9	3,1	3,81	13A
3	GMI_ES02_c4352_145	3,45	0,89	Hidroponia 2	2,68	16-53	27 & 47,2-49,2	4,38	19A
2	GMI_ES17_c18155_185	2,84	0,78	Hidroponia 2	2,68	0	0	3,04	7C
2	BA_grs_14655_201	3,04	0,78	Hidroponia 2	2,68	0	0	3,04	7C
1	GMI_DS_CC7691_280	2,95	0,81	Hidroponia Média	2,64	0-4,1	2	3,39	13A
1	GMI_ES15_c2451_165	3,37	0,87	Hidroponia Média	2,64	0-4,1	2	3,39	13A
2	GMI_ES15_c12378_444	3,23	0,83	Hidroponia Média	2,64	0	0	3,72	7C
2	GMI_ES17_c18155_185	3,54	0,86	Hidroponia Média	2,64	0	0	3,72	7C
2	BA_grs_14655_201	3,72	0,85	Hidroponia Média	2,64	0	0	3,72	7C
3	GMI_ES02_c4352_145	4,03	0,95	Hidroponia Média	2,64	12-53	26-27	4,71	19A

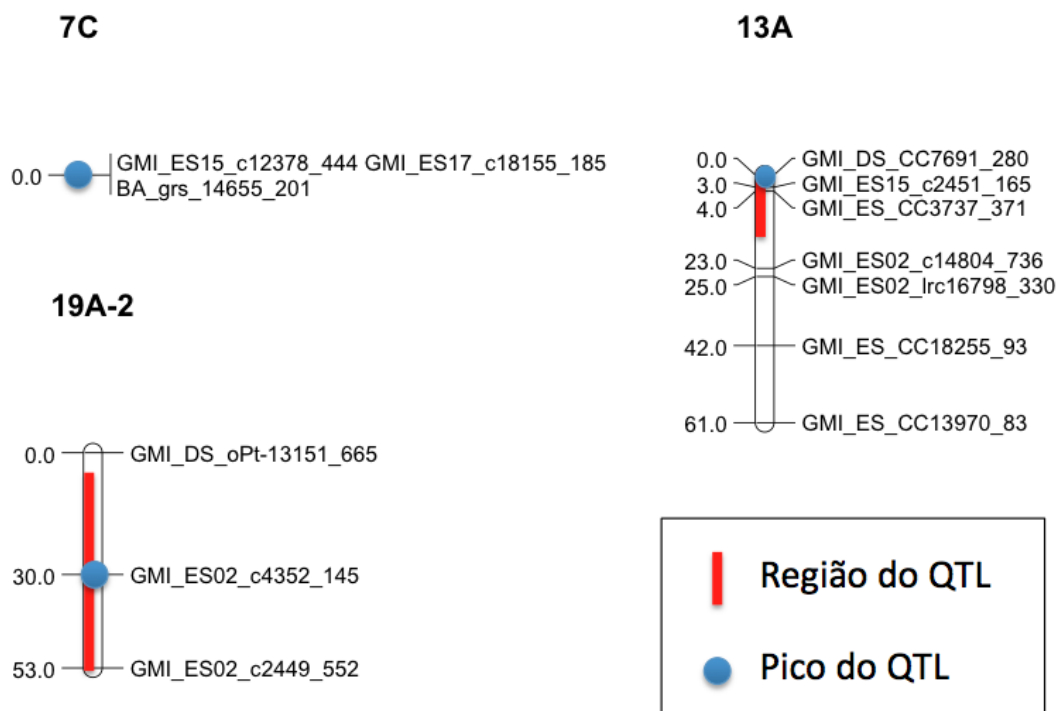


FIGURA 9. Cromossomos 7C, 13A e 19A de aveia e QTLs para tolerância ao alumínio baseados em avaliação do recrescimento de raiz em hidroponia.

Os marcadores localizados na região dos QTLs foram anotados a genes através da análise da comparação das sequências originais de onde os mesmos foram obtidos com o banco de dados do NCBI (TABELA 8). Pode-se observar a alta similaridade de três marcadores com sequências do NCBI, sendo a sequência GMI_ES_CC3737_371, encontrada no cromossomo 13A similar ao RNA para enzima 6G-fructosiltransferase 2, GMI_ES15_c2451_165, também encontrada no mesmo cromossomo, foi similar ao RNA da proteína monocopper oxidase e GMI_ES15_c12378_444, encontrada no cromossomo 7C, foi similar ao RNA de um receptor de ácido abscísico.

TABELA 8. Marcadores na região dos QTLs e o melhor resultado obtido via BLAST no NCBI.

QTL	Marcador	Sequência	BLAST NCBI Top Hit	Descrição
1	GMI_DS_CC7 691_280	ACTTTGTCGCTTTATATGACATTGCCG TTAGTTTTGTTAGTCTTCCATTAGTTT ACCTTTTTAAGGACCAAACACTACCCGTC CGCTTGATCGCTTCATCTGCCCTATTT TTGATTATCACTCGTTAATATCCACAC CGGAGAAAGAGTGGAACCACTGACC GTGTAACCTACCCATGACTCATATGTA CTACGTTCTTACGGCTGACAAATAAA GTCATGGCCGTTGCCGGCGGCCGAA CCTAGAGGAGACGAACTCGGTCAGG GTCATGTGGCTGATCA[A/G]CGTATA CATCTCTTACGCCTCCAGCCGTCGGT ACAACTATAAACTTTGTTCTGCAGCC CATAAAATGTGTACGTGGCCCGTGCC CTTGTGCCACACACG	-	-
1	GMI_ES_CC3 737_371	CGAGCAGACGGCCGTGACTTCTACG TGCCAGGGGCCTTGACGGCGGCCTC CGGACGGACTTCTGCCACGACGAGTC GCGGTCGACGCGGGCCAAGGACGTC GTGAACCGGGTGGTTGGTGGGCCG TGCCGGTTCTCGACGGCGAGACCTTC TCGGTGAGGGTGCTAGTGGACCACT CTATCGTGCAGAGCTTCGTGATGGGC GGGAGGACCACGGCGACGTCGCGGT CGTACCCGACGGAGGCCATCTACGCC GCGGCTGGGGTGTACCTGTTAAACAA CGCCACGAGCGCCACCATCACCCGCG AGGGGCTCGTCTACGACATGGCC TCGGCCGAGAATCGGGCCTTCAGGG AAAACGAGATG[T/C]AGATGAAAATA CTGTAAAGGTCAATGCCGACGGCCAA GCTTGCGGAGAAGCTTCTTCGTCGCC AGATGGGGATCGTCAAGGAAGGAGA GAAGGTCATGGAGATCGCCATTGCGA AGTTGGCAGACATGT	AB288057. 1	<i>Lolium perenne</i> mRNA para fructan:fructan 6G- fructosyltransferase 2, cds completo
1	GMI_ES15_c 2451_165	TCGTTGCACCACTCAGGTATTTCTG GAGCATGGACTGCTGTCTTACTATCA CTTGACAG[T/C]CCTGGTTTCTGGAAC GTGCGCACGGAAAATCTAGACACCTG GTATCTCGGTCAGGAGACT	XM_00355 7226.1	PREDITO: <i>Brachypodium distachyon</i> monocopper oxidase-like protein SKU5-like (LOC100822052), mRNA
2	GMI_ES17_c 18155_185	TAACAAGATCATCAGACGACAGACA GAGCTAGTAGTTGAGCAAGTTCATCA CAAAAATAAGCAAAAAACTCATCA GGGATTCCGGGAGGCTAAAGAGGG[A /C]AGAGATACATAACTACGAAGCTAT CCTTTTATTGTTGATTTGTCTTCCTCA GATCAGTCTCTACTGCTTGGGCTTGA GCAAGTCCTGGCTGCACGAGGCC	-	-

continuação TABELA 8. Marcadores na região dos QTLs e o melhor resultado obtido via BLAST no NCBI.

QTL	Marcador	Sequência	BLAST NCBI Top Hit	Descrição
2	BA_grs_146 55_201	TGCAAANGGTAAGGCCACCCACACTAACCACAATTGC AAATTTTTTCAACGACCGCAAGGAGGGTCCCAAATCTG GCTATAGGCAGAGTCAGAAGAGCATGCCTCACTAGAA AAGGCAAAAGGGAAGAAGGAATACAAGGGGGTCCAA AG[G/A]AATCTCTTGATATGGAGGAGGATACTGAACC CAAGCCCACCGACAAGAACGTCAGCAGAGGAAAGAAC AAGAATCCATTGAGAATAAAAACCCCATCTATCACA CCTTCTCGGAAATCCAATAGTCAGGCGTAGGAAACCT CTTTGA	-	-
2	GMI_ES15_c 12378_444	TTGAGGCTGTGATCAAGTGCAACCTCACATCTCTCGCA GAGGTATCGGAACGGCTAGCAGTTCAGTCACCTACAT CGCCACTTGAACAATAGCATCTCTGC[T/C]GGCACGGAC ATATGAATCAGCATGAATAAGAAGCTTCAAAGGCTAG TCGGAAATTTGATCTTTTTGAGAATGGTAGATTCTCTG TTTCCTTGTTACACA	XM_00 356868 9.1	PREDITO: <i>Brachypodium distachyon</i> receptor de ácido abscísico PYL8-like (LOC100844369) , mRNA
3	GMI_ES02_c 4352_145	CGACAACACTTGATGGAAGTACCATAATCTGGAAATTT CTGTCTCGCCAGCCATTTATC[C/G]GAAACTGCCTGTG CACCAAAGCATTACTGTTGGTCAGGCTACATTGCTATT TTCACCATC	-	-

As sequências relacionadas ao QTL, apesar de terem apresentado efeito aditivo significativo, não possuíram LOD alto e a região aonde se encontram possui uma resolução baixa, dado o baixo número de marcadores polimórficos. No entanto, entre os marcadores identificados com similaridade a RNA mensageiro de proteínas conhecidas, cabe ressaltar a similaridade com as proteínas *SKU5* e *PYL8*. O gene *SKU5* está relacionado com processos envolvidos no crescimento celular, participando na expansão da parede celular (Sedbrook *et al.*, 2002). Enquanto o gene *PYL8* é um receptor de ácido abscísico (ABA), relacionado com a sinalização de ABA e genes regulados por ABA envolvidos em processos de dormência, germinação e respostas a estresses (Saavedra *et al.*, 2010).

A proximidade destes genes com os locos associados à tolerância ao estresse por Al não condiciona a estarem envolvidos na tolerância. Contudo, estes QTLs identificaram duas regiões no genoma contendo genes relacionados a respostas a estresse e que podem ser utilizados como sondas, ou mesmo ter avaliadas suas expressões em resposta ao Al.

4.2 Identificação de genes

A comparação de sequências dos genes *ALMT1*, *STAR1*, *STAR2*, *MATE1*, *MATE2*, *STOP1*, *ART1*, *ALS1* e *ALS3* de diversas espécies com o banco de dados de ESTs de aveia demonstrou que há alta similaridade para a maioria dos genes (TABELA 9).

TABELA 9. Comparação de sequências de cDNA dos genes de tolerância ao alumínio e o banco de ESTs de aveia.

Gene	Acesso*	Organismo	Cobertura da sequência em aveia (ESTs)	Melhor EST Esperança	Melhor EST Identidade
<i>ALS1</i>	DQ469798.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	76,5%	0	72%
<i>ALS3</i>	AY687991.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	91,9%	e-110	67%
<i>ART1</i>	AB379846	<i>Oryza sativa</i>	36,0%	e-108	76%
<i>MATE1</i>	AB571881.1	<i>Secale cereale</i>	63,6%	0	90%
<i>MATE2</i>	AB571882.1	<i>Secale cereale</i>	100%	0	87%
<i>ALMT1</i>	AB081803.1	<i>Triticum aestivum</i>	59,3%	0	85%
<i>STOP1</i>	AT1G34370	<i>Arabidopsis thaliana</i>	43,9%	e-114	73%
<i>STAR1</i>	AB253626.1	<i>Oryza sativa</i>	91,3%	0	88%
<i>STAR2</i>	AB379845.1	<i>Oryza sativa</i>	88,5%	0	86%

*GenBank - NCBI

No entanto, apenas os genes *ALMT1* e *STOP1* foram utilizados para continuar o estudo devido a eficiente amplificação de seus produtos de PCR.

Considerando a alta identidade e cobertura dos demais genes nas ESTs do banco de aveia, futuros estudos devem ser realizados com o intuito de identificar e caracterizar os mesmos.

4.2.1 Os genes *ALMT1* e *STOP1* em aveia

Estudos prévios indicam que um dos principais mecanismos de tolerância ao Al em cereais baseia-se na exsudação de ácidos orgânicos na rizosfera, quelando o mesmo e impedindo que ocorra a interação do Al com as raízes (Collins *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2012). O gene *ALMT1* codifica um transportador de malato, considerado determinante da tolerância ao Al em trigo. E em algumas espécies, o fator de transcrição codificado por *STOP1* regula *ALMT1*. Como UFRGS 17 e UFRGS 930598 diferem na habilidade de limitar a entrada de Al nos tecidos internos da raiz (Castilhos *et al.*, 2011) é possível que haja diferenças em relação a este tipo de proteína.

A sequência obtida para o gene *ALMT1* em UFRGS 17 possui 2606 pb, 6 exons (1341 pb) e 5 introns (1265 pb) (TABELA 10). Em UFRGS 930598, a sequência gênica não foi amplificada por completo, faltando 347 pb da região aonde se encontra o primeiro exon (336 pb) e parte do primeiro intron do gene, quando comparada com a sequência gênica de UFRGS 17 (FIGURA 10). A não amplificação completa do gene *ALMT1* no genótipo sensível UFRGS 930598 pode indicar a ocorrência de significativa diferença na sequência nucleotídica ou de deleção desta parte do gene, sugerindo que o gene *ALMT1* presente no genótipo tolerante seja um gene candidato a mediar a tolerância ao Al³⁺ na população oriunda do cruzamento destes genótipos. Comparando-se a sequência protéica do gene *ALMT1* de trigo

(BAD10883.1) com a sequência protéica predita de UFRGS 17 e UFRGS 930598 (sequência parcial baseada nos sítios de *splicing* de UFRGS 17), pôde-se observar modificações ao nível de aminoácidos, com algumas longas regiões conservadas entre trigo e aveia, poucas modificações são observadas entre os genótipos de aveia (FIGURA 11). A hidrofobicidade entre as sequências protéicas é semelhante, o que sugere que todas tenham mesma localização celular.

Recentemente foi determinado que o principal ácido orgânico exsudado em cultivares de aveia da América do Norte tolerantes ao Al é o malato (Radmer *et al.*, 2012). Em um estudo recente envolvendo o genótipo UFRGS 17 demonstrou-se que este possui um mecanismo de exclusão do Al, apresentando menor presença de Al nas células do córtex da raiz na região meristemática em comparação ao genótipo UFRGS 930598 (Castilhos *et al.*, 2011). A ausência de um gene funcional envolvido na exsudação de malato, pode estar associada com a sensibilidade de UFRGS 930598 ao alumínio tóxico. No entanto, a ausência desta região inicial da sequência em UFRGS 930598 pode ser devido a problemas com a amplificação, o que não prova por si só que o gene não é funcional neste genótipo.

A sequência gênica completa de UFRGS 17 foi comparada através de BLAST com o banco de dados do NCBI confirmando que esta é homóloga ao *ALMT1*, possuindo como resultado de maior similaridade a sequência EF424085.1 do gene *ALMT1* predito em *Aegilops tauschii*, apresentando esperança 0 e identidade de 92% em uma cobertura de 50%. O motivo da cobertura do gene ter sido de apenas 50% foi o melhor

alinhamento da sequência genômica ter sido a uma sequência de RNA, o que indica que o melhor método para se fazer uma análise comparativa de sequências seja com o cDNA predito.

TABELA 10. Estrutura do gene ALMT1 em *Avena sativa* na cultivar UFRGS 17.

Sequência	Região gênica (pb)	Tamanho Exon (pb)	Tamanho Intron (pb)
Exon 1	1 – 337	337	-
Intron 1	338 – 554	-	217
Exon 2	555 – 690	136	-
Intron 2	691 – 800	-	110
Exon 3	801 – 1053	253	-
Intron 3	1054 – 1788	-	735
Exon 4	1789 – 1894	106	-
Intron 4	1895 – 1979	-	85
Exon 5	1980 – 2125	146	-
Intron 5	2126 – 2243	-	118
Exon 6	2244 – 2606	363	-
Tamanho final	2606	1341	1265

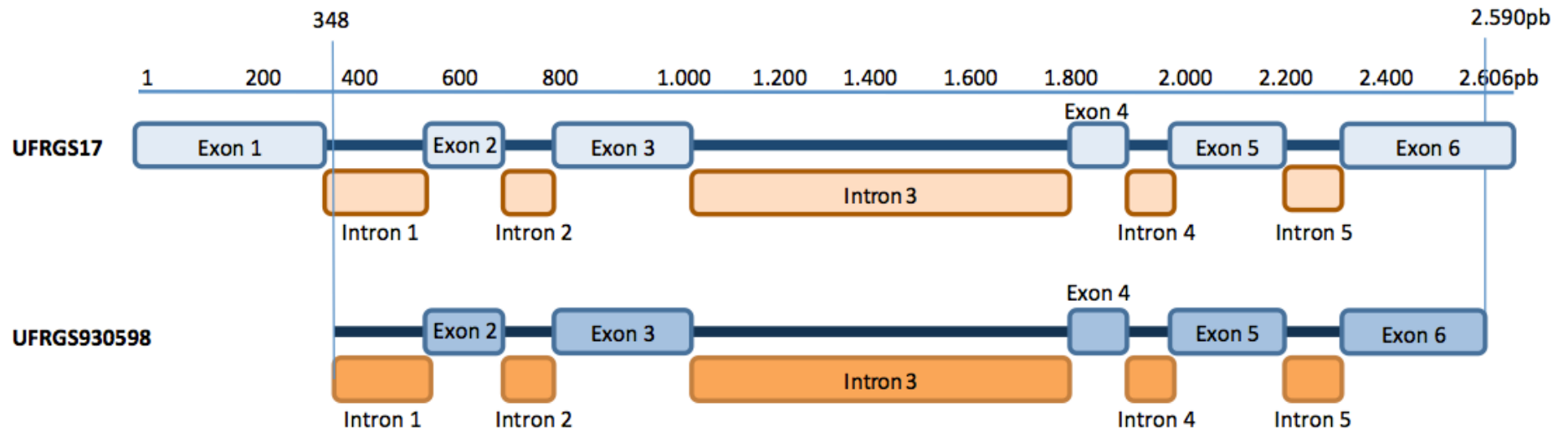


FIGURA 10. Comparação da estrutura predita do gene *ALMT1* na cultivar UFRGS 17 e sequência parcial de UFRGS 930598 de aveia.

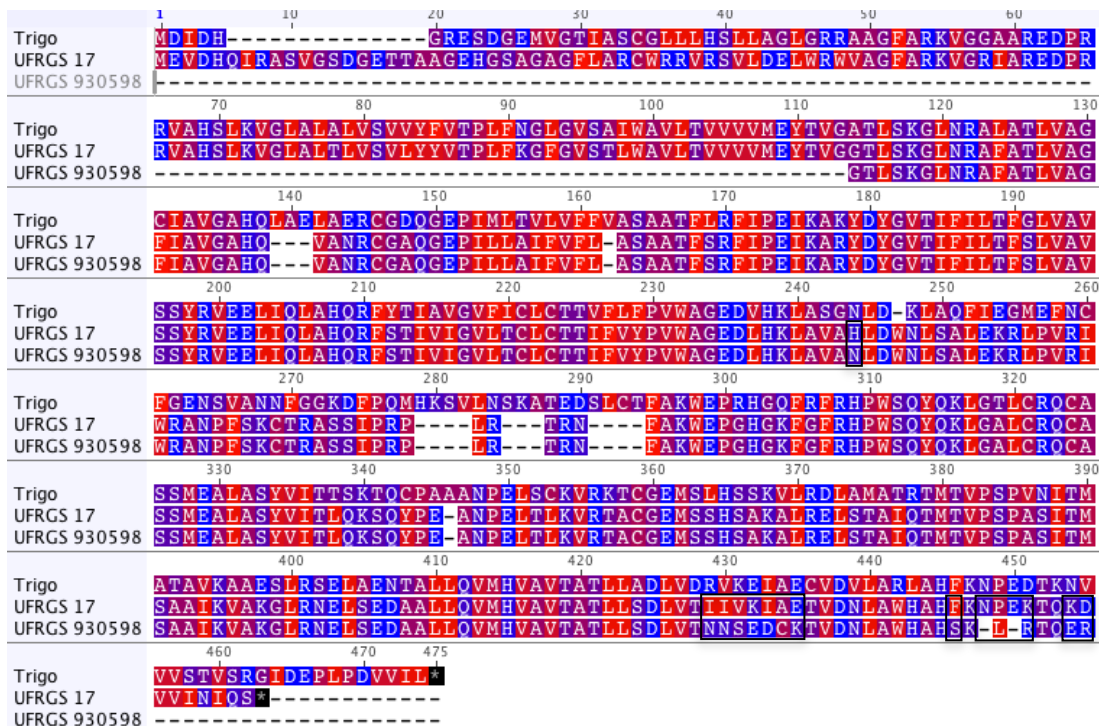


FIGURA 11. Alinhamento da sequência protéica do gene *ALMT1* de trigo (BAD10882.1) com as sequências preditas para os genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598. Regiões marcadas com retângulos indicam diferenças entre as sequências dos genótipos de aveia. Coloração de acordo com hidrofobicidade em escala de azul (hidrofilicas) a vermelho (hidrofóbicas).

A sequência homóloga ao gene *STOP1* foi identificada parcialmente para os genótipos UFRGS 17 e UFRGS 930598 (Figura 12). Esta sequência apresentou 89 % de identidade de nucleotídeos com a sequência XM_003564671.1 de *Brachypodium distachyon*, homóloga ao gene *STOP1* de arábida. A região sequenciada nestes genótipos apresentou 1391 pb e 1384 pb, respectivamente, situando-se na região entre 180 pb e 1600 pb do gene predito de *brachypodium*. Este gene, em arroz, codifica um fator de transcrição responsável pela regulação não apenas do gene *ALMT1*, mas também de outros genes envolvidos na tolerância ao Al e à acidez (Sawaki *et al.*, 2009). Quando comparadas as sequências de UFRGS 17 e UFRGS 930598 a similaridade foi de 99,2 %, indicando que existem pequenas

diferenças entre os genótipos ao nível de DNA, apresentando 11 diferenças: oito nucleotídeos polimórficos e três inserções.

UFRGS 930598	5	CTGACCTATCCAACAGGGTGTACGTTACAATCCATGGACCTGTCTTATTTTGAAGACC	64
UFRGS 17	1391	CTGACCTATCC-ACAGGGTGTACGTTACAATCCATGGACCTGTCTTATTTTGAAGACC	1333
UFRGS 930598	65	TGGCCAATCARTCCCTAGCTGTCTCCATTCTTTGCTCCTCAGTCTTCCAGTTTTGGCCT	124
UFRGS 17	1332	TGGCCAATCARTCCCTAGCTGTCTCCATTCTTTGCTCCTCAGTCTTCCAGTTTTGGCCT	1273
UFRGS 930598	125	TCCCGATGACAGTGGAGCTAAAGTGGGCGACCCGTTTGAATCGAATCCTTCACTGAACAC	184
UFRGS 17	1272	TCCCGATGACAGTGGAGCTAAAGTGGGCGACCCGTTTGAATCGAATCCTTCACTGAACAC	1213
UFRGS 930598	185	TCCTATATCAGATTGGGATCCCCAGGCAATGCTGAGCAACCTAACCTTTCTTGAGCAGAA	244
UFRGS 17	1212	TCCTATATCAGATTGGGATCCCCAGGCAATGCTGAGCAACCTAACCTTTCTTGAGCAGAA	1153
UFRGS 930598	245	GATCAAGCAGGTAAAAGATATTGTGCGTCCATGGGTAATCTAGGGAGCCAAAGTTGTTGG	304
UFRGS 17	1152	GATCAAGCAGGTAAAAGATATTGTGCGTCCATGGGTAATCTAGGGAGCCAAAGTTGTTGG	1093
UFRGS 930598	305	TGGTTCCTGCGAGCTCGCAGCAAAGCAGCAGCTTGTCACTGCTGATCTCACTTCTATCAT	364
UFRGS 17	1092	TGGTTCCTGCGAGCTCGCAGCAAAGCAGCAGCTTGTCACTGCTGATCTCACTTCTATCAT	1033
UFRGS 930598	365	AATTGAGCTTATCTCAACAGCTGGCTCTATGCTTCCCTTCGATGAAGAGCCCTCTGCTTAG	424
UFRGS 17	1032	AATTGAGCTTATCTCAACAGCTGGCTCTATGCTTCCCTTCGATGAAGAGCCCTCTGCTTAG	973
UFRGS 930598	425	CAGCAATCCAGCTGTCAGGCAACTCAACACATATGGTTCCTCCATGGGCTTTGGCTCGGT	484
UFRGS 17	972	CAGCAATCCAGCTGTCAGGCAACTCAACACATATGGTTCCTCCATGGGCTTTGGCTCGGT	913
UFRGS 930598	485	TGGCAATCAGCGGCCAAGCACAACAGGGAAGAGACAATTCCTGACTTGACCAAGACTGC	544
UFRGS 17	912	TGGCAATCAGCGGCCAAGCACAACAGGGAAGAGACAATTCCTGACTTGACCAAGACTGC	853
UFRGS 930598	545	TGACTATGAGGAGCTGATGAATACCATTAAACAACCTCATGATGAGAAGGATGAGCTGAC	604
UFRGS 17	852	TGACTATGAGGAGCTGATGAATACCATTAAACAACCTCATGATGAGAAGGATGAGCTGAC	793
UFRGS 930598	605	CAAAATGCCCAAATCCTTGTAGTGGGGAAGKGTCTGAACTGATTCTTATGGAAGACCATGA	664
UFRGS 17	792	CAAAATGCCCAAATCCTTGTAGTGGGGAAGKGTCTGAACTGATTCTTATGGAAGACCATGA	733
UFRGS 930598	665	CGTGAAGGAGAGCGATGATGGTGGTGGGGGAGAGAATCTCCCCCTGGTTCCTATGTGG	724
UFRGS 17	732	CGTGAAGGAGAGTGTGATGGTGGTGGGG-AGAGAATCTCCCCCTGGTTCCTATGTGG	674
UFRGS 930598	725	TCCTGCAATTTGGAGAAGGAGGAGATTTTAGCACCACACACTCATTCTGTGTGATATGTG	784
UFRGS 17	673	TCCTGCACTGGAGAAGGAGGAGATTTTAGCACCACACACTCATTCTGTGTGATATGTG	614
UFRGS 930598	785	GCAAGGGTTTCAAGAGAGATGCTAACCTGCGGATGCACATGAGGGGCCACGGAGACGAGT	844
UFRGS 17	613	GCAAGGGTTTCAAGAGAGATGCTAACCTGCGGATGCACATGAGGGGCCACGGAGACGAGT	554
UFRGS 930598	845	ACAAGACTCCTGCAGCTCTTGCCAAACCCATGAGAGATTCTGGCTTAGATCATACACCAG	904
UFRGS 17	553	ACAAGACTCCTGCAGCTCTTGCCAAACCCATGAGAGATTCTGGCTTAGATCATACACCAG	494
UFRGS 930598	905	TTACAAGTACTCTTGCCCAATTTGTGGTTGCAAGCGGAACAAGGAGCACAGGAAGTCC	964
UFRGS 17	493	TTACAAGTACTCTTGCCCAATTTGTGGTTGCAAGCGGAACAAGGAGCACAGGAAGTCC	434
UFRGS 930598	965	AGCCTCTCAAGACAATCTTGTGTGGAAGAACCCACTACAAGAGAGCCACTGCGACAAAG	1024
UFRGS 17	433	AGCCTCTCAAGACAATCTTGTGTGGAAGAACCCACTACAAGAGAGCCACTGCGACAAAG	374
UFRGS 930598	1025	GCTATACCTGCAGCCGATGCAACACCAAGAAGTTCTCGGTTCATCGCGGACTTGAAGACTC	1084
UFRGS 17	373	GCTATACCTGCAGCCGATGCAACACCAAGAAGTTCTCGGTTCATCGCGGACTTGAAGACTC	314
UFRGS 930598	1085	ATGAGAAGCACTGCGGGCGCGACAAGTGGCTGTGCTCATGTGGAACGACCTTCTCAAGAA	1144
UFRGS 17	313	ATGAGAAGCACTGCGGGCGCGACAAGTGGCTGTGCTCATGTGGAACGACCTTCTCAAGAA	254
UFRGS 930598	1145	AGGACAAGCTGTTTGGGCATGTGCGCCCTTTTCCAAGGGCACACCTGCTCTTCACATGG	1204
UFRGS 17	253	AGGACAAGCTGTTTGGGCATGTGCGCCCTTTTCCAAGGGCACACCTGCTCTTCACATGG	194
UFRGS 930598	1205	ATGATCTGAAAGCAACAGGAGCATCGGAGCAGCCTCAGGGGAGCGAGGCGATGGAAGACA	1264
UFRGS 17	193	ATGATCTGAAAGCACAGGAGCATCGGAGCAGCCTCAGGGGAGCGAGGCGATGGAAGACA	134
UFRGS 930598	1265	TGGTAGGGAGCGCAGGGTACAACCTCCCTGGCAGCACGTCCGACGGCATCCCGAATCTCG	1324
UFRGS 17	133	TGGTAGGGAGCGCAGGGTACAACCTCCCTGGCAGCACGTCCGACGGCATCCCGAATCTCG	74
UFRGS 930598	1325	ACATGAAAGTCGATGATACTCGTGGCTATTTCTCGCCGTTGAACTTCGATCCGTGCT	1381
UFRGS 17	73	ACATGAAAGTCGATGATACTCGTGGCTATTTCTCGCCGTTGAACTTCGATCCGTGCT	17

FIGURA 12. Alinhamento entre as sequências nucleotídicas do gene *STOP1* de UFRGS 930598 e UFRGS 17. Ausência de traços entre as sequências indicam polimorfismo entre ambas.

A ausência da sequência completa do gene *STOP1*, impossibilitou uma avaliação mais detalhada do gene para se buscar diferenças entre os parentais. Além disto, a partir da sequência obtida, pôde ser observado que não houve grande similaridade (61,2 %) da região sequenciada com o gene *STOP1* identificado em *Arabidopsis thaliana* (AT1G34370).

Em arroz, o gene *ALMT1* tem sua expressão regulada pelo gene *STOP1*. Sugere-se que o gene *ALMT1*, responsável pela produção de uma proteína envolvida com o transporte de malato para rizosfera, juntamente ao gene *STOP1*, fator de transcrição que regula o nível de expressão do gene *ALMT1*, sejam dois genes essenciais para tolerância ao Al (Iuchi *et al.*, 2007; Iuchi *et al.*, 2008; Sawaki *et al.*, 2009).

4.2.2 Árvore filogenética dos genes *ALMT1* e *STOP1*

A partir da análise comparativa entre as sequências de proteína homólogas ao gene *ALMT1* (TABELA 11) e de RNA ao gene *STOP1* (TABELA 12) em aveia e os melhores resultados provenientes do BLAST destas no NCBI, foram obtidas sequências de diferentes espécies, as quais foram utilizadas para construção de duas árvores filogenéticas comparativas entre espécies da família Poaceae.

TABELA 11. Comparação de sequências de proteína do gene *ALMT1* de outras espécies com a sequência predita do genótipo UFRGS 17 de aveia.

Organismo	Acesso*	Cobertura	Identidade	Esperança
<i>Hordeum vulgare</i>	ACJ15441.1	100%	80%	0,0
<i>Secale cereale</i>	ACB05980.1	99%	81%	0,0
<i>Aegilops tauschii</i>	ABQ59606.1	100%	81%	0,0
<i>Brachypodium distachion</i>	XP_003579717.1	100%	77%	0,0
<i>Sorghum bicolor</i>	XP_002447812.1	92%	69%	0,0
<i>Zea mays</i>	NP_001132468.1	93%	65%	0,0
<i>Oryza sativa</i>	CAH67598.1	92%	77%	0,0
<i>Triticum aestivum</i>	BAD10882.1	100%	63%	0,0

*GenBank – NCBI

TABELA 12. Comparação de sequências de cDNA do gene *STOP1* de outras espécies com a sequência parcial predita do genótipo UFRGS 17 de aveia.

Organismo	Acesso*	Cobertura	Identidade	Esperança
<i>Brachypodium distachion</i>	XM_003564671.1	98%	89%	0,0
<i>Hordeum vulgare</i>	AK252406.1	98%	88%	0,0
<i>Oryza sativa</i>	NM_001051470.1	98%	83%	0,0
<i>Zea mays</i>	NM_001156256.1	97%	82%	0,0
<i>Populus trichocarpa</i>	XM_002327294.1	39%	76%	2e-67

*GenBank - NCBI

Para o gene *ALMT1* foi construída uma árvore filogenética pelo modelo de distância genética de Jukes-Cantor, pelo método “*Neighbor-Joining*”, com alinhamento global assumindo uma matriz de 93% de similaridade, com penalidade de GAP de 12 e penalidade de 3 de extensão (FIGURA 13). Neste modelo pode ser observado que o gene *ALMT1* de

aveia apresentou proximidade filogenética com cevada (*Hordeum vulgare*), centeio (*Secale cereale*) e um ancestral diploide de trigo (*Aegilops tauschii*).

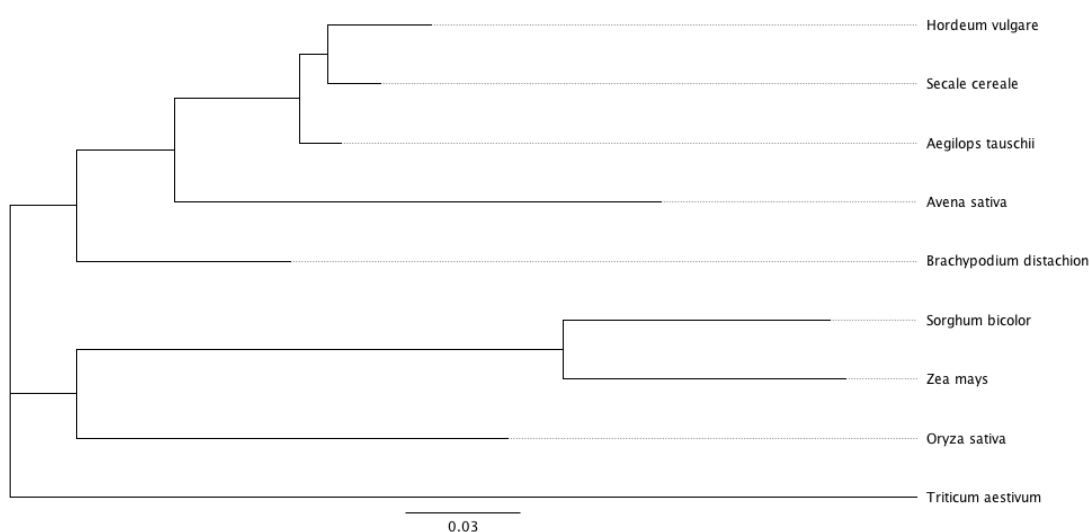


FIGURA 13. Árvore filogenética do gene *ALMT1* em gramíneas através da análise comparativa de sequência protéica.

A proximidade do gene *ALMT1* de aveia com *Aegilops tauschii* é uma forte evidência da origem comum destas sequências em poaceas, observada a distância do mesmo para trigo. *Aegilops tauschii* destacou-se dentre os gêneros silvestres como potencial candidato a doador de genes de interesse para trigo por apresentar alta homologia cromossômica (Gill & Raupp, 1987). Isto sugere que o gene identificado em trigo possuiu uma origem em comum com o gene de aveia, sendo genes ortólogos e descartando a hipótese de genes parálogos. A proximidade com centeio, cereal com maior tolerância ao Al, que utiliza o gene *ALMT1* como um dos mecanismos de tolerância (Collins *et al.*, 2008) sugere a importância do mesmo para a tolerância em aveia. Contudo, cevada também apresentou proximidade com aveia e é extremamente sensível ao Al. Inclusive a inserção do gene *ALMT1* de trigo em cevada aumentou a tolerância do mesmo (Delhaize *et al.*, 2004). Em trigo, a tolerância ao Al é dependente da presença de determinados elementos cis na região promotora. Assim,

avaliações da expressão destes genes são necessárias, bem como avaliação da secreção de malato.

Para o gene *STOP1*, foi construída uma árvore filogenética pelo modelo de distância genética de Tamura-Nei, pelo método de “Neighbor-Joining”, com alinhamento global assumindo uma matriz de 70 % de similaridade, com penalidade de GAP de 12 e penalidade de 3 de extensão (FIGURA 14). Nesta árvore filogenética pode se observar que o gene *STOP1* em aveia, apesar de ter apresentado uma alta similaridade com *Brachypodium distachyon*, quando comparado através de BLAST, não ficou tão próximo do grupo. No entanto, cevada (*Hordeum vulgare*), a qual sabe-se que o genoma possui grande homologia com o genoma de aveia, está próxima a *Brachypodium distachyon*. Isto pode indicar que a sequência de aveia formou um grupo externo aos demais por estar incompleta.

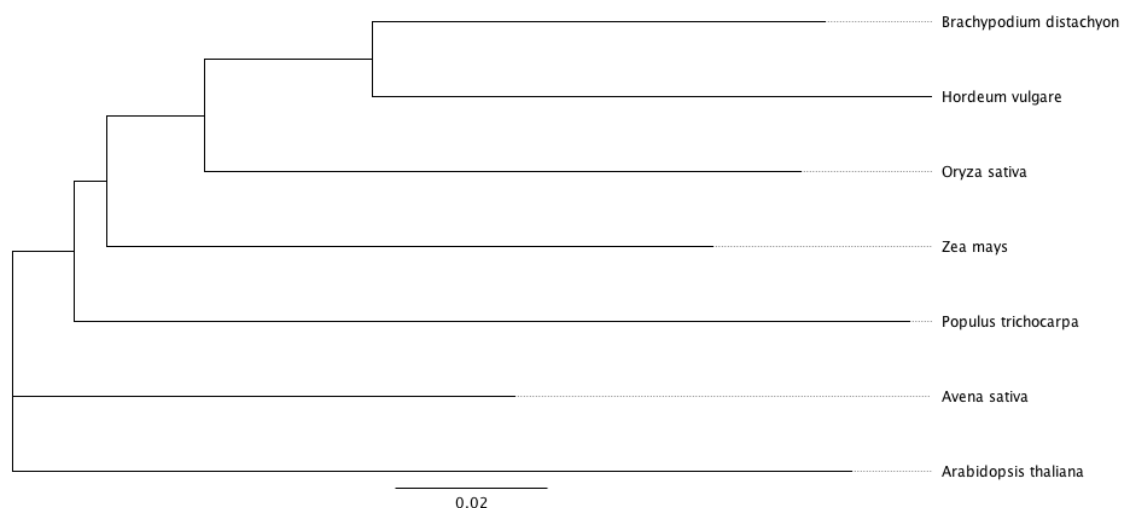


FIGURA 14. Árvore filogenética do gene *STOP1* baseada nos melhores escores de BLAST com a sequência parcial de aveia (UFRGS 17).

4.2.3 Estrutura e sequência proteica

A sequência candidata do gene *ALMT1* identificada no genótipo de aveia UFRGS 17 foi analisada ao nível de proteína através do software Geneious e Phyre2. A sequência predita possui 447 aminoácidos (FIGURA 15). A partir do BLAST da sequência no NCBI foi observada 81 % de similaridade com a sequência ABQ59606.1 da proteína *ALMT2* em *Aegilops tauschii*, com esperança de 0,0. Foi encontrado a mesma esperança para as sequências ACB05980.1 de centeio (*Secale cereale*), ABQ59605.1 e ACJ15441.1 de cevada (*Hordeum vulgare*), XP_003579717.1 de *Brachypodium distachyon*, CAH67598.1 de arroz (*Oryza sativa*), XP_002447812.1 de sorgo (*Sorghum bicolor*), BAD10882.1, Q76LB1.1 e AAZ22849.1 de trigo (*Triticum aestivum*) e NP_001132468.1 e ACF82892.1 de milho (*Zea mays*). A exceção da primeira sequência de *Aegilops tauschii*, a qual foi indicada como proteína proveniente do gene *ALMT2*, todas as demais foram descritas como sequências de proteína *ALMT1*. Isto pode indicar que o gene *ALMT2*, até hoje não descrito na literatura, seja na verdade o alelo *ALMT1-2* de trigo descrito por Sasaki *et al.* em 2004.

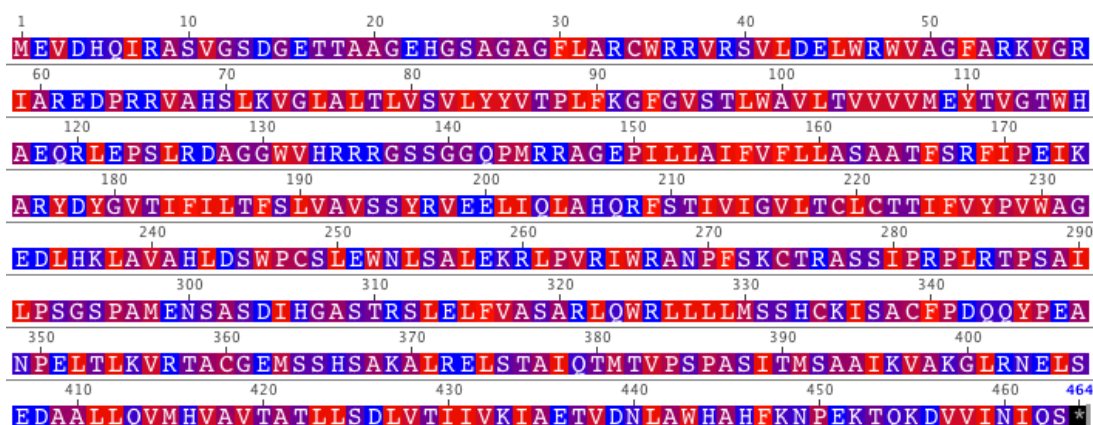


FIGURA 15. Sequência predita da proteína *ALMT1* em UFRGS 17 de acordo com hidrofobicidade em escala de azul (hidrofílicas) a vermelho (hidrofóbicas).

A sequência proteica foi avaliada no aplicativo Phyre2 (Kelley & Sternberg, 2009), no qual foi predita como uma proteína localizada na membrana plasmática, com seis domínios transmembrana (TABELA 13). Em trigo, o gene *ALMT1* codifica uma proteína ativada por Al, a qual é um transportador de malato que confere tolerância ao Al. A topologia desta proteína, localizada na membrana plasmática foi investigada em trigo através de técnicas imunocitoquímicas. O estudo definiu a presença de seis domínios transmembrana com a região amino e carboxi terminal localizadas na região extracelular da membrana (Motoda *et al.*, 2007). A análise do aplicativo Phyre2 sugeriu o mesmo modelo de estrutura secundária para a proteína predita em aveia (FIGURA 16). A semelhança entre ambas predições sugere que as proteínas possuam estrutura semelhante. A sequência de UFRGS 17 ainda foi avaliada pelo mesmo aplicativo para determinação do modelo 3D da proteína (FIGURA 17).

TABELA 13. Regiões identificadas como hélices transmembranas da proteína predita de *ALMT1* no genótipo UFRGS 17 de aveia.

N	Região transmembrana	Região (aa)	Comprimento (aa)
1	AHSLKVGLALTLVSVLYY	68-85	18
2	LWAVLTVVVVMEYTVG	98-113	16
3	LNRAFATLVAGFIAVGAHQVA	120-140	21
4	PILLAIFVFLASAATFSRFIP	149-169	21
5	TIFILTFSLVAVSSYR	180-195	16
6	RFSTIVIGVLTCLCTTIFVYPVW	206-228	23

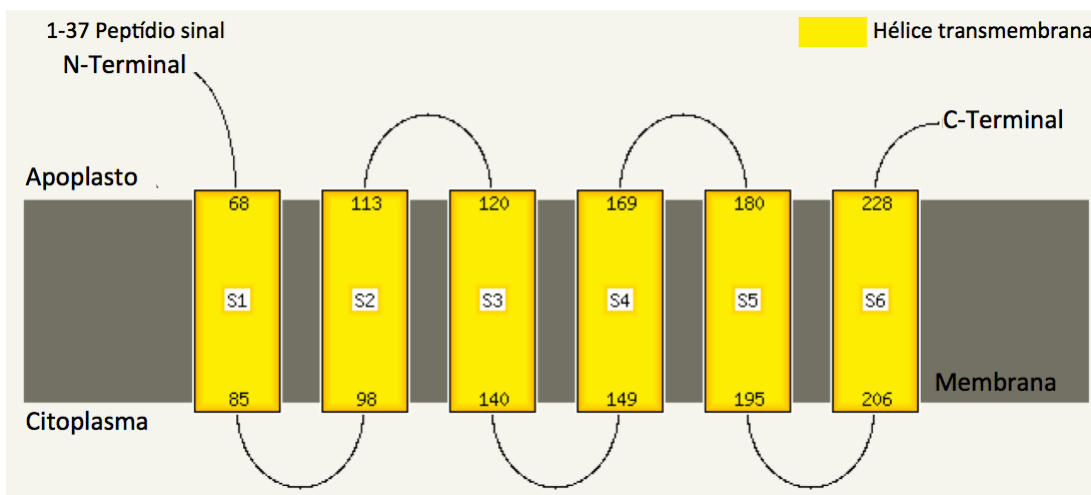


FIGURA 16. Estrutura secundária predita e localização da proteína codificada pelo gene *ALMT1* do genótipo UFRGS 17 de aveia pelo aplicativo Phyre2.

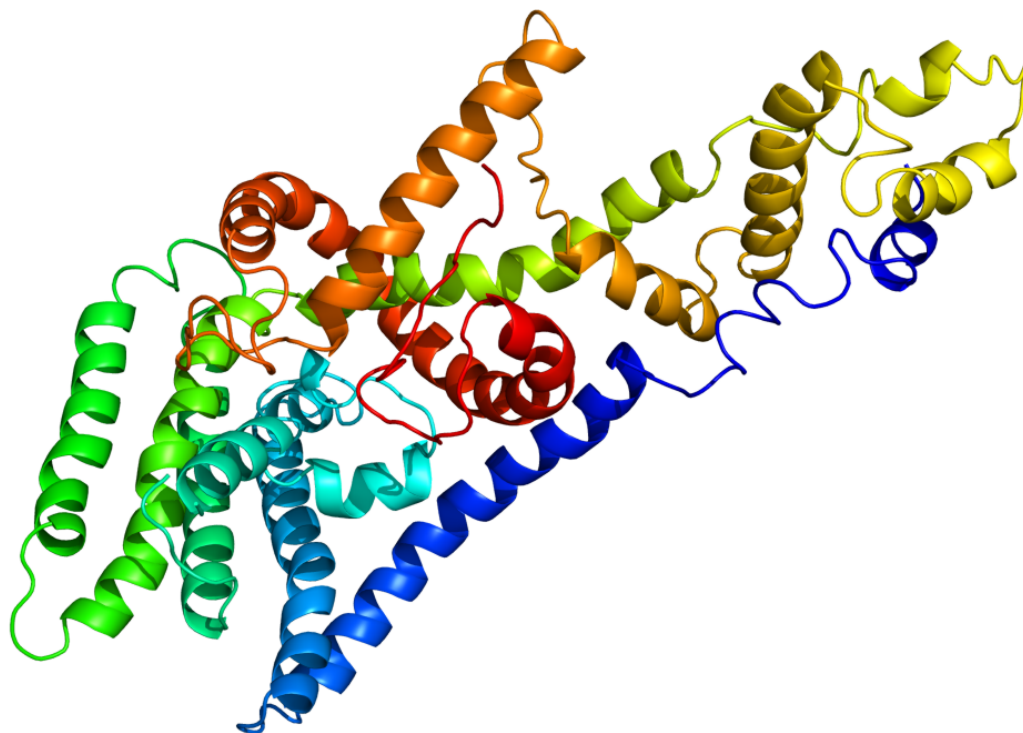


FIGURA 17. Estrutura terciária predita pelo aplicativo Phyre2 da proteína *ALMT1* em aveia.

Em aveia, estudos ao nível de expressão quantitativa devem ser realizados para determinar se há um aumento da expressão deste gene conforme o tempo de exposição ao AI. Em trigo, foi inicialmente considerado

que o gene *ALMT1* era um gene constitutivo na planta, diferindo apenas na presença de alelos que produziriam proteínas com diferentes eficiências e no nível de expressão dos mesmos entre genótipos tolerantes e sensíveis (Sasaki *et al.*, 2004). No entanto, mais recentemente foi identificado, em trigo, que a proteína do gene *ALMT1* possui uma alta especificidade com Al, sendo que apesar de possuir uma expressão constitutiva em um nível basal, quando há a exposição ao Al há um aumento no nível de produção da proteína (Ligaba *et al.*, 2009). Em centeio também é observada uma regulação positiva na expressão do gene de acordo com o tempo de exposição ao Al (Collins *et al.*, 2008). A quantificação da secreção de malato também deve ser analisada, uma vez que fatores pós-transcricionais podem afetar a estabilidade e atividade das proteínas.

Essas análises devem ser realizadas em ambos os genótipos para verificar se esse é o mecanismo que causa diferença na tolerância ao Al dos mesmos. O que poderá ser confirmado com a posterior análise das linhagens segregantes desenvolvidas a partir destes genótipos.

5 CONCLUSÕES

O número de marcadores polimórficos utilizados para o mapeamento de QTLs foi limitante, no entanto, a identificação de QTLs associados à tolerância ao Al em hidroponia sugere regiões cromossômicas para o estudo da tolerância ao Al.

O gene *ALMT1*, considerado um dos principais genes que confere tolerância ao Al em gramíneas, foi neste trabalho identificado pela primeira vez em aveia. A sequência identificada permite a predição de proteína de membrana plasmática com características similares daquela identificada em trigo.

Foram observadas diferenças entre os alelos de *ALMT1* obtidos em UFRGS 17 e UFRGS 930598, porém a obtenção da sequência parcial neste último não permite concluir a funcionalidade deste.

Considerando a similaridade obtida também no gene *STOP1* acredita-se que este mecanismo de resposta à acidez e ao Al tenha sido conservado em aveia.

6 PERSPECTIVAS

Para o gene *ALMT1* estudos devem ser realizados com o intuito de identificar e diferenciar os três alelos possíveis, visto que aveia é hexaplóide. A expressão do gene *ALMT1* está sendo avaliada sob diferentes tempos de estresse para conferir se é um gene constitutivo ou induzível pelo estresse de AI. A presença do alelo funcional deve ser avaliada nas linhagens consideradas tolerantes da progenie para confirmar a importância deste gene na tolerância ao AI nesta população de aveia. O gene *STOP1* deve ser isolado e clonado por completo, para que seja analisada a sequência proteica e seu controle sob o gene *ALMT1* em aveia.

Outros genes devem ser avaliados para a tolerância ao AI, visto que possuem alta similaridade com sequências expressas de aveia. A interação destes genes deve ser avaliada no intuito de se identificar a rota de tolerância ao AI em aveia.

Marcadores devem ser desenvolvidos nas regiões dos genes *ALMT1* e *STOP1* com polimorfismo entre os parentais para que seja possível o mapeamento destes genes na população e se avaliar se os mesmos estão na região dos QTLs identificados. Novos marcadores devem ser incorporados para uma melhor resolução e cobertura do mapa genético.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ANDRADE, L. R. M. et al. Al-hyperaccumulator Vochysiaceae from the Brazilian Cerrado store aluminum in their chloroplasts without apparent damage. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 70, n. 1, p. 37-42, 2011.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Los Angeles, v. 55, n. 1, p. 373-399, 2004.

BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses , root exudates , and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 48, n. 2, p. 75-92, 2002.

BURNETTE, D. et al. Marketing, processing and uses of oat for food. In: MARSHALL, H. G.; SORRELLS, M. E. (Ed.). **Oat science and technology**. Madison, Wisconsin: Crop Science Society of America, 1992. p. 247-263.

BURRELL, S.-A. M.; EXLEY, C. There is (still) too much aluminium in infant formulas. **BMC Pediatrics**, London, v. 10, n. 63, p. 1-4, 2010.

CASTILHOS, G. et al. Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 74, n. 1, p. 114-121, 2011.

COLLINS, N. C. et al. An ALMT1 gene cluster controlling aluminum tolerance at the Alt4 locus of rye (*Secale cereale* L). **Genetics**, Bethesda, v. 179, n. 1, p. 669-682, 2008.

CUI, X. et al. The effects of chronic aluminum exposure on learning and memory of rats by observing the changes of Ras/Raf/ERK signal transduction pathway. **Food and Chemical Toxicology**, Andover, v. 50, n. 2, p. 315-319, 2012.

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

DELHAIZE, E. et al. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) - I. uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 103, n. 1, p. 685-693, 1993.

DELHAIZE, E. et al. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. **PNAS**, Washington, v. 101, n. 42, p. 15249-15254, 2004.

DRUMMOND, A. J. et al. **Geneious v5.5**. Disponível em: <<http://www.geneious.com>>. Acesso em: 18 abr. 2011.

EXLEY, C. A molecular mechanism of aluminium-induced Alzheimer ' s disease ? **Journal of Inorganic Biochemistry**, Columbia, v. 76, n. 1, p. 133-140, 1999.

EXLEY, C. Aluminium-based adjuvants should not be used as placebos in clinical trials. **Vaccine**, Rochester, v. 29, n. 50, p. 9289, 2011.

FAOSTAT. **Base de dados estatísticos da agricultura mundial**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 09 abr. 2012.

FEDERIZZI, L. C. Progressos no melhoramento genético de aveia no Brasil, história, principais resultados e perspectivas futuras. In: REUNIÃO DA COMISSÃO BRASILEIRA DE PESQUISA DE AVEIA, 22., 2002, Passo Fundo. **Anais...** Passo Fundo: UPF, 2002. p. 45-63.

GILL, B. S.; RAUPP, W. J. Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. **Crop Science**, Madison, v. 27, n. 3, p. 445-450, 1987.

GUO, P. et al. Transcriptional analysis between two wheat near-isogenic lines contrasting in aluminum tolerance under aluminum stress. **Molecular Genetics and Genomics**, Gotemburgo, v. 277, n. 1, p. 1-12, 2007.

HEBSGAARD, S. M. et al. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 24, n. 17, p. 3439-3452, 1996.

HOEKENGA, O. A. et al. AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. **PNAS**, Washington, v. 103, n. 25, p. 9738-9743, 2006.

HUANG, C. F. et al. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. **The Plant cell**, Waterbury, v. 21, n. 2, p. 655-667, 2009.

HUANG, C.-F.; YAMAJI, N.; MA, JIAN FENG. Knockout of a bacterial-type ATP-binding cassette transporter gene, AtSTAR1, results in increased aluminum sensitivity in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 153, n. 4, p. 1669-1677, 2010.

IUCHI, S. et al. STOP1, a Cys2/His2 type zinc-finger protein, plays critical role in acid soil tolerance in Arabidopsis. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 3, n. 2, p. 128-130, 2008.

IUCHI, S. et al. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. **PNAS**, Washington, v. 104, n. 23, p. 9900-9905, 2007.

JELLEN, E. N.; PHILLIPS, R. L.; RINES, H. W. C-banded karyotypes and polymorphisms in hexaploid oat accessions (*Avena* spp.) using Wright's stain. **Genome**, Ottawa, v. 36, n. 6, p. 1129-1137, 1993.

JELLEN, E. N.; BEARD, J. Geographical distribution of a chromosome 7C and 17 intergenomic translocation in cultivated oat. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 1, p. 256, 2000.

KAMPRATH, E. J.; FOY, C. D. Lime-fertilizer plant interactions in acid soils. In: ENGELSTAD, O. P. (Ed.). **Fertilizer technology use**. Madison: Soil Science Society of America, 1985. p. 91-151.

KELLEY, L. A; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature protocols**, Londres, v. 4, n. 3, p. 363-371, 2009.

KINRAIDE, T. B. Identity of the rhizotoxic aluminum species. **Plant and Soil**, Crawley, v. 134, n. 1, p. 167-178, 1991.

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**, Los Angeles, v. 55, n. 2, p. 459-493, 2004.

KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; HOEKENGA, O. A. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. **Plant and Soil**, Crawley, v. 274, n. 1, p. 175-195, 2005.

LADIZINSKY, G. Chromosome rearrangements in the hexaploid oats. **Heredity**, Gales, v. 25, n. 1, p. 457-461, 1970.

LANDER, E. S. et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, Boston, v. 1, n. 2, p. 174-181, 1987.

LARSEN, P. B. et al. Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. **Planta**, Heidelberg, v. 225, n. 6, p. 1447-1458, 2007.

LARSEN, P. B. et al. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Londres, v. 41, n. 3, p. 353-363, 2005.

LI, Q.-Y. et al. Transgenic barley with overexpressed PTRx increases aluminum resistance in roots during germination. **Journal of Zhejiang University**, Hangzhou. v. 11, n. 11, p. 862-870, 2010.

LIGABA, A.; KOCHIAN, L.; PIÑEROS, M. Phosphorylation at S384 regulates the activity of the TaALMT1 malate transporter that underlies aluminum resistance in wheat. **The Plant Journal**, London, v. 60, n. 3, p. 411-423, 2009.

LIMBERGER, E. **Identificação de genes responsivos ao alumínio tóxico em aveia branca (Avena sativa L.)**. 85 f. 2006. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

LIU, J. et al. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. **The Plant journal**, Londres, v. 57, n. 3, p. 389-399, 2009.

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

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

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

MERIGA, B. et al. Aluminium-induced production of oxygen radicals , lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). **Journal of Plant Physiology**, Irvine, v. 161, n. 4, p. 63-68, 2004.

MOHANTY, S. et al. Effect of a low dose of aluminum on mitotic and meiotic activity, 4C DNA content, and pollen sterility in rice, *Oryza sativa* L. cv. Lalat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Albany, v. 59, n. 1, p. 70-75, 2004.

MOTODA, H. et al. The Membrane Topology of ALMT1, an Aluminum-Activated Malate Transport Protein in Wheat (*Triticum aestivum*). **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 2, n. 6, p. 467-472, 2007.

NAVA, I. C. **Caracterização genética e molecular de fatores associados a resposta à vernalização para o florescimento em aveia**. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

NAVA, I. C. et al. Inheritance of aluminum tolerance and its effects on grain yield and grain quality in oats (*Avena Sativa* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 148, n. 3, p. 353-358, 2006.

OGIMOTO, M. et al. Aluminium content in foods with aluminium-containing food additives. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, Tóquio, v. 53, n. 1, p. 57-62, 2012.

OLIVEIRA, P. H. et al. Inheritance in oat (*Avena sativa* L) of tolerance to soil aluminum toxicity. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 5, n. 7, p. 302-309, 2005.

PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 4, n. 7, p. 592-597, 2009.

PANDA, S. K.; MATSUMOTO, H. Molecular physiology of aluminum toxicity. **The Botanical Review**, New York, v. 73, n. 12, p. 326-347, 2007.

PETERSON, D. M. Composition and nutritional characteristics of oat grain and products. In: MARSHALL, H. G.; SORRELLS, M. E. (Ed.). **Oat Science and Technology**, Madison, p. 265-292, 1992.

PINEROS, M. A. et al. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 129, n. 7, p. 1194-1206, 2002.

PINEROS, M. A. et al. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 137, n. 1, p. 231-241, 2005.

RADMER, L. et al. Aluminum resistance mechanisms in oat (*Avena sativa* L.). **Plant and Soil**, Crawley, v. 351, n. 1, p. 121-134, 2012.

ROSSIELLO, R. O.; NETTO, J. J. Toxidez de alumínio em plantas: novos enfoques para um velho problema. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**, Viçosa, p. 375-418, 2006.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (Ed.). **Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Totowa: Humana Press, 2000. p. 365-386.

RYAN, P. R.; DITOMASO, J. M.; KOCHIAN, L. V. Aluminium toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 437-446, 1993.

SAAVEDRA, X. et al. The nuclear interactor PYL8/RCAR3 of *Fagus sylvatica* FsPP2C1 is a positive regulator of abscisic acid signaling in seeds and stress. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 152, n. 1, p. 133-150, 2010.

SANZ, M. J. et al. A new chromosome nomenclature system for oat (*Avena sativa* L. and *A. byzantina* C. Koch) based on FISH analysis of monosomic lines. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 121, n. 8, p. 1541-1552, 2010.

SASAKI, T. et al. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. **The Plant Journal**, London, v. 37, n. 5, p. 645-653, 2004.

SAWAKI, Y. et al. STOP1 regulates multiple genes that protect arabidopsis from proton and aluminum toxicities. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 150, n. 1, p. 281-294, 2009.

SCHLINDWEIN, J. A. et al. Redução da toxidez de alumínio em raízes de soja por culturas antecessoras no sistema de plantio direto. **Revista Brasileira de Agrociências**, Pelotas, v. 9, n. 1, p. 85-88, 2003.

SEDBROOK, J. C. et al. The arabidopsis SKU5 gene encodes an extracellular glycosyl phosphatidylinositol – anchored glycoprotein involved in directional root growth. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 14, n. 7, p. 1635-1648, 2002.

SILVA, S. et al. Al toxicity mechanism in tolerant and sensitive rye genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 75, n. 8, p. 89-97, 2012.

SIMONOVICOVÁ, M. et al. Root growth inhibition by aluminum is probably caused by cell death due to peroxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Protoplasma**, Viena, v. 224, n. 10, p. 91-98, 2004.

SIVAGURU, M. et al. Aluminum-Induced 1->3-B-D-Glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminum toxicity in plants. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 124, n. 11, p. 991-1005, 2000.

SORENSEN, J. R. et al. Aluminum in the environment and human health. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 8, n. 8, p. 3-95, 1974.

SUTTIE, J. M.; REYNOLDS, S. G. **Fodder oats**: a world overview. Rome: FAO, 2004. p. 65-79.

SÁNCHEZ-CHACÓN, C. D. et al. Variabilidade genética e herança da tolerância à toxicidade do alumínio em aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 9, p. 1797-1808, 2000.

TAMÁS, L. et al. Aluminum-induced cell death of barley-root border cells is correlated with peroxidase- and oxalate oxidase-mediated hydrogen peroxide production. **Plant Cell Reports**, Strasbourg, v. 24, n. 3, p. 189-194, 2005.

THOMAS, H. Cytogenetics of *Avena*. In: MARSHALL, H. G.; SORRELLS, M. E. (Ed.). **Oat Science and Technology**, Madison, p. 473-507, 1992.

TINKER, N. A.; MATHER, D. E. MQTL: software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. **Journal of Agricultural Genomics**, Quebec, v. 1, n. 1, p. 1-4, 1995.

TSUTSUI, T.; YAMAJI, N.; FENG MA, J. Identification of a cis-acting element of ART1, a C2H2-type zinc-finger transcription factor for aluminum tolerance in rice. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 156, n. 2, p. 925-931, 2011.

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

VOORRIPS, R. E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 77-78, 2002.

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

WATANABE, T. et al. Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. **The New Phytologist**, Lancaster, v. 178, n. 3, p. 581-789, 2008.

WIGHT, C. P. et al. Identification of molecular markers for aluminium tolerance in diploid oat through comparative mapping and QTL analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Stuttgart, v. 112, n. 2, p. 222-231, 2006.

XIA, J. et al. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. **PNAS**, Washington, v. 107, n. 43, p. 18381-18385, 2010.

XUE, Y. J.; TAO, L.; YANG, Z. M. Aluminum-induced cell wall peroxidase activity and lignin synthesis are differentially regulated by jasmonate and nitric oxide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 56, n. 9, p. 9676-9684, 2008.

YAMAJI, N. et al. A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 21, n. 10, p. 3339-3349, 2009.

YOKOSHO, K.; YAMAJI, N.; MA, J. F. Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 37, n. 4, p. 296-303, 2010.

ZATTA, P. et al. Aluminium (III) as a promoter of cellular oxidation. **Coordination Chemistry Reviews**, Toronto, v. 228, n. 3, p. 271-284, 2002.

ZHAO, J. et al. Suppression of phospholipase *Dys* confers increased aluminum resistance in *Arabidopsis thaliana*. **PloS**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. 1-11, 2011.

8 APÊNDICE

APÊNDICE 1. Laudo de análise de solo

Amostra	Argila (%)	pH	Índice SMP	P (mg/dm ³)	K (mg/dm ³)	M.O. (%)	Al _{troc} (cmol/dm ³)	Ca _{troc} (cmol/dm ³)
1	53	4,7	4,9	44	212	2,8	2,9	1,5
2	53	4,9	4,9	22	245	2,6	2,4	1,4
3	56	4,7	4,9	33	272	2,7	2,7	1,3
4	48	4,9	4,9	21	244	2,4	2,6	1,2
5	54	4,7	4,9	27	177	2,5	2,5	0,9
6	50	4,7	4,9	55	222	2,5	3,0	1,3
Amostra	Al+H (cmol/dm ³)	CTC (cmol/dm ³)	% SAT da CTC		Relações			Mg _{troc} (cmol/dm ³)
			BASES	Al	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	
1	15,4	18,2	15	51,0	2,5	2,8	1,1	0,6
2	15,4	18,0	14	47,8	2,8	2,2	0,8	0,5
3	15,4	18,0	14	51,0	2,6	1,9	0,7	0,5
4	15,4	17,8	13	52,0	2,4	1,9	0,8	0,5
5	15,4	17,1	10	59,2	3,0	2,0	0,7	0,3
6	15,4	17,9	13	54,8	2,6	2,3	0,9	0,5
Amostra	S (mg/dm ³)	Zn (mg/dm ³)	Cu (mg/dm ³)	B (mg/dm ³)	Mn (mg/dm ³)	Fe (g/dm ³)		
1	1,2	1,2	2,1	1,0	81	1,7		
2	0,7	0,7	2,4	1,0	50	2,1		
3	0,8	0,8	2,5	0,9	54	1,3		
4	1,3	1,3	2,9	1,0	42	1,2		
5	1,0	1,0	2,9	0,9	37	1,1		
6	1,3	1,3	3,1	1,0	60	1,4		

APÊNDICE 2. Análise do cariótipo

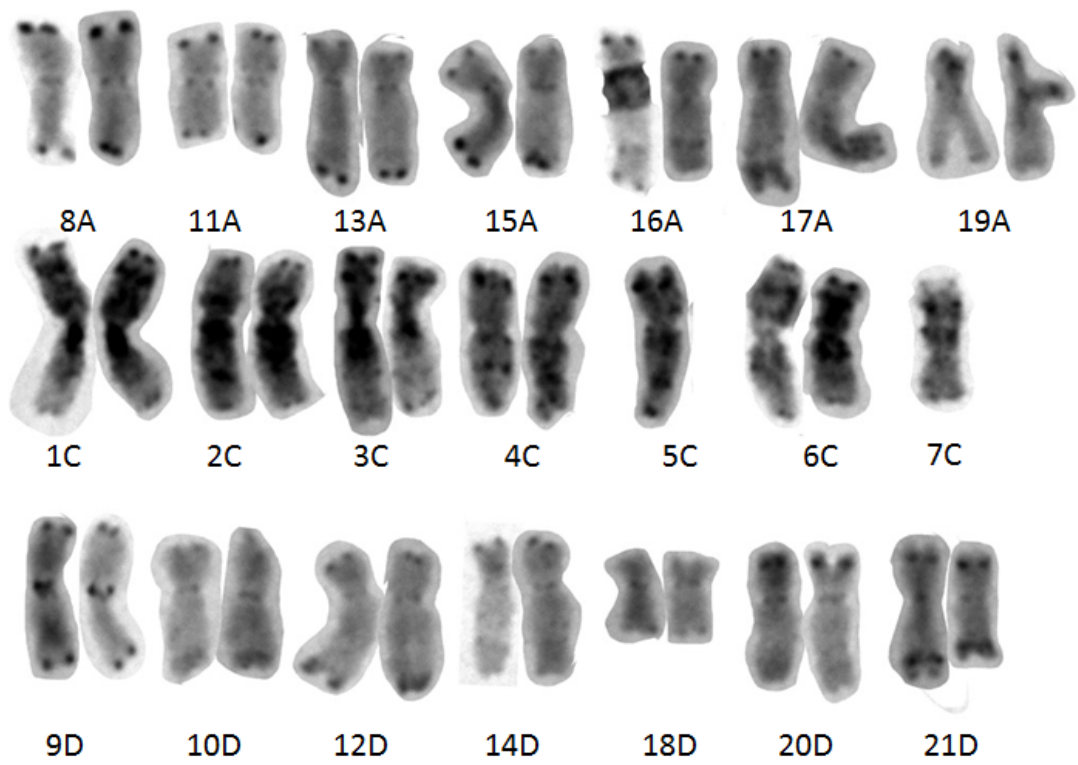
Através da cariotipagem dos genótipos parentais pela técnica de coloração de bandas C, pode-se observar os 21 cromossomos de UFRGS 17 e UFRGS 930598 e suas características. A nomenclatura dos cromossomos está de acordo com o sistema de nomenclatura estabelecido por Sanz *et al.* em 2010. A partir do cariótipo de UFRGS 17 (APÊNDICE 3) foi observado a presença de bandas C teloméricas nos cromossomos 8A, 11A, 13A (braço longo), 15A (braço longo), 16A (braço curto), 17A (braço curto), 9D; no knob no telômero do braço longo do cromossomo 5C, banda C+ no centrômero do cromossomo 9D, moderada heterocromatina com regiões organizadoras do nucléolo (NOR) no cromossomo 19A, 20D e 21D e a translocação entre o cromossomo 7C e o braço longo do cromossomo 17A, encontrado tipicamente em variedades modernas (Jellen & Beard, 2000). Também pode ser observada a monossomia dos cromossomos 5C e 7C. Este resultado não era esperado em uma cultivar, pois espera-se que aberrações cromossômicas como estas resultem em problemas no pareamento de cromossomos durante o cruzamento, fazendo com que a semente se torne inviável.

A partir da análise do cariótipo de UFRGS 930598 (APÊNDICE 4), pode ser observada a presença de bandas C teloméricas nos cromossomos 8A (braço curto), 11A, 13A (braço curto) e 16A. Assim como em UFRGS 17, não foi observado knob no braço longo do cromossomo 5, assim como

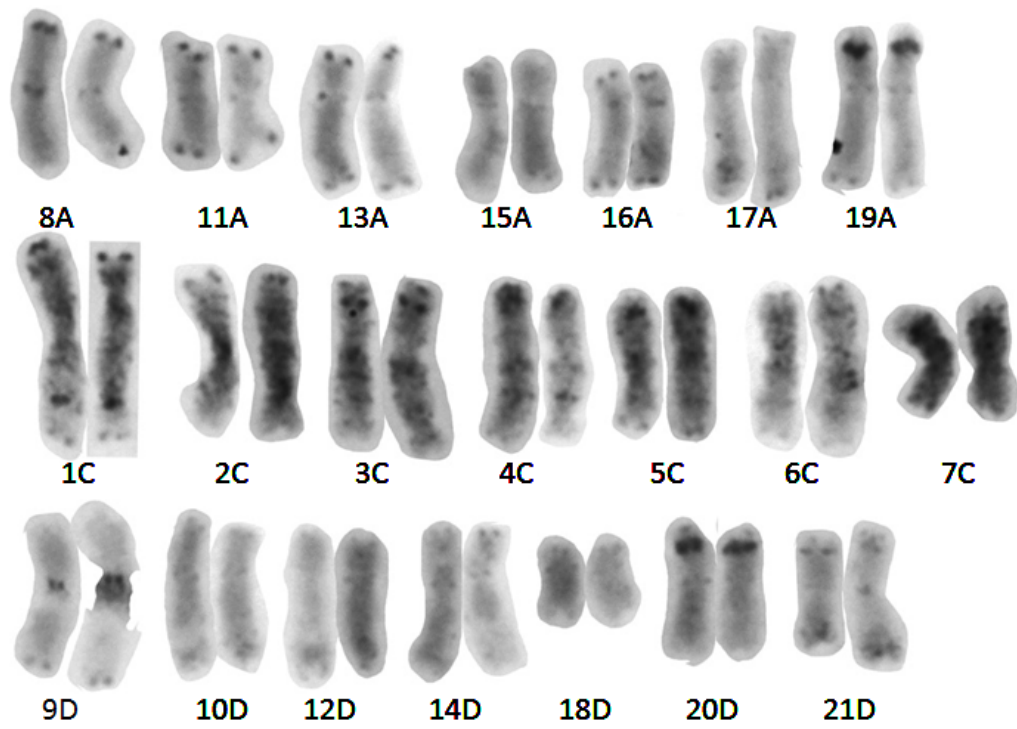
ausência de bandas teloméricas, as quais foram observadas em UFRGS 17. Também foi observado um nível moderado de bandas C+ centroméricas no cromossomo 9D, e muito pouca heterocromatina no cromossomo 21D. A translocação entre o cromossomo 7C e 17A também pode ser observada através da coloração mais escura no braço longo do cromossomo 17A. Não foi observada a coloração devido a região translocada ser pequena.

A avaliação através da coloração com bandas C, sugeriu que existem diferenças visíveis entre ambos genótipos, possibilitando inclusive o mapeamento de caracteres de interesse por análises citológicas, através do padrão de bandas C (Jellen, E., comunicação pessoal). No entanto, a análise do cariótipo de UFRGS 17 e UFRGS 930598 neste trabalho teve como objetivo apenas comparar os parentais antes do estudo de mapeamento genético com marcadores SNP.

APÊNDICE 3. Cariótipo de UFRGS 17.



APÊNDICE 4. Cariótipo de UFRGS 930598.



APÊNDICE 5. Sequência completa do gene *ALMT1* de UFRGS 17, cDNA predito de UFRGS 17 e gene parcial de UFRGS 930598

> Sequência completa ALMT1 UFRGS 17

ATGGAGGTTGATCACCAGATCAGAGCGAGCGTAGGCAGCGACGGCGAGAC
 GACGGCGGCCGGCGAACACGGTTCTGCCGGCGCCGGCTTCTTGGCGAGAT
 GCTGGCGGCGAGTCCGCTCGGTGCTCGACGAGCTGTGGCGCTGGGTCCGC
 GGGTTCCGCCAGGAAGTTGGCCGGATCGCCAGGGAGGACCCGAGGCGGGT
 GGCGCACTCGCTCAAGGTCGGGCTGGCGCTCACCCCTGGTGTCCGTGCTCT
 ACTACGTCACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCC
 GTGCTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGTACGTACGACAC
 GCGGTATGGTCCATCATCTGAGTCGTGTCGGACTATTGGATATGGATGTC
 ATGCATGCAGATAATCTCTTCTGTGCGTGACGCCATATACGAACGTGTGT
 GTATCTACAACGTATACTGCAATGTTTTAATTGTGCCAGTAAATATCTTG
 TGTGCGTCACGCCATGTATGTATGTATGAACTGAAACGTGCGTGTATGTA
 ACAGGTGGCACGCTGAGCAAAGGCTTGAACCGAGCCTTCGCGACGCTGGT
 GGCTGGGTTTCATCGCCGTCGGGGCTCATCAGGTGGCCAACCGATGCGGCG
 CGCAGGGGGAGCCAATTCGCTCGCCATCTTCGCTTCTTGCTAGGTACG
 CCGTGCCTACGCATGCATCCATGCTACTTTCTGAAGCCTGTCAAGATA
 ACCCTGCACCCAGTAATAACACGGATGGTGTACGTATATTATTAATTGC
 AGCGTCGGCGGCGACCTTCTCGCGGTTTCATCCCGGAGATCAAGGCGAGGT
 ACGACTACGGCGTCACCATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTG
 TCAAGCTACCGCGTCGAGGAGCTCATCCAGCTCGCGCACCCAGCGATTCTC
 CACCATCGTCATCGGCGTCCCTCACTTGCCATATGCACCACCATCTTCGTCT
 ACCCGTCTGGGCAGGAGAGGACCTGCACAAGCTCGCAGTCGCCACCTC
 GATAGCTGGCCTTGTTCCTGGAGGTAGTACTCCCTCCGTTCCAAATATA
 GATATTTACTTTATAAGGGTGTATCTAGATCTTATTAATATGTTGATTCA
 CTAAGTTTTTATTTAATATGTAGGTTCAATTTAAGTTTTGAATGAACATA
 TACTAAAAAGGGTTTAGATACACTTCTTTCACAAAGCTAAAAATATCTTATA
 TTTTGAAAACGGAGGGAGTACATAAAGCCCCCGCAAACTCGATGTGTCTCT
 GGCCATGCATTGCATGTCATACTCGTATTCTGGTCACAAAAATTCCTGAC
 ACTTTTCTGTCAATCTGGTCTTAGTATAACAATGCAACTTGATCTGAAATT
 AATCTCAAAAAGAAGACCAGACTTGTGTTCCCGAAAAAAAAGAGTACCA
 AATAATAGTGGACTCTTCTGACTAGAGTCACCAGCCATACTCTGTTTTTA
 TATTTCTGCTTCTACCCACTCAAAAACCTCTCTGATACAGACAACCTAGCA
 CTTTCGGTTATGTGGATACACTGTACAAGGAATCTGGGACAATTTTGCTG
 ACAAAAATTAAGGATAAAAATAGAAGGCCAACAGAAAGCCATATAATGACA
 CCGTTCAACTCTGCCAAAAGAATAATTTGAAAAGACAGAAGTAGAAAAC
 TATCATCTACCTGTAGTTAACCTATTGACATAGACCTCAGATGGACACCA
 GAGTGCAAGACTGAAAACATAACGCATCTATGCAGGGATGGAATCTGAGT
 GCTTTGGAGAAAAAGGCTTCCAGTGAGAAATTTGGAGGGCAAACCCCTTCTC
 CAAGTGTAACAAGAGCGTCCCAATTCGAAGGCCGCTGAGGACTCCCTCGT
 AAGCTTCTTTACAATTGATACAGTGTATGCATCTTGTATACACAGCAGT
 TTTTGTGATGTTATTTCCAAAATTCAGAGCAATTTTGCCAAGTGGGAGC
 CCGGCCATGAAAAATTCGGCTTCCGACATCCATGGAGCCAGTACCAGAAG
 CTTGGAGCTCTTTGTGCCAGTGCAGCTTCAATGGAGGCTCTTGTCTC
 TTATGTCATCACACTGCAAAAATCTCAGGTAATTCATCCACGCCCTGGCAA
 ATTCTGCATCAGACATGAATGGATTCTTCCCCACTTTATGGTCTTAAAAG
 AGTACAAAACCAAGTTATTAACCCACCGTGTCTTCCCTGATCAACAGTACC
 CTGAGGCCAATCCTGAGCTAACCTTGAAGGTCCGAACGGCATGCGGGGAA
 ATGAGCTCGCACTCTGCAAAGGCGCTGAGGGAGCTATCAACAGCGATTCA
 AACAAATGACTGTACCGTCTCCAGCCAGCATCACCATGTCTGCAGCCATCA
 AAGTTGCTAAAAGCCCTCAGAAATGAGTTATCAGAGGACGCAGCCCTGTTG
 CAAGTGATGCATGTGGCTGTACTGCAACACTTCTCTCAGACCTGGTTAC
 AATAATAGTGAAGATTGCAGAAACCGTTGATAATCTAGCATGGCATGCC
 ATTTCAAGAACCAGAAAAAACTCAGAAAGATGTCGTTATCAACATTCAG
 AGTTGACAAAGAGGC

continuação APÊNDICE 5. Sequência completa do gene *ALMT1* de UFRGS 17, cDNA predito de UFRGS 17 e gene parcial de UFRGS 930598

> Sequência cDNA predito ALMT1 UFRGS 17

ATGGAGGTTGATCACCAGATCAGAGCGAGCGTAGGCAGCGACGGCGAGAC
 GACGGCGGCCGGCGAACACGGTTCTGCCGGCGCCGGCTTCTTGGCGAGAT
 GCTGGCGGCGAGTCCGCTCGGTGCTCGACGAGCTGTGGCGCTGGGTGCGC
 GGGTTGCGCAGGAAGGTTGGCCGGATCGCCAGGGAGGACCCGAGGCGGGT
 GGCGCACTCGCTCAAGGTCGGGCTGGCGCTCACCCCTGGTGTCCGTGCTCT
 ACTACGTCACGCCGCTCTTCAAGGGCTTCGGGGTCTCCACGCTCTGGGCC
 GTGCTCACCGTCGTCGTCGTCATGGAGTACACCGTCGGTGGCACGCTGAG
 CAAAGGCTTGAACCGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCTGGGTTTCATCGCCG
 TCGGGGCTCATCAGGTGGCCAACCGATGCGGCGCGCAGGGGGAGCCAATT
 CTGCTCGCCATCTTCGTCTTCTTAGCGTCGCGGGCGACCTTCGCGGTT
 CATCCCGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTACCATCTTCATAC
 TCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCAAGCTACCGCGTCGAGGAGCTCATC
 CAGCTCGCGCACCAGCGATTCTCCACCATCGTCATCGGCGTCTCACTTG
 CCTATGCACCACCATCTTCGTCTACCCCGTCTGGGCAGGAGAGGACCTGC
 ACAAGCTCGCAGTCGCCACCTCGATTGGAATCTGAGTGCCTTGGAGAAA
 AGGCTTCCAGTGAGAAATTTGGAGGGCAAACCTTTCTCCAAGTGTACAAG
 AGCGTCTCAATTTCAAGGCCGCTGAGGACTCGCAATTTTGCCAAGTGGG
 AGCCCGGCCATGGAAAATTCGGCTTCCGACATCCATGGAGCCAGTACCAG
 AAGCTTGGAGCTCTTTGTGCGCCAGTGCAGCTTCAATGGAGGCTCTTGC
 TTCTTATGTCATCACACTGCAAAAATCTCAGTACCCGAGGCCAATCCTG
 AGCTAACCTTGAAGGTCCGAACGGCATGTGGGGAAATGAGCTCGCACTCT
 GCAAAGGCGCTGAGGGAGCTATCAACAGCGATTCAAACAATGACTGTACC
 GTCTCCAGCCAGCATACCATGTCTGCAGCCATCAAAGTTGCTAAAGGCC
 TCAGAAATGAGTTATCAGAGGACGCAGCCCTGTTGCAAGTGATGCATGTG
 GCTGTTACTGCAACACTTCTCTCAGACCTGGTTACAATAATAGTGAAGAT
 TGCAGAAAACCGTTGATAATCTAGCATGGCATGCCATTTCAAGAACCCAG
 AAAAACTCAGAAAGATGTCGTTATCAACATTCAGAGTTGA

> Sequência parcial ALMT1 UFRGS 930598

GACGCGCTATGGTCCATCATCTGAGTCGTGTCGGACTATTGGATATGGAT
 GTCATGCATGCAGATAATCTCTTCTGTGCGTGACGCCATATACGAACGTG
 TGTGTATCTACAACGTATACTGCAATGTTTTAATTTGTGCCAGTAATATC
 TTGTGTGCGTCACGCCATGTATGTATGTATGAACTGAAACGTGCGTGTAT
 GTAACAGGTGGCACGCTGAGCAAAGGCTTGAACCGAGCCTTCGCGACGCT
 GGTGGCTGGGTTTCATCGCCGTCGGGGCTCATCAGGTGGCCAACCGTACG
 GCGCGCAGGGGGAGCCCATTTCTGCTCGCCATCTTCGTCTTCTTGTAGGT
 ACGCCGTGCCGTACGCATGCATCCATGCTACTTTTCTGAAGCCTGTGCAAG
 ATAACCCTGCACCCAGCTAATAACACGGATGGTGTACGTATATTTAAT
 TGCAGCGTCGGCGGCGACCTTCTCGCGGTTTCATCCCGGAGATCAAGGCGA
 GGTACGACTACGGCGTCACCATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCC
 GTGTCAAGCTACCGGTCGAGGAGCTCATCCAGCTCGCGCACCAGCGATT
 CTCCACCATCGTCATCGGCGTCTCACTTGCCATGCACCACCATCTTCG
 TCTACCCCGTCTGGGCAGGAGAGGACCTGCACAAGCTCGCAGTCGCCAAC
 CTCGATAAGCTGGCCTTGTTCCTTGAAGGTAGTACTCCCTCCATTCAAA
 ATATAAGATATTTTACCTTTATAAAAAGGAGTGTATCTAGATCTTATTTAA
 TATGTTGATTCATCTAAGTTTTATTTAATATGTAGGTTTCATTTAAGTTTT
 GAATGAACATACATACTAAAAGGCTTAGATACACTTCTTTTCAAAAGCT
 AAAATATCTTATATTTTGAACCGGAGGAGTACATAAAGCCCCGCGAAA
 CTCGATGTGTCTGGCCATGCATTTGCATGTCTACTCGTATTCTGGTTCAC
 AAAAAATTCCTGACACTTTTCTGTCACTTCTGGTCTTAGTATACAATGCAAC
 TTGATCTGAAATTAATCTCAAAAAGGAAGACCAGACTTGTGTTCCCGGAAA
 AAAAAAGAGTACCAAATAATAGTGGACTCTTCTGACTAGAGTACCAGC
 CATACTCTGTTTTATATTTCTGCTTCTACCCACTCAAAAACCTCTCTGAT
 ACAGACAACCTAGCACTTTCGGTTATGTGGATACACTGTACAAGGAATCTG
 GGACAATTTTACTGACAAAATTTAAGGATAAAAATAGAAGGCCAACAGAAA
 GCCATATAATGACACCGTTCAACTCTGCCAAAAGAATATTTGAAAAGACA
 GAAGTAGAAAACCTATATCATCTACCTGTAGTTAACCTATTGACATAGACC

continuação APÊNDICE 5. Sequência completa do gene *ALMT1* de UFRGS 17, cDNA predito de UFRGS 17 e gene parcial de UFRGS 930598

TCAGATGGACACCAGAGTGC AAGACTGAAAAC TATACGCATCTATGCAGG
 GATGGAATCTGAGTGCTTTGGAGAAAAGGCTTCCAGTGAGAATTTGGAGG
 GCAAACCTTTCTCCAAGGTACAAGAGCGTCC TCAATTTCCAAGGCCGCT
 GAGGACTCCCTCGTAAGCTTCTTTACAATTGATACAGTGTATGCTCTTG
 TATACACAGCAGTTTTTGTGATGTTATTTCCAAAATTGCAGAGCAATTTT
 GCCAAGTGGGAGCCCGGCCATGGAAAATTCGGCTTCCGACATCCATGGAG
 CCAGTACCAGAAGCTTGGAGCTCTTTGTGCGCCAGTGC GCGCTTTC AATGG
 AGGCTCTTGCTTCTTATGT CATCACACTGCAAAAATCTCAGGTAATTCGG
 CCTTGCCATGGCAAATTCGGCATCCAACATGAATGGATTC TTTCCCACTT
 CATGGTCTCAAAAAGACTACAAAACCAAGTTATTAACCAACAGTGT TTTCC
 TGATCAACAGTACCCTGAGGCCAATCCTGAGCTAACCTTGAAGGTCGGAA
 CGGCATGCGGGGAAATGAGCTCGCACTCTGCAAAGGCGCTGAGGGAGCTA
 TCAACAGCGATTCAAACAATGACTGTACCGTCTCCAGCCAGCATCACCAT
 GTCTGCAGCCATCAAAGTTGCTAAAGGCCCTCAGAAAATGAGTTATCAGAGG
 ACGCRGCCCTGTTGCAAGTGATGCATGTGGCTGTTACTGCAACCC TTTCTC
 TCAGACCTGGTTACAAAATAATAGTGAAGATTGCAAACCCGTTGATAATCT
 AGCATGGCATGCCCATTCGAAACTCAGAACCCAAGAAAGATG

> Sequência parcial cds predito ALMT1 UFRGS 930598
 GTGGCACGCTGAGCAAAGGCTTGAACCGAGCCTTCGCGACGCTGGTGGCT
 GGGTTCATCGCCGTCGGGGCTCATCAGGTGGCCAACCGATGCGGGCGCGCA
 GGGGGAGCCCATTTCTGCTCGCCATCTTCGTCTTCTTAGCGTCGGCGGGCA
 CCTTCTCGCGTTCATCCCGGAGATCAAGGCGAGGTACGACTACGGCGTC
 ACCATCTTCATACTCACCTTCAGCCTGGTGGCCGTGTCAAGCTACCGCGT
 CGAGGAGCTCATCCAGCTCGCGCACCCAGCGATTCTCCACCATCGTCATCG
 GCGTCCCTCACTTGCCTATGCACCACCATCTTCGTCTACCCCGTCTGGGCA
 GGAGAGGACCTGCACAAGCTCGCAGTCGCCAACCTCGATTGGAATCTGAG
 TGCTTTGGAGAAAAGGCTTCCAGTGAGAATTTGGAGGGCAAACCC TTTCT
 CCAAGTGTACAAGAGCGTCTCAATTTCCAAGGCCGTGAGGACTCGCAAT
 TTTGCCAAGTGGGAGCCCGGCCATGGAAAATTCGGCTTCCGACATCCATG
 GAGCCAGTACCAGAAGCTTGGAGCTCTTTGTGCGCCAGTGC GCGCTTTC A
 TGGAGGCTCTTGCTTCTTATGT CATCACACTGCAAAAATCTCAGTACCCT
 GAGGCCAATCCTGAGCTAACCTTGAAGGTCCGAACGGCATGCGGGGAAAT
 GAGCTCGCACTCTGCAAAGGCGCTGAGGGAGCTATCAACAGCGATTCAA
 CAATGACTGTACCGTCTCCAGCCAGCATCACCATGTCTGCAGCCATCAA
 GTTGCTAAAGGCCCTCAGAAAATGAGTTATCAGAGGACGCRGCCCTGTTGCA
 AGTGATGCATGTGGCTGTTACTGCAACCC TTTCTCAGACCTGGTTACAA
 ATAATAGTGAAGATTGCAAACCCGTTGATAATCTAGCATGGCATGCCCAT
 TCGAAACTCAGAACCCAAGAAAGATG

> Sequência parcial STOP1 UFRGS 930598
 GTAKCTGACCTATCCAACAGGGTGTACGTTACAATTCATGGACCTGTCT
 TATTTTGAAGACCTGGCCAATCARTCCCTAGCTGTCCCTCCATTTCTTTGC
 TCCTCAGTCTTCCAGTTTTTGGCCTTCCCGATGACAGTGGAGCTAAAGTGG
 GCGACCCGTTTGAATCGAATCCTTCACTGAACACTCCTATATCAGATTGG
 GATCCCCAGGCAATGCTGAGCAACCTAACCTTTCTTGTGAGCAGAAGATCAA
 GCAGGTA AAAAGATATTTGTGCAGTCCATGGGTAATCTAGGGAGCCAAGTTG
 TTGGTGGTTCTTGCAGCTCGCAGCAAAGCAGCAGCTTGTCACTGCTGTGAT
 CTCACTTCTATCATAAATTCAGCTTATCTCAACAGCTGGCTCTATGCTTCC
 TTCGATGAAGAGCCCTCTGCTTAGCAGCAATCCAGCTGTGAGGCAACTCA
 ACACATATGGTTCTCCCATGGGCTTTGGCTCGGTTGGCAATCAGCGGCCA
 AGCACAAAACAGGGAAGAGACAATTCCTGACTTGACCAAGACTGCTGACTA
 TGAGGAGCTGATGAATACCATTAATACAATCATGATGAGAAGGATGAGC
 TGACCAAATGCCCAAATCCTTGTAGTGGGGAAGKGTCTGAACTGATTCCT
 ATGGAAGACCATGACGTGAAGGAGAGCGATGATGGTGGTGGGGGAGAGA
 ATCTCCCCCTGGTTCTTATGTGGTCTGCAATTGGAGAAGGAGGAGATT
 TTAGCACACACACTCATTTCTGTGTGATATGTGGCAAGGGTTTCAAGAG
 AGATGCTAACCTGCGGATGCACATGAGGGGCCACGGAGACGAGTACAAGA

continuação APÊNDICE 5. Sequência completa do gene *ALMT1* de UFRGS 17, cDNA predito de UFRGS 17 e gene parcial de UFRGS 930598

CTCCTGCAGCTCTTGCCAAACCCATGAGAGATTCTGGCTTAGATCATAACA
 CCAGTTACAAGGTACTCTTGCCCATTTGTGGGTGCAAGCGGAACAAGGA
 GCACAGGAAGTTCAGCCTCTCAAGACAATCTTGTGTGTGAAGAACCCT
 ACAAGAGAAGCCACTGCGACAAGAGCTATACCTGCAGCCGATGCAACACC
 AAGAAGTTCCTCGGTCATCGCGGACTTGAAGACTCATGAGAAGCACTGCGG
 GCGCGACAAGTGGCTGTGCTCATGTGGAACGACCTTCTCAAGAAAGGACA
 AGCTGTTTGGGCATGTCGCCCTTTTCCAAGGGCACACACCTGCTCTTAC
 ATGGATGATCTGAAAGCAACAGGAGCATCGGAGCAGCCTCAGGGGAGCGA
 GCGATGGACGACATGGTAGGGAGCGCAGGGTACAACCTCCCTGGCAGCA
 CGTCCGACGGCATCCCGAATCTCGACATGAAAGTCGATGATACCTCGTGGC
 TATTTCTCGCCGTTGAACTTCGATCCGTGCTTCG

> Sequência parcial STOP1 UFRGS 17

CGTACTCGAGCGCGGAGCACGGATCGAAGTTCAACGGCGAGAAATAGCC
 ACAGATATCATCGACTTTCATGTCGAGATTCGGGATGCCGTCGGACGTGC
 TGCCAGGAAGTGTACCCTGCGCTCCCTACCATGTCTTCCATCGCCTCG
 CTCCCCGAGGCTGCTCCGATGCTCCTGGTGCCTTTCAGATCATCCATGTG
 AAGAGCAGGTGTGTGCCCTTGGAAGGGCGACATGCCCAAACAGCTTGT
 CCTTTCTTGAGAAGGTCGTTCCACATGAGCACAGCCACTTGTGCGGCCCG
 CAGTGTCTCATGAGTCTTCAGGTCGCGATGACCGAGAACCTTCTTGGT
 GTTGCATCGGCTGCAGGTATAGCTCTTGTGCGCAGTGGCTTCTCTTGTAGT
 GGTCTTACACACAAGATTGTCTTGTGAGAGGCTGGAACCTCCCTGTGCTCC
 TTGTTCGCTTGCAACCCACAAATGGGCAAGAGTACCTTGTAACTGGTGT
 ATGATCTAAGCCAGAATCTCTCATGGGTTTGGCAAGAGCTGCAGGAGTCT
 TGTAATCGTCTCCGTGGCCCCCTCATGTGCATCCGCAGGTTAGCATCTCTC
 TTGAAACCCTTGCCACATATCACACAGAAATGAGTGTGTGGTGTAAAAT
 CTCTCCTTCTCCAGCTGCAGGACCACATAAGAACCAGGGGGGAGATTCT
 CTCCCTCACCACCATCATCACTCTCCTTTCAGTGCATGGTCTTCCATAGGA
 ATCAGTTCAGACGCTTCCCCACTACAAGGATTTGGGCATTTGGTGCAGCTC
 ATCCTTCTCATCATGAGTTGTATTAATGGTATTCATCAGCTCCTCATAGT
 CAGCAGTCTTGGTCAAGTCAGGAATTGTCTCTTCCCTGTTTGTGCTTGGC
 CGCTGATTGCCAACCGAGCCAAAGCCCATGGGAGAACCATATGTGTGAG
 TTGCCTGACAGCTGGATTGCTGCTAAGCAGAGGGCTCTTCATGGAAGGAA
 GCATAGAGCCAGCTGTTGAGATAAGCTGAATTATGATAGAAGTGAGATCA
 GCAGTGACAAGCTGCTGCTTTGCTGCGAGCTCGCAGGAACCACCAACAAC
 TTGGCTCCCTAGATTACCCATGGACTGCACAATATCTTTTACCTGCTTGA
 TCTTCTGCTCAAGAAAGGTTAGGTTGCTCAGCATTTGCCCTGGGGATCCCAA
 TCTGATATAGGAGTGTTCAGTGAAGGATTCGATTCAAACGGGTCGCCAC
 TTTAGCTCCACTGTCATCGGGAAGGCCAAAAC TGGAAGACTGAGGAGCAA
 AGAATGGAGGACAGCTAGGGAYTGATTGGCCAGGCTTGCAAAATAAGAC
 AGGTCCATGGAATTGTAACGTACACCCTGTGGATAGGTCAG

9 VITA

Adriano de Bernardi Schneider é filho de Helena Beatriz de Bernardi Schneider e Luis Antonio Mascarello Schneider. Nasceu em Porto Alegre – RS, em 20 de agosto de 1988. Coursou o ensino fundamental e médio no Colégio Anchieta em Porto Alegre – RS. Em 2006 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, onde se graduou Bacharel em Ciências Biológicas em 2010. No mesmo ano, iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).