

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA EM CEREAIS DE
INVERNO QUANTO À TOLERÂNCIA DO
ALUMÍNIO TÓXICO**

ROBERTO PORTALUPPI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, junho de 2008

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA EM CEREAIS DE
INVERNO QUANTO À TOLERÂNCIA DO
ALUMÍNIO TÓXICO**

ROBERTO PORTALUPPI

Orientadora: Dr^a. Sandra Patussi Brammer

Co-orientador: Dr. Jurandir Vieira de Magalhães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de Concentração em Produção Vegetal.

Passo Fundo, junho de 2008

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Trigo), pelo fornecimento de todo o material utilizado e disponibilidade da infra-estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Dr^a. Sandra Patussi Brammer, pela excelente orientação oferecida e amizade sempre demonstrada;

Ao Dr. Jurandir Vieira de Magalhães, pela valiosa colaboração em todas as etapas desta pesquisa;

Aos colegas do Núcleo de Biotecnologia Aplicada aos Cereais de Inverno da Embrapa Trigo, pelo apoio, amizade, e principalmente, pela ajuda sempre disponível quando necessitei;

Aos funcionários das Casas de Vegetação da Embrapa Trigo pelo suporte técnico e ajuda na multiplicação das sementes usadas neste trabalho;

Aos professores do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, por terem compartilhado comigo não somente seus saberes, mas também suas experiências pessoais e sua amizade;

À funcionária Mari da secretaria do PPagro, pela eficiência e amabilidade com que sempre me atendeu;

À equipe da biblioteca da Embrapa Trigo, sempre tão solícita e gentil no atendimento;

Aos Drs. Márcio Voss e José Pereira da Silva Júnior, pela ajuda nos trabalhos do cultivo hidropônico;

Aos Drs. Alfredo Nascimento Junior, Eduardo Caierão e Euclides Minella, melhoristas da Embrapa Trigo, pela disponibilidade em colaborar sempre quando foram solicitados;

Aos Drs. Antônio Nhani Júnior e Luciano Consoli, pelo desenho dos primers utilizados neste trabalho e pelas dicas no laboratório de biologia molecular;

Ao MSc. Márcio Nicolau, da Embrapa Trigo, pelo auxílio na realização das análises estatísticas;

Ao suporte financeiro da FINEP e do Ministério da Ciência e Tecnologia – MCT (FNDCT/CT – INFRA, convênio nº 01/04/0154/00);

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio, carinho, compreensão e estímulo durante todas as etapas de realização deste trabalho;

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	x
RESUMO	1
ABSTRACT	3
1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
Toxicidade do alumínio nas plantas	7
Mecanismo de tolerância ao alumínio nas plantas	9
Genes de resistência à toxicidade do alumínio nos cereais	11
Comparação de genomas em cereais	21
Cereais de inverno e sua importância econômica	24
 CAPÍTULO I	 30
 AVALIAÇÃO EM GENÓTIPOS DE CEREAIS DE INVERNO SOB CULTIVO HIDROPÔNICO E CAMPO QUANTO À TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO	 30
RESUMO	30
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO	34
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Material	38
2.2 Métodos	41
2.2.1 Cultivo hidropônico	41

Preparo das sementes	42
Preparo das soluções	43
Solução estoque e solução nutritiva	43
Solução estoque de alumínio	44
Avaliação em solução hidropônica	44
Condições da câmara de crescimento	44
Aplicação do teste	44
Hidroponia da Cevada (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	45
Hidroponia do Triticale (X <i>Triticosecale</i> Wittmack).....	45
Hidroponia do Centeio (<i>Secale cereale</i> L.).....	46
Hidroponia do Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L. em Thell)	46
Hidroponia do <i>Aegilops tauschii</i>	46
Análise	46
Determinação do crescimento das raízes	46
2.2.2 Cultivo a campo	47
Delineamento experimental	48
Avaliação do crescimento: Variáveis analisadas	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
3.1 Avaliação em hidroponia	49
3.2 Avaliação em campo	60
4 CONCLUSÃO	67
CAPÍTULO II	69
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEREAIS DE INVERNO QUANTO À PRESENÇA DO GENE ALMT1, LIGADO À TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO	69

RESUMO	69
ABSTRACT	71
1 INTRODUÇÃO	73
2 MATERIAL E MÉTODOS	75
2.1 Material	75
2.2 Métodos	79
Extração e Amplificação de DNA	79
Obtenção do primers	80
2.3 Otimização dos primers	83
Primer ScALMT1-3	83
Primers ALMT1-jur1, ALMT1-jur2, ALMT1-jur3, ALMT1 -pr3 e ALMT1-pr5	86
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	90
4 CONCLUSÕES	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura		Página
1	Etapas do cultivo hidropônico do centeio (<i>S. cereale</i> L.): A) Sementes em placas de petri para quebra de dormência; B) Sementes na tela para germinação; C) Bandeja mostrando, no detalhe, as sementes selecionadas; D) Genótipos no último dia do cultivo hidropônico; E e F) Raízes dos genótipos com 10 e 0 ppm de Al ³⁺ , respectivamente.	43
2	Medição do comprimento das raízes: A) Bandejas no freezer para posterior medição das raízes; B e C) Medição das raízes que foram expostas a concentrações de 0 e 10 ppm de Al ³⁺ , respectivamente.	45
3	Etapas do cultivo em campo: A trigo, B centeio, C triticales, D cevada, fotos tirada 67 dias após a emergência, solo sem correção. E trigo, F centeio, G triticales, H cevada, fotos tiradas 54 dias após a emergência, solo sem correção.	61

- 4 Etapas do cultivo em campo: **A** trigo, **B** centeio, **C** triticales, **D** cevada, fotos tirada 67 dias após a emergência, solo com correção. **E** trigo, **F** centeio, **G** triticales, **H** cevada, fotos tiradas 54 dias após a emergência, solo com correção. 61

CAPÍTULO II

- 1 Genótipos de triticales (*X Triticoseclae* Wittmack) sendo multiplicados na casa de vegetação da Embrapa Trigo. 79
- 2 Amostras de genótipos de trigo, triticales e *Ae. tauschii* para o primer ScALMT1-3 em gel de agarose 2%, do teste um (M = marcador de peso molecular de 100 pb). 92
- 3 Amostras de genótipos de trigo, triticales, centeio e *Ae. tauschii* para o primer ScALMT1-3 em gel de agarose 2%, do teste dois (M = marcador de peso molecular de 100 pb). 93

- | | | |
|---|--|----|
| 4 | Genótipos de triticales e centeio para o primer ScALMT1-3 em gel de agarose 2%, do teste três (M = marcador de peso molecular de 100 pb). | 94 |
| 5 | Genótipos de trigo e <i>Ae. tauschii</i> para o primer ScALMT1-3 em gel de agarose 2%, do teste quatro (M = marcador de peso molecular de 100 pb). | 96 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela		Página
1	Genótipos de Cevada (<i>Hordeum vulgare</i> L.) utilizados, genealogia e origem. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007	39
2	Genótipos de Triticale (X <i>Triticosecale</i> Wittmack) utilizados, genealogia e origem. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007	39
3	Genótipos de Centeio (<i>Secale cereale</i> L.) utilizados, genealogia e origem. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007	40
4	Genótipos de Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.) utilizados, genealogia e origem. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007	40
5	Genótipos de <i>Aegilops tauschii</i> utilizados e origem. Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007	41

- 6 Tolerância/Sensibilidade de cultivares de cevada ao Al^{3+} (0 e 0,5 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controles os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (R). Passo Fundo, 2008 51
- 7 Tolerância/Sensibilidade de cultivares de triticales ao Al^{3+} (0 e 6 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controle das condições de hidroponia os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (T) e como testemunhas os cultivares de triticales PFT 209 (S) e IAPAR 23 Arapoti (T). Passo Fundo, 2008 53
- 8 Tolerância/Sensibilidade de cultivares de centeio ao Al^{3+} (0 e 10 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controle das condições de hidroponia os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (T) e como testemunhas os cultivares de centeio BRS Serrano (T) e 698210 (MS). Passo Fundo, 2008 56

- 9 Tolerância/Sensibilidade de cultivares de trigo ao Al^{3+} (0 e 2 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controles e testemunhas os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (R). Passo Fundo, 2008 58
- 10 Tolerância/Sensibilidade de cultivares *Aegilops tauschii* ao Al^{3+} (0 e 2 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controles os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (R). Passo Fundo, 2008 60
- 11 Resistência/Suscetibilidade dos genótipos de cevada em condições de campo em submetidas a duas condições de acidez: sem correção e corrigido em $\frac{1}{4}$ do índice SMP. Passo Fundo, 2008 62
- 12 Resistência/Suscetibilidade dos genótipos de triticale em condições de campo em submetidas a duas condições de acidez: sem correção e corrigido em $\frac{1}{4}$ do índice SMP. Passo Fundo, 2008 64

- | | | |
|----|---|----|
| 13 | Resistência/Suscetibilidade dos genótipos de centeio em condições de campo em submetidas a duas condições de acidez: sem correção e corrigido em $\frac{1}{4}$ do índice SMP. Passo Fundo, 2008 | 65 |
| 14 | Resistência/Suscetibilidade dos genótipos de trigo em condições de campo e submetidas a duas condições de acidez: sem correção e corrigido em $\frac{1}{4}$ do índice SMP. Passo Fundo, 2008 | 66 |

CAPÍTULO II

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Genótipos de <i>Hordeum vulgare</i> L. avaliados quanto à tolerância ao Al^{3+} . Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007 | 76 |
| 2 | Genótipos de X <i>Triticosecale</i> Wittmack avaliados quanto à tolerância ao Al^{3+} . Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007 | 76 |

- | | | |
|---|--|----|
| 3 | Genótipos de <i>Secale cereale</i> L. avaliados quanto à tolerância ao Al ³⁺ . Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007 | 77 |
| 4 | Genótipos de <i>Triticum aestivum</i> L. em Thell avaliados quanto à tolerância ao Al ³⁺ . Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007 | 77 |
| 5 | Genótipos de <i>Aegilops tauschii</i> avaliados quanto à tolerância ao Al ³⁺ . Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007 | 78 |
| 6 | Primers retirados da literatura, referentes à amplificação do gene de tolerância ao alumínio. | 82 |
| 7 | Primers desenhados, a partir da seqüência do gene ALMT1, isolado por Sasaki et al., 2004. | 82 |

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO DA
VARIABILIDADE GENÉTICA EM CEREAIS DE INVERNO
QUANTO À TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO TÓXICO
ROBERTO PORTALUPPI¹, SANDRA PATUSSI BRAMMER² E
JURANDIR VIEIRA DE MAGALHÃES³**

RESUMO - O alumínio é o mais abundante metal da crosta terrestre. Em solos ácidos ($\text{pH} < 5$), forma o cátion Al^{3+} , o qual ao reagir com moléculas orgânicas, modifica-as, suprimindo suas funções e, assim, tornando-se tóxico às plantas. O desenvolvimento de cultivares tolerantes à toxicidade do alumínio requer a identificação de genótipos portadores de genes de tolerância, processo que pode ser agilizado por seleção assistida. Para os agricultores que cultivam em solos ácidos, cultivares tolerantes representam maior produtividade e diminuição no custo das suas lavouras. O gene *ALMT1*, isolado e caracterizado em linhas isogênicas de trigo, é um dos responsáveis pela tolerância ao cátion Al^{3+} . Pode ser inserido no genoma de plantas sensíveis ao alumínio, conferindo-lhes um aumento de tolerância a este metal tóxico. O objetivo deste trabalho foi comparar a técnica de cultivo hidropônico com ensaio a campo, na identificação de genótipos

¹ Biólogo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Produção Vegetal.

² Orientadora, Bióloga, Dr.^a em Genética e Biologia Molecular, Professora do PPGAgro e Pesquisadora da Embrapa Trigo.

³ Co-orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Field Crop Science, concentração Plant Genetic, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

tolerantes à toxicidade do alumínio, bem como verificar a presença do gene ALMT1 em genótipos de triticale, centeio, cevada, trigo e na espécie *Aegilops tauschii*, doadora do genoma D de *Triticum aestivum* L. em Thell, a fim de identificar um marcador molecular para esta característica nos genótipos brasileiros que possa ser usado posteriormente no melhoramento genético. Os resultados obtidos demonstraram relação positiva entre o cultivo hidropônico e o ensaio a campo na identificação de genótipos tolerantes ao Al^{3+} , destacando-se a hidroponia como excelente ferramenta de apoio, e sugerem que o primer ScALMT1-3 seja um bom candidato como marcador molecular, associado ao gene ALMT1. É de fundamental importância a validação deste em maior número de genótipos para as culturas estudadas.

Palavras-chave: toxicidade ao alumínio, cultivo hidropônico, marcadores moleculares, tolerância a metais.

**MOLECULAR CHARACTERISATION AND STUDY OF
GENETICS VARIABILITY IN WINTER CEREALS TO THE
TOLERANCE TO ALUMINUM TOXICITY**

**ROBERTO PORTALUPPI, SANDRA PATUSSI BRAMMER
AND JURANDIR VIEIRA DE MAGALHÃES**

ABSTRACT - Aluminum is the most abundant metal in the earth's crust. In acid soil ($\text{pH} < 5$), the cation Al^{3+} is formed, which reacts with the organic molecules, modify them by removing their functions and thus becoming toxic to the plants. The development of tolerant cultivars to the aluminum toxicity, requires the identification of genotypes which carry genes for tolerance and DNA markers for use in assisted selection. For farmers who grown acid soil, these aluminum tolerant represent greater productivity and decrease in their crops cost. The ALMT1 gene, isolated and characterized in isogenic lines of wheat, confers Al^{3+} tolerance. It can be inserted into the genome of plants sensitive to aluminum, giving them an increase of tolerance. The objective of this study was to compare the technique of hydroponic culture with a field test in the identification of genotypes tolerant to the toxicity of aluminum, as well as verify the presence of the gene ALMT1 in genotypes of triticale, rye, barley, wheat and the specie *Aegilops tauschii*, the D genome donor of *Triticum aestivum* L. em Thell to identify a molecular marker for this feature, in the Brazilian genotypes which can be used later in the genetic breeding. The results showed positive relationship between the hydroponic culture and test the field in the identification of tolerant genotypes to

Al^{3+} , emphasizing to hydroponics as an excellent tool for support, and suggest that the primer ScALMT1-3 is a good candidate as a molecular marker, coupled the ALMT1 gene. It is of fundamental importance the validation of this primer in a greater number of genotypes for the crops studied.

Key words: aluminum toxicity, hydroponic culture, molecular markers, metal tolerance

1 INTRODUÇÃO

A agricultura constitui a base da economia brasileira, a qual gera inúmeros empregos diretos e indiretos, seja por meio das atividades industriais ou do comércio ligados às práticas agrícolas.

Um dos principais fatores que limitam a produtividade agrícola é a acidez dos solos ($\text{pH} < 5$), associada à toxicidade do alumínio (Al^{3+}), a qual atinge cerca de 50% das terras potencialmente agricultáveis no mundo, representando um bilhão de hectares de solos tropicais e temperados e 68% do território brasileiro.

Ao ser absorvido pelas plantas na forma livre ou como íon Al^{3+} , o alumínio pode reduzir o crescimento da raiz; esta pode tornar-se menor e mais grossa, perdendo ramificações e reduzindo sua capacidade de absorver água e nutrientes no solo. Como consequência, as plantas ficam sensíveis ao déficit hídrico, a invernos rigorosos, à resistência às doenças, diminuindo sua produtividade e rendimento.

O desenvolvimento de cultivares resistentes aos solos ácidos é de fundamental importância para o sustento das atividades agrícolas não somente no Brasil, mas em todas as regiões tropicais e subtropicais, para melhorar o rendimento das lavouras em solos ácidos. Mesmo com a correção da acidez com a calagem, cultivares sensíveis são afetados, pois a correção é superficial.

Dentre os cereais de inverno, o trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell) é uma das culturas mais estudadas em relação à tolerância/resistência genética ao alumínio, devido à sua importância na alimentação mundial. Estudos genéticos recentes comprovaram que

a tolerância à toxicidade do alumínio no trigo é governada por um ou dois pares de genes dominantes. Destaca-se, como importante fonte de tolerância ao alumínio, o cultivar brasileiro BH1146, por possuir o gene dominante a esta característica. Esse gene foi mapeado no braço longo do cromossomo 4D, primeiramente por Aniol e Gustafson (1984); após, via monossômicos, por Lago e colaboradores (1991), seguido da confirmação por técnicas moleculares, por Riede e Anderson (1996). Este gene é conhecido como Alt_{BH} ou $Alt2$ (aluminum tolerance locus) e está relacionado à liberação de malatos dos ápices de raízes ativada pelo alumínio.

Recentemente, foi demonstrado que o gene $ALMT1$ (aluminum-activated malate transporter), isolado e caracterizado por Sasaki e colaboradores (2004), codifica uma proteína de membrana a qual é expressa nos ápices das raízes de linhagens tolerantes. Este gene também foi mapeado por Raman et al. (2005) no braço longo do cromossomo 4D, sendo que Raman sugere que o $ALMT1$ corresponde ao mesmo locus genético do Alt_{BH} .

A comparação de genomas e a colinearidade dos seus genes é uma ferramenta que pode ser utilizada para se determinar a função dos genes ou para predizer relações e inter-relações entre as proteínas codificadas por estes genes. Esta possibilidade permite que sejam, então, comparadas as diferentes espécies de uma determinada tribo ou família, como é o caso das Triticeae e Poaceae, respectivamente, cuja maioria das espécies é agronomicamente importante o que, certamente, abre novas perspectivas para a prospecção de genes.

Além do mencionado, a identificação de cultivares de cevada, de triticale, de centeio, de trigo resistentes aos efeitos da toxicidade do alumínio (Al^{3+}) nos solos ácidos, em especial nos solos subtropicais, contribui para a implantação de novas práticas de manejo menos agressivas à estrutura físico-química dos solos, bem como diminui os custos de produção dos cereais.

Portanto, uma vez selecionados os genótipos tolerantes à toxicidade do alumínio (Al^{3+}), através das ferramentas fornecidas pelas técnicas da biologia molecular, os mesmos podem ser utilizados nos programas de melhoramento de cereais de inverno, tanto por meio de programas convencionais, como da seleção assistida ou do desenvolvimento de cultivares transgênicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Toxicidade do alumínio nas plantas

O alumínio é o mais abundante metal da crosta terrestre (SASAKI et al., 2004). Devido à sua reatividade, forma compostos insolúveis que não penetram nas células de plantas e animais. Mas em solos ácidos ($\text{pH} < 5$), torna-se solúvel reagindo com moléculas orgânicas, modificando-as e suprimindo suas funções (Khimya, 1988; Martin et al., 1994 apud BULANOVA et al., 2001). Por isso, o alumínio solúvel é chamado de alumínio tóxico para as plantas. A toxicidade deste metal nos solos ácidos é um dos fatores que mais limitam a produção agrícola, comprometendo cerca de 50% dos solos agricultáveis no mundo. Grande parte dos solos ácidos ocorre em

países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais, estimando-se que nos trópicos encontram-se 60% dos solos ácidos (KOCHIAN et al., 2004). No Brasil, 68% dos solos possuem elevada acidez, toxicidade de alumínio e baixa disponibilidade de fósforo (GUIMARÃES, 2005).

A presença de alumínio tóxico no solo causa danos em cerca de 1,01 bilhão dos 3,24 bilhões de hectares de terras cultivadas no mundo, sendo 34,8 milhões somente nos Estados Unidos (GUSTAFSON, 2001).

O alumínio pode ser absorvido na forma livre ou como íon Al^{3+} , causando como efeito primário a redução do crescimento das raízes. Estas se tornam menores, engrossam e perdem suas ramificações finas, reduzindo assim sua capacidade de absorver água e nutrientes, inibindo com isto a expansão, a alongação e a divisão celular (KOCHIAN et al., 2004). Além disso, as raízes intoxicadas por alumínio tornam-se incapazes de explorar as camadas mais profundas do solo, restringindo a absorção de nutrientes, reduzindo a tolerância à seca, resultando em baixas produtividades e afetando a produção de grãos por área de cultivo (CAMARGO, 1998; GUIMARÃES, 2005).

O alumínio dificulta a absorção do fósforo de duas maneiras: reduzindo o crescimento do sistema radicular e ligando-se ao fósforo, tanto na superfície quanto no interior das células, formando compostos de baixa solubilidade. Assim, ocorre a redução do nutriente nas raízes, restringindo sua translocação para a parte aérea, provocando, em algumas plantas, sintomas foliares e deficiência de fósforo (Foy, 1976; Clarkson, 1966 apud ABICHEQUER et. al., 2003; WANG et al., 2006).

A presença do alumínio pode provocar aberrações cromossômicas nas cromátides e nos genomas das células meristemáticas dos ápices de raízes (BULANOVA et al., 2001). O estresse com alumínio também pode ocasionar instabilidade mitótica e meiótica, altos níveis de polimorfismo dos micrósporos, mosaicismo cromossômico, distúrbio de pareamento e aderências, cromossomos dicêntricos e presença de micronúcleos nas células mitóticas. Nos micrósporos, as principais anormalidades citológicas são os distúrbios da polaridade e orientação do fuso, produção de pólen-p menores e com exina fina, produção de micronúcleos, pólenes vazios e pólenes com dois poros (BRAMMER et al., 2005).

Mecanismos de tolerância ao alumínio nas plantas

As plantas apresentam duas classes de mecanismos fisiológicos em relação à tolerância ao alumínio:

a) Mecanismos de exclusão (resistência externa): impedem o alumínio de alcançar seus sítios de toxicidade na planta; o alumínio é excluído dos tecidos da planta, em especial, da porção simplástica e do meristema da raiz. Estes mecanismos são baseados na detoxificação do alumínio no apoplasto e na rizosfera, através da formação de quelatos de alumínio não tóxicos com quelantes de alumínio secretados pelos ápices das raízes e pela alcalinização do apoplasto apical e da rizosfera, a qual transfere as concentrações de espécies mononucleares de alumínio em favor de hidróxidos de alumínio menos tóxicos. A alcalinização ocorre pela elevação do pH da rizosfera para as raízes, a síntese de mucilagens no ápice radicular e a

síntese e a exudação de polipeptídeos. O efluxo de ácidos orgânicos e ânions das raízes ativado pelo alumínio é um mecanismo bem estabelecido. A “hipótese do malato” propõe que o malato secretado liga-se ao alumínio em uma forma atóxica e protege a raiz dos danos (DELHAIZE et al., 2004).

b) Mecanismos internos (de reparo): as plantas toleram o íon Al^{3+} no simplasto; possibilitam a penetração do alumínio no interior das células, mas têm sua ação fitotóxica neutralizada, pois detoxificam o alumínio no simplasto. Entre estes mecanismos, podemos citar a ação de polipeptídeos do citoplasma como moléculas quelantes, a existência de enzimas tolerantes cuja atividade não é prejudicada pelo alumínio e a eliminação do alumínio do ambiente celular por compartimentalização em vacúolos (WENZL et al., 2001; ABICHEQUER et al., 2003; WANG et al., 2006).

Citando Taylor (1991) e Kochian (1995), Watsumoto et al. (2006) relacionam como possíveis mecanismos de exclusão de tolerância ao alumínio a sua imobilização na parede celular ou a baixa capacidade de troca de cátions da parede celular, a permeabilidade seletiva da membrana plasmática, a formação de uma barreira de pH induzida pela planta na rizosfera ou no apoplasma da raiz, exudação de ligantes de quelatos, exudação de fosfato e efluxo de alumínio.

A toxicidade do alumínio é o principal fator que leva ao crestamento de cereais, entre eles o trigo (VOSS, 2007). Em cultivares de trigo, suscetíveis ao crestamento, os sintomas da planta deficiente são raízes atrofiadas, folhas amareladas, formação de espigas rudimentares com poucas espiguetas ou até mesmo sem sua formação. Desta forma, a tolerância ao alumínio é um fator importante

na adaptação dos cultivares de trigo e outros cereais às condições de cultivo dos solos ácidos, causadores do crestamento (SANTOS, 1999).

Genes de resistência à toxicidade do alumínio nos cereais

No Brasil, até o início da década de 90, para incorporar no processo de produção agrícola os solos ácidos e de baixa fertilidade, usavam-se grandes quantidades de corretivos e fertilizantes, que chegavam a 40% - 45% do custo final das lavouras. A partir de então, conhecimentos sobre os princípios de nutrição mineral, fisiologia vegetal e química do solo aliaram-se aos métodos tradicionais de melhoramento, provocando um avanço tecnológico na agricultura brasileira. Desenvolveram-se materiais genéticos mais resistentes à acidez do solo e que apresentam uma maior capacidade na aquisição e uso dos nutrientes, em especial o fósforo (GUIMARÃES, 2005).

Através das modernas técnicas de bioquímica, de biologia molecular e celular, vários genes de tolerância contra os efeitos do alumínio foram identificados. Mais de vinte genes induzidos pelo estresse ao alumínio foram isolados em um grande número de espécies de plantas, incluindo o trigo. A maioria destes genes falsos positivos parecem ser genes gerais ligados aos causados por diversos elementos tóxicos, por estresse, baixos níveis de fósforo, por ferimentos, por infecções de patógenos ou por estresses oxidativos (EZAKI et al., 2001).

Estudando o cultivar brasileiro de trigo BH1146, Aniol e Gustafson (1984) e Lagos e colaboradores (1991) determinaram a

localização do gene dominante de tolerância no braço longo do cromossomo 4D. Este gene é conhecido como *Alt_{BH}* ou *Alt2* (aluminum tolerance locus) e está relacionado à liberação de malatos dos ápices de raízes ativadas pelo alumínio. Outros genes de tolerância foram localizados nos cromossomos 5AS, 2D e 4DL.

O gene ALMT1 (aluminum-activated malate transporter) isolado e caracterizado por Sasaki e colaboradores (2004), codifica uma proteína de membrana a qual é expressa nos ápices das raízes de linhagens tolerantes ao alumínio em níveis maiores que as isogênicas próximas, quando há exposição ao alumínio. Este gene localiza-se no braço longo do cromossomo 4D e a liberação de malato das raízes do trigo complexa os cátions Al^{3+} , impedindo-os de serem capturados pelas raízes. Os referidos autores também mostraram que a expressão do gene ALMT1 aumenta a tolerância ao alumínio por decréscimo da acumulação de alumínio nas células, havendo evidência de que o fluxo de malato das raízes de cultivares de trigo tolerante ao alumínio são mediadas por canais aniônicos. Isto levou a equipe a inferir que a proteína codificada pelo ALMT1 é o primeiro membro de uma nova família de canais aniônicos de plantas. Sua estrutura consiste de 6 éxons interrompidos por 5 íntrons (RAMAN et al., 2005; SASAKI et al., 2006). Raman e colaboradores (2005) demonstraram que o ALMT1 localiza-se, como o *Alt_{BH}*, no braço longo do cromossomo 4D do trigo, sugerindo que o ALMT1 corresponda ao mesmo locus genético do *Alt_{BH}* (MAGALHÃES et al., 2007).

As linhagens isogênicas de trigo utilizadas por Sasaki e colaboradores (2004) foram a ET8 (tolerante ao alumínio) e a ES8

(sensível ao alumínio), as quais diferem na tolerância ao alumínio em um só locus designado de *Alt₁*. Este locus co-segrega com um efluxo de malato ativado pelo alumínio a partir do ápice das raízes (Delhaize et al., 1993 apud SASAKI et al., 2004). Os cDNAs derivados de ET8 e ES8, mostraram que as seqüências diferiram em seis nucleotídeos, resultando em proteínas que possuem dois resíduos de aminoácidos diferentes. As seqüências derivadas das linhagens isogênicas ET8 e ES8 foram designadas como ALMT1-1 (alelo da ET8) e ALMT1-2 (alelo da ES8). Análises de Northern blot indicaram que os transcritos do gene ALMT1 (1,5 kb) eram mais abundantes na linhagem isogênica ET8 que na linhagem ES8 e eram primariamente expressos nos ápices das raízes. Ao seqüenciarem a região codificante do ALMT1 nos cultivares de trigo, Atlas 66 (tolerante ao alumínio) e Scout 66 (sensível ao alumínio), anteriormente estudados por Kochian (1995), descobriram que a região codificante no Atlas 66 era idêntica ao do alelo ALMT1-1, enquanto que no Scout 66 era idêntica ao do alelo ALMT1-2 e seus níveis de expressão foram intermediários entre o trigo alumínio-tolerante (ET8 e Atlas 66) e o trigo alumínio-sensível (ES8 e Scout 66). Os resultados dos estudos de co-segregação do ALMT1-1 com trigo tolerante ao alumínio indicam que este gene ALMT1-1 é também mais proximamente ligado ao locus de tolerância *Alt₁* (aproximadamente 0,25 cM) ou codifica o próprio *Alt₁*.

Os resultados de Sasaki (2004) sugerem que a tolerância relativa ao alumínio devido ao ALMT1 em diferentes cultivares de trigo é determinada primariamente pelo nível de expressão dos alelos ALMT1-1 e ALMT1-2, em vez da diferença de dois aminoácidos entre eles.

Em estudo publicado recentemente, Sasaki e colaboradores (2006) concluíram que as diferenças na seqüência “upstream” do ALMT1 devem regular a resistência ao alumínio no trigo por meio do controle da expressão do ALMT1. Seis diferentes tipos de seqüências foram identificadas, as quais diferiram uma da outra pelo número e modelo dos blocos repetidos da seqüência entre as primeiras 1000 pb “upstream” do códon de iniciação do ALMT1’. A presença de vários motivos na região “upstream”, comumente associados a estresses abióticos, podem indicar que a expressão do gene pode ser modulada por fitohormônios ou por gatilhos ambientais. O mesmo estudo demonstrou que a região genômica da seqüência “upstream” da região codificante do ALMT1 é mais variável que a região codificante e a seqüência “downstream” imediata. De acordo com os autores, a presença dessas seqüências repetidas da região “upstream” do ALMT1 influencia a expressão do gene e a tolerância ao alumínio em linhagem de trigo de origem não japonesa. O motivo pelo qual as linhagens japonesas comportam-se de modo diferente ainda não foi esclarecido. PCRs que marcam esta alta variabilidade da região “upstream” podem ser usados como marcadores moleculares para tolerância ao alumínio no trigo (SASAKI et al., 2006).

Análises das seqüências dos éxons do TaALMT1 (*Triticum aestivum* ALMT1) somente identificaram dois alelos. Em contraste, o íntron três e a região promotora mostram uma considerável variabilidade alélica. A viabilidade de marcadores para o éxon quatro, íntron três e a região promotora torna possível estudar as relações genéticas do gene TaALMT1 em uma série de genótipos de trigo. Os marcadores SSR (seqüências simples repetidas) possuem alta

diversidade alélica, tanto entre germoplasma cultivado quanto em “landraces” e identificaram oito alelos associados à região promotora de trigos hexaplóides (RAMAN et al., 2008).

Estudos genealógicos e moleculares sugerem que a tolerância no germoplasma moderno provém de diversas origens independentes. Muitos dos alelos dos promotores associados à resistência ao alumínio pré-existiam na Europa, no Oriente Médio e na Ásia, anterior à dispersão do germoplasma cultivado ao redor do mundo. Os marcadores baseados nos íntrons, éxons e regiões promotoras do gene TaALMT1 podem delinear a herança do locus de resistência ao alumínio entre linhagens de trigos e traçar a resistência ao alumínio em programas de seleção assistida (RAMAN et al., 2008).

Trabalhando com centeio, Fontecha e colaboradores (2007) concluíram ser provável que na homeologia do grupo 4 das poáceas haja um mecanismo de tolerância de diferentes magnitudes dependendo das espécies baseado no efluxo de ácido orgânico no solo via o gene ALMT1.

Nesse sentido, em cevada (*Hordeum vulgare* L.), o gene *Alp* (aluminum tolerance locus), localizado no braço longo do cromossomo 4 confere tolerância ao cultivar americano Dayton e há evidências de que este mesmo gene estaria presente em trigo, sugerindo a possibilidade de as diferenças intra-específicas em trigo e cevada possam ser devidas à variação alélica em loci ortólogos (Tange et al., 2000 apud KOCHIAN et al., 2004). Porém, o locus *Alp* é associado com a liberação de citrato das raízes, os quais protegem as plantas da toxicidade do alumínio do mesmo modo que o efluxo de malato protege o trigo: ligando-se aos cátions nocivos Al^{3+} no

apoplasto e detoxificando-os (Delhaize & Ryan, 1995; Ma et al., 2004 apud WANG et al., 2007).

Em uma cevada transgênica, expressando o gene ALMT1, o gene conferiu um efluxo de malato, ativado pelo alumínio, com propriedades similares às daquelas do trigo tolerante ao alumínio (DELHAIZE et al., 2004). A cevada transgênica mostrou um alto nível de tolerância ao alumínio tanto em cultura hidropônica como em solos ácidos. Os autores do estudo concluíram que o ALMT1 é capaz de conferir tolerância ao alumínio em plantas intactas e confirmaram a idéia de que o ALMT1 é o gene principal para a tolerância ao alumínio em trigo (DELHAIZE et al., 2004).

O principal mecanismo fisiológico de tolerância ao alumínio nas plantas envolve a ativação de transportadores de membrana que medeiam a exsudação de ácidos orgânicos do ápice das raízes, formando complexos estáveis e não tóxicos com o Al^{3+} na rizosfera. As proteínas da família MATE (multidrug and toxic compound extrusion) são membros de uma grande e complexa família de transportadores de membrana. Primeiramente descobertas em organismos procariotos, mais tarde foram descobertas em eucariotos, estando geralmente envolvidas no efluxo de pequenos solutos orgânicos (Revisão em MAGALHÃES et al., 2007).

Explorando a sintenia entre a cevada, o trigo, o centeio e o arroz para mapear a região genômica na cevada, Wang e colaboradores (2007) construíram um mapa de alta resolução da região *Alp* com linhas recombinantes de uma grande população F_2 e identificaram um gene designado como HvMATE (*H*ordeum *v*ulgare MATE), controlando o alumínio na cevada. A expressão relativa do

HvMATE foi relacionada de modo significativo à tolerância ao alumínio e ao efluxo de citrato ativado pelo alumínio. Os seus resultados também indicam que, apesar de uma localização cromossômica semelhante para os loci de tolerância ao alumínio em trigo e cevada, os genes provavelmente codificam proteínas diferentes e não são, portanto, ortólogos. Sua descoberta de que a expressão do HvMATE estava relacionada ao efluxo de citrato e à tolerância ao alumínio levou-o a identificar o HvMATE como um candidato ao controle gênico da tolerância ao alumínio na cevada.

Baseado na hipótese de que a família MATE originou-se nos procariotos e que alguns membros da família, foram, então, transmitidos aos eucariotos; Magalhães e colaboradores (2007) julgam ser possível que a tolerância ao alumínio codificada por *Alt_{SB}* (o locus de tolerância do alumínio no sorgo) originou-se de mutações em um gene codificando uma família MATE pré-existente, a qual já tinha a habilidade de transportar pequenas moléculas orgânicas.

As proteínas da família MATE estão relacionadas ao efluxo de pequenas moléculas orgânicas, o que é consistente com o mecanismo fisiológico para a tolerância ao alumínio no sorgo, baseado na exsudação de citrato pelas raízes ativada pelo alumínio. O gene da família MATE isolado do *Sorghum bicolor* (SbMATE) mostrou, através da análise de seqüências, não estar relacionado à família ALMT de proteínas de membrana, tornando-o um novo candidato a gene de tolerância. Análises de RT-PCR quantitativo mostraram que o SbMATE expressou-se somente nas raízes de linhas isogênicas tolerantes ao alumínio, no primeiro centímetro da raiz. Isto é consistente com o mecanismo de exclusão que atua prevenindo o

Al^{3+} de atingir os sítios sensíveis no ápice das raízes (MAGALHÃES et al., 2007).

Estudando a tolerância da *Arabidopsis thaliana* ao alumínio, Hoekenga e colaboradores (2006) investigaram um gene homólogo ao do ALMT1 (aluminum-activated malate transporter) do trigo. Este gene foi chamado de AtALMT1 (*Arabidopsis thaliana* ALMT1) e foi o melhor candidato dos 14 membros da família AtALMT1 a estar envolvido com a tolerância ao alumínio, baseada nos modelos de expressão e localização genômica. O gene AtALMT1 é considerado crítico para a tolerância ao alumínio e codifica um transportador de malato ativado pelo alumínio, o qual está associado à tolerância. O AtALMT1 possui sua expressão máxima nas células epidérmicas da raiz, associadas com a liberação de malato da raiz na rizosfera. As análises fisiológicas mostraram que a proteína codificada pelo gene AtALMT1 é responsável pela liberação de malato pela raiz ativada pelo alumínio. Os autores afirmam que o gene AtALMT1 medeia a liberação de malato em resposta ao estresse de alumínio e é o passo final essencial nesta rota de tolerância ao alumínio.

No centeio (*Secale cereale* L.), o braço longo do cromossomo 4 contém o gene *Alt₃* (aluminum tolerance locus), o qual demonstra forte ligação com marcadores ligados ao gene *Alt_{BH}*. Um segundo gene de tolerância, *Alt₁*, foi localizado no braço curto do cromossomo 6. Contudo, não está claro se o gene *Alt₁* do centeio tem ligação com o do trigo (KOCHIAN et al., 2004).

Usando primers utilizados por Sasaki (2004) para amplificar o gene ALMT1 no trigo, Fontecha et al. (2007)

identificaram um novo gene em centeio no cromossomo 7RS, o qual foi designado como ScALMT1. Este gene possui 91% de similaridade em nível de nucleotídeos com o ALMT1 do trigo. O gene ScALMT1 possui 6 éxons e 5 íntrons e sua seqüência genômica revelou 86% de similaridade de aminoácidos ao ALMT1 do trigo. O autor considera a possibilidade de o gene ScALMT1 facilitar a liberação de citrato ao invés de malato, uma vez que Li e colaboradores (2000) constataram que o centeio libera tanto o citrato quanto o malato das suas raízes. Seus experimentos demonstraram que os transcritos do ScALMT1 são primeiramente expressos nos ápices das raízes e são induzidos pelo alumínio.

Matos e colaboradores (2005) mapearam o gene *Alt₄*, que se localiza no braço curto do cromossomo 7R do centeio. O gene foi mapeado após o estudo de três diferentes populações F₂ através das técnicas de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), SCIM (*Secale cereale* inter-microsatélites) e SCM (*Secale cereale* microsatélites), as quais demonstraram uma herança dominante e uma relação de segregação de 3:1, indicando que a dominância é controlada por um locus dominante. Os autores obtiveram um mapa do cromossomo 7R do centeio com o gene *Alt₄*, 16 marcadores SCIM e RAPD e dois marcadores SCM.

Fontecha e colaboradores (2007) obtiveram resultados que também sugerem que o locus *Alt₄* codifica um gene transportador de ácido orgânico ativado pelo alumínio o qual poderia ser utilizado para aumentar a tolerância ao alumínio em espécies de plantas sensíveis.

No triticales (*X Triticosecale* Wittmack), espécie que é um híbrido resultante do cruzamento artificial de trigo e centeio, Ma e colaboradores (2000) descobriram que o braço curto do cromossomo 3R, oriundo do centeio, carrega genes necessários para a tolerância ao alumínio. Os genes induzem à secreção de malato e citrato, um dos mecanismos envolvidos na tolerância ao alumínio.

Estudando a tolerância ao alumínio em aveia (*Avena sativa* L.), Nava e colaboradores (2006) concluíram que seus genótipos tolerantes devem carregar os alelos dominantes Al_a Al_a , enquanto os genótipos sensíveis possuem os alelos recessivos al_a al_a . Consideraram ser possível incorporar a fonte de tolerância ao alumínio no germoplasma da aveia sem perdas de rendimento e qualidade. Afirmam também que o alelo Al_a possibilitaria a obtenção de grãos com um alto rendimento e qualidade quando a aveia fosse cultivada em solos ácidos.

Embora não sendo uma poácea, as raízes da colza (*Brassica napus*) também liberam malato e citrato quando tratadas com alumínio. Como esta resposta é similar ao efluxo de malato pelo trigo, o qual é controlado pelo gene TaALMT1, dois homólogos deste gene isolados na colza receberam os nomes de BnALMT1 e BnALMT2 (*Brassica napus* aluminum-activated malate transporter). A expressão destes genes foi induzida nas raízes, por tratamento com alumínio. A função das proteínas do BnALMT1 e do BnALMT2 foram investigadas por expressão heteróloga em culturas de células de tabaco (*Nicotina tabacum*) e oócitos de *Xenopus laevis*. Ambos os sistemas mostraram uma elevada capacidade de efluxo de malato, mas não de citrato, quando expostos ao alumínio. As células transgênicas

de tabaco cresceram de modo significativamente melhor que as células controle seguindo um tratamento de 18 horas com alumínio, indicando que a expressão do BnALMT1 e do BnALMT2 aumentaram a resistência dessas plantas ao estresse de alumínio (LIGABA et al., 2006).

Portanto, localizar os genes de tolerância ao Al^{3+} , bem como identificar marcadores moleculares ligados e/ou associados a eles é importante para os programas de melhoramento, seja para sua transferência por métodos clássicos de melhoramento seja por transgenia. A introgressão de genes como o ALMT1 e de outros que possam conferir e/ou aumentar a tolerância ao Al^{3+} em culturas sensíveis é uma estratégia importante a ser considerada para aumentar a produtividade em solos ácidos. A identificação de genótipos que possam ser utilizados como nova fonte de genes é também igualmente importante (BOFF, 2006), e até o momento, tem sido a fonte de tolerância ao alumínio usada em programas de melhoramento de trigo no Brasil.

Comparação de genomas em cereais

A conservação do conteúdo e ordem dos genes nos cromossomos de diferentes espécies é chamada de colinearidade. Muitos genes também compartilham um grupo de ligação em outras espécies. Esta conservação da ligação em um cromossomo, na ausência de uma ordem definida, é chamada de sintenia (BENNETZEN & DEVOS, 2002).

No trigo hexaplóide, cada um dos três conjuntos de cromossomos possui conteúdo e ordem de genes muito semelhantes. Nos genomas de espécies próximas, a preservação do conteúdo e ordem dos genes foram conservadas devido ao fato de que esses genomas derivam de um ancestral comum. Contudo, mapas genéticos comparativos de espécies distantes de poáceas têm demonstrado grandes regiões de colinearidade (BENNETZEN & DEVOS, 2002).

A comparação de genomas e a colinearidade dos seus genes é uma ferramenta que pode ser utilizada para se determinar a função dos genes ou para prever relações e inter-relações entre as proteínas codificadas por estes genes (GALE, 2004).

O seqüenciamento do DNA estrutural tem permitido o desenvolvimento de estudos comparativos entre os genomas, os chamados estudos de sintenia entre espécies afins ou distantes. A família *Poaceae* é um dos grupos mais estudados em termos de colinearidade entre os genomas das espécies. Estes estudos têm permitido a identificação de espécies ancestrais e seus descendentes, prever a presença de um gene em uma espécie a partir do conhecimento da localização de um ortólogo em outra, localizar uma seqüência nos grupos de ligação de espécies afins, usar pequenos genomas de espécies substitutas para o isolamento de genes em espécies de genomas maiores através de aproximação baseada em mapas, possibilitar os estudos de criação de genes com novas funções e a subsequente melhora do organismo durante o processo de evolução (GALE, 2004; BENNETZEN & DEVOS, 2002).

A comparação entre genomas de diferentes tribos, há mais de dez anos, já havia comprovado a proximidade entre os

genomas do arroz e do milho, a colinearidade entre o arroz e o trigo e entre o milho e o trigo. Mesmo genomas poliplóides complexos como o da cana-de-açúcar foi mapeado lado a lado com o do milho e do sorgo. Com a explosão de dados baseados nos marcadores de seqüências expressas (EST) no arroz e no milho e sua localização nos mapas genéticos ou físicos, já se previa uma rápida expansão de bancos de dados de seqüências gênicas (GALE & DAVOS, 1998). Basta fazer uma busca na internet para comprovar que esta previsão estava correta.

Estudos de mapeamento em diferentes espécies de poáceas mostraram o alto grau de conservação de posição e ordem de marcadores ortólogos nesta família, apesar das diferenças de tamanho dos genomas e do longo intervalo desde a divergência das espécies entre 41 a 47 milhões de anos atrás. Foi descoberto haver colinearidade entre diferentes espécies em relação às características agronômicas e evolutivas importantes como o nanismo, o tempo de floração e a dispersão, o que reforça o conceito de macro-colinearidade (Revisão em JARDIM, 2007).

Marcadores ligados ao gene *Alt_{BH}* têm mostrado ligação ao gene *Alp* (tolerância ao alumínio em cevada). O marcador bcd 230, fortemente ligado ao *Alt_{BH}* foi mapeado a 33 cM do gene *Alp*, sugerindo que a quebra de colinearidade por meio de rearranjos estruturais entre os cromossomos 4H da cevada e 4D do trigo deve ter ocorrido. De quatro loci de características quantitativas (QTL) descritos para tolerância ao alumínio em aveia, o QTL de maior efeito, responsável por 39% da variação, estava associado ao marcador bcd 250, ligado ao gene de tolerância do trigo *Alt_{BH}*. Portanto, é possível

que esta região genômica contenha o gene ortólogo ao principal gene de tolerância descoberto na tribo *Triticeae* (Revisão em JARDIM, 2007).

As tentativas de estudos de genômica comparativa à tolerância ao alumínio podem agora identificar e utilizar apropriadamente regiões genômicas e genes responsáveis pela tolerância ao alumínio nas poáceas, independente da origem, para o melhoramento dos cereais (JARDIM, 2007).

Cereais de inverno e sua importância econômica

Considerando os efeitos da toxicidade do alumínio nos solos, as pesquisas visando desenvolver novos cultivares tolerantes aos solos ácidos e ao alumínio é de fundamental importância para o aumento da produtividade e do rendimento das culturas no Brasil e no mundo.

Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2007) mostram que a produção mundial de grãos, nos últimos três anos, passou de 1,99 bilhão de toneladas em 2006/2007 para 2,1 bilhões estimados para 2007/2008. Os maiores produtores mundiais de grãos são os Estados Unidos (413,8 milhões de toneladas), a China (391 milhões de toneladas) e a União Européia (253 milhões de toneladas). A seguir vêm a Índia (201,8 milhões de toneladas), o Brasil (131,7 milhões de toneladas), a Rússia (75,8 milhões de toneladas, sem incluir a soja) e a Argentina (43,7 milhões de toneladas) (PROJEÇÕES ..., 2008).

Em decorrência do uso de novas tecnologias de produção relacionadas aos insumos modernos - sementes melhoradas, calcário, produtos fito-sanitários, irrigação e máquinas agrícolas mais desenvolvidas – aumento da profissionalização dos produtores, melhorias na comercialização e apoio dos governos, a oferta de alimentos aumentou e foi suficiente para atender a demanda mundial. A partir de meados da década de oitenta, os índices de produtividade estabilizaram-se em relação a vários cultivos, o que pode ser considerado uma exaustão tecnológica em relação ao conhecimento tradicional (PRODUÇÃO AGRÍCOLA....., 2008).

Entre 1970 – 2005, a população mundial passou de 3,693 bilhões para 6,453 bilhões. Para 2025, a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) prevê uma população mundial de 7,851 bilhões. Deste total, 1,380 bilhões viverão nos países desenvolvidos e os restantes 7,556 bilhões no restante do mundo. Nos próximos vinte anos, 1,398 bilhões de pessoas incorporar-se-ão no mercado de consumo. O atendimento das necessidades de alimentos e fibras vegetais, especialmente nos países desenvolvidos, terá que ser feito de modo sustentável e harmônico, a fim de não comprometer as gerações futuras no atendimento de suas necessidades (PRODUÇÃO AGRÍCOLA....., 2008).

Considerando este contexto, o Brasil pode vir a ser o celeiro do mundo, pois tem apresentado um bom desempenho nas exportações de produtos do agronegócio e vem conquistando novos mercados nas mais diversas partes do mundo. Em pouco mais de dez anos, a produção de grãos aumentou em mais de 100%: 57 milhões de toneladas em 1990 para 115 milhões de toneladas em 2005,

participando em mais de 4% do comércio mundial do agronegócio. Os grãos são responsáveis por 66% da alimentação mundial. Os mais importantes são as poáceas arroz, trigo, milho, centeio, sorgo, cevada, milho e triticale. Além disso, há poucos países no mundo que ainda possuem áreas aptas para a agricultura ainda não cultivadas. Cerca de 90% destas áreas estão na América do Sul e na África. O Brasil usa 34% da sua área de terras nas atividades agropecuárias: 64 milhões de hectares na agricultura e 220 milhões em pastagens, possuindo uma fronteira agrícola inexplorada de 103,32 milhões de hectares (PRODUÇÃO AGRÍCOLA..., 2008).

O trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell) é uma das culturas mais estudadas para diversas características agronômicas, devido à sua importância econômica no mundo ocidental. Segundo a FAPRI (Food and Agricultural Policy Research Institute) a produção mundial de trigo de 530,8 milhões de toneladas em 2006/2007 e poderá ser elevada para 677,8 milhões de toneladas em 2016/2017. Seu uso como alimento poderá atingir 562,2 milhões de toneladas em 2016/2017. Já a FAO faz projeções de consumo crescente de trigo para todos os usos (alimentação humana e rações animais), passando de 85 kg per capita em 1999/2001 para 92 em 2030 e 94 em 2050, devendo sua demanda crescer de modo especial nos períodos de 2030 a 2050. O principal exportador é os Estado Unidos, seguido pela Argentina, Austrália, Canadá, União Européia e a Rússia. Os preços mundiais mostram tendência crescente nos próximos três anos e praticamente constantes nos próximos dez anos. A produção brasileira deverá crescer até 2017/2018. O consumo interno deverá crescer 1,63% ao ano em média, atingindo 13,3 milhões de toneladas em

2017/2018. Atualmente o consumo anual brasileiro mantém-se em torno de dez milhões de toneladas (Projeções Agrícolas..., 2008). É cultivado nas regiões Sul (RS, SC e PR), Sudeste (MG e SP) e Centro-oeste (MA, GO e DF). Cerca de 90% da produção está na Região Sul. A cultura do trigo está sendo introduzida na região do cerrado sob irrigação ou sequeiro (CNPT, 2008).

O triticale (X *Triticosecale* Wittmack) é um cereal de inverno, fruto do cruzamento artificial de trigo com centeio. A área cultivada no Brasil é de cerca de 100 mil hectares nos estados da região Sul (RS, SC e PR). Possui mais proteína e menos energia que o milho, podendo ser usado em produtos dietéticos, massas para pizzas, pães caseiros e biscoitos. Seu principal uso destina-se à alimentação animal. Em 2004, a Embrapa Trigo registrou o cultivar Triticale BRS Minotauro, o primeiro obtido por cruzamento no Brasil, o qual é indicado para cultivo nos estados do Rio Grande do Sul, de Santa Catarina, do Paraná e de São Paulo (CNPT, 2008).

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) é o quinto cereal de inverno em importância econômica mundial. É muito utilizada na produção de bebidas (cerveja e destilados), na composição de farinhas ou flocos para a indústria panificadora, na produção de medicamentos e produtos dietéticos. Também é usada como substituta do café, na alimentação animal e como forragem. A produção brasileira concentra-se na região Sul, nos estados de Goiás, Minas Gerais e São Paulo, em mais de 140 mil hectares. O Brasil produz somente 30% da cevada utilizada pela sua indústria cervejeira. Existem três maltarias em atividade nos estados do Rio Grande do Sul, do Paraná e em São Paulo (CNPT, 2008).

O centeio (*Secale cereale* L.) é o oitavo cereal mais cultivado no mundo. Juntas, Rússia e Polônia cultivam 56% da área total, que, se somadas às áreas da Alemanha, Ucrânia e Belarus, totalizam 81%. Nestes países, o centeio é utilizado na alimentação humana (pães, biscoitos e pré-misturas), animal e adubação verde. No Brasil, foi introduzido pelos imigrantes alemães e poloneses no século XIX. A área cultivada é a segunda maior da América do Sul. O Rio Grande do sul é o estado com maior área de cultivo de centeio, 4 mil hectares na safra 2006/2007 e 2,9 mil hectares na safra 2007/2008 (CNPT, 2008; CONAB, 2008). Esta espécie apresenta fecundação cruzada e é muito rústica e adaptada a solos pobres e arenosos. Seu sistema radicular profundo e abundante, além de permitir absorver água e nutrientes indisponíveis a outras espécies, contribui para manter a matéria orgânica no solo, reduz as perdas de solo por erosão e intensifica a penetração e a retenção da água no solo. É um cereal rico em fibras, sais minerais, aminoácidos essenciais, de alto valor dietético e pobre em calorias (CNPT, 2008).

O grande aumento da produtividade agrícola nos últimos anos no Brasil deve-se à adoção de novas tecnologias de produção, muitas das quais foram resultado das pesquisas desenvolvidas pelas unidades da Embrapa espalhadas pelo Brasil. No Centro Nacional de Pesquisa do Trigo (CNPT) - Embrapa Trigo – são desenvolvidas pesquisas visando ao melhoramento das espécies de trigo, centeio, cevada e triticale às condições de clima e solo brasileiros. O Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno (NBAC) adota diferentes ferramentas que são usadas nos programas de melhoramento dos cereais de inverno, contribuindo para o aumento

da sua produção e rendimento, proporcionando aos agricultores uma melhoria na sua qualidade de vida bem como no agroecossistema de suas propriedades.

**AValiação DA TOLERância AO ALUMíNIO EM
GENóTIPOS DE CEREAIS DE INVERNO SOB CULTIVO
HIDROPôNICO E CAMPO**

**ROBERTO PORTALUPPI¹, SANDRA PATUSSI
BRAMMER², JURANDIR VIEIRA DE MAGALHÃES³,
CIBELE TESSER DA COSTA⁵, EDUARDO CAIERÃO⁴,
ALFREDO DO NASCIMENTO JUNIOR⁴ E JOSÉ PEREIRA
DA SILVA JUNIOR⁴**

RESUMO - A toxicidade do alumínio (Al^{3+}) está presente em grande parte dos solos agrícolas no mundo. Por meio de cruzamentos com germoplasma específico, auxiliados ou por seleção assistida via marcadores moleculares ou por técnicas de transgenia, é possível obter cultivares tolerantes a esta característica. Como apoio à seleção, destaca-se, também, o cultivo hidropônico, que permite selecionar genótipos tolerantes, em um curto período de tempo, através do crescimento das raízes expostas a diferentes concentrações do cátion Al^{3+} , em solução nutritiva e em ambiente controlado. A seleção a

¹ Biólogo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Produção Vegetal.

² Orientadora, Bióloga, Dr^a. em Genética e Biologia Molecular, Professora do PPGAgro e Pesquisadora da Embrapa Trigo.

³ Co-orientador, Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Field Crop Science, concentração Plant Genetic, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

⁴ Pesquisador da Embrapa Trigo.

⁵ Bióloga, Bolsista Apoio Técnico/FAPEMIG/ Embrapa Trigo.

campo, quando comparada à hidroponia, apresenta certas limitações, pois o pH do solo e os teores dos elementos químicos variam consideravelmente no espaço, em profundidade e no tempo. O objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade de crescimento radicular de 75 genótipos de cereais de inverno (cevada, triticales, centeio, trigo e *Aegilops tauschii*) em cultivo hidropônico, sob diferentes concentrações de alumínio, e relacionar o grau de tolerância/sensibilidade em solução hidropônica com a resistência/suscetibilidade ao crescimento em campo. Os resultados mostraram existir uma elevada relação entre a tolerância ao alumínio em hidroponia e a resistência ao crescimento em campo, indicando que a seleção via hidroponia pode ser considerada como eficiente ferramenta de apoio aos programas de melhoramento genético para esta característica.

Palavras-chave: alumínio, cultivo hidropônico, tolerância, campo, resistência, crescimento, toxicidade.

**EVALUATION FOR TOLERANCE TO ALUMINUM OF
GENOTYPES OF WINTER CEREALS ON HYDROPONIC
CULTURE AND FIELD**

**ROBERTO PORTALUPPI, SANDRA PATUSSI BRAMMER,
JURANDIR VIEIRA DE MAGALHÃES, CIBELE TESSER
DA COSTA, EDUARDO CAIERÃO, ALFREDO DO
NASCIMENTO JUNIOR AND JOSÉ PEREIRA DA SILVA
JUNIOR**

ABSTRACT - The toxicity of aluminum (Al^{3+}) is present in a large proportion of the world agricultural land. Through crossbreeding with specific germplasm, aided by molecular markers or transgenic techniques by assisted selection, it's possible to obtain tolerant cultivars to this characteristic. As support for selection, there is also the hydroponic culture, as it allows select different genotypes, in a short period of time, by means of assessing the growth of roots when exposed to different concentrations of Al^{3+} cation in nutrient solution in controlled environment. Selecting in the field, compared to selection in hydroponics, has serious limitations, since the soil pH and the levels of the chemical elements can vary considerably in the space, in profundity any time. The objective of this study was to determine root growth of 75 genotypes of small graine cereals (barley, triticale, rye, wheat and *Aegilops tauschii*) in hydroponic culture under different concentrations of aluminum, and establish the relationship between the tolerance/sensitivity in hydroponic solution to the

resistance/susceptibility index in the field. Data obtained for all genotypes assessed, showed that there is a high correlation between tolerance to aluminum in hydroponics and resistance to “crestamento” in the field, indicating that selection in hydroponics can be considered as an efficient tool to support plant breeding for resistance to this important loci.

Key words: aluminum, hydroponic culture, tolerance, field, resistance, ”crestamento”, toxicity.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo hidropônico, a fim de avaliar a redução do crescimento radicular dos cereais de inverno, provocado pelo alumínio tóxico na forma do cátion Al^{3+} , possui algumas vantagens em relação às metodologias que envolvem cultivo em campo. No cultivo hidropônico, o sistema radicular é facilmente observado e permite a medição das raízes de modo preciso, pois as estruturas sofrem menos danos físicos ao serem retiradas da solução nutritiva, em comparação ao solo. A hidroponia é um método de caracterização específica da toxicidade do alumínio, enquanto que no solo estão incluídos outros fatores potenciais ligados à toxicidade como os teores elevados de ferro e manganês e a deficiência de fósforo e de molibdênio. Em experimentos em campo, o pH e os teores dos elementos químicos do solo variam constantemente de acordo com as variações climáticas e a toxicidade ao alumínio não é o único fator limitante. Além disso, as raízes, que são a parte mais afetada pelo alumínio, não são facilmente observadas. Nos métodos hidropônicos, é possível controlar essas variáveis e também os estudos genéticos e caracterização de germoplasma específico para a tolerância ao alumínio (CAMARGO et al., 2006; VOSS et al., 2006).

Técnicas para caracterização fidedignas e efetivas em relação à tolerância ao alumínio para predizer performances em campo são importantes para os programas de melhoramento em regiões onde solos ácidos são um problema. Em comparações entre resultados de técnicas de “screening” em laboratório e avaliações em

campo, é importante verificar se as condições de laboratório podem ou não prever respostas aos estresses de campo (Ruiz-Torres et al., 1992 apud BAIER et al., 1995).

Os sintomas de toxicidade de alumínio podem ser obtidos via aumento da concentração de Al^{3+} ou da diminuição das concentrações de sais da solução nutritiva (CAMARGO et al., 2006).

O Al^{3+} precipita o fósforo (P) nas raízes, reduzindo sua translocação para a parte aérea. Como o fósforo tem um papel fundamental no ciclo de energia das células, sua deficiência causa mudanças significativas no metabolismo, alterando as concentrações de P inorgânico, ADP e ATP. Isso afeta o metabolismo respiratório e influencia todas as reações que dependem destas substâncias (Alam, 1981; Ryan et al., 2001 apud BOFF, 2006).

Bertan et al. (2006) verificaram, por meio do uso da técnica de hidroponia, diferenças entre 23 genótipos de trigo, constatando a presença de variabilidade genética para a tolerância ao alumínio. Isto possibilitou aos autores identificarem, no seu estudo, os melhores genótipos para cruzamentos e obtenção de progênies superiores para tolerância ao alumínio em programas de melhoramento. Além do mencionado, diversos estudos com o objetivo de detectar a tolerância ao alumínio são abordados em espécies distintas de gramíneas e servem de subsídio aos programas de melhoramento genético (BERTAN et al., 2006; BERZONSKY & KIMBER, 1986; CAMARGO et al., 2006; RAMAN et al., 2008; SILVA et al., 2006; WANG et al. 2006a, 2006b).

O cultivo em solução hidropônica também pode ser usado para determinar a relação entre resistência ao alumínio e o nível de efluxo de malato em diversos cultivares de trigo, usando, como parâmetro, a medida das raízes para avaliar a resistência ao alumínio (RAMAN et al., 2008).

Wang et al. (2006a), usando um meio hidropônico, procuraram estabelecer a ligação da tolerância ao alumínio com o pH da rizosfera e os ácidos orgânicos exsudados pelas raízes do trigo sob o estresse de alumínio e consideraram que a inibição do crescimento da raiz foi a melhor medida para os sintomas da toxicidade ao alumínio. Esses resultados indicaram que o alumínio está associado com o pH da rizosfera em cultivares de trigo. O cultivar tolerante ao alumínio Atlas 66 é capaz de manter um elevado pH na rizosfera e, assim, reduzir a atividade e toxicidade do Al^{3+} . Além disso, permite estudar outros componentes químicos básicos que ocorrem na rizosfera e suas conseqüências diretas para a função de resistência ao alumínio pelas raízes das plantas, tais como os íons H^+ , os eletrólitos, os aminoácidos e os metabólitos secundários que são exsudados nas raízes, os quais podem fornecer informações úteis sobre os mecanismos de detoxificação das espécies resistentes ao alumínio na rizosfera (WANG et al., 2006b).

A toxicidade do alumínio é o principal fator que leva ao crestamento de cereais, entre eles o trigo (VOSS, 2007). Cultivares de trigo suscetíveis ao Al^{3+} apresentam, como sintomas da planta deficiente, raízes atrofiadas, folhas amareladas, formação de espigas rudimentares com poucas espiguetas ou até mesmo sem sua formação,

o que é conhecido, no Rio Grande do Sul, como “crestamento”. A tolerância ao alumínio é, pois, um fator importante na adaptação dos cultivares de trigo e outros cereais às condições de cultivo dos solos ácidos, causadores do crestamento (SANTOS, 1999).

No presente estudo, a característica usada para a avaliação dos genótipos quanto à tolerância/sensibilidade ao alumínio foi a medida do comprimento das duas raízes maiores. Esta característica é considerada a mais apropriada abordagem para estudos genéticos e moleculares e fornecem uma boa separação dos genótipos tolerantes e sensíveis ao alumínio (WANG et al., 2006).

Existem múltiplos mecanismos de tolerância ao alumínio em plantas, codificados por diferentes genes, e as forças de tolerância ao alumínio não podem ser todas identificadas com um único método de avaliação. A combinação de cultivo hidropônico e cultivo em campo pode ser essencial para identificar genótipos que possuem múltiplos mecanismos de tolerância ao alumínio. Estes genótipos poderiam ser usados para a transferência de genes por meio da transformação genética (NARASIMHAMOORTHY et al., 2007).

O objetivo do presente estudo foi determinar a capacidade de crescimento radicular entre os genótipos de cevada, triticale, centeio, trigo e *Aegilops tauschii*, quando cultivados em hidroponia, em diferentes concentrações de alumínio e relacionar a tolerância/sensibilidade dos genótipos em solução hidropônica e a resistência/suscetibilidade ao crestamento em campo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno (NBAC) da Embrapa Trigo e em campo na estação experimental da Embrapa Trigo, localizada na BR 285, km 299 (Passo Fundo – RS).

Foram avaliados 75 genótipos, sendo 14 de cevada (*Hordeum vulgare* L.) (Tabela 1); 15 de triticales (X *Triticosecale* Wittmack) (Tabela 2); 15 de centeio (*Secale cereale* L.) (Tabela 3); 16 de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Tabela 4); e 15 de *Aegilops tauschii* (= *Triticum tauschii*) (Tabela 5), mantidos pelo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Trigo.

Em todos os experimentos foram usados os cultivares de trigo Anahuac 75 (sensível ao alumínio) e IAC 5 – Maringá (tolerante ao alumínio), como controles para o caráter em questão.

Tabela 1- Genótipos de Cevada (*Hordeum vulgare* L.) utilizados, genealogia e origem
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Genealogia/Cruzamento	Origem do Programa de Melhoramento Embrapa Trigo
Antártica 01	Seleção de Volla	727037/97
Antártica 04	Seleção de W-6601	126708/01
Antártica 05	Origem Desconhecida	227510/02
MN 698	MN 599/MN 635	227526/02
IPFC 20011	Seleção de Scarlett	EPR 2005
Cevada BR 1	Binder/Opal//Balder/Kenia	627536/96
BR 2	FM 424/Norbert	L. 01/94
BRS Marciana	PFC 9240/PFC 9211	PFC 98074- BC 2005- 50110
BRS 224	Embrapa 43/PFC 9114	Cev. 9605 1 - L. 05/98
Alpha	Manchuria/Champion of Vermont	C1959 126729/01
Harrington	Klages//Gazelle/Betzes	325805/03
FM 404	Seleção de Alpha	827015/98
FM 519	Km1/Union//Volla/3/Km2/Volla//Wisa/4/Alpha	287221/90
PFC 7802	Binder*2//Opal //Balder/Kenia/3/Aplha	141162/83

Tabela 2- Genótipos de Triticale (X *Triticosecale* Wittmack) utilizados, genealogia e origem
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Genealogia	Origem do Programa de Melhoramento Embrapa Trigo
PFT 112	PFT 512/Guará	640208/06
PFT 209	PFT215*2/TCA 3050-89	540235/05
PFT 307	PFT 312/PFT 511	L.844/04 G
PFT 0407	ERIZ011*2/Milman*2/Picus	L. 712/05 G
PFT 0417	Presto//2*Tesmo-1 Mus 603/4/Ardi-1/...	L. 720/05 G
PFT 0609	Embrapa 53//PFT 116/HOH-87.102-6-1	L. 996/06
BRS 148	Yogui/Tatu	640202/06
BRS 203	LT-1/Rhino	640203/06
BRS Minotauro	Octo 92-3 (PF 89358/CBR1) Triticale BR4	640204/06
BRS Netuno	Pollmer//2*Erizo/Bull-1	640209/06
BRS Ulisses	Erizo/Nimir	640210/06
Embrapa 53	LT 1117.62/Civet/Tatu	640207/06
IAPAR 23 Arapoti	CIN/CNO//BGL/3/MERINO	640214/06
IPR 111	Anoas 5/Stier13	640213/06
Triticale BR 1	M2A/CML	340010/2003

Tabela 3- Genótipos de Centeio (*Secale cereale* L.) utilizados, genealogia e origem
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Genealogia	Origem do Programa de Melhoramento Embrapa Trigo
698206	Pl. Rfco no Al+03 (Cd)	698206/06
698207	Pl. Rfco.no Al+03(Cd)	698207/06
698210	Pl. Rfco.no Al+03(Cd)	698210/06
PFS 0501	Pop. 8011	698225/06
PFS 0502	Pop. Andreas Kreuzscha	698226/06
PFS 0504	Pop. Estefano Schneider	698228/06
PFS 0601	Sel. 3pl.	698229/06
PFS 0603	Pop. Cent. Desc.	698231/06
PFS 0604	Pop. Cent. 981	698232/06
PFS 0605	Sel. Pl. Sel Al ³⁺ + Rfco	698233/06
PFS 0606	Sel. Pl. Bx. Color clara	698234/06
PFS 0607	Sel. Pl. Bx. Color escura	698235/06
Centeio BR 1	Seleção de pop.coloniais brasileiras	L. 128/98
BRS Serrano	Centeio Garcia/Centeio Bagé	PFB 1205/2005
IPR 89	Seleção de pop. australianas	440106/2004

Tabela 4 – Genótipos de Trigo (*Triticum aestivum* L.) utilizados, genealogia e origem
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Genealogia	Origem do Programa de Melhoramento Embrapa Trigo
Anahuac 75	II 12300//Lerma Rojo 64/8156/3/ Norteno 67	64001611-A/06
BRS Angico	PF 87107/2*IAC 13	L.169/98
BRS Buriti	Embrapa 27/Klein Orion	L.277/00
BRS Guabiju	PF 86743/BR 23	1.201/01
BRS Guamirim	Embrapa 27/Buck Nandu//PF 93159	L.PFB 115/04
BRS Tarumã	Century/BR 35	6009-BC 06
BRS 194	(2000) CEP14/BR23//CEP17	L.97/96
BRS 209	Iupateco 73/Embrapa 16	EFM-PR
BRS 229	Embrapa 27*3//BR35/Buck Poncho	6102-BC 06
CD 104	PFAU SIB/ Iapar 17	227246/02
IAC 5 Maringá	Frontana/ Kenya 54//PG1	327135/03
IPR 85	Iapar 30/BR 18	6195/BC 2006
IPR 87	IOC 878/ Iapar 17	IAPAR 2004
Jesuíta	Polyssu/ Alfredo Chaves 3-21	626595/96
PF 844005	<i>T. durum</i> Hércules,NE 22912/ <i>Ae. squarrosa</i> ,NE 20211 -C	341219/91
Toropi	Petiblanco 8//Frontana 1971-37/ Quaderna A	326505/03

Tabela 5 – Genótipos de *Aegilops tauschii* utilizados e origem
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Origem no BAG - Embrapa Trigo
NE 20202-A	247369/94
NE 20223-A	247383/94
NE 20064-A	140602/83
NE 20196-B	125103/01
NE 20229-B	30769/88
NE 20195-C	180468/89
NE 20206-C	247376/94
NE 20234-T	340029/91
NE 20238-X	247399/94
NE 201165-Y	180454/89
NE 20207-Y	340010/91
NE 20215-Y	340016/91
RL 5776	825055/98
RL 5786	<i>T. tauschii</i> Oídio 89
RL 5795	625057/96

2.2 Métodos

2.2.1 Cultivo Hidropônico

Utilizou-se a metodologia para a avaliação de tolerância ao alumínio em hidroponia em trigo, a qual permite classificar os genótipos como tolerantes ou sensíveis, adotada pela Embrapa Trigo, protocolo baseado em Voss et al. (2006), com adaptações. Essa metodologia foi seguida para todos os cereais de inverno, alterando as concentrações de alumínio solúvel, conforme a espécie. Contudo, os cultivares de trigo IAC 5 Maringá e Anahuac 75 foram utilizados, respectivamente, como controles de caráter tolerante e sensível ao íon Al^{3+} , para todos os experimentos

Preparo das sementes

As sementes foram previamente desinfestadas com imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio (2%), por quatro minutos, seguida de seis enxágües com água destilada e deionizada. Após, as sementes foram colocadas sobre círculos de papel germitest (Germilab), dentro de placas de petri, umedecidas com água destilada e mantidas em câmara de crescimento com temperatura de 4°C, por 24 horas. Para os genótipos de *Ae. tauschii*, em temperatura de 2°C, por 26 dias, a fim de promover a quebra de dormência. Em seguida, a germinação foi realizada por um período de 36 a 40 horas, com temperatura de 20°C, +- 1°C.

De um total de 15 a 30 sementes colocadas nas placas, foram selecionadas oito sementes de cada genótipo, com tamanho similar, com raízes medindo 0,5 cm e transferidas para uma tela plástica com dois milímetros de malha, firmada em uma grade de plástico rígido, com alvéolos de três centímetros de comprimento por três centímetros de largura e por dois centímetros de altura. Tiras de poliestileno fixadas nas margens da estrutura telada mantinham-na flutuando dentro de bandejas plásticas de 30 cm de comprimento por 22 cm de largura e por sete cm de altura (Figura 1).

Tomou-se o cuidado de, ao inserir cada raiz nos orifícios da tela dos alvéolos, não danificá-las, acrescentando-se a seguir 2000 ml de solução nutritiva.

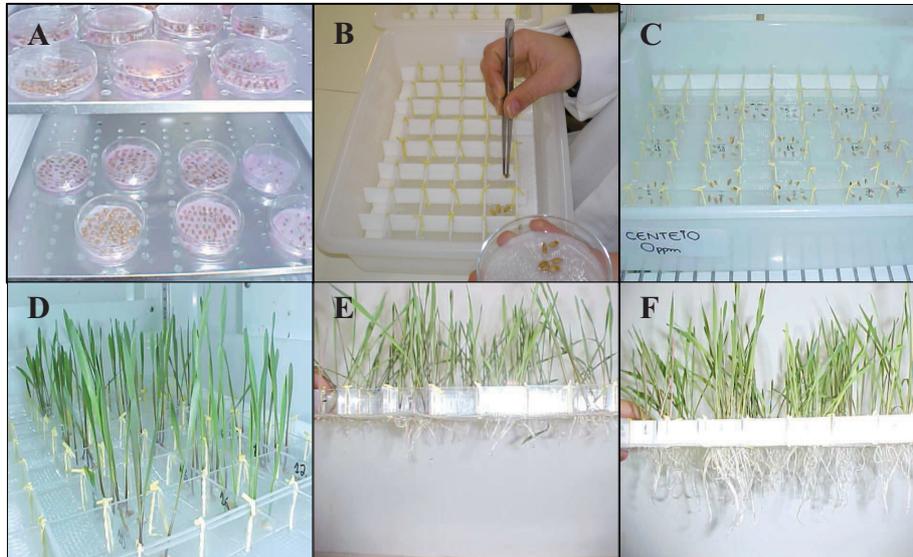


Figura 1. Etapas do cultivo hidropônico do centeio (*S. cereale* L.): A) Sementes em placas de petri para quebra de dormência; B) Sementes na tela para germinação; C) Bandeja mostrando, no detalhe, as sementes selecionadas; D) Genótipos no último dia do cultivo hidropônico; E e F) Raízes dos genótipos com 10 e 0 ppm de Al^{3+} , respectivamente.

Preparo das soluções

Solução estoque e solução nutritiva

Foram preparadas soluções estoque individualizadas com os seguintes reagentes p.a.: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 58,80 g/l; KNO_3 , 65,70 g/l; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50,80 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,30 g/l; NH_4NO_3 , 3,20 g/l. A solução foi armazenada em frasco escuro ao abrigo da luz direta.

A solução nutritiva foi preparada usando-se a seguinte concentração e composição: 400 $\mu\text{mol/l}$ de CaCl_2 ; 650 $\mu\text{mol/l}$ de KNO_3 ; 250 $\mu\text{mol/l}$ de MgCl_2 ; 10 $\mu\text{mol/l}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 40 $\mu\text{mol/l}$ de

NH_4NO_3 (pH 4,0). Foi usado 1 ml da solução estoque de cada sal por litro de água destilada e deionizada. O pH foi corrigido para 4,0 com o uso de HCl.

Solução estoque de alumínio

Foi dissolvido 0,894 g de AlCl_3 em um balão volumétrico com água destilada com litros de água destilada. A solução foi armazenada em frasco escuro, ao abrigo da luz direta. Sua concentração final foi de 1 mg de Al/ml.

Avaliação em solução hidropônica

Condições da câmara de crescimento

Foi utilizada câmara de crescimento com controle de temperatura e de luz, ajustadas para 23°C, +- 1°C e 24 horas. As soluções nas bandejas foram aeradas por meio de dois tubos de vidro de 20 cm de comprimento por três milímetros de diâmetro interno, postos nas laterais das bandejas conectados a um compressor de ar.

Aplicação do teste

Em uma das bandejas, foi adicionado alumínio, enquanto que a outra permaneceu apenas com a solução nutritiva, servindo como grupo controle. Cada espécie teve uma concentração

de solução estoque de alumínio específica com alumínio substituída em 24, 48 e 72 horas. Após 96 horas de crescimento, foi retirada a solução nutritiva e as bandejas foram postas no freezer, à temperatura de -23°C até o momento da medição do comprimento (Figura 2).



Figura 2. Medição do comprimento das raízes: A) Bandejas no freezer para posterior medição das raízes; B e C) Medição das raízes que foram expostas a concentrações de 0 e 10 ppm de Al^{3+} , respectivamente.

Hidroponia da Cevada (*Hordeum vulgare* L.)

As sementes pré-germinadas foram colocadas em telas plásticas, dentro de bandejas com solução nutritiva com zero (controle) e 0,5 ppm de Al^{3+} , conforme Minella e Sorrels (2002).

Hidroponia do Triticale (*X Triticosecale* Wittmack)

O screening dos genótipos de triticale em solução hidropônica ocorreu de modo semelhante ao de cevada, em soluções nutritivas, em bandejas com zero (controle), 2 e 6 ppm de Al^{3+} .

Hidroponia do Centeio (*Secale cereale* L.)

A exemplo do triticales, também foram avaliadas três diferentes concentrações de alumínio: 0 (controle), 6 e 10 ppm de Al^{3+} .

Hidroponia do Trigo (*Triticum aestivum* L. em Thell)

Após a desinfestação, pré-germinação e seleção, as sementes foram postas nas bandejas com solução nutritiva contendo zero (controle) e 2 ppm de Al^{3+} , conforme Voss et al. (2006).

Hidroponia do *Aegilops tauschii*

Com procedimento semelhante às anteriores, após o período de quebra de dormência (três semanas) e de germinação, as sementes foram selecionadas e postas nas bandejas com solução nutritiva em concentrações de 0 ppm (controle) e 2 ppm.

Análises

Determinação do crescimento das raízes

Os experimentos foram completamente casualizados, sendo que cada planta consistiu uma repetição. Foi utilizado o Procedimento GLM do SAS – (Statistical Analysis System).

Inicialmente as plantas foram retiradas do freezer e suas raízes foram mergulhadas em água, na temperatura ambiente, a fim de promover o descongelamento e facilitar as medições. Foram medidos o comprimento da raiz principal e da secundária maior, com o auxílio de um paquímetro digital. Para a análise estatística, considerou-se a média da medida de ambas as raízes de cada planta.

A interpretação de tolerância seguiu a metodologia de Voss et al. (2006), baseada no quociente entre o comprimento médio das raízes em solução com alumínio e o comprimento médio das raízes crescidas na solução sem alumínio. Considerou-se sensível o material semelhante à testemunha sensível, e tolerante, o material semelhante à testemunha tolerante para cada espécie. Os genótipos com crescimento radicular intermediário foram considerados moderadamente sensíveis, quando apresentavam índices numéricos de 26 a 50% maiores do que a média da testemunha sensível e moderadamente tolerantes quando seus índices estavam entre 51 e 75% do valor obtido pela testemunha tolerante.

2.2.2 Cultivo em campo

A fim de testar/comparar a eficiência do método hidropônico com os resultados verificados nos ensaios em campo, os mesmos genótipos foram semeados no campo experimental da Embrapa Trigo. Os genótipos foram testados nas concentrações de pH 4,4 e 4,85, disponíveis na área experimental e que fazem parte de uma área propriamente conduzida para este tipo de avaliação,

corrigida a $\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ do índice SMP. O solo é do tipo Latossolo Vermelho Distrófico típico, textura argilosa.

Para esse método de avaliação, o local do experimento deve permitir que o cultivar sensível ao alumínio, o trigo Anahuac 75, apresente claramente os sintomas de crestamento servindo como controle do mesmo.

Delineamento experimental

A semeadura dos genótipos de cevada, triticale, centeio e trigo foi feita nos dias 30 e 31 de agosto de 2007, usando-se 60 sementes aptas por metro linear. As parcelas foram constituídas por cinco linhas de um metro de comprimento com vinte centímetros de espaçamento entre as linhas, sem repetições. Para a espécie *Aegilops tauschii* não foi feito cultivo e análise em campo uma vez que a mesma não apresenta tipo agrônômico adequado para plantio. A semeadura foi feita fora da época recomendada, devido à necessidade de se utilizar sementes multiplicadas com pureza genética, fator este que gerou o atraso na obtenção das mesmas e menor número de sementes por material.

As plantas nas parcelas foram submetidas aos tratamentos agrônômicos com o fungicida Piraclostrobina + Epoxiconazole, na dosagem de 1333+50g i.q./ha, nos estágios de afilhamento e espigamento, sem tratamento de sementes. O controle de ervas daninhas foi feito através da capina manual.

Avaliação do crestamento: Variáveis analisadas

A avaliação do experimento no campo, no dia 05 de novembro de 2007, durante o ciclo vegetativo, seguiu a metodologia de Sousa (1998), utilizada na Embrapa Trigo, a qual classifica os genótipos com uma escala de notas de zero a cinco, da seguinte maneira: altamente resistente (0,50 – 0,80); resistente (0,81 - 1,50); moderadamente resistente (1,51 - 2,50), moderadamente suscetível (2,51 - 3,50); suscetível (3,51 - 4,50) e altamente suscetível (4,51 - 5,0).

O critério dos escores utilizado foi: 0,5, altamente resistente; 1, resistente, plantas normais e vigorosas com perfilho abundante; 2, moderadamente resistente, plantas normais, levemente menos vigorosas e com menos perfilhos do que o grupo anterior; 3, moderadamente suscetíveis, desenvolvimento das plantas intermediário; 4, suscetíveis, plantas deficientes, sem perfilho; e 5, altamente suscetíveis, plantas mortas ou com desenvolvimento muito deficiente (SOUSA, 1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Avaliação em hidroponia

As médias do comprimento das duas raízes maiores de cada genótipo de cevada são apresentadas na tabela 6.

Os genótipos MN 698, Cevada BR2, BRS Marciana, FM 519 e Antártica 05 apresentaram baixo índice de germinação, inviabilizando assim a realização das suas análises estatísticas.

Dos 14 genótipos testados, dois foram incluídos no grupo dos tolerantes: PFC 7802 e Antártica 01. Os cultivares de cevada Antártica 04, BR1, IPFC 20011, BRS 224 e FM 404 foram incluídos no grupo dos moderadamente tolerantes. Os cultivares Harrington e Alpha foram incluídos no grupo dos moderadamente sensíveis.

A cevada é considerada o cereal mais sensível à toxicidade do alumínio. Sua tolerância ao alumínio é controlada por um locus simples, de um gene localizado no cromossomo 4H, sendo muito pequena sua base genética para a tolerância (WANG et al., 2006). Minela e Sorrells, (1992), concluíram que há uma pequena possibilidade para o melhoramento da cevada em relação à tolerância ao alumínio. Os resultados aqui obtidos demonstram que esse melhoramento é possível.

A partir do modelo estatístico empregado, Procedimento GLM do SAS – (Statistical Analysis System), os cultivares Harrington e Alpha não diferiram do cultivar de trigo Anahuac 75 (sensível) ($P=0,05$), sendo que o modelo ajustado explicou 69,45% da variação observada.

Tabela 6: Tolerância/Sensibilidade de cultivares de cevada ao Al^{3+} (0 e 0,5 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controles os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (R).

Passo Fundo, 2008

Genótipo	ppm	Comprimento (mm)	Tolerância/Sensibilidade
Antártica 04	0	31,21	MT
	0,5	19,71	
PFC 7802	0	29,86	T
	0,5	26,93	
Cevada BR 1	0	38,64	MT
	0,5	25,40	
Harrington	0	31,89	MS
	0,5	16,00	
Anahuac 75 ¹	0	32,31	S
	0,5	14,36	
IAC 5 Maringá ²	0	53,43	T
	0,5	62,71	
IPFC 20011	0	32,07	MT
	0,5	20,64	
Alpha	0	22,34	MS
	0,5	11,71	
BRS 224	0	26,10	MT
	0,5	15,85	
FM 404	0	21,21	MT
	0,5	16,33	
Antártica 01	0	23,39	T
	0,5	27,53	

¹ Controle sensível

² Controle tolerante

T: tolerante MT: moderadamente tolerante

S: sensível MS: moderadamente sensível

Para determinar a tolerância/sensibilidade dos genótipos de triticales à concentração de 6 ppm de alumínio, utilizaram-se os cultivares IAPAR 23 Arapoti (tolerante) e PFT 209 (sensível) como testemunhas, além dos controles de trigo (Tabela 7). Dos 15 genótipos testados, somente um foi incluído no grupo dos sensíveis: PFT 209. Os genótipos BRS 203, BRS Netuno, Triticale BR 1 e PFT 307 foram incluídos no grupo dos moderadamente tolerantes. No grupo dos tolerantes encontram-se os cultivares IAPAR 23 Arapoti, Embrapa 53, PFT 112, IPR 111, BRS 148, BRS

Ulisses, PFT 0407, PFT 0609 e BRS Minotauro. O cultivar PFT 0417 apresentou baixo índice de germinação, o que impossibilitou sua análise estatística.

O triticale é um híbrido de trigo e centeio, o qual apresenta alguns graus de tolerância ao Al^{3+} . A tolerância do trigo parental ao Al^{3+} é muito importante nos programas de melhoramento de genótipos de triticale (ANIOL & GUSTAFSON, 1984). Provavelmente, seja esta a explicação dos resultados obtidos nesta avaliação.

Contudo, os genótipos tolerantes e moderadamente tolerantes não diferiram do IAPAR 23 Arapoti ($P=0,05$); os sensíveis PFT 209 e Triticale BR1 também não diferiram entre si. O modelo ajustado explicou 79,54% da variação observada.

Tabela 7: Tolerância/Sensibilidade de cultivares de triticale ao Al^{3+} (0 e 6 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controle das condições de hidroponia os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (T) e como testemunhas os cultivares de triticale PFT 209 (S) e IAPAR 23 Arapoti (T). Passo Fundo, 2008

Genótipo	ppm	Comprimento (mm)	Tolerância/Sensibilidade
PFT 209 ¹	0	39,47	S
	6	13,94	
Triticale BR1	0	32,02	S
	6	12,67	
Embrapa 53	0	32,98	T
	6	22,49	
PFT 112	0	36,41	T
	6	21,48	
IPR 111	0	35,42	T
	6	23,55	
BRS 148	0	32,06	T
	6	23,29	
BRS Ulisses	0	42,88	T
	6	27,85	
IAC 5 Maringá*	0	67,21	T
	6	26,50	
Anahuac 75*	0	52,23	S
	6	9,14	
BRS 203	0	31,15	MT
	6	14,39	
BRS Netuno	0	35,88	MT
	6	16,27	
IAPAR 23 Arapoti ²	0	33,89	T
	6	23,04	
PFT 0407	0	39,20	T
	6	21,26	
PFT 0609	0	34,84	T
	6	19,04	
PFT 307	0	39,02	MT
	6	17,75	
BRS Minotauro	0	32,99	T
	6	24,33	

* Trigo, controle das condições da hidroponia

¹ Testemunha sensível

² Testemunha tolerante

T: tolerante

MT: moderadamente tolerante

S: sensível

MS: moderadamente sensível

No caso dos genótipos de centeio, visando verificar a tolerância/sensibilidade à concentração de 10 ppm de alumínio, foram utilizados os genótipos de trigo IAC 5 Maringá (tolerante) e Anahuac 75 (sensível) como controles da hidroponia. Já os genótipos de centeios BRS Serrano e 698210, conhecidos na Embrapa Trigo por seus caracteres tolerante e moderadamente sensível, respectivamente, foram utilizados como testemunhas (Tabela 8).

Os genótipos PFS 0501, IPR 89, PFS 0502, PFS 0504, PFS 0605, PFS 0606, PFS 0607, 698206 e 698207 foram incluídos no grupo dos tolerantes. PFS 0601, PFS 0603 e Centeio BR 1 foram incluídos no grupo dos moderadamente tolerantes. O genótipo PFS 0604 mostrou ser moderadamente sensível.

Para esta espécie, o modelo estatístico ajustado explicou 88,90% da variação observada.

Em estudo comparativo realizado entre sete populações de centeio, cultivadas há vários séculos pelos agricultores do norte de Portugal e onze cultivares de centeio do norte da Europa, Pinto-Carnide e Guedes-Pinto (2000) verificaram que a tolerância ao alumínio nos dois grupos foi muito distinta. As populações de centeio português, com uma grande variabilidade genética, revelaram ser mais tolerante que os cultivares europeus, em concentrações de 30 e 40 ppm.

Contudo, usando a técnica de cultivo hidropônico proposta por Moore et al. (1976) e Poole et al. (1993), com modificações sugeridas por Aniol (1984), constatou-se que, com o aumento da concentração de alumínio, o número de plantas sem

recrescimento da raiz também aumentava. Além disso, explica-se o comportamento diferente verificado entre as populações portuguesas de centeio, através do processo evolutivo de adaptação destas populações às condições locais de acidez do solo, comum em Portugal. Consideraram ser possível que, em tais condições, as plantas tenham sido selecionadas para a tolerância ao alumínio.

O centeio é conhecido como o cereal de inverno mais tolerante à toxicidade do alumínio. Os resultados deste ensaio corroboram esta tese, pois não foi constatado nenhum genótipo sensível à concentração de 10 ppm de Al^{3+} no cultivo hidropônico.

Assim sendo, o germoplasma do centeio, além de ser importante para os programas de melhoramento do próprio cereal, pode vir a ser uma força potencial de genes para introgressão no trigo ou inclusão no tritcale para a tolerância ao alumínio (PINTO-CARNIDE & GUEDES-PINTO, 2000).

Tabela 8: Tolerância/Sensibilidade de cultivares de centeio ao Al^{3+} (0 e 10 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controle das condições de hidroponia os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (T) e como testemunhas os cultivares de centeio BRS Serrano (T) e 698210 (MS). Passo Fundo, 2008

Genótipo	ppm	Comprimento (mm)	Tolerância/Sensibilidade
698210 ²	0	49,06	MS
	10	12,57	
PFS 0604	0	59,99	MS
	10	15,63	
PFS 0603	0	64,96	MT
	10	23,53	
PFS 0501	0	63,24	T
	10	29,40	
Centeio BR 1	0	68,81	MT
	10	26,33	
BRS Serrano ¹	0	61,75	T
	10	30,79	
IPR 89	0	76,36	T
	10	34,42	
Anahuac 75*	0	34,12	S
	10	4,96	
IAC 5 Maringá*	0	69,74	T
	10	16,89	
PFS 0504	0	76,36	T
	10	29,80	
698206	0	29,80	T
	10	22,48	
698207	0	61,03	T
	10	23,63	
PFS 0607	0	52,29	T
	10	23,72	
PFS 0606	0	56,51	T
	10	22,87	
PFS 0605	0	66,35	T
	10	26,28	
PFS 0502	0	70,92	T
	10	33,40	
PFS 0601	0	72,39	MT
	10	20,98	

* Trigo, controle das condições da hidroponia

¹Testemunha sensível

²Testemunha tolerante

T: tolerante

MT: moderadamente tolerante

S: sensível

MS: moderadamente sensível

No caso específico do trigo, o teste de tolerância/sensibilidade dos genótipos à concentração de 2 ppm foi feito utilizando-se os cultivares IAC 5 Maringá (tolerante) e

Anahuac 75 (sensível) tanto como controles como testemunhas do referido experimento (Tabela 9).

Os genótipos PF964004 e Toropi apresentaram baixo índice de germinação das sementes, o que inviabilizou a realização das suas análises estatísticas.

No grupo dos tolerantes, foram incluídos os genótipos IPR 85, BRS 194, BRS Angico, BRS Buriti, BRS Guabiju e BRS Guamirim. No grupo dos moderadamente tolerantes, estão incluídos Jesuíta, PF 844005, IPR 87 e BRS 229. O genótipo BRS 209 foi classificado como moderadamente sensível e o CD 104 como sensível. E, a partir do modelo estatístico empregado, não diferiram do IAC 5 Maringá ($P=0,05$). Neste caso, o modelo ajustado explicou 86,65% da variação observada.

Os genótipos NE 20206-C e NE 20202-A foram incluídos no grupo dos tolerantes. No grupo dos moderadamente tolerantes, incluíram-se os genótipos NE 20238-X, RL 5786, NE 20064-A, NE 20195-C, NE 2029-B, NE 201196-B, NE 201165-Y, NE 20207-Y, NE 20223-A e NE 20234-T. Os genótipos NE 20215-Y, RL 5776 e RL 5795 foram incluídos no grupo dos moderadamente sensíveis. Nestas análises, o modelo ajustado explica 81,57% da variação observada.

Usando concentrações de 12 ppm de alumínio nas soluções de cultura, Berzonsky e Kimber (1986) testaram 83 acessos de *Ae. tauschii*. A essa concentração, nenhum dos acessos mostrou ser tolerante à toxicidade provocada pelo alumínio.

Tabela 10: Tolerância/Sensibilidade de cultivares *Aegilos tauschii* ao Al^{3+} (0 e 2 ppm) em condições de hidroponia através do parâmetro comprimento de raiz, considerando como controles os cultivares de trigo Anahuac 75 (S) e IAC 5 Maringá (R).
Passo Fundo, 2008

Genótipo	ppm	Comprimento (mm)	Tolerância/Sensibilidade
NE 20238-X	0	19,69	MT
	2	10,36	
NE 20215-Y	0	24,52	MS
	2	8,59	
RL 5786	0	22,47	MT
	2	9,15	
NE 20234-T	0	27,11	MT
	2	9,68	
NE 20064-A	0	21,92	MT
	2	8,04	
NE 20195-C	0	23,74	MT
	2	10,29	
NE 20206-C	0	22,95	T
	2	14,14	
IAC 5 Maringá ²	0	55,25	T
	2	38,85	
Anahuac 75 ¹	0	44,05	S
	2	7,12	
NE 2029-B	0	24,19	MT
	2	11,16	
NE 201196-B	0	30,42	MT
	2	12,25	
NE 201165-Y	0	18,35	MT
	2	7,44	
RL 5776	0	25,63	MS
	2	8,77	
NE 20207-Y	0	25,94	MT
	2	10,06	
NE 20202-A	0	16,22	T
	2	9,65	
NE 20223-A	0	28,98	MT
	2	13,93	
RL 5795	0	27,31	MS
	2	8,90	

¹ Controle sensível

T: tolerante

S: sensível

² Controle tolerante

MT: moderadamente tolerante

MS: moderadamente sensível

3.2 Avaliação em campo

Os experimentos realizados em campo foram conduzidos em duas condições de acidez do solo: sem correção e

corrigido em $\frac{1}{4}$ do índice SMP. As figuras 3 e 4 apresentam os experimentos conduzidos no campo para cada tipo de solo, respectivamente.

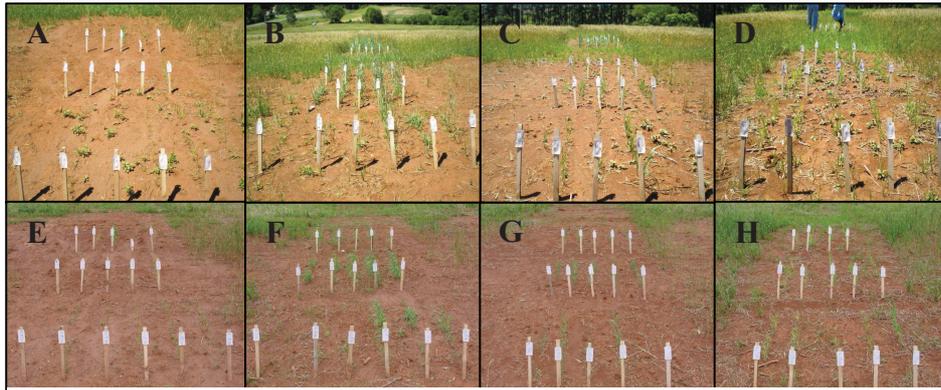


Figura 3: Etapas do cultivo em campo: **A** trigo, **B** centeio, **C** triticale, **D** cevada, fotos tirada 67 dias após a emergência, solo sem correção. **E** trigo, **F** centeio, **G** triticale, **H** cevada, fotos tiradas 54 dias após a emergência, solo sem correção.

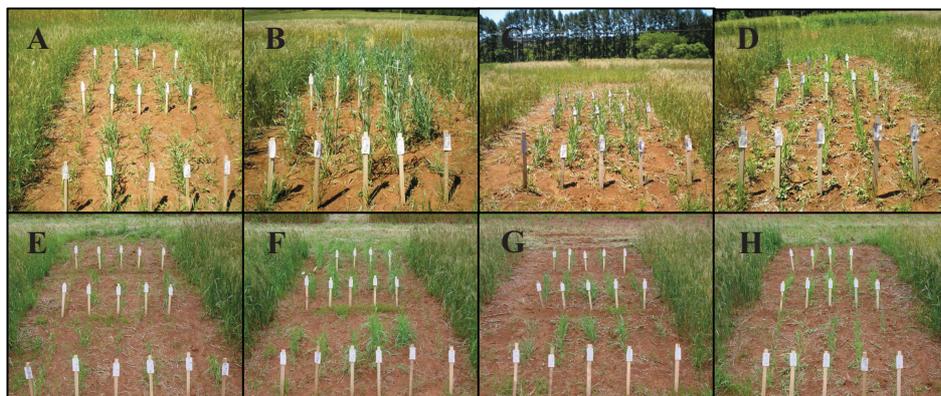


Figura 4: Etapas do cultivo em campo: **A** trigo, **B** centeio, **C** triticale, **D** cevada, fotos tirada 67 dias após a emergência, solo com correção. **E** trigo, **F** centeio, **G** triticale, **H** cevada, fotos tiradas 54 dias após a emergência, solo com correção.

Para a cevada, nenhum dos genótipos mostrou-se resistente no experimento em campo (Tabela 11), ao contrário do cultivo hidropônico, em que os genótipos PFC 7802 e Antártica 01

mostraram tolerância à concentração de 0,5 ppm de Al^{3+} . Em comparação com o cultivo hidropônico, em que cinco genótipos não germinaram, quatro cultivares (44,44%) obtiveram o mesmo resultado de avaliação: Alpha, BRS 224, FM 404 e Harrington. Os outros cinco (55,56%) apresentaram resultados contraditórios: em cultivo hidropônico mostraram ser tolerantes ou moderadamente tolerantes e em campo suscetíveis ou moderadamente suscetíveis. Como no experimento em campo, os genótipos ficam sujeitos a muitas outras variáveis, e não somente à concentração de alumínio. Essas podem ter influenciado no comportamento destes genótipos, embora esta espécie seja descrita como altamente suscetível ao alumínio (ANIOL & GUSTAFSON, 1984).

Tabela 11: Resistência/Suscetibilidade dos genótipos de cevada em condições de campo em submetidas a duas condições de acidez: sem correção e corrigido em $\frac{1}{4}$ do índice SMP. Passo Fundo, 2008

Genótipo	Sem correção	Corrigido em $\frac{1}{4}$	Resistência /Suscetibilidade
Antártica 04	4,0	4,0	S
MN 698	4,0	3,5	MS
IPFC 20011	4,5	3,5	MS
Cevada BR 2	3,5	3,0	MS
BRS Marciana	4,5	2,5	MR
Alpha	4,0	3,5	MS
BRS 224	3,0	2,0	MR
FM 404	4,0	2,5	MR
Antártica 01	4,0	3,0	MS
FM 519	4,0	4,0	S
PFC 7802	4,0	4,0	S
Antártica 05	4,5	4,0	S
Cevada BR 1	4,0	3,0	MS
Harrington	4,0	3,5	MS

AR: altamente resistente (0,50 – 0,80) AS: altamente suscetível (4,51 – 5,0)
R: resistente (0,81 – 1,50) MR: moderadamente resistente (1,51 – 2,50)
S: suscetível (3,51 – 4,50) MS: moderadamente suscetível (2,51 – 3,50)

Comparando-se a resposta dos genótipos de triticale à acidez em campo (Tabela 12) e ao cultivo hidropônico, oito cultivares

(57,14%) obtiveram avaliações idênticas em cultivo hidropônico e ensaio a campo: BRS 203, BRS Netuno, IAPAR 23 Arapoti, PFT 307, Triticale BR 1, Embrapa 53, PFT 112 e IPR 111. Outros quatro (28,57%) apresentaram padrões semelhantes entre os índices de resistência/tolerância e suscetibilidade/sensibilidade: PFT 209, PFT 0407, PFT 0609 e BRS Minotauro. Somente dois cultivares (14,29%) apresentaram avaliações diferentes: BRS Ulisses e BRS 148.

A alta relação obtida entre a avaliação hidropônica e em campo do triticale (85,71%) confirma os resultados obtidos por Baier, Somers e Gustafson (1995), em estudo realizado com genótipos de trigo. Os autores encontraram um alto coeficiente de correlação entre as avaliações em cultivo hidropônico e em campo ($r = 0,71 - 0,85$; $P < 0,001$). Isto os levou a concluir que a análise hidropônica identifica níveis de tolerância ao alumínio em uma larga série de genótipos de trigo e que os testes hidropônicos podem ser usados em programas de melhoramento no desenvolvimento de cultivares tolerantes ao Al^{3+} . Como o genoma do trigo é doador de genes de tolerância ao alumínio para o triticale (ANIOL & GUSTAFSON, 1984), os resultados deste estudo corroboram os obtidos por Baier, Somer e Gustafson em 1995.

Tabela 12: Resistência/Suscetibilidade dos genótipos de tritcale em condições de campo em submetidas a duas condições de acidez: sem correção e corrigido em ¼ do índice SMP. Passo Fundo, 2008

Genótipo	Sem correção	Corrigido em ¼	Resistência /Suscetibilidade
PFT 209	4,0	3,0	MS
BRS 203	4,0	3,5	MS
BRS Netuno	4,0	3,5	MS
IAPAR 23 Arapoti	3,0	0,5	AR
PFT 0407	4,0	2,5	MR
PFT 0609	3,0	2,0	MR
PFT 307	4,0	2,0	MR
BRS Minotauro	3,0	2,5	MR
PFT 0417	5,0	3,0	MS
Triticale BR 1	3,0	4,0	S
Embrapa 53	3,0	1,5	R
PFT 112	4,0	1,0	R
IPR 111	4,0	1,0	R
BRS 148	3,0	3,0	MS
BRS Ulisses	3,0	3,0	MS

AR:altamente resistente AS: altamente suscetível (4,51 – 5,0)
R: resistente (0,81 – 1,50) MR: moderadamente resistente (1,51 – 2,50)
S: suscetível (3,51 – 4,50) MS: moderadamente suscetível (2,51 – 3,50)

No caso do centeio, tanto no ensaio a campo quanto no cultivo hidropônico, nenhum genótipo mostrou ser suscetível ou sensível ao Al³⁺ (Tabela 13). Quatro linhagens (26,66%) obtiveram avaliações idênticas: 698206, 698207, PFS 0601e PFS 0604. Um cultivar (6,68%), IPR 89, apresentou resultado diferente. Dez genótipos (66,66%) apresentaram padrão semelhante de resistência/tolerância em ambos os experimentos: 698210, PFS 0504, PFS 0607, PFS 0606, PFS 0605, PFS 0502, PFS 0603, PF 0501, Centeio BR 1 e IPR 89.

Os resultados obtidos mostram haver relação entre as avaliações de cultivo hidropônico e em campo, na determinação da tolerância/resistência ao alumínio tóxico do solo. Este resultado vai

de encontro com os anteriormente obtidos por Baier, Somers e Gustafson (1995) em estudo realizado com genótipos de trigo.

Tabela 13: Resistência/Suscetibilidade dos genótipos de centeio em condições de campo em submetidas a duas condições de acidez: sem correção e corrigido em $\frac{1}{4}$ do índice SMP. Passo Fundo, 2008

Genótipo	Sem correção	Corrigido em $\frac{1}{4}$	Resistência /Suscetibilidade
698210	4,0	2,0	MR
PFS 0504	1,0	1,0	R
698206	5,0	2,0	MR
698207	4,0	2,0	MR
PFS 0607	3,0	1,0	R
PFS 0606	2,0	0,5	AR
PFS 0605	2,0	1,0	R
PFS 0502	2,0	0,5	AR
PFS 0601	0,5	0,5	AR
PFS 0604	1,0	1,0	R
PFS 0603	2,0	1,0	R
PF 0501	2,0	1,0	R
Centeio BR 1	2,0	0,5	AR
BRS Serrano	2,0	0,5	AR
IPR 89	3,0	3,0	MS

AR:altamente resistente	AS: altamente suscetível (4,51 – 5,0)
R: resistente (0,81 – 1,50)	MR: moderadamente resistente (1,51 – 2,50)
S: suscetível (3,51 – 4,50)	MS: moderadamente suscetível (2,51 – 3,50)

Para os genótipos de trigo, e comparando-se os ensaios em campo (Tabela 14) e em hidroponia, seis cultivares (42,87%) apresentaram reações idênticas: Anahuac 75, BRS Buriti, BRS Angico, BRS 229, BRS 194 e CD 104. Cinco (35,71%) apresentaram reação semelhante de resistência/tolerância em ambos os experimentos: IPR 87, BRS 209, BRS Guamirim, IAC 5 Maringá e PF 844005. Três cultivares (21,42%) apresentaram resultados diferentes: BRS Guabiju, Jesuíta e IPR 85.

Tabela 14: Resistência/Suscetibilidade dos genótipos de trigo em condições de campo e submetidas a duas condições de acidez: sem correção e corrigido em ¼ do índice SMP. Passo Fundo, 2008

Genótipo	Sem correção	Corrigido em ¼	Resistência /Suscetibilidade
Anahuac 75	5,0	4,0	S
BRS Buriti	4,0	3,0	MS
IPR 87	4,5	4,0	S
BRS Angico	4,0	3,0	MS
BRS 229	4,0	2,0	MR
BRS Guabiju	5,0	3,0	MS
BRS 209	4,5	3,0	MS
Toropi	4,0	1,0	R
BRS Guamirim	5,0	2,0	MR
BRS 194	4,5	1,0	R
Jesuíta	4,5	2,0	MR
CD 104	5,0	4,0	S
IAC 5 Maringá	3,0	2,0	MR
IPR 85	4,5	3,0	MS
PF 844005	5,0	5,0	S
BRS Tarumã	4,5	3,0	MS

AR: altamente resistente AS: altamente suscetível (4,51 – 5,0)
R: resistente (0,81 – 1,50) MR: moderadamente resistente (1,51 – 2,50)
S: suscetível (3,51 – 4,50) MS: moderadamente suscetível (2,51 – 3,50)

Avaliando 75 cultivares de trigo brasileiro em relação à toxicidade do alumínio em solos ácidos durante 15 anos, sob condições de campo na área experimental do CNPT, Sousa (1998) usou como controle suscetível o cultivar Anahuac 75 e como controle positivo o cultivar IAC 5 Maringá. Todos os genótipos foram avaliados visualmente em relação a estes dois controles. Assim sendo, optou-se, também, no presente estudo, usar estes cultivares como controle positivo e negativo.

Ressalta-se ainda que as comparações foram feitas relacionando os resultados de comprimento da raiz dos cultivos hidropônicos com as avaliações visuais fenotípicas dos ensaios a campo. Estes resultados vêm corroborar os dados anteriormente

obtidos por Voss et al. (2006), de que a técnica de hidroponia possibilita a realização de estudos genéticos e de caracterização de germoplasma específico para a tolerância ao alumínio.

Estudando os efeitos concomitantes de faixas de alumínio e de pH na atividade do alumínio na solução do solo, Nalla et al. (2007), constataram que em pH 4,0 houve redução da matéria seca e fresca das raízes e da parte aérea das plântulas. Também constataram que o crescimento das raízes é menor na condição de pH 4,0 do que em pH 5,0 e 6,0, sendo que em pH 5,0, o crescimento radicular é pouco afetado pelas espécies rizotóxicas de alumínio.

Embora não sendo um cereal de inverno, Narasimhamoorthy e colaboradores (2007) avaliaram a tolerância à toxicidade ao alumínio em alfafa (*Medicago truncata*), comparando o cultivo hidropônico, o cultivo a campo e métodos de coloração de raízes. Em seu estudo, a maioria dos genótipos que apresentaram tolerância no solo também foram tolerantes ao alumínio no cultivo hidropônico e métodos de coloração de raízes, o que vem corroborar os resultados obtidos nesse estudo.

4 CONCLUSÃO

Com exceção da cevada, os genótipos de triticales, centeio e trigo apresentaram elevada similaridade nas suas avaliações em cultivo hidropônico e ensaio em campo: no triticales, 85,71%; no centeio, 93,34% e no trigo, 78,57%.

Além disso, constatou-se haver uma relação direta entre a tolerância/sensibilidade e resistência/suscetibilidade dos genótipos quando submetidos ao cultivo hidropônico e ensaios em campo.

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE CEREAIS DE
INVERNO QUANTO À PRESENÇA DO GENE ALMT1,
LIGADO À TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO**

**ROBERTO PORTALUPPI¹, SANDRA PATUSSI BRAMMER² E
JURANDIR VIEIRA DE MAGALHÃES³**

RESUMO - O gene ALMT1, isolado e clonado em 2004, confere tolerância à toxicidade ao alumínio (Al^{3+}) no trigo. Este gene também foi mapeado no braço longo do cromossomo 4D, o que indica corresponder ao mesmo locus do gene *AltBH*, ao qual foi mapeado em 1991, via monossômicos e confirmado, em 1995, via marcadores de DNA. A herança genética ao alumínio, no trigo, na cevada, no centeio e no triticale é considerada como herança simples, atribuída a um ou a poucos genes. O conhecimento dos mecanismos de ação desses genes nos cereais, bem como a identificação de genótipos com alelos tolerantes ao alumínio, por meio de marcadores moleculares, permite que estes genótipos sejam usados em programas de melhoramento, visando à obtenção de cultivares mais tolerantes ao cátion Al^{3+} . O objetivo deste trabalho foi verificar a presença do gene ALMT1 em cereais de inverno, bem como identificar um marcador molecular para uso posterior em seleção assistida no melhoramento genético.

¹ Biólogo, mestrando do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de concentração em Produção Vegetal.

² Orientadora, Bióloga, Dr.^a em Genética e Biologia Molecular, Professora do PPGAgro e Pesquisadora da Embrapa Trigo.

³ Co-orientador, Engenheiro Agrônomo, Dr. em Field Crop Science, concentração Plant Genetic, Pesquisador na área de Biologia Molecular Vegetal da Embrapa Milho e Sorgo.

Foram testados 18 primers, cujas seqüências foram obtidas da literatura e de seqüências desenhadas, em 78 genótipos de cereais de inverno. Os dados obtidos indicaram a potencialidade do primer ScALMT1-3 servir como um marcador molecular para uso posterior em seleção assistida. Nos genótipos tolerantes avaliados, houve a presença da banda de 650 pb, indicativa da tolerância, embora esse marcador necessite ser primeiramente validado em um maior número de genótipos.

Palavras-chave: gene ALMT1, sintenia, poáceas, marcadores moleculares, tolerância ao alumínio.

**MOLECULAR CHARACTERISATION OF WINTER
CEREALS TO THE PRESENCE OF ALMT1 GENE**

**ROBERTO PORTALUPPI, SANDRA PATUSSI BRAMMER E
JURANDIR VIEIRA DE MAGALHÃES**

ABSTRACT - The ALMT1 gene, isolated and cloned in 2004, confers tolerance to the toxicity of aluminum (Al^{3+}) in wheat. This gene also was mapped on the long arm of chromosome 4D, which indicates match at the same locus of the gene *AltBH*, which was mapped in 1991 by monosomics lines and confirmed in 1995, through DNA markers. The genetic heritage to aluminum, in wheat, barley, rye and triticale, is considered a simple inheritance, attributed to one or a few genes. The knowledge of the mechanisms of action of these genes in cereals, and identification of genotypes with tolerant alleles to aluminum, through molecular markers, allows these genotypes are used in breeding programs, aimed at obtaining more tolerant cultivars to the cation Al^{3+} . The objective of this study was to verify the presence of the gene ALMT1 in winter cereals, and identify a new molecular marker for later use in assisted selection in plant breeding. It were tested 18 primers, whose sequences were obtained from literature and designed sequences, in 78 genotypes of winter cereals. The data indicated the potential of the primer ScALMT1-3 serve as a molecular marker for later use in assisted selection. In the assessed tolerant genotypes, there was the presence of the band of 650

bp, indicative of tolerance, although this marker needs to be validated in a larger number of genotypes.

Keywords: ALMT1 gene, synteny, poaceae, molecular markers, aluminum tolerance.

1 INTRODUÇÃO

Os melhoristas de plantas têm procurado aumentar a tolerância à toxicidade do alumínio em espécies sensíveis. Para atingir este objetivo, é essencial conhecer a base genética e o modo de transmissão desse caráter. O conhecimento dos mecanismos de ação dos genes responsáveis pela tolerância à toxicidade ao alumínio nos cereais é fundamental para o desenvolvimento de novos cultivares. Estes cultivares, quando forem fornecidos aos agricultores que cultivam em solos ácidos, representarão maior produtividade e sensível diminuição no custo das lavouras, beneficiando as regiões do globo onde não há recursos suficientes para o desenvolvimento deste tipo de pesquisa.

Em caracteres qualitativos, como a estatura das plantas e a tolerância ao íon Al^{3+} , um único gene tem grande efeito no genótipo e a substituição desse gene por outro pode modificar drasticamente o desempenho da planta (BOFF, 2006).

Na maioria das espécies vegetais, a herança genética relacionada à tolerância ao alumínio é considerada poligênica, a qual pode ser controlada por um ou mais genes de ação maior e diversos genes modificadores (Cançado et al., 1999 apud ABICHEQUER et al., 2003). Contudo, no trigo, na cevada, no centeio e no triticale, a tolerância à toxicidade ao alumínio é considerada uma herança simples, sendo atribuída a um ou poucos genes (BOFF, 2006).

O cultivar brasileiro BH 1146 é mundialmente utilizado como fonte de tolerância a Al^{3+} . Em 1991, Lagos e colaboradores, localizaram o gene dominante de tolerância, o gene *AltBH*, no braço

longo do cromossomo 4D, através da análise genética de linhas monossômicas. Sasaki e colaboradores (2004) isolaram e caracterizaram o gene ALMT1. A equipe de Ramam (2005) demonstrou que este gene, como o *AltBH*, localiza-se no braço longo do cromossomo 4D do trigo, sugerindo que o ALMT1 corresponda ao mesmo locus genético do *AltBH* (MAGALHÃES et al., 2007).

O gene ALMT1, clonado em *Arabidopsis thaliana*, designado como AtALMT1, também codifica um transportador de malato pelas raízes, ativado pelo alumínio (HOEKENGA et al., 2006). Em sorgo (*Sorghum bicolor*), foi isolado seu homólogo da família MATE, o SbMATE. Este último, que não está associado à família de proteínas de membrana ALMT, é um novo candidato a gene de tolerância à toxicidade do alumínio (MAGALHÃES et al., 2007). Contudo, tais genes mostram ser essenciais para a tolerância ao Al³⁺ no trigo, na arabidopsis e no sorgo.

Wang e colaboradores (2007) identificaram o gene HvMATE, um dos genes que controla a tolerância ao alumínio na cevada. A expressão desse gene foi relacionada à liberação de citrato ativado pelo alumínio. Isto levou os pesquisadores a identificarem o HvMATE como um candidato ao controle gênico da tolerância ao alumínio na cevada.

Estudar a tolerância ao alumínio por meio da genômica comparativa permite a identificação dos melhores alelos com potencial uso no desenvolvimento de novos cultivares, tanto em programas de seleção assistida, quanto por meio da produção de plantas transgênicas. As investidas da genômica comparativa em relação à tolerância à toxicidade ao alumínio já podem identificar e

utilizar de modo apropriado regiões genômicas e genes responsáveis pela tolerância ao alumínio nas poáceas, independente da sua fonte de origem, visando ao melhoramento de cereais (JARDIM, 2007).

A sintenia entre genomas pode ser usada para a identificação de genes em clones. Estudos de microssintenia permitirão o uso de genomas, de tamanhos menores, como um veículo para o mapeamento, baseado em clones de genes em poáceas que possuem genomas maiores. Uma vez que a ortologia de genes de diferentes espécies tenha sido identificada, a informação obtida no estudo do gene de uma espécie pode ser aplicada no estudo deste gene em outras espécies (BENNETZES & FREELING, 2007).

Além de localizar os genes de tolerância ao Al^{3+} , é importante identificar marcadores moleculares ligados e/ou associados a eles, pois os marcadores moleculares permitem monitorar a transferência de genes nos programas de melhoramento, sejam eles feitos através dos métodos clássicos ou por meio da transgenia.

O objetivo do presente estudo foi verificar a presença do gene ALMT1 em cereais de inverno, bem como identificar um marcador molecular para uso posterior em seleção assistida no melhoramento genético.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Núcleo de Biotecnologia Aplicada aos Cereais de

Inverno (NBAC) da Embrapa Trigo, localizada na BR 285, Km 294 (Passo Fundo – RS).

Foi avaliado um total de 78 genótipos, sendo 14 de *Hordeum vulgare* L. (Tabela 1), 15 de X *Triticosecale* Wittmack (Tabela 2), 15 de *Secale cereale* L. (Tabela 3), 18 de *Triticum aestivum* L em Thell (Tabela 4) e 15 de *Aegilops tauschii* (= *Triticum tauschii*) (Tabela 5) oriundos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Trigo.

Tabela 1- Genótipos de *Hordeum vulgare* L. avaliados quanto à tolerância ao Al³⁺ Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Genealogia	Origem no BAG Embrapa Trigo
Antártica 04	Seleção de W-6601	126708/01
MN 698	MN 599 / MN 635	227526/02
IPFC 2001	Seleção de Scarlett	EPR 2005
BR 2	FM 424/Norbert	L. 01/94
BRS Marciana	PFC 9240 / PFC 9211	PFC 98074- BC 2005- 50110
Alpha	Manchuria/Champion of Vermont	C1959 126729/01
BRS 224	Embrapa 43/PFC 9114	Cev. 9605 1 - L. 05/98
FM 404	Seleção de Alpha	827015/98
Antártica 01	Seleção de Volla	727037/97
FM 519	Km1/Union//Volla/3/Km2//Volla//Wisa/4/Alpha	287221/90
PFC 7802	Binder*2/Opal //Balder/Kenia/3/Aplha	141162/83
Antártica 05	Origem Desconhecida	227510/02
Cevada BR 1	Binder/Opal//Balder/Kenia	627536/96
Harrington	Klages//Gazelle/Betzes	325805/03

Tabela 2- Genótipos de X *Triticosecale* Wittmack avaliados quanto à tolerância ao Al³⁺ Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Genealogia	Origem no BAG Embrapa Trigo
PFT 209	PFT215*2/TCA 3050-89 (Chile)	540235/05
BRS 203	LT-1/Rhino(PFT 22A)	640203/06
BRS Netuno	Polmer//2*Erizo/Bull-1	640209/06
IAPAR 23 Arapoti	CIN/CNO//BGL/3/MER/NO	640214/06
PFT 0407	ER/Z011*/Milman*2/Picus	L. 712/05 G
PFT 0609	Embrapa 53//pft 116/MOH-87.102-6-1	L. 996/06
PFT 307	PFT 312/PFT 511	L.844/04 G
BRS Minotauro	Octo 92-3 (PF 89358/CBR1) Triticale BR4	640204/06
PFT0417	Presto//2*Tesmo-1 Museh 603/4/Ardi-1/...	L. 720/05 G
Triticale BR 1	M2A / CML	340010/2003
Embrapa 53	LT 1117.62/Civet/Tatu	640207/06
PFT112	PFT 512/Guara	640208/06
IPR 111	Anoas5 /Stier13	640213/06
BRS 148	Yogui/Tatu	640202/06
BRS Ulisses	Erizo/Nimir	640210/06

Tabela 3- Genótipos de *Secale cereale* L. avaliados quanto à tolerância ao Al³⁺
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Genealogia	Origem BAG Embrapa Trigo
698210	Pl. Rfco.no AI+03(Cd)	698210/06
PFS 0504	Pop. Estefano Schneider	698228/06
698206	Pl. Rfco no AI+03 (Cd)	698206/06
698207	Pl. Rfco.no AI+03(Cd)	698207/06
PFS 0607	Pl. Bx. Color escura < 01F	698235/06
PFS 0606	Pl. Bx. Color clara < 01F	698234/06
PFS 0605	Pl. Sel AI3+ + Rfco <01F	698233/06
PFS 0502	Pop. Andreas Kreuzscha	698226/06
PFS 0601	Sel. 3pl.(PO/04), pl.diversas, gr. Sem.	698229/06
PFS 0604	Pop. Cent. 981-01F-09F<01F	698232/06
PFS 0603	Pop. Cent. Desc.- 2 Fco- 1F-1F-2F-1F	698231/06
PFS 0501	Pop. 8011	698225/06
Centeio BR 1	Seleção de pop.coloniais bras.de centeio	L. 128/98
BRS Serrano	Centeio Garcia/Centeio Bagé	PFB 1205/2005
IPR 89	PG Cent 950	440106/2004

Tabela 4- Genótipos de *Triticum aestivum* L. em Thell avaliados quanto à tolerância ao Al³⁺
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Genealogia	Origem BAG- Embrapa Trigo
Anahuac 75	II 12300//Lerma Rojo 64/8156/3/ Norteno 67	64001611-A/06
BRS Buriti	Embrapa 27/Klein Orion	L.277/00
IPR 87	IOC 878/ Iapar 17	IAPAR 2004
BRS Angico	PF 87107/2*IAC 13	L.169/98
BRS 229	Embrapa 27*3//BR35/Buck Poncho	6102-BC 06
BRS Guabiju	PF 86743/BR 23	1.201/01
BRS 209	Iupateco 73/Embrapa 16	EFM-PR
Toropi	Petiblanco 8//Frontana 1971-37/ Quaderna A	326505/03
BRS Guamirim	Embrapa 27/Buck Nandu//PF 93159	L.PFB 115/04
BRS 194	(2000) CEP14/BR23//CEP17	L.97/96
Jesuíta	Polyssu/ Alfredo Chaves 3-21	626595/96
CD 104	PFAU SIB/ Iapar 17	227246/02
IAC 5 Maringá	Frontana/ Kenya 58//PG1	327135/03
IPR 85	Iapar 30/BR 18	6195/BC 2006
PF 844005	<i>T. durum</i> Hércules, NE 22912/ <i>Ae. squarrosa</i> , NE 20211 - C	341219/91
BRS Tarumã	Century/BR 35	6009-BC 06
Carazinho	Colunista/Frontana	-----
BH 1146	PG1//Fronteira/Mentana	-----

Tabela 5 – Genótipos de *Aegilops tauschii* avaliados quanto à tolerância ao Al³⁺
Embrapa Trigo, Passo Fundo, 2007

Genótipo	Origem no BAG - Embrapa Trigo
NE 20238-X	247399/94
NE 20229-B	30769/88
NE 20196-B	125103/01
NE 201165-Y	180454/89
RL 5776	825055/98
NE 20207-Y	340010/91
NE 20202-A	247369/94
NE 20223-A	247383/94
RL 5795	625057/96
RL 5786	<i>T. tauschii</i> Oídio 89
NE 20215-Y	340016/91
NE 20234-T	340029/91
NE 20064-A	140602/83
NE 20195-C	180468/89
NE 20206-C	247376/94

As sementes do material utilizado foram colhidas de plantas especialmente multiplicadas em casa de vegetação. Suas espigas foram envoltas em envelopes de papel manteiga, durante a fase reprodutiva, a fim de evitar a possível contaminação por grãos de pólen provenientes de outros cultivares (Figura 1).

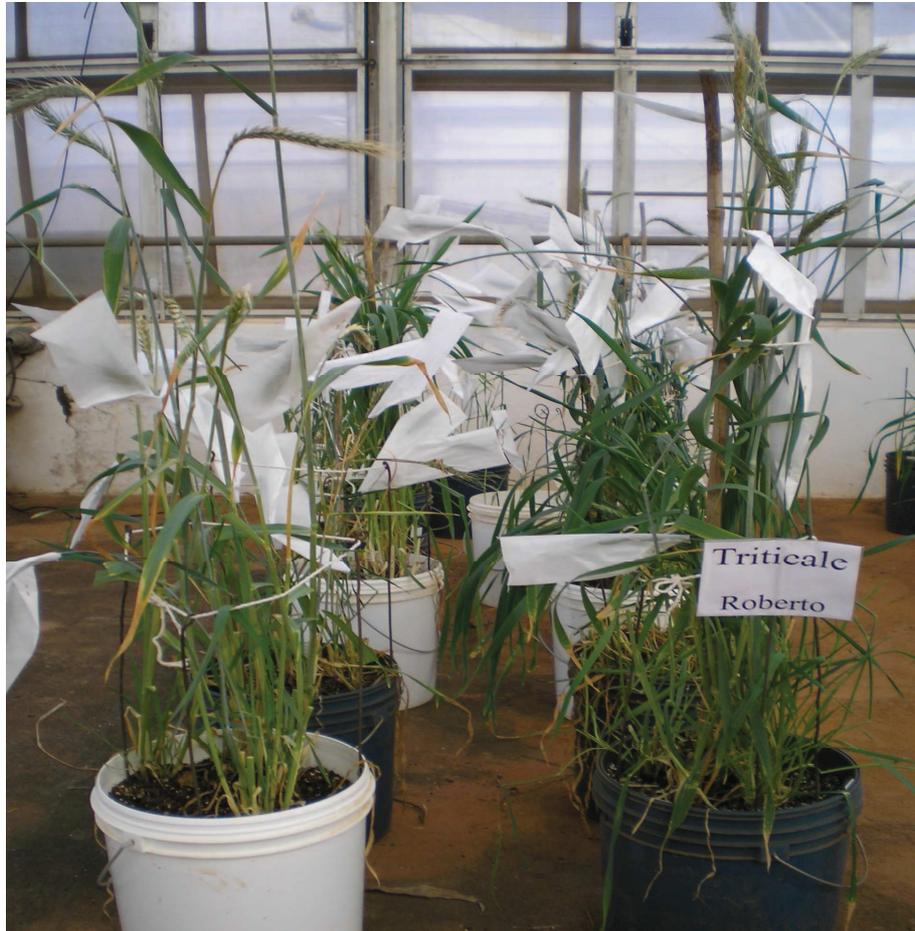


Figura 1: Genótipos de triticale (*X Triticoseclae* Wittmack) sendo multiplicados na casa de vegetação da Embrapa Trigo.

2.2 Métodos

Extração e Amplificação de DNA

O DNA foi extraído a partir do tecido foliar, obtido através da germinação das sementes em papel germitest (Germilab) no laboratório de sementes da Embrapa Trigo. O protocolo de extração

foi o de Sambrook, et al., 1989, com adaptações feitas pelo Dr. Luciano Consoli. Dentre elas, destacam-se o tempo de precipitação do DNA e sua purificação. A amplificação dos DNAs foi feita através de reações PCR (Polymerase Chain Reaction), no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 - Applied Biosystems. Os produtos das PCRs foram visualizados em géis de agarose 2%, utilizando-se sempre a mesma cuba e fonte, corados com brometo de etídio, sendo que o marcador molecular utilizado foi o λ 25, 100 pb – Bio-Rad. Os géis foram digitalizados utilizando-se o aparelho Gel Doc™XR 170 – 8170 170 –8171, da Bio-Rad.

Obtenção dos primers

Primeiramente, foi feita uma pesquisa *in silico*, a fim de obterem-se as seqüências do gene ALMT1 e dos primers, já testados por diversos pesquisadores em cereais de inverno, em cultivares de origens diversas dos utilizados neste estudo.

A seqüência do gene ALMT1 foi obtida do site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=113460112>), locus AB243167, acessado em 20 de fevereiro de 2007.

Além desta, foram obtidas seqüências de primers de publicações dos seguintes autores: Yamaguchi et al., (2005); Sasaki et al., (2004); Raman et al., (2005), Ligaba et al., (2006) e do site Grain Genes(<http://wheat.pw.usda.gov/cgibin/graingenet/report.cgi?class=sequence&name=AB243166>), acessado em 20 de fevereiro de 2007 (Tabela 6).

A partir da seqüência obtida no NCBI, os doutores Antônio Nhani Júnior e Luciano Consoli, pesquisadores da Embrapa Trigo e o doutor Jurandir Vieira de Magalhães da Embrapa Milho e Sorgo/MG desenharam primers através do programa Primer 3, a fim de também serem testados (Tabela 7).

Tabela 6 - Primers retirados da literatura, referentes à amplificação do gene de tolerância ao alumínio.

Primer	Seqüência F	Seqüência R	Referência
ALMT1 - 1	CCGGATCCATGGATATTGATCAGCGGACAGAGAG	CCGGATCCCAAAATAACCACCGTCAAGGCCAAAAGG	Yamaguchi et al., 2005
ALMT1 - 2	GGAAATGGAATTCAACTGCTTTGGCG	TCCTCAGTGGCCCTTCGAATTAAGG	Sasaki et al., 2004
ALMT1 - 3	CGTGAAGCAGCGGAAAAGCC	CCCTCGACTCAGCGGTACTAACCAACG	Raman et al., 2005
ALMT1 - 4	CACCCCAAACTCTTGAAGAAGGAAGTG	CTAGCACTTGGAGCTCATCAGCTAG	Ligaba et al., 2006
ALMT1 - 5	CCTGGTTTCTTTGATGGGGCAGACAC	TGCCACCATCTCGCCGTCCTCTCT	GrainGenes, sequence report AB2431666
ScALMT1-1	ATGGATATTGATCAGCGCAGAGAG	CCAGACGGGGAAGAGGAAGACGGT	Fontecha et al., 2007
ScALMT1-2	ACCAGCGGTTCTACACCATAGTTG	ATTGGCTCCATGGGTGTGGAATC	Fontecha et al., 2007
ScALMT1-3	GTCATGGCCAGTTTCAGATTTGAC	TTACAAATTAACCACGTCAGGCCAAAAGG	Fontecha et al., 2007
ScALMT1-4	GCTCGCCGCTGTTCCGTCGCTA	GCCAGCCACCACGTCGCCAAGG	Fontecha et al., 2007

Tabela 7 - Primers desenhados, a partir da seqüência do gene ALMT1, isolado por Sasaki et al., 2004.

Primer	Seqüência F	Seqüência R	Referência
ALMT1-PR1	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTTTTGA TTGCCGGACTTTG*	ACAACCTTGCACCTGGTGAT	Embrapa Trigo, 2007
ALMT1-PR3	GCCGGACTTTGGCTAIGTT	GGAGCTCCGGATCAGATTTCAG	Embrapa Trigo, 2007
ALMT1-PR4	TGTA AAAACGACGGCCAGTCTTTGATGAGCTCCATGTC*	ACAACCTTGCACCTGGTGAT	Embrapa Trigo, 2007
ALMT1-PR5	GTCGCCGAACTGTGTCAATTT	GGAGCTCCGGATCAGATTTCAG	Embrapa milho e Sorgo, 2007
ALMT1-JUR1	GCTGGCGGCTGCTGCTCCAC	CTCCGGGATGAAGGCCAAGAACG	Embrapa milho e Sorgo, 2008
ALMT1-JUR2	TCGGCTGGTGTCCGTCGCTACT	AGGGCACTGGGTTTTTGGAGGTTGT	Embrapa Milho e Sorgo, 2008
ALMT1-JUR3	CCGTCGGCGTCTTCAATCTG	TTTTTGTGTCCTCGGGGTTCTT	Embrapa Milho e Sorgo, 2008
ALMT1 SEQ 1	TGGATATTGATCAGCGCAGAGA	GGAAATCTTTTCCCCAAAA	Embrapa Trigo, 2007
ALMT1 SEQ 2	GAGAGGACGTCCACAAGCTC	ATAACCAACGTCAGGCCAAAAGG	Embrapa Trigo, 2007

* Marcado com a partícula M13

2.3 Otimização dos primers

Para esta etapa, foram utilizadas amostras escolhidas de modo aleatório de trigo, triticale, centeio e *Ae. tauschii*. Para os referidos testes, fizeram-se diferentes reações de PCR, as quais se encontram especificadas nos testes a seguir.

Primer ScALMT1-3

Teste 1: realizado com genótipos de trigo, triticale e *Aegilops tauschii*

Protocolo I da reação PCR, “mix B” utilizado no Laboratório de Biotecnologia, área de Biologia Molecular da Embrapa Trigo.

Estoque		[] usada na reação PCR	Vol. µl
H ₂ O DirectQ			10,86
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	1,5mM	0,6
dNTP Mix	2,5mM	0,35mM	2,8
Primer D	5µM	0,25µM	1,0
Primer E	5µM	0,25µM	1,0
Taq pol.	5U/µl	0,75U/µl	0,15
DNA	25ng/µl	40ng/µl	1,6

[]: concentração final

O programa da PCR foi o TD (touch-down) 60°-50°C:
1 ciclo de 95°C – 3 min; 35 ciclos de 10 vezes 94°C – 30 seg , 60°C –

30 seg, 72°C – 30 seg , 25 vezes 94°C – 30 seg, 50°C – 30 seg, 72°C – 30 seg; 1 ciclo de 72°C – 5 min; 10°C ∞.

Teste 2: realizado com genótipos de trigo, triticale, centeio e *Ae. Tauschii*

Protocolo II da reação PCR fornecido pelo Dr. Jurandir Vieira de Magalhães, utilizado como rotina no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo.

Estoque		[] usada na reação PCR	Vol. µl
H ₂ O DirectQ			10,8
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	0,125mM	1,0
Primer D	5µM	0,5µM	2,0
Primer E	5µM	0,5µM	2,0
Taq pol.	5U/µl	1U/µl	0,2
DNA	25ng/µl	30 ng/µl	1,2

[]: concentração final

Programa da PCR (FONTECHA et al., 2007): 1 ciclo de 94°C – 5 min; 35 ciclos de 94°C – 30 seg, 59°C – 30 seg, 72°C – 2 min; 1 ciclo de 72°C – 10 min; 4°C ∞.

Teste 3: realizado com os genótipos de triticale e centeio

Protocolo III, reação para o centeio conforme (FONTECHA et al., 2007) e Protocolo II para o triticale .

Triticale

Estoque		[] usada na reação PCR	Vol. μ l
H ₂ O DirectQ			10,8
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	0,125mM	1,0
Primer D	5 μ M	0,5 μ M	2,0
Primer E	5 μ M	0,5 μ M	2,0
Taq pol.	5U/ μ l	1U/ μ l	0,2
DNA	25ng/ μ l	30 ng/ μ l	1,2

[]: concentração final

Centeio

Estoque		[] usada na reação PCR	Vol. μ l
H ₂ O DirectQ			7,1
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	100mM	3,2
Primer D	5 μ M	5pM	2,0
Primer E	5 μ M	5pM	2,0
Taq pol.	5U/ μ l	5U/ μ l	0,5
DNA	25ng/ μ l	60 ng/ μ l	2,4

[]: concentração final

Programa da PCR (FONTECHA et al., 2007): 1 ciclo de 94°C – 5 min; 35 ciclos de 94°C – 30 seg, 59°C – 30 seg, 72°C – 2 min; 1 ciclo de 72°C – 10 min; 4°C ∞ .

Teste 4: realizado com os genótipos de trigo e *Aegilops tauschii*

Protocolo II da reação PCR.

Estoque		[] usada na reação PCR	Vol. µl
H ₂ O DirectQ			10,8
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	0,125mM	1,0
Primer D	5µM	0,5µM	2,0
Primer E	5µM	0,5µM	2,0
Taq pol.	5U/µl	1U/µl	0,2
DNA	25ng/µl	30 ng/µl	1,2

[]: concentração final

Programa da PCR (FONTECHA et al., 2007): 1 ciclo de 94°C – 5 min; 35 ciclos de 94°C – 30 seg, 59°C – 30 seg, 72°C – 2 min; 1 ciclo de 72°C – 10 min; 4°C ∞.

Primers ALMT1-jur1, ALMT1-jur2, ALMT1-jur3, ALMT1-pr3 e ALMT1-pr5

Várias reações PCRs foram realizadas com os genótipos de trigo, triticales, centeio e *Ae. tauschii*. Os testes com as condições de PCR também encontram-se especificados a seguir.

Teste 5: realizado com os genótipos de triticales

Protocolo II da reação PCR

Estoque	[] usada na reação PCR		Vol. μ l
H ₂ O DirectQ			10,8
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	0,125mM	1,0
Primer D	5 μ M	0,5 μ M	2,0
Primer E	5 μ M	0,5 μ M	2,0
Taq pol.	5U/ μ l	1U/ μ l	0,2
DNA	25ng/ μ l	30 ng/ μ l	1,2

[]: concentração final

O programa da PCR foi o TD (touch-down) 60°-50°C:
 1 ciclo de 95°C – 3 min; 35 ciclos de 10 vezes 94°C – 30 seg , 60°C – 30 seg, 72°C – 30 seg , 25 vezes 94°C – 30 seg, 50°C – 30 seg, 72°C – 30 seg; 1 ciclo de 72°C – 5 min; 10°C ∞ .

Teste 6: realizado com genótipos de trigo

Protocolo II da reação PCR.

Estoque	[] usada na reação PCR		Vol. μ l
H ₂ O DirectQ			10,8
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	0,125mM	1,0
Primer D	5 μ M	0,5 μ M	2,0
Primer E	5 μ M	0,5 μ M	2,0
Taq pol.	5U/ μ l	1U/ μ l	0,2
DNA	25ng/ μ l	30 ng/ μ l	1,2

[]: concentração final

O programa da PCR foi o TD (touch-down) 60°-50°C:
 1 ciclo de 95°C – 3 min; 35 ciclos de 10 vezes 94°C – 30 seg , 60°C – 30 seg, 72°C – 30 seg , 25 vezes 94°C – 30 seg, 50°C – 30 seg, 72°C – 30 seg; 1 ciclo de 72°C – 5 min; 10°C ∞.

Teste 7: realizado com genótipos de centeio

Protocolo II da reação PCR.

Estoque	[] usada na reação PCR	Vol. µl
H ₂ O DirectQ		10,8
Tampão	10X	2,0
MgCl ₂	50mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	1,0
Primer D	5µM	2,0
Primer E	5µM	2,0
Taq pol.	5U/µl	0,2
DNA	25ng/µl	1,2

[]: concentração final

Programa da PCR (FONTECHA et al., 2007): 1 ciclo de 94°C – 5 min; 35 ciclos de 94°C – 30 seg, 59°C – 30 seg, 72°C – 2 min; 1 ciclo de 72°C – 10 min; 4°C ∞.

Teste 8: realizado com genótipos de centeio

Protocolo III.

Estoque		[] usada na reação PCR	Vol. μ l
H ₂ O DirectQ			7,1
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	100mM	3,2
Primer D	5 μ M	5pM	2,0
Primer E	5 μ M	5pM	2,0
Taq pol.	5U/ μ l	5U/ μ l	0,5
DNA	25ng/ μ l	60 ng/ μ l	2,4

[]: concentração final

Programa da PCR (FONTECHA et al., 2007): 1 ciclo de 94°C – 5 min; 35 ciclos de 94°C – 30 seg, 59°C – 30 seg, 72°C – 2 min; 1 ciclo de 72°C – 10 min; 4°C ∞ .

Teste 9: realizado com genótipos de centeio

Protocolo II da reação PCR.

Estoque		[] usada na reação PCR	Vol. μ l
H ₂ O DirectQ			10,8
Tampão	10X	1X	2,0
MgCl ₂	50mM	2mM	0,8
dNTP Mix	2,5mM	0,125mM	1,0
Primer D	5 μ M	0,5 μ M	2,0
Primer E	5 μ M	0,5 μ M	2,0
Taq pol.	5U/ μ l	1U/ μ l	0,2
DNA	25ng/ μ l	30 ng/ μ l	1,2

[]: concentração final

O programa da PCR foi o TD (touch-down) 60°-50°C: 1 ciclo de 95°C – 3 min; 35 ciclos de 10 vezes 94°C – 30 seg , 60°C – 30 seg, 72°C – 30 seg , 25 vezes 94°C – 30 seg, 50°C – 30 seg, 72°C – 30 seg; 1 ciclo de 72°C – 5 min; 10°C ∞.

Teste 10: realizado com a população de *Aegilops tauschii*

Protocolo II da reação PCR.

Estoque	[] usada na reação PCR	Vol. µl
H ₂ O DirectQ		10,8
Tampão	10X	1X
MgCl ₂	50mM	2mM
dNTP Mix	2,5mM	0,125mM
Primer D	5µM	0,5µM
Primer E	5µM	0,5µM
Taq pol.	5U/µl	1U/µl
DNA	25ng/µl	30 ng/µl

[]: concentração final

O programa da PCR foi o TD (touch-down) 60°-50°C: 1 ciclo de 95°C – 3 min; 35 ciclos de 10 vezes 94°C – 30 seg , 60°C – 30 seg, 72°C – 30 seg , 25 vezes 94°C – 30 seg, 50°C – 30 seg, 72°C – 30 seg; 1 ciclo de 72°C – 5 min; 10°C ∞.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente trabalho procurou identificar, em genótipos oriundos do BAG – Embrapa Trigo, a presença do gene ALMT1. A partir dos resultados obtidos nos testes, somente os primers

ScALMT1, ALMT1-jur1, ALMT1-jur2, ALMT1-jur3, ALMT1-pr3 e ALMT1-pr5 apresentaram a banda de 650 pb esperada, associada ao ALMT1.

Dos primers retirados da literatura, o único que apresentou resultados satisfatórios foi o ScALMT1-3. Provavelmente isto aconteceu devido ao fato de os cultivares citados na literatura possuírem constituição genética diversa da dos genótipos utilizados neste estudo. Entre os primers desenhados, os que apresentaram resultados foram o ALMT1-jur1, o ALMT1-jur2, o ALMT1-jur3, o ALMT1-pr3 e o ALMT1-pr5. As bandas esperadas em gel de agarose eram de 650 pb.

Os genótipos de cevada (*Hordeum vulgare* L.) não apresentaram bandas de amplificação de DNA através da PCR com nenhum dos primers utilizados neste estudo. Este resultado já era esperado, uma vez que a cevada é o cereal de inverno mais sensível à toxicidade do alumínio e que o gene ALMT1 é considerado o principal gene de tolerância/resistência ao íon Al^{3+} em trigo (DELHAIZE et al., 2004).

No presente estudo, foram realizado diferentes testes visando otimizar e detectar o(s) primer(s) que apresentassem a banda de 650 pb, esperada para a detecção da presença do ALMT1.

A Figura 2 apresenta os resultados do teste para o primer ScALMT1-3 em que somente os genótipos PFT 209 de triticale, sensível em cultivo hidropônico, e o RL 5776 de *Ae. tauschii*, moderadamente sensível, não apresentaram a referida banda de 650 pb. Os outros que apresentaram esta banda demonstraram serem

tolerantes (trigo e triticales) e moderadamente tolerantes (*Ae. tauschii*) às concentrações de Al^{3+} testadas previamente.

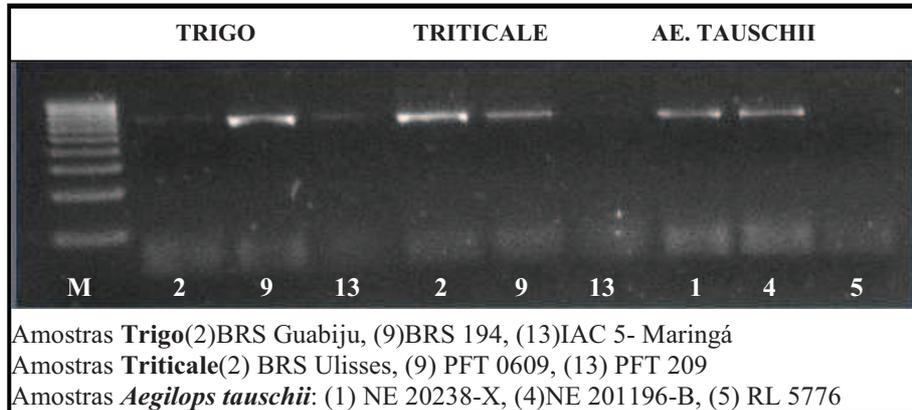


Figura 2: Amostras de genótipos de trigo, triticales e *Ae. tauschii* para o primer ScALMT1-3 em gel de agarose 2%, do teste um (M = marcador de peso molecular de 100 pb).

Para o segundo teste, com o primer ScALMT1-3, os únicos genótipos que não apresentaram bandas foram os de centeio (Figura 3). Em cultivo hidropônico, o cultivar PFT 0601 demonstrou ser tolerante e o demais moderadamente tolerantes à concentração de Al^{3+} usada. O fato de as bandas não aparecerem pode ser devido às condições da reação PCR utilizadas no teste, uma vez que os demais foram tolerantes ou moderadamente tolerantes. No triticales, todos foram tolerantes. No trigo, somente o IPR 87 mostrou ser moderadamente sensível e os demais tolerantes. Embora o cultivar Toropi não tenha germinado no experimento da hidroponia, é um cultivar brasileiro conhecido por sua tolerância à toxicidade do alumínio, o que pode ser verificado em Boff (2006). No *Ae. tauschii*, somente os genótipos NE 20215 – Y e NE 20234 – T mostraram ser

moderadamente sensíveis, sendo os restantes classificados como moderadamente tolerantes ou tolerantes em cultivo hidropônico.

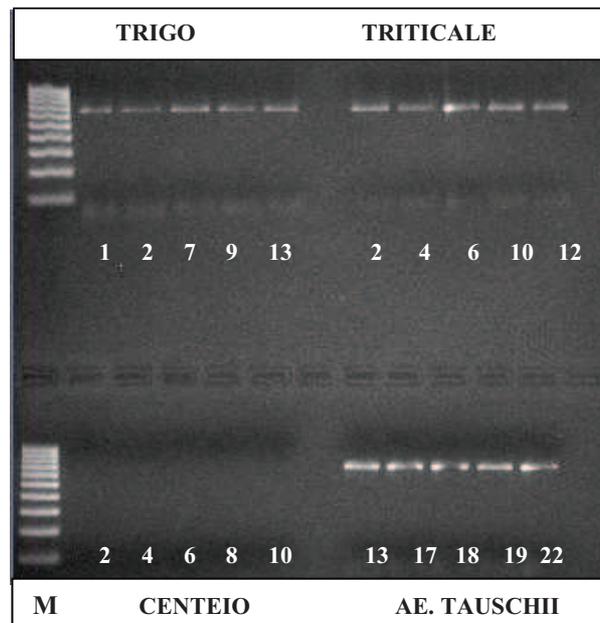


Figura 3: Amostras de genótipos de trigo, triticale, centeio e *Ae. tauschii* para o primer ScALMT1-3 em gel de agarose 2%, do teste dois (M = marcador de peso molecular de 100 pb).

Amostras de **Trigo**

- 1) IPR 87
- 2) BRS Guabiju
- 7) Toropi
- 9) BRS 194
- 13) IAC 5 Maringá

Amostras de **Triticale**

- 2) BRS Ulisses
- 4) BRS Minotauro
- 6) IAPAR 23 Arapoti
- 10) PFT 0407
- 12) PFT 112

Amostras de **Centeio**

- 2) PFS 0603
- 4) PFS 0605
- 6) PFS 0607
- 8) 698207
- 10) PFS 0601

Amostras de *Aegilops tauschii*

- 13) NE 20215-Y
- 17) NE 20234-T
- 18) NE 20064-A
- 19) NE 20195-C
- 22) NE 20206-C

Para o teste três (ScALMT1-3), ficou evidenciado que nos genótipos do triticales analisados, somente o genótipo BRS 203, moderadamente tolerante em cultivo hidropônico, não apresentou banda (Figura 4). Os demais genótipos, mesmos os Triticales BR 1 e PFT 209, sensíveis em cultivo hidropônico, mostraram bandas, ainda que fracas. Já na população do centeio, apesar de o cultivo hidropônico não haver mostrado nenhum genótipo sensível ao Al^{3+} , somente os genótipos 698210, PFS 0504 e PFS 0501 mostraram as bandas de 650 pb. Isto talvez esteja relacionado à genealogia do germoplasma brasileiro analisado, diferente daquele onde o primer ScALMT1-3 foi testado por Fontecha (2007).

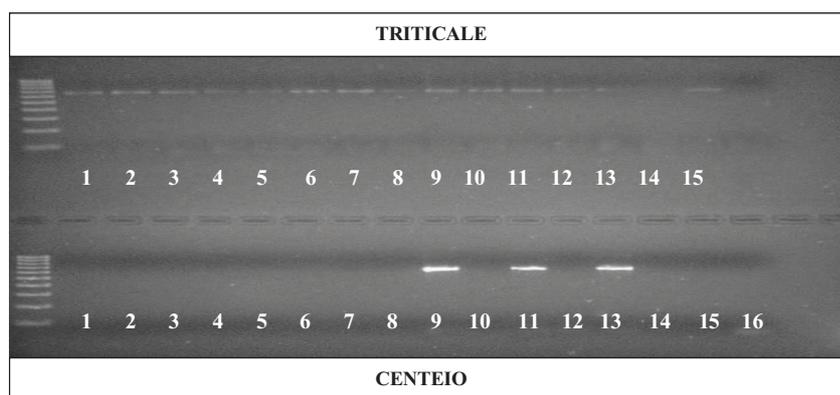


Figura 4: Genótipos de triticales e centeio para o primer ScALMT1-3 em gel de agarose 2%, do teste três (M = marcador de peso molecular de 100 pb).

Amostras de **Triticales**

- 1) BRS 148
- 2) BRS Ulisses
- 3) Triticales BR 1
- 4) BRS Minotauro
- 5) BRS Netuno
- 6) IAPAR 23 Arapoti
- 7) Embrapa 53

- 8) PFT 0417
- 9) PFT 0609
- 10) PFT 0407
- 11) PFT 307
- 12) PFT 112
- 13) PFT 209
- 14) BRS 203
- 15) IPR 111

Amostras de **Centeio**

- | | |
|-------------|------------------|
| 1) PFS 0602 | 9) 698210 |
| 2) PFS 0603 | 10) PFS 0601 |
| 3) PFS 0604 | 11) PFS 0504 |
| 4) PFS 0605 | 12) PFS 0502 |
| 5) PFS 0606 | 13) PFS 0501 |
| 6) PFS 0607 | 14) IPR 89 |
| 7) 698206 | 15) BRS Serrano |
| 8) 698207 | 16) Centeio BR 1 |

No teste 4, também para o primer ScALMT1-3, como era esperado, o genótipo de trigo Anahuac 75, sensível ao Al^{3+} em cultivo hidropônico, não apresentou a banda de 650 pb (Figura 5). Este trigo é reconhecido mundialmente como sensível ao Al^{3+} , mesmo em pequenas concentrações. Porém os genótipos CD 104 e o BRS 209, ambos descritos como sensíveis ao Al^{3+} em campo, apresentaram a banda de 650 pb. Nestes casos, fazem-se necessários novos estudos, principalmente na tentativa de correlacionar as análises em cultivo hidropônico com o campo, pois muitas vezes os resultados em laboratório respondem diferentemente. Na população de *Ae. tauschii*, somente os genótipos NE 2012165 – Y e RL 5776, moderadamente tolerantes em cultivo hidropônico, não apresentaram bandas. Todos os demais que, em cultivo hidropônico, foram classificados como tolerantes, moderadamente tolerantes ou moderadamente sensíveis, demonstraram a presença de bandas no gel. Este fato também deverá ser mais bem estudado, principalmente por se tratar de uma espécie ainda pouco explorada para esta característica.

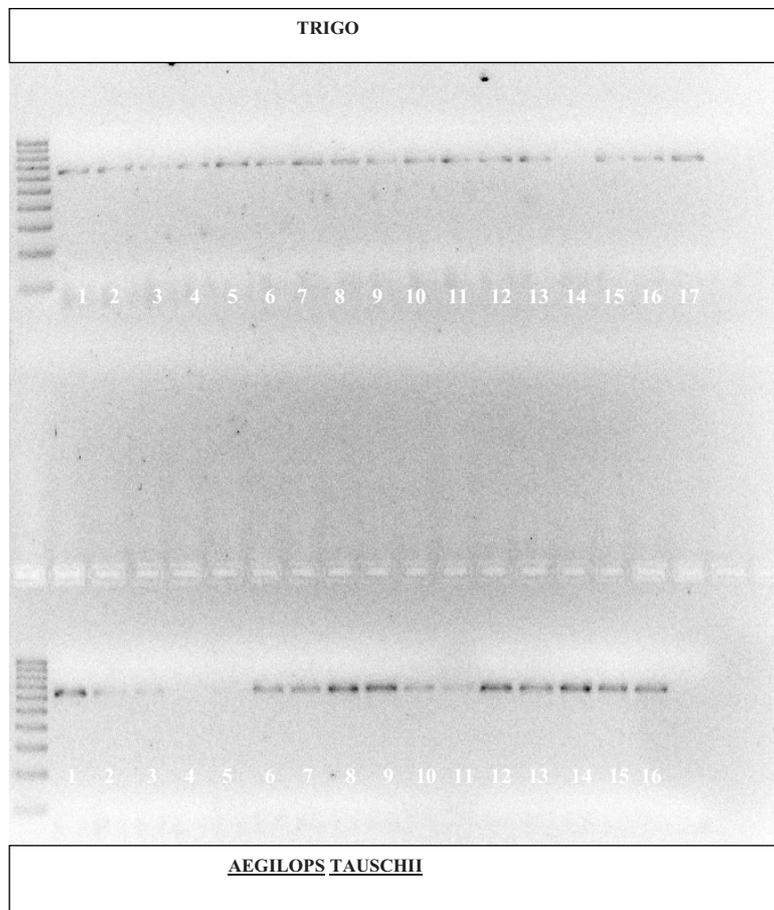


Figura 5: Genótipos de trigo e *Ae. tauschii* para o primer ScALMT1-3 em gel de agarose 2%, do teste quatro (M = marcador de peso molecular de 100 pb).

Amostras de **Trigo**

- | | |
|-----------------|-------------------|
| 1) IPR 87 | 9) BRS 194 |
| 2) BRS Guabiju | 10) BRS 209 |
| 3) BRS Guamirim | 11) BRS Buriti |
| 4) BRS Tarumã | 12) BRS 229 |
| 5) Jesuíta | 13) IAC 5 Maringá |
| 6) CD 104 | 14) Anahuac 75 |
| 7) Toropi | 15) IPR 85 |
| 8) BRS Angico | 16) Carazinho |
| | 17) BH 1146 |

Amostras de *Aegilops tauschii*

- | | |
|------------------|-------------------|
| 1) NE 20238 - X | 9) RL 5795 |
| 2) NE 20229 - B | 10) RL 5786 |
| 3) NE 20196 - B | 11) NE 20215 - Y |
| 4) NE 201165 - Y | 12) NE 20234 - T |
| 5) RL 5776 | 13) NE 20064 - A |
| 6) NE 20207 - Y | 14) NE 20195 - C |
| 7) NE 20202 - A | 15) NE 20206 - C |
| 8) NE 20223 - A | 16) NE 20 206 - C |

Os resultados obtidos para os primers ALMT1-jur 1, ALMT1-jur 2, ALMT1-jur 3, ALMT1-pr 3 e ALMT1-pr 5 foram bem diversos entre os genótipos de triticale, trigo, centeio e *Ae. tauschii*, o que certamente exclui a possibilidade de uso destes primers como potenciais marcadores moleculares para uso em seleção assistida. A seguir, destacam-se alguns aspectos dos demais testes com os referidos primers:

No teste cinco, para os genótipos de triticale estudados, o primer ALMT1-jur1 apresentou bandas em todos os genótipos, variando de 120 pb até 200pb. O primer ALMT1-pr3 apresentou bandas de 650 pb, porém, somente os genótipos BRS148, PFT 0417 e PFT 0609 não apresentaram bandas. Em cultivo hidropônico, estes genótipos demonstraram ser tolerantes à concentração de Al^{3+} , com exceção do PFT 0417, que não germinou.

No caso dos genótipos do trigo, o primer ALMT1-jur1 mostrou bandas de 200 pb, sendo que somente os genótipos BRS 209 e IPR 85 não apresentaram esta banda. Em cultivo hidropônico, o BRS 209 mostrou ser sensível e o IPR 85, tolerante ao Al^{3+} . Já o primer ALMT1-pr3 apresentou uma banda de 650 pb, sendo que os genótipos BRS Guamirim, BRS Tarumã e IPR 85 não apresentaram as bandas. Em cultivo hidropônico, exceto o BRS Tarumã que não germinou, os outros foram tolerantes ao Al^3 .

Para o teste sete, com os genótipos de centeio, somente o primer ALMT1-jur1 apresentou bandas de 200 pb nos genótipos PFS 0601, PFS 0504 e PFS 0502, sendo o PFS 0601 tolerante e os outros moderadamente tolerantes ao Al^{3+} em cultivo hidropônico.

Porém, para os mesmos genótipos de centeio, o primer ALMT1-jur1 foi o único a apresentar uma banda de 650 pb, somente com os genótipos PFS 0502 e IPR 89, ambos moderadamente tolerantes ao Al^{3+} em cultivo hidropônico.

No teste nove, com os genótipos de centeio, o primer ALMT1-jur1 foi novamente o único que apresentou bandas de 200 pb nos seguintes genótipos: 698207, 698210, PFS 0601, PFS 0504 e PFS 0501, sendo o 698210n e o PFS 0601 tolerantes e o demais moderadamente tolerantes em cultivo hidropônico.

Finalmente, com os genótipos de *Ae. tauschii*, o primer ALMT1-jur1 apresentou uma banda de 450 pb em todos os genótipos e o ALMT1-pr3 uma banda de 250 pb. Somente o genótipo NE 20238 – X não apresentou esta banda e em cultivo hidropônico demonstrou ser moderadamente tolerante à toxicidade do alumínio.

Os primers foram desenhados a partir de uma sequência do gene ALMT1 isolado em trigo. O fato de haver divergências do gene homólogo em cada espécie, talvez explique o insucesso dos mesmos em detectar o gene ALMT1, nas diferentes espécies testadas. Estudos posteriores, usando-se primers degenerados, bem como o seqüenciamento das bandas amplificadas, serão necessários para a confirmação dos dados obtidos, uma vez que a diferença entre um alelo tolerante ou sensível ao Al^{3+} pode estar na presença de um SNP (single nucleotide polymorfism), o qual poderia estar fora do anelamento do sítio dos primers.

Sasaki e colaboradores (2004), ao clonarem o gene ALMT1 em linhas isogênicas de trigo, constataram que a expressão heteróloga deste gene em *Xenopus oocytes*, arroz e células de tabaco conferia a estas espécies um efluxo de malato ativado pelo alumínio. Também constataram que o ALMT1 aumentou a tolerância das células do tabaco ao tratamento com alumínio. Suas descobertas demonstraram que o ALMT1 codifica um transportador de malato

ativado pelo alumínio, o qual é capaz de conferir tolerância ao alumínio em plantas.

O trabalho de Sasaki foi confirmado pela equipe de Delhaize, também em 2004. Usando uma cevada transgênica que expressava o gene ALMT1, os pesquisadores constataram que o gene conferiu um efluxo de malato ativado pelo alumínio com propriedades muito semelhantes às daquelas do trigo tolerante ao alumínio, tanto em cultura hidropônica como em solos ácidos. Os autores concluíram que o ALMT1 é capaz de conferir tolerância ao alumínio em plantas intactas e confirmaram a idéia de que o ALMT1 é o gene principal para a tolerância ao alumínio em trigo.

4 CONCLUSÕES

A caracterização molecular dos genótipos de cereais de inverno, quanto à presença do gene ALMT1, é possível de ser feita através da reação PCR. Há a necessidade de se adequar condições de PCRs específicas aos primers desenhados, para o desenvolvimento de um marcador molecular preciso.

O primer ScALMT1-3 pode ser considerado como um marcador potencial para seleção assistida, pois de todos os que foram testados, foi o que apresentou a banda esperada para a identificação do gene ALMT1 nos genótipos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O melhoramento genético vegetal é um processo contínuo que compreende basicamente a criação de variabilidade genética, a seleção e a recombinação de características desejáveis. As duas primeiras são decisivas num programa de melhoramento, porque vão determinar o produto final com as características desejadas. O uso de técnicas de laboratório, tais como seleção de genótipos em cultivo hidropônico e marcadores moleculares de DNA, visando à seleção assistida, tem permitindo acelerar os resultados no que diz respeito à avaliação das linhagens advindas de diversos cruzamentos, tornando possível a identificação de genes e alelos desejáveis nas primeiras gerações.

Os testes de laboratório permitem um ganho de tempo muito grande no desenvolvimento de novos cultivares mais tolerantes à toxicidade do alumínio. O cultivo hidropônico e a seleção via marcadores moleculares são precisos e não dependem de condições climáticas e ambientais, ao contrário das análises em campo, podendo serem realizados a qualquer momento e em curto período de tempo. Isto é muito importante quando se deseja monitorar uma característica durante os processos de hibridações dos programas de melhoramento.

Contudo, para que possa ser usado em seleção assistida, o primer ScALMT1-3 necessita de validação através do seqüenciamento automático do DNA, bem como ser testado em um número maior de genótipos. Os dados até agora obtidos neste trabalho o apontaram como um provável marcador molecular para a tolerância ao cátion Al^{3+} no germoplasma da Embrapa Trigo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICHEQUER, A.D.; BOHNEN, H. e ANGHINONI, I. *Absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo submetidas à toxidez de alumínio.* R. Brás. Ci. Solo, 27:373-378, 2003.

ALVES, V.M.C. *Desenvolvimento, caracterização e organização de recursos genéticos de gramíneas cultivadas visando a adaptação a solos ácidos.* Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2002.

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

BRAMMER, S.P. *Atualização em técnicas celulares e moleculares aplicadas ao melhoramento genético vegetal.* / Organizado por Sandra Patussi Brammer, Edson Jair Iorczeski. Passo Fundo:Embrapa Trigo, 2002. 404p.

BRAMMER, S.P.; SCAGLIUSI, S.M.M.; NASCIMENTO JUNIOR, A.. BONATO, A.L.V.; CAVERZAN, A. e ZANOTTO, M. *Análise citológica de cultivares tolerantes e sensíveis de trigo (Triticum aestivum L. em Tthell) em resposta à presença de alumínio em solução.* Passo Fundo:Embrapa Trigo, 2005. 8p. html. (Embrapa Trigo. Circular Técnica Online, 19).

BENNETZEN, J.L.; DEVOS, K. *Plant synteny, colinearity and genome evolution.* Encyclopedia of Life Sciences / © 2002 Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group /www.els.net.

BULANOVA, N.V.; SYNZYNYNS, B.I. and KOZ'MIN, G.V. *Aluminum induces chromosome aberrations in cells of wheat root meristem.* Russian Journal of Genetics, v.37, n.12, p.1455-1458, 2001.

CAMARGO, C.E.O.; FERREIRA FILHO, A.W.P.; TULMANN NETO, A.; PETTINELLI JUNIOR, A.; CASTRO, J.L.; FELICIO, J.C.; MISTRO, J.C. e SALOMON, M.V. *Avaliação de linhagens de trigo originárias de hibridação com e sem irradiação gama.* Bragantia, Campinas, v.64, n.1, p.61-74, 2005.

CAMARGO, C.E.O.; TULMANN NETO, A.; FERREIRA FILHO, A.W.P. and FELICIO, J.C. *Genetic control of aluminum tolerance in mutant lines of the wheat cultivar Anahuac.* Euphytica, 114, p.47-53, 2000.

CAMARGO, C.E.O.; FERREIRA FILHO, A.W.P. e FELICIO, J.C. *Herança da tolerância ao alumínio em populações híbridas de trigo.* Pesq. Agropec. Brás., Brasília, v.35, p.517-522, mar. 2000.

CAMARGO, C.E.O.; FERREIRA FILHO, A.W.P. e FREITAS, J.G. *Avaliação de genótipos de centeio, triticale, trigo comum e trigo duro quanto à tolerância ao alumínio em solução nutritiva.* Sci. Agric., Piracicaba, v.55, n.2, 1998.

CARNEIRO, M.S. e VIEIRA, M.L.C. *Mapas genéticos em plantas.* Bragantia, Campinas, v.61, n.2, p.89-100, maio/ago. 2002.

CATO, S.A.; GARDNER, R.C.; KENT, J. and RICHARDSON, T.E. *A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs.* Theor Appl Genet, 102, p.296-306, 2001.

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

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

FREITAS, J.G.; CANTARELLA, H.; CAMARGO, C.E.O.; FERREIRA FILHO, A.W.P.; PETTINELLI JUNIOR, A.; RAMOS, V.J. e FELICIO, J.C. *Resposta ao calcário e ao fósforo de genótipos de trigo com diferentes tolerâncias ao alumínio.* Pesq. Agrop. Brás., Brasília, v.35,n.3, p.557-566, mar. 2000.

GALE, M. *Synteny in cereals: implications and applications.* In: Palestras / XXIV Reunião Brasileira de Pesquisa de Aveia, Pelotas:UFPEL, p.81-92, 2004.

GUIMARÃES, C.T. *Caracterização da variabilidade genética e alélica da tolerância ao alumínio em gramíneas para sua utilização em programas de melhoramento.* Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, 2005. p.41.

GUSTAFSON, J.P. *Breeding aluminum tolerance into wheat.* Agricultural Research Magazine, December 2001.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O.A. and PIÑEROS, M.A. *How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency.* Annu. Rev. Plant Biol., 55: p.459-493, 2004.

KUMAR, L.S. *DNA markers in plant improvement: An overview.* Biotechnology Advances, 17, p.143-182, 1999.

LAGOS, M.B.; MORAES-FERNANDES, M.I.B.; CAMARGO, C.E.O.; FEDERIZZI, L.C. and CARVALHO, F.I.F. *Genetics and monosomic analysis of aluminum tolerance in wheat.* Rev. Brasil. Genet. V.14, n.4, p.1011-1020, 1991.

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

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

MANIFESTO, M.M.; SCHLATTER, A.R.; HOPP, H.E.; SUÁREZ, E.Y. and DUBCOVSKY, J. *Microsatellites in wheat: An useful tool for variety identification and breeding.* INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, November, 19-20, 1998.

MINELLA, E.; SORRELLS, M.E. *Aluminum tolerance in barley: genetic relationships among genotypes of diverse origin.* PAB, Brasília, v.37, n.8, p.1099-1103, Agosto, 2002.

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

MORAES-FERNANDES, M.I.B. *Genética e novas biotecnologias no melhoramento de trigo.* Passo Fundo:Embrapa Trigo, 2000. 4p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online 4).

MORAES-FERNANDES, M.I.B.; ZANATTA, A.C.A.; PRESTES, A.M.; CAETANO, V.R.; BARCELLOS, A.L. and ANGRA, D.C. *Artificial synthesis of hexaploid wheat (Triticum aestivum L. em Thell) to transfer disease resistance from related species.*

NGUYEN, V.T.; BUROW, M.D.; NGUYEN, H.T. and LE, B.T. *Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (Oriza sativa L.). Theor Appl Genet*, 102: p.1002-1010, 2001.

OWNBY, J.D. *Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminum-treated wheat roots. Physiologia Plantarum*, 87: p.371-380, 1993.

POLLE, E.; KONZAK, C.F. and KITTRICK, J.A. *Visual detection of aluminum tolerance levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. Crop Science*, v.18, p.823-827, 1978.

QIN, L.; PRINS, P.; JONES, J.T. ; POPEIJUS, H. ; SMANT, G. ; BAKKER, J. and HELDER, J. *GenEST, a powerful bidirectional link between cDNA sequence data and gene expression profiles generated by cDNA-AFLP. Nucleic Acids Research*, v.29,n.7, p.1616-1622, 2001.

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

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

SNOWDEN, K.C.; GARDNER, R.C. *Five genes induced by aluminum in wheat (Triticum aestivum L.) roots.* Plant Physiol. 103:p.855-861, 1993.

SOUSA, C.N.A. *Reação de linhagens de trigo de sigla PF ao crestamento em testes de campo.* Pesquisa em Andamento on-line N° 2 – Publicações Embrapa Trigo, 2006.

WENZL, P.; PATIÑO, G.M.; CHAVES, A.L.; MAYER, J.E. and RAO, I.M. *The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external aluminum detoxification in root apices.* Plant Physiology, v.125, p.14773-1484, March 2001.

ZHANG, W.H.; RYAN, P.R. and TYERMAN, S.D. *Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots.* Plant Physiology, v.125, p.1459-1472, March 2001.