

**UBIRACI GOMES DE PAULA LANA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO**

***Alt<sub>SB</sub>* EM SORGO**

Belo Horizonte

2007

**UBIRACI GOMES DE PAULA LANA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE DE TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO  
*Alt<sub>SB</sub>* EM SORGO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética - área de concentração em Biotecnologia, Genômica e Bioinformática - para obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Dra. Claudia Teixeira Guimarães

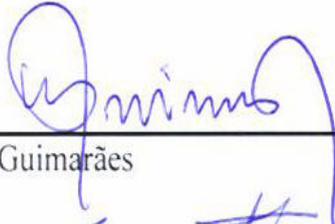
Co-Orientador: Dr. Jurandir Vieira de Magalhães

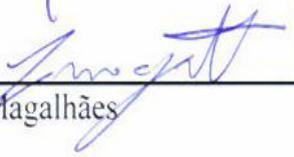
Belo Horizonte  
Departamento de Biologia Geral  
Instituto de Ciências Biológicas  
2007

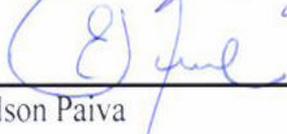


*Universidade Federal de Minas Gerais*  
*Instituto de Ciências Biológicas*  
*Programa de Pós-Graduação em Genética*

Dissertação defendida e aprovada, em 13 de fevereiro de 2007, pela Banca Examinadora constituída pelos Professores:

  
\_\_\_\_\_  
Cláudia Teixeira Guimarães

  
\_\_\_\_\_  
Jurandir Vieira de Magalhães

  
\_\_\_\_\_  
Edilson Paiva

  
\_\_\_\_\_  
Maria Bernadete Lovato

## AGRADECIMENTOS

A Deus por cada dia de vida.

Aos Pesquisadores Cláudia Teixeira Guimarães e Jurandir Vieira de Magalhães pelas orientações e ensinamentos.

Ao Dr. Edilson Paiva pela confiança e incentivo.

À Dra. Vera Maria Carvalho Alves pelas sugestões.

Aos Pesquisadores do Núcleo de Biologia Aplicada pelo apoio.

Aos Drs. Robert Eugene Schaffert, José Avelino Rodrigues e Fredolino Giacomini dos Santos por terem disponibilizado os materiais genéticos dos respectivos programas de melhoramento.

Aos professores e colegas do curso de pós-graduação em genética.

Ao Dr. Antônio Carlos de Oliveira pelo apoio estatístico

À Maria Tereza pelas correções bibliográficas.

Ao professor Fernando Von Zuben e ao Tiago Venturieri pela ajuda nas análises de clusterização utilizando o programa HaiNet (LBiC/UNICAMP).

A Lili e Sílvia pelas sugestões, pela amizade verdadeira e por tornar os dias mais agradáveis.

Aos funcionários da EMBRAPA Milho e Sorgo, especialmente Gislene e Sr. Geraldo, pela disponibilidade na condução deste trabalho.

Aos amigos Miguel, Edna, Célio, Cristiano, Pedro, Fernanda, Lilian, Cíntia Guimarães, Anne, Ruy, Lauro, Denise e Ivana pelos momentos compartilhados.

Aos amigos Wagner e Clovis pelo constante apoio.

Aos estagiários Francine, Wanderson e Edmilson pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos amigos da Escola Técnica, em especial ao João Fernandes, Fernando e Fatinha pela confiança.

À Mary por todo amor, paciência, compreensão e por compartilhar comigo a sua vida.

Acima de tudo à minha família, em especial aos meus pais Vicente e Ieda, pelo constante apoio e amor incondicional.

A todos que estiveram presentes e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. Introdução.....	09
2. Referencial Teórico.....	11
3. Material e Métodos.....	24
3.1. Material genético.....	24
3.2. Avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva.....	24
3.2.1. Análise de agrupamento dos padrões de crescimento radicular.....	25
3.3. Identificação de haplótipos do gene <i>Alt<sub>SB</sub></i> .....	25
3.4. Análise da expressão do gene <i>Alt<sub>SB</sub></i> .....	28
4. Resultados e Discussão.....	32
4.1. Crescimento radicular de linhagens de sorgo submetidas a cinco doses de Al em solução nutritiva.....	32
4.1.1. Crescimento radicular ao longo do tempo.....	32
4.1.2. Crescimento radicular ao longo do tempo em diferentes atividades de Al.....	38
4.2. Estrutura genômica e haplótipos do gene <i>Alt<sub>SB</sub></i> .....	41
4.3. Expressão do gene <i>Alt<sub>SB</sub></i> .....	44
5. Conclusões.....	52
6. Referências Bibliográficas.....	53
7. Anexos.....	66

## RESUMO

A toxidez causada pelo alumínio (Al) é um dos fatores que mais restringem o crescimento e o desenvolvimento das culturas em solos ácidos. Recentemente, foi identificado e clonado um gene de efeito maior que confere tolerância ao Al em sorgo, denominado *Alt<sub>SB</sub>*. No presente trabalho, foi feita uma caracterização detalhada da tolerância ao Al em 13 linhagens de sorgo, procurando associar a variabilidade da tolerância ao Al com variações na estrutura e no padrão de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*. Diversas evidências indicaram que a tolerância ao alumínio tem um forte componente indutível, modulado tanto pela atividade de Al<sup>3+</sup> quanto pelo tempo de exposição ao estresse. Os agrupamentos baseados nos padrões de crescimento radicular discriminaram as linhagens de sorgo quanto aos níveis de tolerância ao Al, onde as linhagens CMS225, SC566 e SC283 foram as mais tolerantes. Variações na seqüência de nucleotídeos do gene *Alt<sub>SB</sub>* não explicaram a tolerância diferencial ao alumínio entre as linhagens de sorgo. No entanto, a detecção de um códon de parada prematura no haplótipo de Tx642 explicou a alta sensibilidade ao Al dessa linhagem, enquanto que a substituição não conservadora de um aminoácido no primeiro éxon em SC566 pode estar relacionada à tolerância ao Al superior com relação às demais linhagens. Por outro lado, diferenças no nível de expressão do *Alt<sub>SB</sub>* apresentaram uma correlação de 0,95 com a tolerância ao alumínio, avaliada por meio do crescimento radicular na atividade de 27 µM de Al, sugerindo que a tolerância ao Al é primariamente condicionada pelo nível de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* em sorgo.

## ABSTRACT

Aluminum (Al) toxicity is one of the most limiting factors to crop yield in acid soils. Recently, a major gene controlling Al tolerance in sorghum, designated *Alt<sub>SB</sub>*, was cloned and characterized. In this work, an in-depth characterization of Al tolerance in 13 sorghum inbred lines was undertaken and associations to *Alt<sub>SB</sub>* haplotypes and gene expression patterns were sought. Several evidences indicated that aluminum tolerance in sorghum shows an inductive component, which is modulated either by the Al<sup>3+</sup> activity in nutrient solution or by the time of exposure to the metal. Cluster analyses based on root growth patterns permitted discriminating sorghum lines to their levels of Al tolerance, with CMS225, SC566 and SC283 being the most tolerant lines. Variations in the nucleotide sequence of the *Alt<sub>SB</sub>* gene could not explain the variability in Al tolerance among the sorghum lines. However, an early stop codon on the Tx642 haplotype was responsible for the high Al sensitivity showed by this line, whereas a non-conservative amino acid substitution in the first exon of SC566 might be associated to its highest Al tolerance level amongst all lines. On the other hand, the correlation coefficient between differences in *Alt<sub>SB</sub>* expression and aluminum tolerance was 0.95, indicating that Al tolerance is primarily conditioned by the level of *Alt<sub>SB</sub>* expression in sorghum.

## 1. INTRODUÇÃO

O sorgo é um dos principais cereais produzidos no mundo (FAO, 2006). Além de ser explorado sob diversas formas, o sorgo apresenta uma notável tolerância à seca e a outros estresses ambientais, tornando-se uma excelente alternativa para a produção agrícola em áreas marginais (Amaral et al., 2003).

No Brasil, em torno de 127 milhões de hectares aptos para a utilização agrícola são compostos por solos ácidos (Rocha, 1997), onde uma das principais limitações à produção vegetal é a toxidez de alumínio. O ápice radicular é o sítio primário da ação tóxica desse metal, que causa uma drástica inibição do crescimento do sistema radicular, restringindo a absorção de água e nutrientes (Kochian et al., 1995). Apesar de haver estratégias agronômicas capazes de minimizar os efeitos danosos do alumínio, a forma mais eficiente e economicamente viável de aumentar a produtividade agrícola em solos ácidos consiste na utilização de cultivares mais tolerantes (Foy, 1984).

O desenvolvimento de genótipos tolerantes ao alumínio requer a identificação tanto de genes quanto de alelos que possuam efeitos superiores na expressão da tolerância. Nesse sentido, vários esforços têm sido direcionados para aumentar o conhecimento acerca da tolerância ao Al em sorgo. Um gene que explica 80% da variação fenotípica da tolerância ao alumínio foi mapeado na região terminal do cromossomo 3 de sorgo por Magalhães et al. (2004), sendo denominado *Alt<sub>SB</sub>*. Utilizando marcadores que flanqueiam o gene *Alt<sub>SB</sub>* em populações derivadas do cruzamento de 11 linhagens de sorgo com amplo espectro de tolerância ao alumínio com uma linhagem sensível (BR012), Caniato et al. (2007) constataram a existência de diferentes alelos no loco *Alt<sub>SB</sub>*, além de novos genes envolvidos na tolerância ao

Al. O gene *Alt<sub>SB</sub>* foi isolado por meio da estratégia de clonagem baseada em mapa e codifica um membro de uma família de transportadores de membrana, responsável pelo efluxo de citrato em raízes de sorgo (Magalhães et al., 2007). Tal resultado confirma as evidências que apontam a exsudação de citrato pelas raízes como o principal mecanismo de tolerância ao alumínio em SC283 (Magalhães, 2002).

Com base na seqüência do gene *Alt<sub>SB</sub>* torna-se fundamental estudar e caracterizar o(s) mecanismo(s) que controlam a variabilidade alélica nesse loco. Assim, o presente trabalho objetivou o estudo da estrutura e da expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* entre linhagens de sorgo com ampla variabilidade para a tolerância ao alumínio.

Espera-se que esses estudos aumentem o entendimento dos mecanismos que modulam a variabilidade fenotípica da tolerância ao alumínio e viabilizem a identificação de alelos superiores para serem efetivamente utilizados no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes ao alumínio tóxico.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. A cultura do sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) é atualmente o quinto cereal mais produzido no mundo, depois do milho, do trigo, do arroz e da cevada (FAO, 2006). A produção mundial em 2005 foi de 58,7 milhões de toneladas, obtidas em uma área de 44,7 milhões de hectares. A maior área plantada está localizada nos continentes africano e asiático, onde é muito utilizado na alimentação humana (FAO, 2006). Devido a sua grande capacidade de produção e suas características nutricionais, o sorgo também é muito empregado na alimentação animal. Seus grãos são uma importante fonte de energia em dietas de monogástricos e ruminantes, podendo substituir outros cereais como o milho e o trigo (Santos, 2000).

No Brasil, segundo dados da FAO (2006), a safra de sorgo no ano 2005 foi de 1,5 milhões de toneladas, produzida em 758,4 mil hectares. Sua utilização na alimentação animal é explorada de diversas formas, havendo cultivares específicos para cada tipo de produto final, quer seja para produção de grãos, massa verde ou pastejo (Sawazaki, 1998).

A tolerância à seca e a outros fatores de estresse ambiental faz com que a cultura de sorgo seja indicada para o plantio intercalado com outras culturas como a soja nas condições do centro-oeste do Brasil. Além disso, na busca por fontes alternativas de etanol, cultivares de sorgo sacarino apresentam boas possibilidades para serem utilizados em nichos específicos onde a cana-de-açúcar não pode ser cultivada de maneira competitiva (Teixeira et al., 1997).

## 2.2. Solos ácidos e o alumínio solúvel

Estima-se que mais de 50% dos solos potencialmente aráveis do mundo sejam ácidos ( $\text{pH} < 5,0$ ), caracterizados pela elevada toxidez de alumínio e pela baixa fertilidade natural (Uexkull e Mutert, 1995). As causas da acidez do solo podem ser naturais, devido ao material de origem e ao processo de intemperização; ou como resultado de ação antrópica, tais como utilização excessiva de fertilizantes amoniacais e a poluição industrial, que pode levar ao fenômeno da chuva ácida (Johnson et al., 1997; Samac e Tesfaye, 2003).

O alumínio (Al) apresenta-se como o metal mais abundante da litosfera, compreendendo em torno de 7% da crosta terrestre (Lindsay, 1979). Em valores de pH próximos da neutralidade, o alumínio encontra-se predominantemente precipitado na forma de hidróxido de alumínio, que não causa fitotoxidez. No entanto, como consequência da acidez, ocorre um aumento da solubilidade do alumínio a partir de aluminossilicatos e óxidos de Al presentes nos minerais que constituem os solos (Martin, 1992). Assim, em valores de pH abaixo de 5,0, o Al pode ser encontrado como um complexo octaédrico hexahidratado,  $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ , que por convenção é denominado comumente como cátion  $\text{Al}^{3+}$ . Embora existam as formas parcialmente protonadas  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ , a espécie  $\text{Al}^{3+}$  parece ser aquela de maior caráter fitotóxico (Kochian, 1995).

## 2.3. Toxidez do alumínio em plantas

A toxidez de alumínio pode ser considerada uma das principais limitações ao uso agrícola dos solos ácidos. O ápice radicular é o sítio primário da ação desse metal e o primeiro sintoma da toxidez é a inibição drástica do crescimento do sistema radicular, que eventualmente pode resultar em dano físico, dependendo do grau

de toxicidade e do tempo de exposição ao estresse (Ryan et al., 1993; Delhaize et al., 1995). As raízes intoxicadas por Al tornam-se incapazes de explorar camadas mais profundas do solo, restringindo a absorção de água e nutrientes. Assim, a toxidez causada pelo Al, associada às deficiências na absorção de água e nutrientes, e à baixa disponibilidade de fósforo, são responsáveis pela substancial redução da produtividade de diferentes culturas em solos ácidos (Foy et al., 1978). Os primeiros efeitos do Al em processos metabólicos podem ser observados poucos minutos após a indução do estresse, os quais são seguidos de efeitos secundários que aparecem depois de várias horas ou dias (Kochian et al., 1995). Dentre os efeitos diretos da presença do alumínio estão a inibição da absorção de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , a redução no efluxo de  $\text{K}^+$ , a formação de calose, a exsudação de ácidos orgânicos, entre outros (Rengel, 1996). Adicionalmente, a inibição da absorção celular de  $\text{Ca}^{2+}$  afeta, em maior ou menor intensidade, vários processos celulares importantes, tais como, mitose, citocinese, gravitropismo e mesmo a sinalização celular (Huang et al., 1996).

A acidez do solo e os problemas advindos dela, incluindo a toxidez de Al, são corrigidos por intermédio da prática de calagem, que consiste na aplicação e incorporação de calcário ao solo. Entretanto, a aplicação de calcário na superfície do solo não soluciona os problemas de acidez nas camadas inferiores e a calagem a grandes profundidades apresenta limitações técnicas e econômicas (Foy, 1984). Assim, a forma mais eficiente de se evitar os efeitos danosos do Al consiste no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes. Programas de melhoramento genético têm identificado fontes de tolerância ao Al em várias espécies de interesse agrônômico (Parentoni et al., 2001), entretanto, os mecanismos fisiológicos,

bioquímicos e moleculares da tolerância ainda não estão completamente esclarecidos.

#### **2.4. Avaliação da tolerância ao alumínio em plantas**

Diferentes métodos podem ser empregados para identificação de plantas tolerantes ao estresse por alumínio. Técnicas de avaliação em campo selecionam genótipos sob todas as condições inerentes aos solos ácidos, refletindo não apenas os efeitos da toxicidade ao Al, mas sua interação com os demais fatores físicos e químicos do solo (Furlani e Clark, 1981). Assim sendo, apesar de ser um parâmetro extremamente importante em programas de melhoramento, as avaliações em campo para estudos básicos de tolerância ao Al podem não ser adequadas.

A maioria dos trabalhos envolvendo a avaliação de genótipos quanto à tolerância ao Al tem sido conduzida utilizando-se solução hidropônica sob condições controladas. Tal metodologia permite avaliar um grande número de plantas em um curto período de tempo e com uma elevada precisão, considerando apenas a influência do alumínio. O critério mais utilizado para medir a toxicidade ao Al consiste na avaliação do percentual de crescimento líquido relativo (%CLR), que representa o crescimento radicular de plantas tratadas com Al em relação à condição controle. Assim, os valores de CLR são obtidos pela divisão da média de crescimento líquido (CL) medido após um período de exposição ao Al pela média de crescimento líquido obtido de plântulas cultivadas nas mesmas condições experimentais, porém na ausência de Al (controle). Os valores de CL representam o comprimento de um dia menos o comprimento radicular imediatamente antes da submissão do estresse. Assim, pela avaliação quantitativa da inibição do

crescimento radicular sob estresse de alumínio, é possível discriminar fenotipicamente os genótipos tolerantes ou sensíveis (Aniol, 1990).

Outra estratégia também utilizada na seleção de genótipos tolerantes ao alumínio consiste na coloração radicular com hematoxilina (Tang et al., 2000). A hematoxilina possui a capacidade de se complexar com cátions livres, mostrando-se eficiente para discriminar genótipos tolerantes ao alumínio, de forma precoce e não-destrutiva (Polle et al., 1978). O método é simples e baseia-se na propriedade colorimétrica da hematoxilina, que gera uma coloração azul-púrpura no tecido radicular, quando na presença do Al. Genótipos sensíveis acumulam mais alumínio em suas raízes em comparação com genótipos tolerantes e assim, pode ser feita a discriminação antes mesmo que diferenças no crescimento das raízes sejam mensuráveis (Delhaize et al., 1993a; Cançado et al., 1999). No entanto, devido à natureza qualitativa do método, este se mostra inadequado em estudos fisiológicos em que a tolerância ao alumínio precisa ser avaliada de forma quantitativa e ao longo do tempo.

## **2.5. Mecanismos fisiológicos da tolerância ao alumínio**

Vários mecanismos de tolerância ao alumínio têm sido propostos, podendo ser divididos em dois grupos: (1) mecanismos simplásticos, decorrentes da imobilização ou neutralização do Al dentro da célula e (2) mecanismos de exclusão ou apoplásticos, com a imobilização ou neutralização do Al externamente à célula (Kochian, 1995).

### **2.5.1. Mecanismos simplásticos de tolerância**

Essa classe de mecanismos tem como base a neutralização do Al dentro da planta. Assim, o cátion  $Al^{3+}$  pode ser complexado por ácidos orgânicos (Foy, 1988; Taylor, 1988), sendo mantido inativo no citoplasma (Taylor, 1988) ou vacúolos (Helyar, 1987), podendo ainda interagir com proteínas ou outros compostos (Suhaya e Haug, 1985), prevenindo os seus efeitos negativos nos diversos processos metabólicos.

Esta estratégia é utilizada por espécies vegetais como trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum*, Ma et al., 1998), chá verde (*Camellia sinensis*, Nagata et al., 1992) e a hortêncica (*Hydrangea macrophylla*, Takeda et al., 1985), na qual a cor das sépalas varia de vermelha a azul à medida que o pH do solo é reduzido. Essa mudança se deve à formação de um complexo entre o Al acumulado e o ácido 3-cafeoilquínico e o delphinidina-3-glucosídeo (Takeda et al., 1985). Segundo Ma et al. (1997), esta espécie pode acumular mais de 3000  $\mu g$  de Al por grama de peso seco.

### **2.5.2. Mecanismos de exclusão**

Os mecanismos de exclusão têm sido alvo de inúmeros estudos e parecem ser a principal classe de mecanismos de tolerância ao alumínio em várias espécies de plantas (Kochian et al., 2004). Entre eles destacam-se: liberação de compostos fenólicos pela raiz (Ofei-Manu et al., 2001); a elevação do pH da rizosfera (Degenhardt et al., 1998), a produção de mucilagem (Miyasaka e Hawes, 2001) e a exsudação de ácidos orgânicos pelo sistema radicular (Delhaize et al., 1993a; Pellet et al., 1995).

Um grande número de evidências tem indicado a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes como o principal mecanismo de tolerância ao alumínio em

espécies como trigo (ácido málico, Delhaize et al., 1993a; Ryan et al., 1995a; 1995b; Pellet et al., 1996), milho (ácido cítrico, Pellet et al., 1995; Jorge e Arruda, 1997; Piñeros et al., 2002), *Arabidopsis thaliana* (ácido málico, Hoekenga et al., 2003) e sorgo (ácido cítrico, Magalhães, 2002; Kochian et al., 2002). Ácidos di e tri-carboxílicos com massa molecular reduzida são capazes de formar complexos estáveis com o  $Al^{3+}$  presente na rizosfera, reduzindo ou mesmo anulando seus efeitos tóxicos, uma vez que tais complexos são incapazes de atravessar a membrana plasmática (Kochian et al., 2004).

O sítio de exsudação de ácidos orgânicos localiza-se no ápice radicular de trigo (Delhaize et al., 1993b), milho (Pellet et al., 1995) e trigo mourisco (Zheng et al., 1998), coincidindo com o sítio alvo da toxicidade do Al.

Em valores de pH típicos do citosol, os ácidos orgânicos apresentam-se como ânions, que podem ser liberados em diferentes padrões considerando o tempo de início da exsudação após a exposição ao alumínio (Ma, 2000a). Enquanto no padrão I, nenhum intervalo é verificado entre a adição do Al e o início da exsudação dos ácidos orgânicos, no padrão II, um período de horas pode ser observado. Assim, a resposta imediata no padrão I sugere que o alumínio possa ativar um canal iônico pré-existente (Ma, 2000a; Ma et al., 2001), como ocorre em trigo, onde o Al induz rapidamente a abertura de canais permeáveis ao malato na membrana plasmática de células radiculares (Ryan et al., 1997; Zhang et al., 2001). Já em centeio, um intervalo de seis e dez horas foi observado entre a exposição ao alumínio e níveis significativos de exsudação de malato e citrato, respectivamente (Li et al., 2000). Esse intervalo de tempo sugere a necessidade da indução de genes, que podem estar relacionados ao metabolismo e/ou transporte de ácidos orgânicos no padrão

de secreção do tipo II. No entanto, até o momento, nenhuma evidência clara foi encontrada confirmando esta hipótese.

Diversos estudos fisiológicos têm sido realizados com objetivo de investigar mais detalhadamente os mecanismos de tolerância ao alumínio baseados na exsudação de ácidos orgânicos ativada por Al. Pellet et al. (1995) verificaram que mudanças no conteúdo radicular de ácidos orgânicos em resposta ao Al foram evidentes entre cultivares de milho. Além disso, Piñeros et al. (2002) encontraram uma correlação positiva entre a exsudação de ácidos orgânicos ativada por alumínio e o aumento no conteúdo interno radicular desses ácidos induzido por Al em milho. Isso levou tais autores a especularem que, nessa espécie, o transporte dos ácidos orgânicos ativados por Al e a síntese destes ácidos podem estar atuando conjuntamente nos genótipos tolerantes.

A superexpressão de enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos orgânicos, como citrato sintase e malato desidrogenase, em plantas transgênicas de tabaco, arábida e alfafa, permitiu um aumento no conteúdo e na exsudação de ácidos orgânicos, bem como um aumento da tolerância ao Al (Fuente et al., 1997; Tesfaye et al., 2001). Entretanto, estudos em trigo e centeio demonstraram que o transporte através da membrana plasmática em células radiculares apresenta-se como o ponto chave do processo, ao contrário da síntese desses ácidos. De acordo com essa hipótese, a exposição ao cátion  $Al^{3+}$  estimularia a liberação de ácidos orgânicos no ápice radicular, sem alteração da concentração interna dos mesmos (Delhaize et al., 1993b; Li et al., 2000; Ryan et al., 2001; Hayes e Ma, 2003). Além disso, ao contrário dos resultados obtidos por Fuente et al. (1997), Delhaize et al. (2001) verificaram que plantas de tabaco transformadas com o gene da citrato sintase, apesar de apresentarem uma elevada atividade desta enzima, não

apresentaram um aumento significativo na concentração interna e na exsudação de citrato, tão pouco na tolerância ao alumínio.

## **2.6. Genética da tolerância ao alumínio em plantas**

Uma característica interessante entre as espécies de gramíneas é que elas têm sido consideradas como um sistema genético único (Bennetzen e Freeling, 1993), tendo sido gerado um mapa-consenso no qual diversos genomas foram alinhados (Gale e Devos, 1998). Assim, com base em relações de ancestralidade comum, torna-se possível a identificação de genes homólogos, presentes em regiões conservadas de espécies distintas.

A tolerância ao alumínio é uma característica quantitativa que, dependendo da espécie e do cruzamento, apresenta padrão de herança monogênica ou poligênica. Na tribo Triticeae, que inclui espécies como trigo, cevada e centeio, o controle genético da tolerância ao alumínio parece dever-se, principalmente, a uma série alélica de genes ortólogos, isto é, genes presentes em diferentes espécies que evoluíram a partir de um gene ancestral comum (Garvin e Carver, 2003). Genes de tolerância ao alumínio têm sido mapeados em regiões sintênicas nos cromossomos 4DL em trigo (*Alt<sub>BH</sub>*, Riede e Anderson, 1996), 4H em cevada (*Alp*, Tang et al., 2000) e 4RL em centeio (*Alt3*, Miftahudin et al., 2002). No entanto, diversos trabalhos têm demonstrado que outros genes podem estar envolvidos na tolerância ao alumínio nessas espécies (Aniol e Gustafson, 1984; Ma et al., 2000b; Tang et al., 2002; Matos et al., 2005).

A variação natural da tolerância ao alumínio em outras espécies de diferentes tribos da família das Poaceae, como o milho (Magnavaca et al., 1987; Ninamango-Cárdenas et al., 2003) e o arroz (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2001; 2002; 2003),

apresentam uma natureza claramente quantitativa. Em arroz, um QTL de tolerância ao Al foi mapeado no cromossomo 3 (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2003), que é homeólogo (cromossomo em diferentes espécies derivado de um mesmo cromossomo ancestral) ao cromossomo 4 de trigo, cevada e centeio (Klein et al., 2003). A presença de marcadores moleculares comuns ligados, tanto ao QTL no cromossomo 3 de arroz quanto aos genes de tolerância ao alumínio no cromossomo 4 da tribo Triticeae, sugere que tais locos podem ser ortólogos (Nguyen et al., 2003).

O primeiro gene de tolerância ao alumínio foi clonado em trigo e denominado *ALMT1*, sendo caracterizado como um transportador de malato ativado pelo alumínio, o que demonstrou coerência com o principal mecanismo fisiológico de tolerância ao alumínio verificado nesta espécie (Sasaki et al., 2004). Este gene é expresso constitutivamente em ápices radiculares de trigo, apresentando níveis de expressão superiores nas linhagens tolerantes em relação às sensíveis, sendo a proteína localizada na membrana plasmática (Sasaki et al., 2004; Yamaguchi et al., 2005). Delhaize et al. (2004) demonstraram que plantas transgênicas de aveia superexpressando *ALMT1* apresentaram um aumento significativo na taxa de exsudação de malato, com conseqüente aumento da tolerância ao alumínio. Recentemente, o gene *ALMT1* foi localizado no cromossomo 4DL de trigo, em uma região consistente com aquela do principal loco de tolerância ao alumínio detectado nesta espécie, *Alt<sub>BH</sub>* (Raman et al., 2005).

Em *arabidopsis*, a tolerância ao alumínio foi descrita como uma característica geneticamente complexa (Hoekenga et al., 2003), sendo que vários mutantes sensíveis e tolerantes ao Al já foram isolados e caracterizados (Larsen et al. 1996; Larsen et al. 1998). Com base na similaridade de seqüência com o gene de tolerância ao Al em trigo, *ALMT1*, Hoekenga et al. (2006) identificaram o gene

homólogo *AtALMT1*, que codifica um transportador de malato localizado na membrana plasmática, sendo responsável por parte da tolerância ao Al em arabidopsis. Plantas cuja expressão do gene *AtALMT1* foi suprimida perderam a capacidade de exsudar malato sob exposição ao alumínio, tornando-se mais sensíveis em relação às plantas controles. Ainda segundo Hoekenga et al. (2006), a expressão do gene *AtALMT1* assim como a atividade de transporte de sua proteína são reguladas pela presença do alumínio. Entretanto, variações nos níveis de expressão gênica e na seqüência codificadora do *AtALMT1* em ecótipos de arabidopsis não foram correlacionadas com as diferenças na tolerância ao Al.

A conservação de genes em gramíneas tem sido amplamente relatada, incluindo para a tolerância ao alumínio (Garvin e Carver, 2003). Entretanto, os genes *ALMT1* e *AtALMT1* são a primeira evidência de conservação funcional de genes que conferem a tolerância ao Al entre mono (trigo) e dicotiledôneas (arabidopsis) (Hoekenga et al., 2006; Magalhães, 2006), reforçando a importância de estudos de genômica comparativa. A utilização de mapeamento comparativo para integrar informações de genomas em plantas modelo como arroz e arabidopsis tem sido fundamental em diversas estratégias genômicas (Nelson et al., 2004). Devido ao tamanho reduzido do seu genoma, o sorgo apresenta-se como uma espécie para, juntamente com o arroz, complementar estudos de genômica comparativa em gramíneas (Mullet et al., 2002; Price et al., 2005). Nesse sentido, iniciativas visando o seqüenciamento do genoma desta espécie têm sido adotadas (Kresovich et al., 2005).

### 2.6.1. Genética da tolerância ao alumínio em sorgo

Magalhães et al. (2004) verificaram que a tolerância ao alumínio em sorgo, avaliada em populações derivadas dos cruzamentos das linhagens altamente tolerantes SC283 e SC566 com uma testadora sensível comum (BR007), foi influenciada principalmente por um gene de efeito maior, denominado *Alt<sub>SB</sub>*. O gene *Alt<sub>SB</sub>* foi mapeado no cromossomo 3 de sorgo, que não é homeólogo ao cromossomo 4 de espécies pertencentes à tribo Triticeae (trigo, centeio e cevada). No entanto, o cromossomo 3 de sorgo é homeólogo ao cromossomo 1 de arroz (Klein et al., 2003), onde um QTL de tolerância ao alumínio em posição conservada foi detectado em diferentes populações (Wu et al., 2000; Nguyen et al., 2001, 2002, 2003). Isso sugere que a herança quantitativa para a tolerância ao Al verificada em arroz, uma das gramíneas mais tolerantes, pode ser atribuída à ação de pelo menos dois QTLs que possuem genes ortólogos nas tribos Andropogoneae (sorgo) e Triticeae (trigo) (Magalhães et al., 2004).

Caniato et al. (2007) avaliaram a tolerância ao Al em 12 linhagens de sorgo de diferentes raças morfológicas e origens geográficas apresentando ampla variação fenotípica para a tolerância ao Al, incluindo as linhagens BR007, SC283 e SC566 avaliadas por Magalhães et al. (2004). Dois marcadores flanqueando *Alt<sub>SB</sub>* foram utilizados para estudar o envolvimento desse loco na tolerância ao Al em populações geradas a partir do cruzamento dos diferentes genótipos de sorgo com uma linhagem testadora comum, BR012. Para estudar o efeito fenotípico isolado dos alelos no loco *Alt<sub>SB</sub>*, foram desenvolvidas linhagens semi-isogênicas utilizando-se duas linhagens tolerantes como doadores (3DX e CMS225) e a linhagem sensível BR012 como parental recorrente. Os resultados sugerem que as diferenças na tolerância ao Al entre tais linhagens de sorgo são condicionadas por diferentes

alelos do gene *Alt<sub>SB</sub>*, que podem ser classificados em ordem ascendente de efeito fenotípico como BR012<3DX<CMS225. Entretanto, nas linhagens SC112 e 5DX, genes distintos ao gene *Alt<sub>SB</sub>* contribuíram para a tolerância ao Al. Assim, Caniato et al. (2007) identificaram uma grande variabilidade em termos de genes e de alelos envolvidos na tolerância ao alumínio em um painel de 12 linhagens de sorgo.

Mais recentemente, Magalhães et al. (2007), utilizando a estratégia de clonagem baseada em mapa, isolaram o gene *Alt<sub>SB</sub>*, que codifica um membro de uma família de transportadores de membrana, responsável pelo efluxo de citrato em raízes de sorgo.

A elucidação dos processos que atuam na tolerância ao alumínio, principalmente no que se refere à caracterização do gene *Alt<sub>SB</sub>*, torna-se de fundamental importância para compreensão do(s) mecanismo(s) de tolerância ao Al em sorgo e sobretudo para o desenvolvimento de genótipos que sejam mais tolerantes a esse estresse.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material genético

Foram utilizadas as 12 linhagens de sorgo previamente caracterizadas por Caniato et al. (2007), denominadas BR007B, BR012R, 5DX61/6/2, 9DX9/11, 3DX57/1/1/910, SC112-14, SC175-14, SC283, SC549, SC566, IS8577, CMSXS225R, incluindo o genótipo BTx642, que também faz parte do programa de melhoramento genético da Embrapa Milho e Sorgo. Abreviações representadas pelos caracteres sublinhados nos nomes de cada linhagem foram utilizadas ao longo do texto. Como testemunha para o experimento de crescimento radicular foi utilizada a linhagem semi-isogênica ATF10B, derivada do cruzamento entre os genótipos SC283 (doador) e BR007 (recorrente) (Magalhães, 2002). Essa linhagem foi selecionada por apresentar um padrão de crescimento radicular conhecido.

#### 3.2. Avaliação da tolerância ao alumínio em solução nutritiva

Sementes das linhagens de sorgo foram germinadas em rolos de papel de germinação umedecidos em água deionizada por quatro dias em câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27 \pm 3^\circ\text{C}$ , noturna de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. As plântulas foram então transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC dentro de bandejas plásticas com capacidade para 8,5 litros de solução nutritiva. As plântulas foram mantidas por 24 horas em solução nutritiva completa sem Al (Magnavaca et al., 1987), com o pH ajustado para 4,0, sob aeração constante. Após esse período, foi adicionada nova solução nutritiva com a mesma constituição anterior, porém adicionando-se  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  nos tratamentos contendo Al. Os experimentos foram mantidos em câmara de crescimento, sob as mesmas condições utilizadas para a germinação.

Os experimentos foram conduzidos com cinco concentrações de Al: 0, 60, 110, 148 e 222  $\mu\text{M}$ , que correspondem à {0}, {11}, {20}, {27} e {39}  $\mu\text{M}$  respectivamente, onde as chaves indicam atividade de Al livre estimadas com o programa GEOCHEM-PC (Parker et al., 1995). Cada linhagem foi representada por 14 plântulas em cada atividade de Al. Devido ao grande número de plântulas os genótipos foram divididos em cinco experimentos, utilizando-se em cada um deles sete plântulas da linhagem tolerante ATF10B como testemunha.

Para obtenção de uma curva de resposta ao Al ao longo de um período de seis dias, avaliou-se o crescimento líquido diário, onde cada valor refere-se à medição radicular em um dado dia menos o valor do dia anterior. Calculou-se ainda a taxa de crescimento radicular (mm/dia) a partir das inclinações das curvas de crescimento em cada atividade de Al ao longo do tempo.

### **3.2.1. Análise de agrupamento dos padrões de crescimento radicular**

Os padrões de crescimento radicular foram agrupados de acordo com o comportamento apresentado nas diferentes concentrações de alumínio e/ou ao longo do tempo. As análises foram realizadas no Laboratório Bioinformática e Computação Bio-Inspirada da Universidade Estadual de Campinas por meio do algoritmo HaiNet (“Hierarchical Artificial Immune Network”, Bezerra et al., 2005), que agrupa hierarquicamente as curvas de crescimento em função do padrão de similaridade entre elas.

### **3.3. Identificação de haplótipos do gene *Alt<sub>SB</sub>***

O isolamento do DNA genômico das treze linhagens (BR007, BR012, 5DX, 9DX, 3DX, SC112, SC175, SC283, SC549, SC566, IS8577, CMS225, Tx642) foi realizado segundo a modificação do método descrito por Saghai-Marroof et al.

(1984). Para isso, 600  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB [2 % (m/v) CTAB; 0,2 M Tris- HCl (pH 7,5); 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA (pH 8,0); 2 % (v/v) 2-mercaptoetanol] foram adicionados à aproximadamente 500 mg de material vegetal moído em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A mistura foi mantida em banho-maria a 65°C durante uma hora, com homogeneização a cada 15 minutos. Em seguida, promoveu-se a lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1, v/v), com homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, onde foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol mantido a -20 °C. Os microtubos foram centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % (v/v) gelado. Os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 16.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o etanol residual retirado em centrífuga a vácuo por cinco minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de tampão TE contendo RNase A (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  RNase A).

As amostras foram quantificadas em gel de agarose 0,8 % (m/v) em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 8,0), comparando-se com um padrão de DNA de concentração conhecida. Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). O DNA estoque foi diluído em água ultrapura para a concentração de 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  e armazenado a -20 °C.

Para o seqüenciamento completo do gene *Alt<sub>SB</sub>* foram utilizados pares de iniciadores para amplificação de fragmentos genômicos, conforme mostrado na Tabela 1. As reações de amplificação por PCR foram preparadas em um volume

final de 40  $\mu$ L, consistindo de 60 ng de DNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM  $MgCl_2$ ; 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,125 mM dNTPs e 20 pmols de cada iniciador. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 90 segundos, seguido por uma elongação final de 72 °C por 5 minutos, mantendo a reação à 4 °C.

**Tabela 1:** Pares de iniciadores utilizados nas reações de amplificação do gene *Alt<sub>SB</sub>* em sorgo.

Nome	Posição	Seqüência (5' - 3')	Fragmento (pb)
JL 37	Éxon 1	GAAGCCGCAGTACCATTCTC	1065
JL 38	Porção 5'	CACGTGAGCCTGCATCTTTA	
JL 47	Porção 3'	ACGTACTAGGGTCGTTTGGGTTGT	1065
JL 48	Éxon 4	ACGCTGATAATGCTGAGCAAGCTG	
JL 49	Éxon 4 / Íntron 4	CCTACTGATCGACTACTGACCGCA	997
JL 50	Éxon 1	GGGAACAGGAGGTTTCGTGCCGTCC	
JL 51	Íntron 1	GGCACGCACAGGCACAGTAACTTA	1003
JL 52	Porção 5'	AACAAGTGGCCAAGTGGGTGATCA	
JL 55	Éxon 2	GCCCGCGCTGCGCTACCTGA	737
JL 49	Éxon 4/ Íntron 4	CCTACTGATCGACTACTGACCGCA	

Ao produto de PCR foram adicionados 5  $\mu$ L de tampão de amostra [0,15 % (m/v) azul de bromofenol; 0,15 % (m/v) xileno cianol; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 5 mM EDTA pH 8,0; 50 % (v/v) glicerol e 0,5 % (m/v) SDS], sendo toda a mistura aplicada em gel de agarose 1 % (m/v) em tampão TAE. Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1  $\mu$ g/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). Os fragmentos amplificados foram removidos do gel e purificados com "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen, Valencia, CA) segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram então eluídas em 50  $\mu$ L de

tampão EB (Qiagen, Valencia, CA), liofilizadas em centrífuga a vácuo e ressuspendidas em 10 µL de água ultra-pura.

As reações de seqüenciamento foram preparadas utilizando-se entre 50 e 100 ng do DNA purificado; 2 µL de Big Dye V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA); 2 µL do tampão 5X (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 5 pmols do iniciador, em um volume final de 10 µL. As reações foram submetidas a 96 °C por 20 segundos, 50 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos, repetidos por 30 vezes.

Posteriormente, 40 µL de isopropanol 75 % (v/v) foram adicionados a cada amostra, sendo incubadas durante 20 minutos no escuro e centrifugadas por 20 minutos a 16000 x g, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100 µL de etanol 70 % (v/v) ao precipitado, sendo os microtubos centrifugados a 16000 x g por 20 minutos, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspendidas em 10 µL de formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, CA), desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e mantidas no gelo até a injeção no equipamento ABI3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A qualidade das seqüências foi avaliada pelo programa Seqman 3.57 (DNASTar, Madison, WI) e as seqüências selecionadas foram alinhadas pelo programa ClustalW (Thompson et al., 1994). Os polimorfismos de nucleotídeos entre as seqüências foram estimados pelo índice  $q$ , onde  $q = S_n / (a_{n-1})(n)$ , sendo  $S_n$  o número de sítios polimórficos,  $n$  o tamanho da seqüência e  $a_{n-1} = \sum 1/i$ , que varia de 1 até  $n-1$ , onde  $i$  é o número de seqüências comparadas (Watterson, 1975).

A predição da estrutura secundária da proteína foi realizada por meio do algoritmo SOSUI (Hirokawa et al., 1998; <http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>).

### 3.4. Análise da expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*

A partir dos dados de crescimento radicular em várias atividades de alumínio ao longo do tempo, observou-se que o tratamento com {27}  $\mu\text{M}$  de Al por três dias foi capaz de evidenciar as diferenças entre as linhagens sensíveis e tolerantes. Com exceção da linhagem ATF10B, foram cultivadas 14 plântulas de cada um dos treze genótipos de sorgo na ausência (controle) e na presença de {27}  $\mu\text{M}$  de Al, visando a obtenção de tecido radicular para análise de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*. Devido ao grande número de plântulas as linhagens foram divididas em dois experimentos sob as mesmas condições, utilizando a linhagem SC283 como testemunha comum. Os experimentos foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Os resultados de cada experimento na presença de Al foram submetidos à análise de variância individual, sendo aplicado o teste F para avaliação da homogeneidade de variância. Uma vez atendido o requisito da homogeneidade, procedeu-se a análise conjunta, utilizando o procedimento GLM (Modelo Linear Generalizado) do programa SAS (SAS Institute, 1985). As médias ajustadas foram comparadas pelo teste de Scott Knott a 5% de significância.

Foram coletados ápices radiculares de dez plântulas cultivadas por três dias sob estresse de alumínio ou na condição controle. Para isso, um segmento de 1 cm da raiz, medido a partir do ápice, foi removido com o auxílio de bisturi e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

As amostras de RNA foram extraídas com o “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Valencia, CA), segundo as recomendações do fabricante. Ao final do procedimento, as amostras foram eluídas em 35  $\mu\text{L}$  de água tratada com DEPC. Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  do RNA foi diluída com 4  $\mu\text{L}$  de água DEPC e tratada com 10 U de DNase I (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) por 15 minutos à temperatura

ambiente. Para a quantificação do RNA total foram utilizados 2 µL de cada amostra acrescidos de 398 µL de água DEPC. A pureza e a concentração do RNA foram determinadas pela leitura das amostras em comprimento de onda de 260 e 280 nm, utilizando-se o espectrofotômetro Lambda Bio (Perkin Elmer, Wellesley, MA). A integridade das amostras foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v) contendo 0,25 µg/mL de brometo de etídio. Após a eletroforese realizada a 200 V durante 30 minutos, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA).

Para a síntese do DNA complementar foram utilizados 300 ng de RNA total, previamente tratados com DNase I, 500 ng de oligo (dT)<sub>12-18</sub> e 100 µmol de cada dNTP, em um volume total de 12 µL. As amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 minutos e transferidas para gelo. A seguir, foram adicionados 4 µL de tampão 5x (Invitrogen, Carlsbad, CA), 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de água DEPC. A mistura foi incubada a 42 °C por 2 minutos, adicionando-se a seguir 1 µL de “SuperScript II RT” (Invitrogen, Carlsbad, CA) e mantida a 42 °C por 90 minutos. Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 70 °C por 15 minutos e armazenadas a -20 °C.

Os pares de iniciadores utilizados para amplificar os genes *Alt<sub>SB</sub>* e *β-actina* (controle) estão mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Pares de iniciadores utilizados para amplificação parcial do cDNA dos genes *Alt<sub>SB</sub>* e *b-Actina* de sorgo.

Gene	Iniciadores (5´- 3´)	Fragmento (pb)
<i>Alt<sub>SB</sub></i>	JL57: GTGCTGGATCCGATCCTGAT	788
	JL58: CACTGCCGAAGAACTTCCA	
<i>b-Actina</i>	ActR: GATCCACATCTGTTGGAACG	506
	ActF: TGATGAAGATTCTCACTGAG	

As reações de PCR para a amplificação do cDNA foram otimizadas visando estabelecer o número de ciclos de amplificação que permitisse a quantificação adequada dos fragmentos ainda na fase exponencial da reação. Foram testados de 24 a 42 ciclos com incrementos de 2 ciclos para ambos os genes.

Após definição dos ciclos de amplificação do PCR semi-quantitativo, as condições da reação em multiplex foram realizadas em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , consistindo de 2  $\mu\text{L}$  de cDNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA); 0,125 mM dNTPs e 10 pmols de cada iniciador. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 40 segundos e 72 °C por 90 segundos, alongação final a 72 °C por 5 minutos, mantendo a reação à 4 °C.

Ao produto da amplificação foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  do corante citado no item 3.3, sendo toda a mistura aplicada em gel de agarose 1 % (m/v) em tampão TAE. Após a eletroforese realizada a 100 V durante duas horas, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). Os produtos de amplificação de cada amostra foram quantificados utilizando-se do programa "ImageQuant" (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Os dados de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* foram normalizados utilizando a razão entre as intensidades dos produtos amplificados do gene e da *b-actina*, representando assim a expressão relativa do gene *Alt<sub>SB</sub>*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Crescimento radicular de linhagens de sorgo submetidas a cinco doses de Al em solução nutritiva

Primeiramente foi avaliado o crescimento radicular da testemunha ATF10B nas atividades de 0, 11, 20, 27 e 39  $\mu\text{M}$  de Al ao longo do tempo em cada um dos experimentos. O padrão de crescimento radicular da ATF10B na presença de Al foi similar entre os cinco experimentos (Figura 1), o que permitiu uma análise combinada dos dados.

Apesar da tolerância ao alumínio ser uma variável de distribuição contínua, que depende fundamentalmente do nível de tolerância das linhagens e das doses de Al, foram estabelecidas classes de tolerância definidas com base nos valores de %CLR (Crescimento Líquido Relativo) obtidos por Caniato et al. (2007) na atividade de 27  $\mu\text{M}$  de Al (Tabela 3).

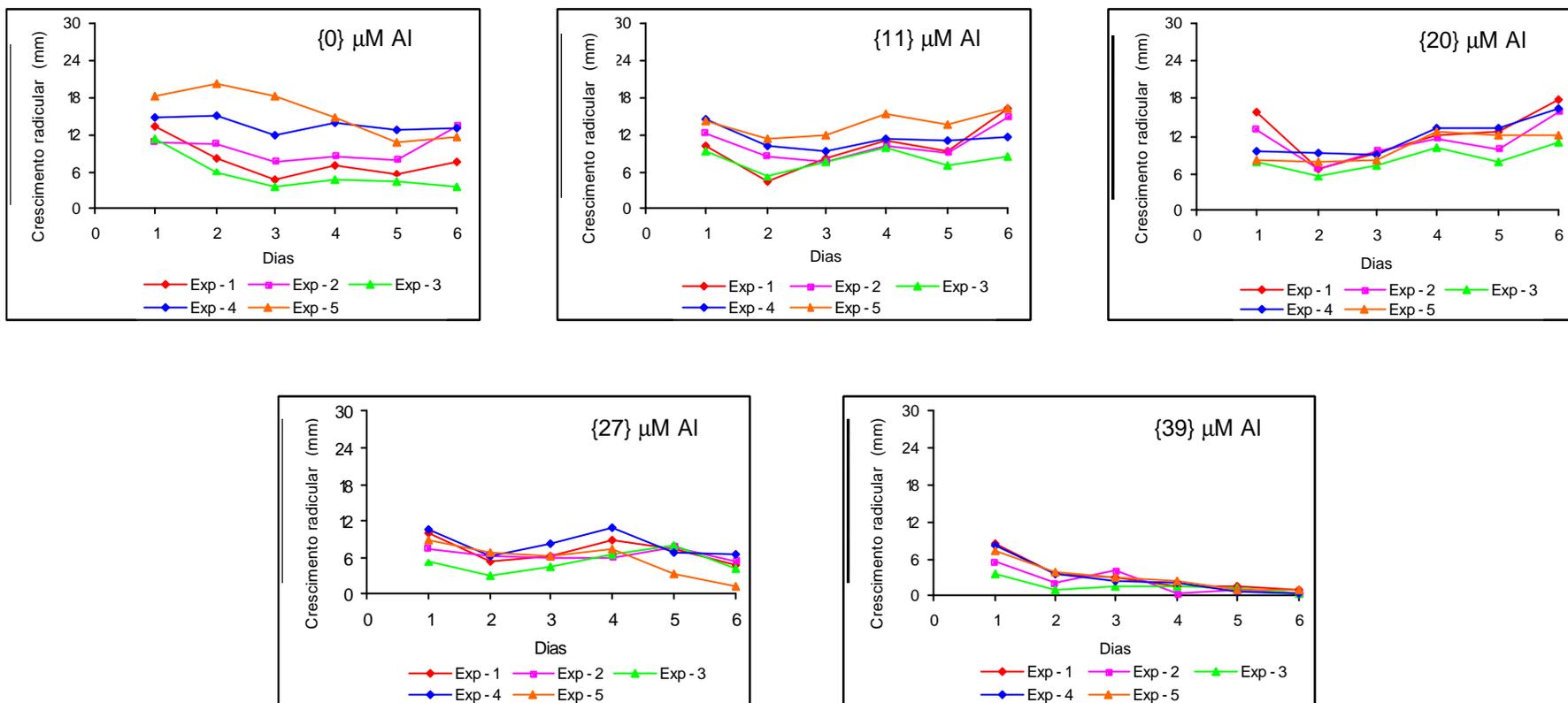
**Tabela 3.** Classificação das 13 linhagens de sorgo quanto à tolerância ao alumínio.

Nível de tolerância ao Al	<sup>a</sup> Parâmetro	Linhagens
Sensível	$\%CLR \leq 35$	Tx642, BR007, BR012
Moderadamente tolerante	$35 < \%CLR \leq 60$	IS8577, SC112
Tolerante	$61 < \%CLR \leq 99$	SC549, 3DX, 5DX, 9DX, SC175
Altamente tolerante	$\%CLR \geq 100$	CMS225, SC283 e SC566

<sup>a</sup> Valores obtidos por Caniato et al. (2007).

#### 4.1.1. Crescimento radicular ao longo do tempo

O crescimento radicular das 13 linhagens de sorgo ao longo de seis dias na ausência do alumínio evidenciou um comportamento uniforme, com variações



**Figura 1.** Agrupamento dos padrões de crescimento radicular da linhagem de sorgo ATF10B em solução nutritiva na ausência e presença de diferentes atividades de alumínio ao longo de seis dias. Cada valor refere-se ao comprimento líquido diário. Valores no gráfico representam médias de sete plântulas.

associadas principalmente à magnitude das curvas (Anexo - Figura 1). As linhagens SC283 e 5DX apresentaram os menores valores de crescimento radicular, enquanto nas linhagens SC175 e BR007 esses valores foram os mais elevados. O crescimento radicular na ausência de alumínio é um importante parâmetro a ser considerado como controle, para comparar com o crescimento radicular sob estresse de alumínio.

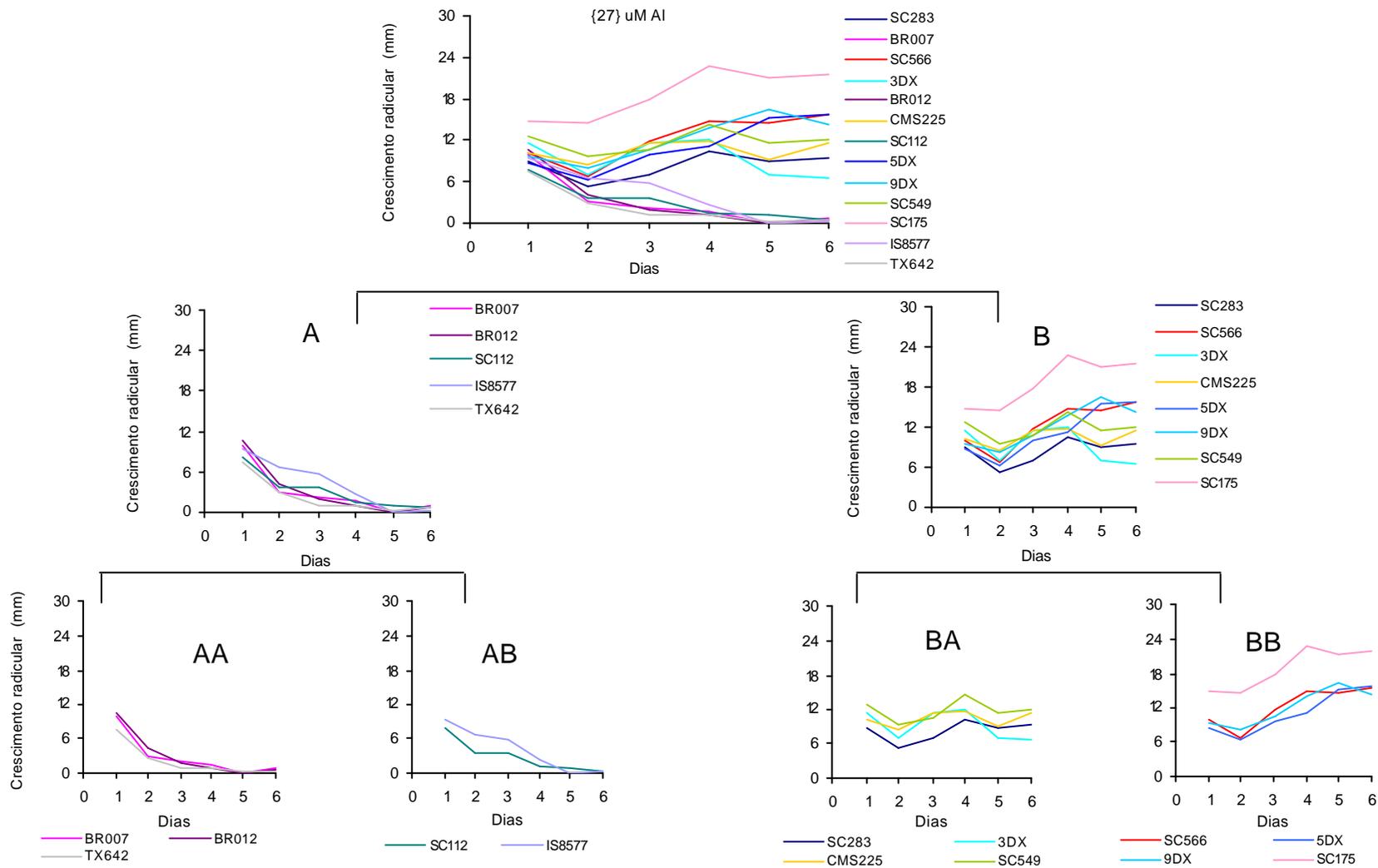
As atividades de 11 e 20  $\mu\text{M}$  de Al não permitiram a discriminação das linhagens de sorgo quanto à tolerância ao alumínio segundo a classificação realizada por Caniato et al. (2007) (Anexo - Figuras 2 e 3). Esta situação é esperada uma vez que em doses menores do alumínio, apenas as linhagens sensíveis (Tx642, BR007 e BR012) são discriminadas das demais.

Já na atividade de 27  $\mu\text{M}$  de Al houve uma clara separação de dois grupos no primeiro nível de clusterização (Figura 2). As linhagens que apresentaram uma redução contínua no crescimento radicular foram agrupadas no grupo A enquanto que no grupo B encontraram-se linhagens que apresentaram manutenção ou aumento dos valores de crescimento radicular ao longo do período experimental. As linhagens do grupo A foram subseqüentemente divididas no grupo AA, onde a redução mais acentuada do crescimento ocorreu a partir do primeiro dia de exposição ao Al (BR007, BR012 e Tx642) e no grupo AB, onde a redução drástica ocorreu a partir do terceiro dia de exposição (SC112 e IS8577). As linhagens agrupadas em B apresentaram uma pequena redução no crescimento radicular no primeiro dia e uma clara recuperação a partir do segundo dia de exposição ao alumínio (SC283, CMS225, 3DX, SC549, SC566, 9DX, 5DX e SC175). A linhagem SC175 se destacou pelo crescimento radicular superior em relação às demais. Esses resultados são consistentes com o nível relativo de tolerância previamente

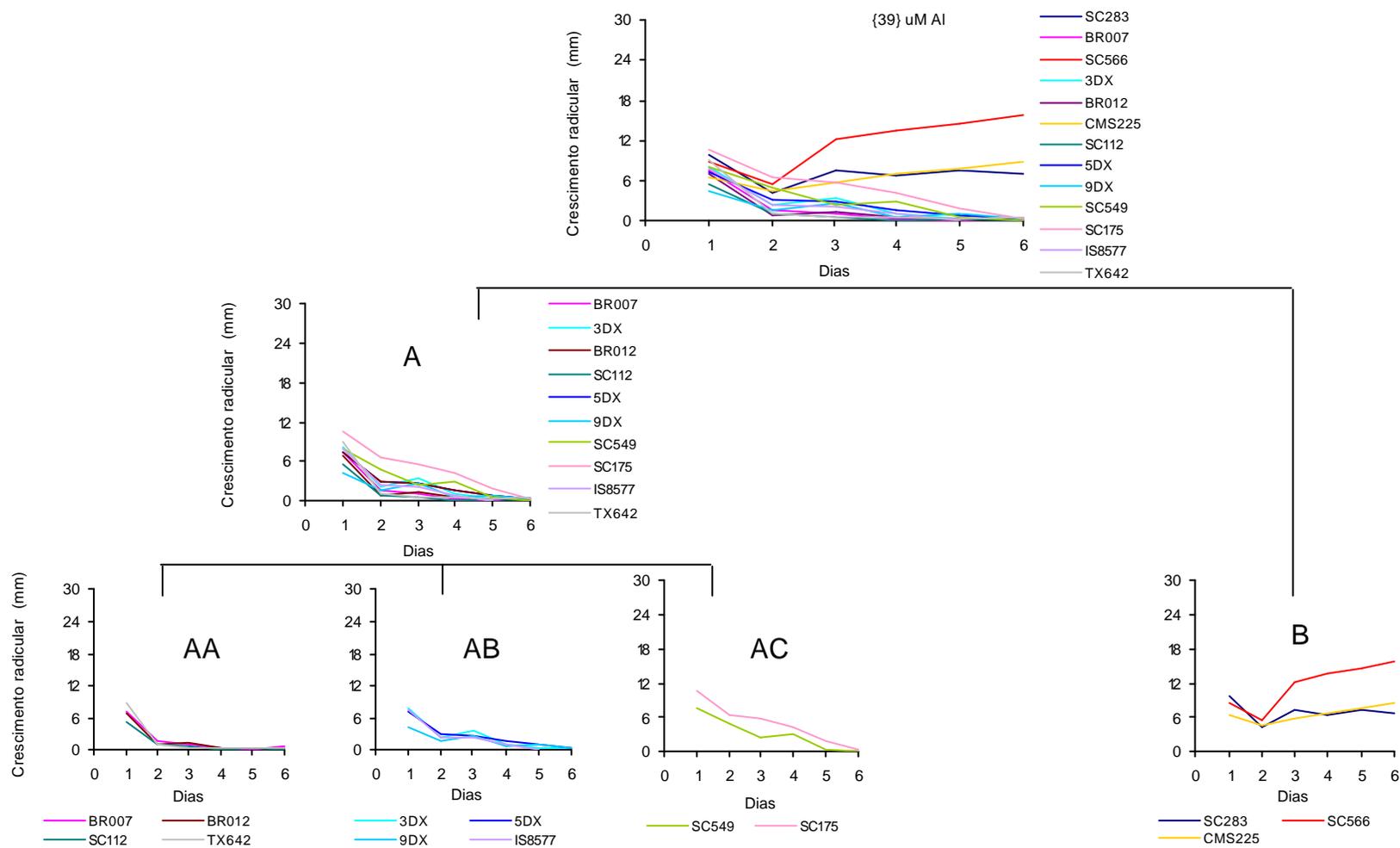
observado por Caniato et al. (2007), indicando que linhagens sensíveis ao Al encontraram-se no grupo AA, as moderadamente tolerantes no grupo AB, as tolerantes e altamente tolerantes nos grupos BA e BB. No entanto, as linhagens tolerantes (SC549, 3DX, 5DX, 9DX e SC175) não puderam ser discriminadas daquelas altamente tolerantes (CMS225, SC283 e SC566).

A atividade de 39  $\mu\text{M}$  de Al foi eficiente para discriminar os genótipos altamente tolerantes (Grupo B: CMS225, SC283 e SC566), que também apresentaram inicialmente uma nítida queda do crescimento, com posterior recuperação após dois dias em solução contendo Al (Figura 3). Os demais genótipos foram subdivididos em função da inibição do crescimento radicular, onde as linhagens sensíveis apresentaram um crescimento quase nulo a partir do segundo dia de exposição ao Al (Grupo AA: BR007, BR012, Tx642).

A avaliação da tolerância ao Al ao longo do tempo permitiu identificar pontos de mudança nas curvas de crescimento. Uma inibição inicial do crescimento radicular seguida de uma recuperação foi verificada em várias linhagens nos dois primeiros dias de exposição ao alumínio. Este comportamento foi evidenciado principalmente na atividade de 27  $\mu\text{M}$  de Al (Figura 2). Nesta condição, as linhagens agrupadas em BA e BB apresentaram um aumento significativo da tolerância com o aumento do tempo de exposição ao Al. Isto sugere que a tolerância ao Al em sorgo pode ter um comportamento indutível ao longo do tempo nas linhagens consideradas tolerantes ou altamente tolerantes. À {39}  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  (Figura 3) esse mesmo comportamento foi verificado nas linhagens SC283, CMS225 e SC566, que foram capazes de resistir aos efeitos tóxicos do Al mesmo nesta condição. Padrões similares foram reportados em centeio (Li et al., 2000; Ma et al., 2000b).



**Figura 2.** Agrupamento dos padrões de crescimento radicular de 13 genótipos de sorgo em solução nutritiva na presença de 27 μM de alumínio ao longo de seis dias. Valores no gráfico representam médias de 14 plântulas. As letras representam grupos hierárquicos.



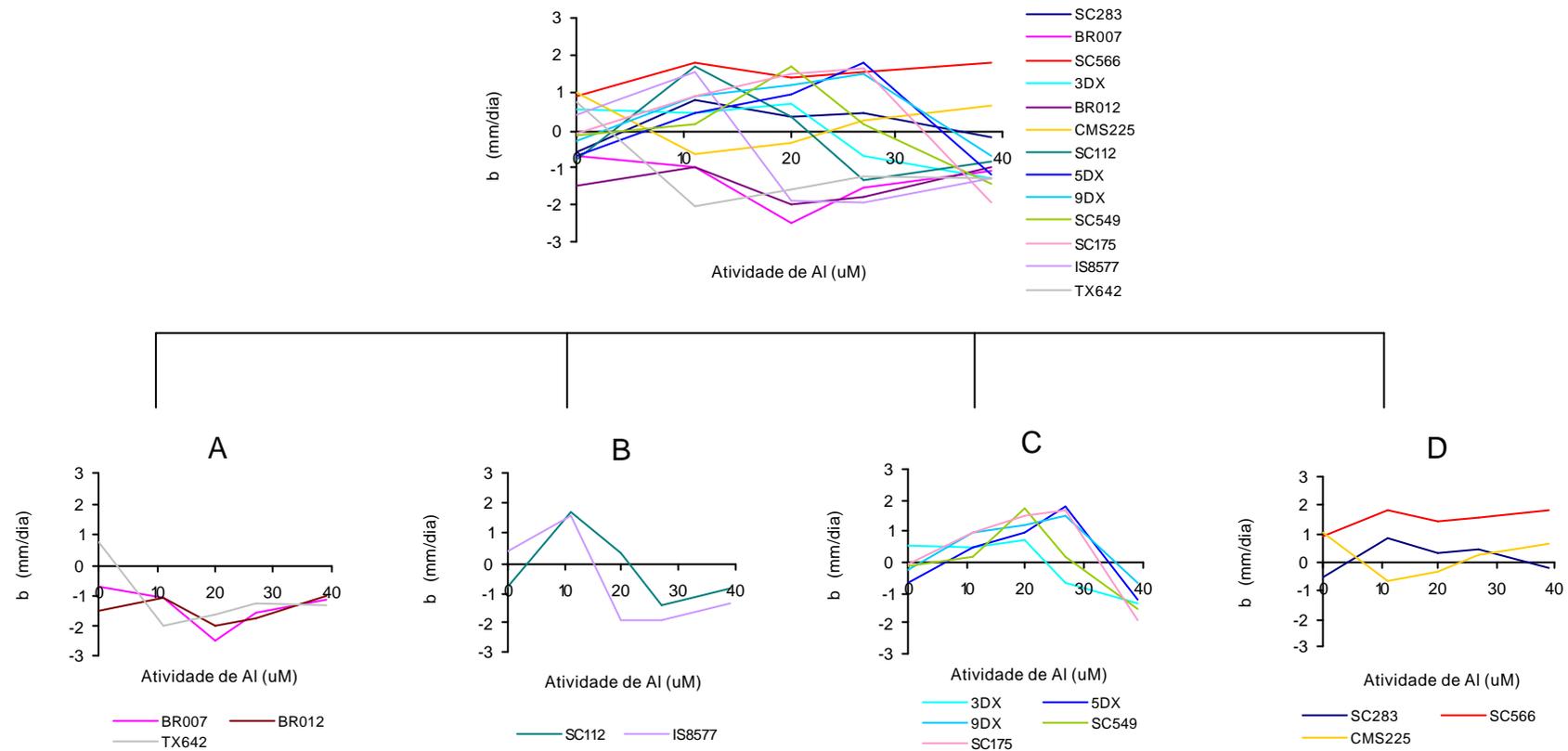
**Figura 3.** Agrupamentos dos padrões de crescimento radicular de 13 genótipos de sorgo em solução nutritiva na presença de {39}  $\mu\text{M}$  de alumínio ao longo de seis dias. Valores no gráfico representam médias de 14 plântulas. As letras representam grupos hierárquicos.

Esse comportamento indutível após dois dias de exposição ao alumínio sugere a necessidade de indução de genes envolvidos no mecanismo de tolerância ao Al em sorgo.

#### **4.1.2 Crescimento radicular ao longo do tempo em diferentes atividades de Al**

Diante da resposta indutível da tolerância ao Al, avaliou-se a taxa de crescimento radicular, calculada a partir da inclinação das curvas de crescimento ao longo tempo em cada atividade de Al (mm/dia). O agrupamento das curvas de crescimento permitiu a caracterização das linhagens em quatro grupos distintos (Figura 4). No grupo A, as linhagens BR007, Tx642 e BR012 tiveram o crescimento radicular inibido a partir de  $11 \mu\text{M}$  de Al, podendo ser caracterizadas como sensíveis. As linhagens SC112 e IS8577, pertencentes ao grupo B, mostraram uma indução no crescimento radicular até a atividade de  $11 \mu\text{M}$  de Al, a partir da qual foi observada uma inibição no crescimento, com uma drástica redução à  $20 \mu\text{M}$  de Al. Essas linhagens podem ser consideradas moderadamente tolerantes.

No grupo C foram incluídas as linhagens 3DX, SC175, SC549, 9DX e 5DX, que apresentaram um aumento da taxa de crescimento radicular até as atividades de  $20 \mu\text{M}$  (3DX e SC549) ou  $27 \mu\text{M}$  de Al (SC175, 5DX e 9DX), a partir das quais houve uma acentuada inibição no crescimento radicular. Esse grupo foi considerado tolerante. O limiar indutivo observado nos grupos B e C (Figura 4) é consistente com o nível de tolerância observado em uma única atividade e em um único período de exposição ao Al (Tabela 3). Isso sugere que a tolerância diferencial ao Al entre esses grupos deve-se à manutenção da resposta indutiva com o aumento da atividade de Al.



**Figura 4.** Agrupamento das curvas de crescimento radicular de 13 genótipos de sorgo em solução nutritiva na ausência e presença de diferentes atividades de alumínio. O valor de  $b$  representa a inclinação das curvas de crescimento radicular ao longo de seis dias. As letras representam grupos hierárquicos.

As linhagens CMS225, SC283 e SC566, agrupadas em D, apresentaram taxas de crescimento praticamente constantes até a atividade de 39  $\mu\text{M}$  de Al, novamente demonstrando uma tolerância superior em relação às demais linhagens. Dentre as linhagens agrupadas como altamente tolerantes, CMS225 apresentou uma acentuada inibição à 11  $\mu\text{M}$  de Al, o que não foi observado nas demais linhagens.

De maneira geral, além do comportamento indutível no crescimento radicular ao longo do tempo de exposição ao Al (Figuras 2 e 3), houve uma indução do crescimento radicular em resposta às diferentes doses de Al, dependendo do nível de tolerância de cada linhagem (Figura 4). As exceções foram observadas para as linhagens altamente tolerantes, que apresentaram uma taxa de crescimento radicular constante nas diferentes atividades de Al (Grupo D, Figura 4).

Assim, em relação à resposta indutiva, quatro padrões foram caracterizados. Enquanto as linhagens sensíveis não apresentaram nenhum tipo de indução, as linhagens moderadamente tolerantes mostraram um comportamento indutivo apenas ao longo das atividades de Al. As linhagens tolerantes mostraram um comportamento indutivo tanto ao longo do tempo quanto ao longo das atividades de Al. Já as linhagens altamente tolerantes (CMS225, SC283 e SC566) apresentaram um comportamento indutivo ao longo do tempo e taxas de crescimento constantes nas doses de alumínio. A existência de duas respostas indutivas distintas verificadas entre as linhagens com diferentes níveis de tolerância ao Al pode indicar a atuação de mecanismos diferentes envolvidos no controle da tolerância ao alumínio.

Os diferentes padrões observados entre e dentro dos grupos formados com base no crescimento radicular ao longo do tempo e nas diferentes doses de Al (Figuras 2, 3 e 4) confirmam a variabilidade genética no controle da tolerância ao Al

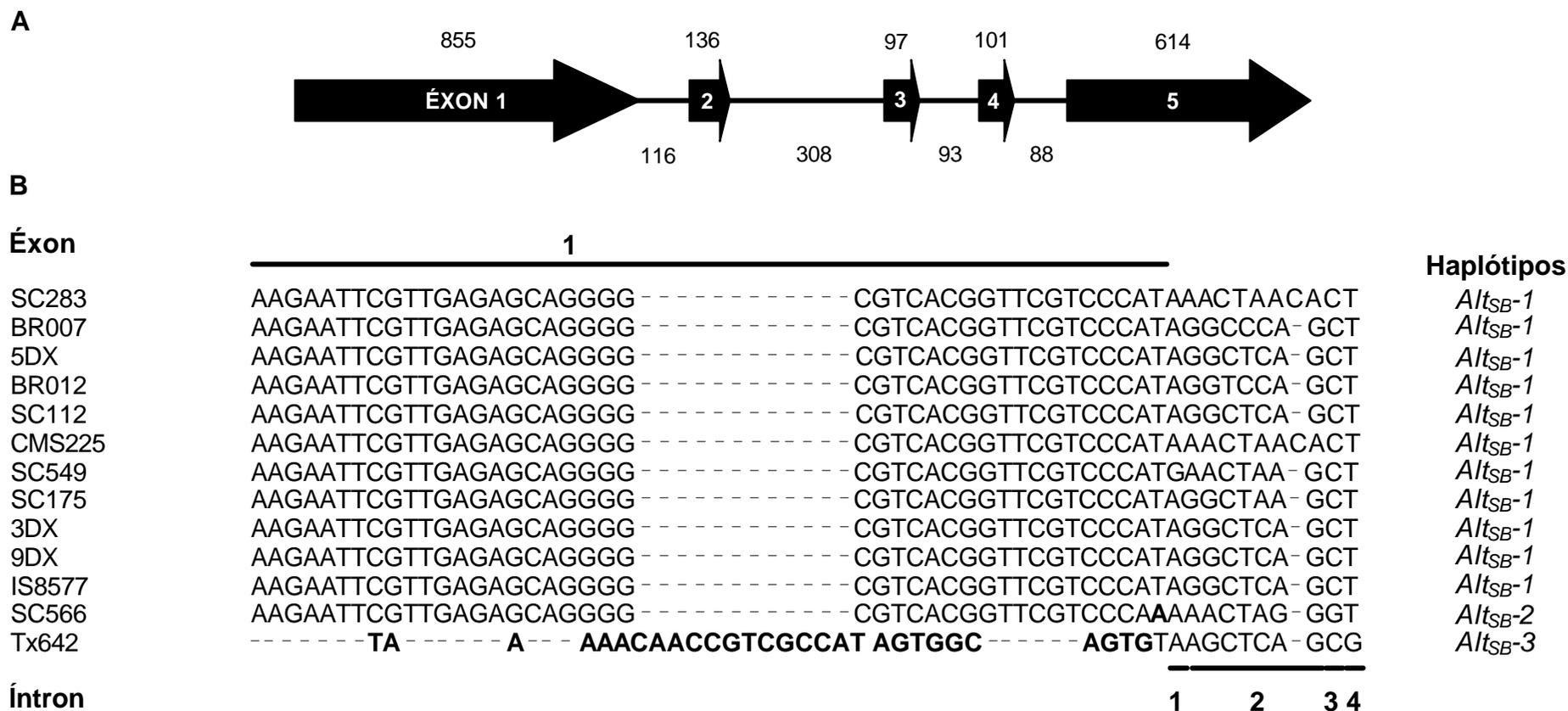
encontrada por Caniato et al. (2007). A atribuição dos padrões observados a diferentes alelos do gene *Alt<sub>SB</sub>* ou a genes distintos de tolerância requer a utilização de estoques genéticos apropriados, trabalho esse que se encontra em andamento.

#### **4.2. Estrutura genômica e haplótipos do gene *Alt<sub>SB</sub>***

O gene *Alt<sub>SB</sub>* possui cinco éxons e quatro íntrons totalizando 2408 pares de bases (pb), sendo que a sua região codificadora possui 1803 pb na linhagem SC283 (Magalhães et al., 2007). Detalhes da estrutura do gene estão mostrados na Figura 5A.

O alinhamento das seqüências do gene *Alt<sub>SB</sub>* revelou um reduzido número de polimorfismos na região codificadora entre as linhagens de sorgo. Onze dos treze genótipos não apresentaram variação na seqüência de nucleotídeos do gene, sendo o mesmo haplótipo da linhagem altamente tolerante SC283, *Alt<sub>SB</sub>-1*. Na linhagem SC566 houve uma única substituição de timina (T) por adenina (A) no primeiro éxon do gene, sendo denominado haplótipo *Alt<sub>SB</sub>-2*. Uma notável exceção foi observada no haplótipo *Alt<sub>SB</sub>-3* da linhagem Tx642, que apresentou a maioria dos polimorfismos identificados ao longo do gene, incluindo substituições de nucleotídeos únicos (SNPs), inserções e deleções (Figura 5B). Assim, a variabilidade na tolerância ao alumínio verificada entre as treze linhagens de sorgo não pôde ser explicada pelas variações estruturais na seqüência do gene *Alt<sub>SB</sub>*, uma vez que tanto linhagens altamente tolerantes (CMS225 e SC283) quanto sensíveis (BR007 e BR012) apresentaram o mesmo haplótipo.

Do total de 63 sítios polimórficos, 11 foram localizados nos íntrons e 52 nos éxons. O primeiro éxon foi o único que apresentou polimorfismos, sendo 34 do tipo inserção/deleção (indel), variando entre um e nove nucleotídeos, e 18 SNPs, dos



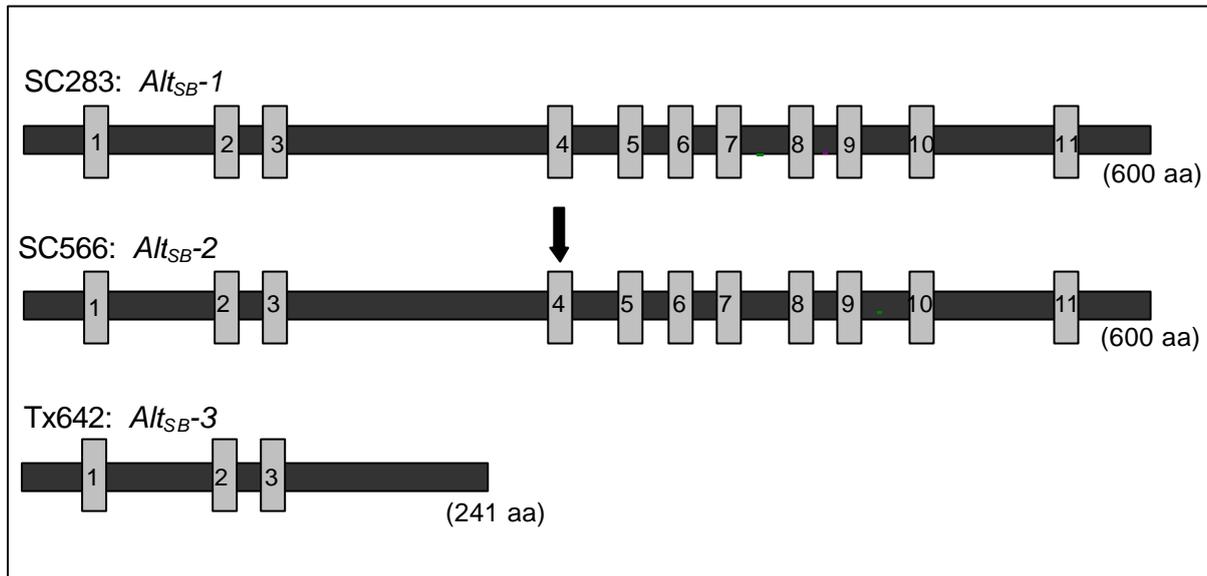
**Figura 5.** Estrutura do gene *Alt<sub>SB</sub>* e descrição dos haplótipos. (A) As setas representam os cinco éxons que são interrompidos por quatro íntrons. Os tamanhos dos éxons e íntrons são referentes ao genótipo de sorgo SC283. (B) Alinhamento parcial das seqüências do *Alt<sub>SB</sub>* indicando os polimorfismos entre 13 genótipos de sorgo. As seqüências foram alinhadas através do programa ClustalW, sendo apenas os polimorfismos mostrados. O éxon e os íntrons que contém polimorfismos são identificados por linhas acima e abaixo das seqüências. As bases em negrito destacam as mutações em relação ao *Alt<sub>SB</sub>-1*, que caracterizam os diferentes haplótipos.

quais todos eles, com exceção de um SNP, foram identificados na linhagem Tx642. Em todos os íntrons foram observados polimorfismos, sendo 10 SNPs e uma indel de apenas um nucleotídeo.

A diversidade global de nucleotídeos ( $\theta$ ) do gene *Alt<sub>SB</sub>* entre as trezes linhagens de sorgo foi de 0,0038. O mesmo parâmetro avaliado para o gene *ALMT1* foi igual a 0,0034, calculado a partir de 13 linhagens de trigo com tolerância diferencial ao Al (Raman et al., 2005). Esses autores também não associaram os polimorfismos na região codificadora do gene *ALMT1* com a tolerância diferencial ao alumínio em trigo. Hoekenga et al. (2006) obtiveram  $\theta$  de 0,0032 para o gene *AtALMT1*, homólogo ao *ALMT1*, em seis ecótipos de *Arabidopsis*, também com níveis variáveis de tolerância ao alumínio. Tais valores, no entanto, foram menores do que a diversidade de nucleotídeos média entre os genes de *Arabidopsis thaliana* ( $\theta = 0,007$ ) (Schmid et al., 2005), sugerindo uma conservação estrutural dos mesmos quando comparados aos demais genes.

A predição da proteína codificada pelo haplótipo *Alt<sub>SB-1</sub>* revelou uma proteína composta por 600 aminoácidos e 11 domínios transmembrânicos (Figura 6). A mutação observada no haplótipo *Alt<sub>SB-2</sub>* da linhagem SC566 resultou na troca do aminoácido leucina pela histidina na posição 261, localizada no quarto domínio transmembrânico (Figura 6). Apesar da troca ter ocorrido entre um aminoácido hidrofóbico (leucina) por um hidrofílico (histidina), a estrutura secundária predita da proteína não sofreu alteração significativa. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que a elevada tolerância da linhagem SC566 esteja relacionada a essa mutação. Os polimorfismos no primeiro éxon da linhagem Tx642 ocasionaram uma mudança da matriz de leitura, resultando no aparecimento de um códon de terminação prematuro. A proteína predita foi de apenas 241 aminoácidos, sendo

eliminados oito domínios transmembrânicos que certamente possuem importância para a sua funcionalidade, que também pode ser responsável pela elevada sensibilidade ao alumínio da linhagem Tx642.



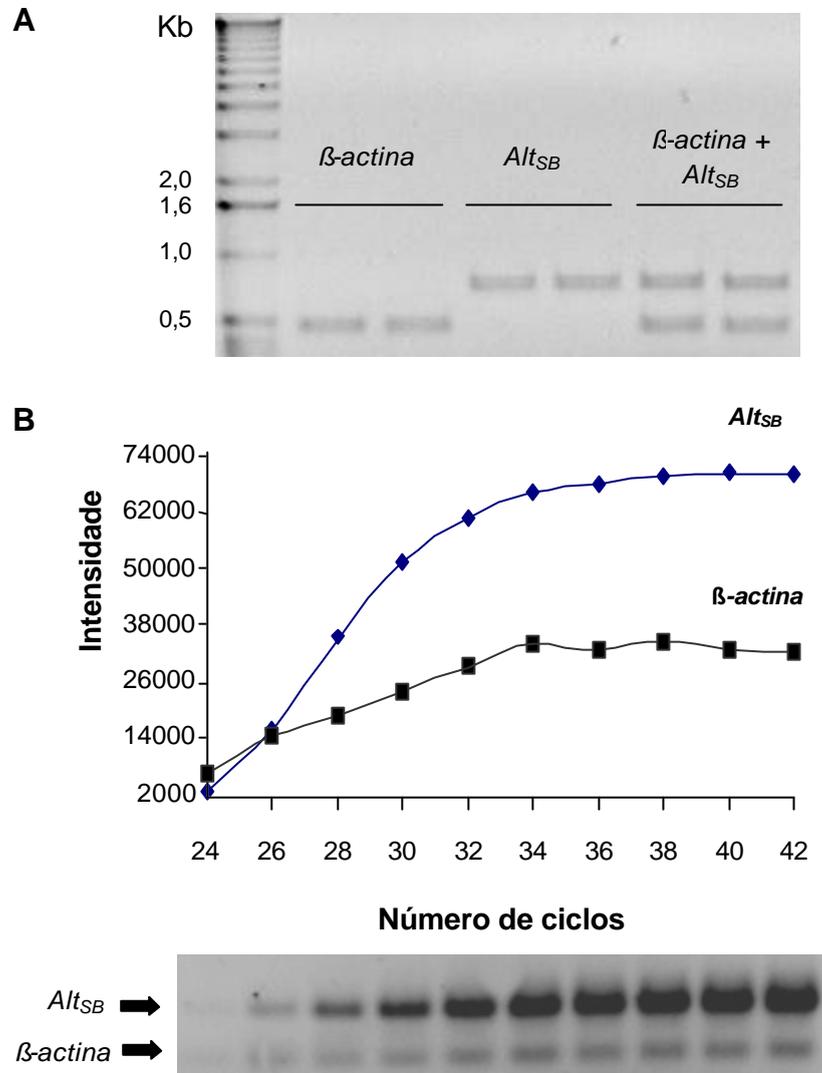
**Figura 6.** Representação esquemática da estrutura secundária da proteína *Alt<sub>SB</sub>* predita por meio do algoritmo SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>). Cada retângulo cinza indica um domínio transmembrânico. A seta mostra a localização do aminoácido polimórfico do genótipo SC566 em relação ao SC283.

Assim, apesar da tolerância ao alumínio não poder ser explicada com base nas variações estruturais do gene *Alt<sub>SB</sub>*, os polimorfismos identificados na seqüência codificadora dos dois haplótipos podem estar associados com pelo menos parte da tolerância ao alumínio, uma vez que a linhagem Tx642 é sensível, enquanto SC566 altamente tolerante.

#### 4.3. Expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*

As condições da reação de RT-PCR semi-quantitativo foram otimizadas para amplificar em multiplex os genes *Alt<sub>SB</sub>* e  *$\beta$ -actina*, sendo selecionados 30 ciclos para

amplificação, por permitir uma quantificação adequada dos fragmentos ainda na fase exponencial da reação (Figura 7).



**Figura 7.** Padronização das condições de RT-PCR semi-quantitativo dos genes *Alt<sub>SB</sub>* e *β-actina*. A) Otimização da reação multiplex. B) Curva de amplificação para determinação do número de ciclos de PCR para análise semi-quantitativa.

O teste de homogeneidade de variância com os dados de expressão relativa do gene *Alt<sub>SB</sub>* na presença de alumínio permitiu a análise estatística conjunta dos dados, sendo que as médias de cada linhagem foram ajustadas em função da média da linhagem comum SC283.

A expressão relativa do gene *Alt<sub>SB</sub>* na presença de {27} µM de alumínio possibilitou a classificação das linhagens em quatro grupos pelo teste de Scott-Knot a 5% (Tabela 4).

**Tabela 4.** Expressão relativa do gene *Alt<sub>SB</sub>* (*Alt<sub>SB</sub>* / *β-Actina*), haplótipos e tolerância ao alumínio avaliados em 13 genótipos de sorgo.

Linagem	<sup>a</sup> Expressão relativa de <i>Alt<sub>SB</sub></i>	<sup>b</sup> Haplótipos	<sup>c</sup> Fenótipo
BR007	0,62 a	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Sensível
Tx642	0,67 a	<i>Alt<sub>SB</sub>-3</i>	Sensível
SC112	0,78 a	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Moderadamente tolerante
BR012	0,99 a	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Sensível
IS8577	1,49 b	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Moderadamente tolerante
SC549	1,65 c	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Tolerante
5DX	1,80 c	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Tolerante
3DX	1,99 c	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Tolerante
SC175	2,12 c	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Tolerante
9DX	2,13 c	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Tolerante
CMS225	2,52 d	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Altamente tolerante
SC283	2,57 d	<i>Alt<sub>SB</sub>-1</i>	Altamente tolerante
SC566	3,05 d	<i>Alt<sub>SB</sub>-2</i>	Altamente tolerante

<sup>a</sup> Médias com a mesma letra constituem grupos homogêneos pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Os valores representam médias de três repetições e foram avaliados após três dias de submissão à {27} µM de alumínio.

<sup>b</sup> Com base na seqüência codificadora do gene *Alt<sub>SB</sub>*.

<sup>c</sup> Com base nas taxas de crescimento radicular ao longo das atividades de Al (0, 11, 20, 27 e 39 µM).

As linhagens BR007, Tx642, SC112 e BR012 apresentaram uma baixa expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* e, com exceção da SC112, foram classificadas como sensíveis ao Al (Tabela 3). As linhagens SC112 e IS8577 apresentaram padrões de

crescimento radicular muito parecidos (Figuras 2 e 4) e foram classificadas como moderadamente tolerantes. Apesar de ambas as linhagens serem igualmente classificadas com relação à tolerância ao AI, a expressão do *Alt<sub>SB</sub>* em SC112 foi duas vezes menor que na linhagem IS8577. O padrão de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* na linhagem SC112 corrobora perfeitamente com os dados de Caniato et al. (2007) que demonstraram que a tolerância ao AI nessa linhagem não é controlada por esse gene. Assim, a tolerância superior de SC112 com relação às linhagens sensíveis seria condicionada por gene(s) distinto(s) ao *Alt<sub>SB</sub>*.

A linhagem Tx642 não foi previamente avaliada por Caniato et al. (2007), mas sua elevada sensibilidade ao AI está associada ao baixo nível de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*. Entretanto, é interessante o fato de que essa linhagem foi a única a apresentar um grande número de polimorfismos na região codificadora, sugerindo que esses polimorfismos possam comprometer a estabilidade do mRNA.

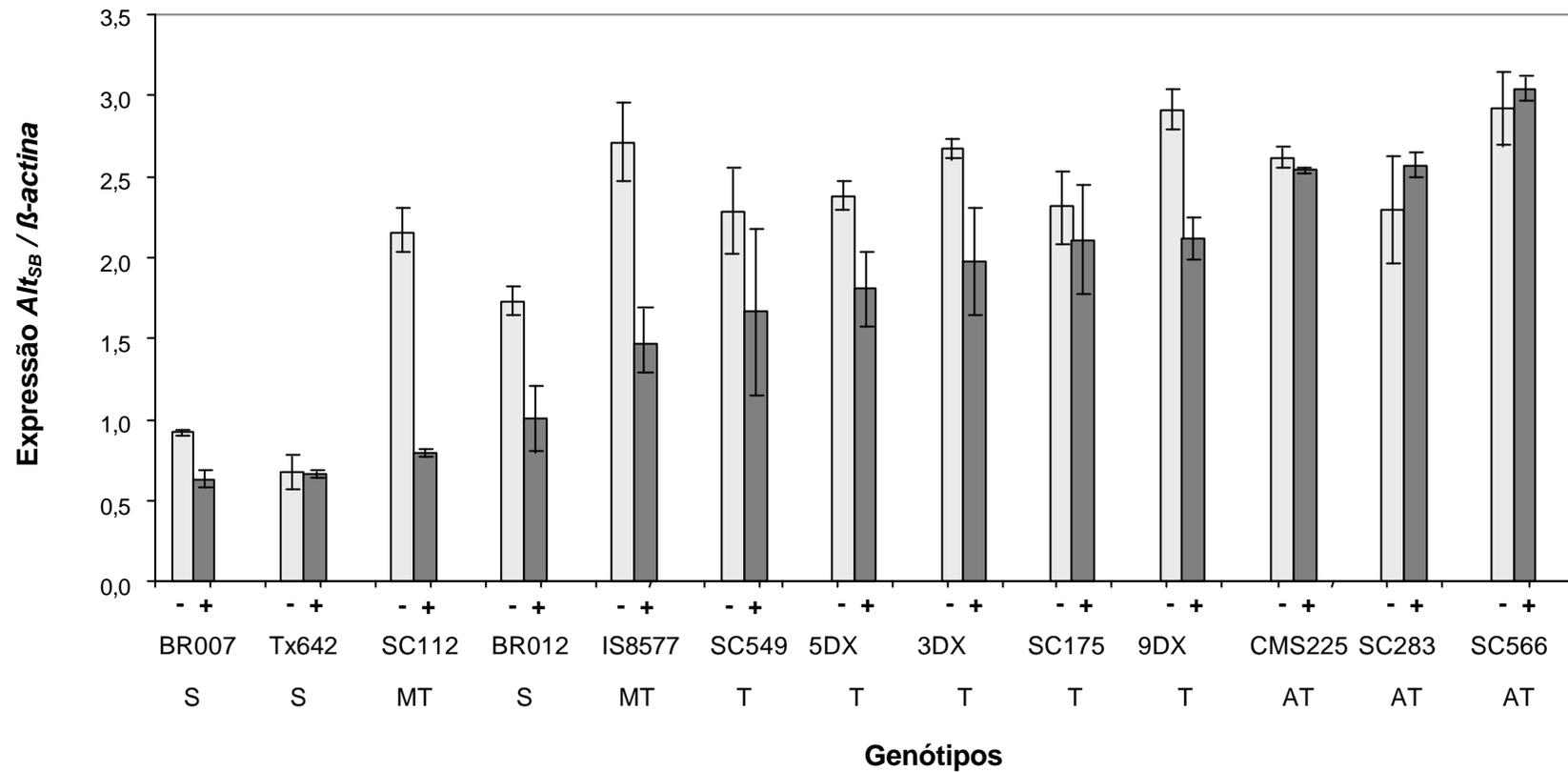
As linhagens SC549, 3DX, 5DX, 9DX e SC175 apresentaram uma expressão intermediária do gene *Alt<sub>SB</sub>* e foram classificadas como tolerantes ao AI. Dentre essas linhagens, 3DX e 5DX apresentam uma similaridade genética de 100% considerando resultados de quinze marcadores microssatélites (Caniato et al., 2007). Apesar de ambas as linhagens terem sido agrupadas como tolerantes, a superioridade na tolerância ao AI de 5DX em comparação com 3DX é ressaltada pelo padrão de crescimento radicular tanto na atividade de 27  $\mu$ M (Figura 2) quanto na taxa de crescimento radicular (Figura 4) e confirmada pelos dados de Caniato et al. (2007). Esses autores sugerem que a maior tolerância da 5DX pode ser advinda da introgressão de genes diferentes do *Alt<sub>SB</sub>*. Evidências apresentadas no presente trabalho suportam essa hipótese, uma vez que os níveis de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* na presença do AI nessas duas linhagens foram muito similares, sugerindo que

essas linhagens herdaram o mesmo alelo. Assim, a maior tolerância ao Al da linhagem 5DX seria realmente conferida por outro(s) gene(s), distinto(s) ao *Alt<sub>SB</sub>*.

As linhagens CMS225, SC283 e SC566 apresentaram os maiores níveis de expressão do *Alt<sub>SB</sub>* e foram consideradas altamente tolerantes ao Al de acordo com a taxa de crescimento radicular. A linhagem SC283 é um padrão de tolerância ao Al, tendo sido utilizada como fonte para a clonagem do gene *Alt<sub>SB</sub>* (Magalhães et al., 2007). Mesmo tendo sido agrupada juntamente com CMS225 e SC283, a linhagem SC566 apresentou um maior crescimento radicular sob estresse de alumínio, ressaltado nas Figuras 3 e 4. Tal tolerância pode estar relacionada tanto à maior expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* na presença do alumínio quanto à mutação não-sinônima no primeiro éxon, que alterou um aminoácido no quarto domínio transmembrânico da proteína predita. Como resultado, a linhagem poderia ter um transportador de membrana mais eficiente e/ou um maior número deles.

Na maioria das linhagens moderadamente tolerantes e tolerantes uma clara repressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* pôde ser observada na presença de Al em relação à condição controle (Figura 8). Por outro lado, nas linhagens altamente tolerantes, o gene *Alt<sub>SB</sub>* não foi diferencialmente expresso em função da presença do alumínio, à semelhança da expressão do gene de tolerância em trigo *ALMT1*, que também não sofreu influência do Al (Sasaki et al., 2004).

As linhagens BR012, 3DX e CMS255 podem ser consideradas como representantes dos três maiores grupos de linhagens que apresentam diferentes níveis de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*. De maneira interessante, Caniato et al. (2007) desenvolveram linhagens semi-isogênicas e verificaram que a tolerância diferencial ao alumínio entre essas três linhagens de sorgo foi governada por uma série alélica no loco *Alt<sub>SB</sub>*, que foi classificada em ordem crescente de acordo com os efeitos



**Figura 8.** Expressão relativa do gene  $Alt_{SB}$  em genótipos de sorgo na ausência e presença de  $\{27\} \mu\text{M}$  de alumínio por três dias. As colunas em cinza claro representam os genótipos submetidos à condição controle ( $\{0\} \mu\text{M}$  de Al) e em cinza escuro na presença do estresse. Os valores representam a média de três repetições e as barras verticais indicam o erro padrão. As letras abaixo dos nomes dos genótipos referem-se aos níveis de tolerância ao alumínio previamente caracterizados: (S) sensível, (MT) moderadamente tolerante, (T) tolerante e (AT) altamente tolerante.

fenotípicos, como BR012<3DX<CMS225. Esses resultados, juntamente com a correlação de 0,9511 ( $p < 0,0001$ ) entre a expressão relativa do gene *Alt<sub>SB</sub>* e o crescimento líquido relativo da raiz seminal à {27}  $\mu\text{M}$  de Al obtido por Caniato et al. (2007), sugerem que a tolerância ao alumínio em sorgo é primariamente condicionada pelo nível de expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*. Assim, a variação alélica no loco *Alt<sub>SB</sub>* associada aos diferentes níveis de tolerância ao alumínio, encontrada por Caniato et al. (2007), poderia ser explicada pelos níveis de expressão desse gene.

A diversidade alélica no gene de efeito maior para tolerância ao Al em cevada, *Alp* (Minella e Sorrells, 1992), também parece ser responsável pela variação fenotípica para tolerância ao Al nessa espécie, em que 37 genótipos com ampla diversidade genética foram avaliados. A modulação do mecanismo da tolerância ao alumínio por meio da expressão de genes foi também obtida em trigo, uma vez que a variação na expressão do *ALMT1* apresentou uma correlação de 0,93 com a tolerância diferencial ao Al em um painel de 13 linhagens (Raman et al., 2005), confirmando que esse seria um importante gene de tolerância ao Al neste grupo de genótipos.

A regulação da expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* parece ser o ponto chave do processo de tolerância ao Al em sorgo, de maneira que a diversidade alélica previamente identificada no loco *Alt<sub>SB</sub>* pode estar relacionada a variantes envolvidos no controle transcricional. Segundo Sasaki et al. (2006), blocos de repetição encontrados nos 1000 pb que antecederam a região codificadora do gene *ALMT1* em linhagens de trigo de origem não japonesa foram positivamente relacionados ao nível de expressão de *ALMT1* e à tolerância ao Al. Assim, estudos envolvendo a caracterização da região promotora do gene *Alt<sub>SB</sub>* podem permitir um melhor

entendimento dos mecanismos regulatórios associados ao diferentes níveis de tolerância ao alumínio em sorgo.

A utilização de alelos superiores do gene *Alt<sub>SB</sub>* juntamente com outros genes de tolerância ao Al em sorgo podem favorecer estratégias para seleção assistida visando à geração de cultivares mais tolerantes ao alumínio, quer pela introgressão desses alelos, quer pela piramidação de genes distintos que confirmam patamares superiores de tolerância. Tais cultivares favorecerão a sustentabilidade da produção agrícola em solos marginais, onde a toxidez de alumínio seja uma importante restrição de cultivo. Além disso, plantas transgênicas superexpressando alelos superiores podem contribuir para o aumento dos níveis de tolerância ao alumínio em outras espécies agronomicamente importantes.

## 5. CONCLUSÕES

Os padrões de crescimento radicular em cinco atividades de Al ao longo de seis dias permitiram classificar as 13 linhagens de acordo com os diferentes níveis de tolerância ao Al, de forma consistente com estudos previamente realizados. Os padrões de crescimento radicular indicaram que a tolerância ao alumínio em sorgo apresenta um componente indutível, modulado tanto pela atividade quanto pelo tempo de exposição ao estresse. No entanto, a resposta dos genótipos frente a essas condições pareceu ser distinta, dependendo principalmente do nível de tolerância ao Al.

Foi observada uma reduzida diversidade de nucleotídeos no gene *Alt<sub>SB</sub>*, cujas variações na sua estrutura não explicaram a tolerância diferencial ao alumínio entre as linhagens de sorgo. No entanto, dois dos três haplótipos foram identificados nas linhagens que apresentaram níveis extremos de sensibilidade (Tx642) e de tolerância ao Al (SC566).

Diferentes respostas foram observadas na expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>*. Enquanto nas linhagens moderadamente tolerantes e tolerantes houve uma clara repressão desse gene na presença de Al, um comportamento constitutivo foi observado nas linhagens altamente tolerantes. A alta correlação (0,95) entre a tolerância ao Al e a expressão do gene *Alt<sub>SB</sub>* indicou que a tolerância diferencial ao alumínio das linhagens de sorgo foi devida principalmente à variação na expressão desse gene. Assim, a diversidade alélica previamente identificada no loco *Alt<sub>SB</sub>* deve estar relacionada a variantes envolvidos no controle transcricional, apresentando uma evidência adicional de que *Alt<sub>SB</sub>* é um importante gene de tolerância ao alumínio neste grupo de linhagens de sorgo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, S. R.; LIRA, M. A.; TABOSA, J. N.; SANTOS, M. V. F.; MELLO, A. C. L.; SANTOS, V. F. Comportamento de linhagens de sorgo forrageiro submetidas a déficit hídrico sob condição controlada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 8, p. 973-979, 2003.

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

ANIOL, A. Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L. Thell). **Plant and Soil**, The Hague, v. 123, p. 223-227, 1990.

BENNETZEN, J. L.; FREELING, M. Grasses as a single genetic system: genome composition, colinearity and compatibility. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 9, p. 259-261, 1993.

BEZERRA, G. B.; CANÇADO, G. M. A.; MENOSSI, M.; CASTRO, L. N.; ZUBEN, F.J. von. Recent advances in gene expression data clustering: a case study with comparative results. **Genetics Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 4, p. 514-524, 2005.

CANÇADO, G. M. A.; LOGUERCIO, L. L.; MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; PAIVA, E.; BORÉM, A.; LOPES, M. A. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 747-754, 1999.

CANIATO, F. F.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V.; BORÉM, A.; KLEIN, P. E.; MAGALHÃES, J. V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, p. 863-876, 2007.

DEGENHARDT, J.; LARSEN, P. B.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum resistance in the arabidopsis mutant *alr-104* is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 117, p. 19-27, 1998.

DELHAIZE, E.; CRAIG, S.; BEATON, C. D.; BENNET, R. J.; JAGADISH, V. C.; RANDALL, P. J. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.): I. Uptake and distribution of aluminum in root apices. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 103, p. 685-693, 1993a.

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

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

DELHAIZE, E.; HEBB, D. M.; RYAN, P. R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, p. 2059-2067, 2001.

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

FAO **Statistical Database**. Rome, 2002. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/408/default.aspx>> Acesso em: 01 dez. 2006.

FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 29, p. 511-566, 1978.

FOY, C.D. Physiological effects of hydrogen, aluminum and manganese toxicities in acid soil. In: ADAMS, F. (Ed.) **Soil acidity and liming**. 2. ed. Madison: Soil Science Society American, 1984. p. 57-97.

FOY, C. D. Plant adaptation to acid aluminum-toxic soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 19, p. 959-987, 1988.

FUENTE, J. M. de la.; RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V.; CABRERA-PONCE, J. L.; HERRERA-ESTRELLA, L. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. **Science**, Washington, v. 276, p.1566-1568, 1997.

FURLANI, P.R.; CLARK, R.B. Screening sorghum for aluminium tolerance in nutrient solution. **Agronomy Journal**, Madison, v. 73, p. 587-594, 1981.

GALE, M. D.; DEVOS, K. M. Comparative genetics in the grasses. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 1971-1974, 1998.

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

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

HELYAR, K. R. Effects of aluminum and manganese toxicities on legume growth. In: ANDREW. C. S.; KAMPRATH, E. J. (Ed.). **Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soils**. Melbourne: CSIRO, 1987. p.207-231.

HIROKAWA, T.; BOON-CHIENG, S.; MITAKU, S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. **Bioinformatics**, New York, v. 14, p. 378-379, 1998.

HOEKENGA, O. A.; VISION, T. J.; SHAFF, J. E.; MONFORTE, A. J.; LEE, G. P.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* × *Columbia*) by quantitative trait locus mapping. A physiologically simple but genetically complex trait. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 132, p. 936-948, 2003.

HOEKENGA, O. A.; MARON, L. G.; PIÑEROS, M. A.; CANÇADO, G. M. A.; SHAFF, J.; KOBAYASHI, Y.; RYAN, P. R.; DONG, B.; DELHAIZE, E.; SASAKI, T.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y.; KOYAMA, H.; KOCHIAN, L. V. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 9738-9743, 2006.

HUANG, J. W.; PELLET, D. M.; PAPERNIK, L. A.; KOCHIAN, L. V. Aluminum interactions with voltage-dependent calcium transport in plasma membrane vesicles isolated from roots of aluminum-sensitive and resistant wheat cultivars. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 110, p. 561-569, 1996.

JOHNSON, J. P.; CARVER, B. F.; BALIGAR, V. C. Productivity in great plains acid soils of wheat genotypes selected for aluminum tolerance. **Plant and Soil**, The Hague, v. 188, p. 101-106, 1997.

JORGE R.; ARRUDA, P. Aluminum-induced organic acid exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. **Phytochemistry**, Emsford, v. 45, p. 675-81, 1997.

KLEIN, P. E.; KLEIN, R. R.; VREBALOV, J.; MULLET, J. E. Sequence-based alignment of sorghum chromosome 3 and rice chromosome 1 reveals extensive conservation of gene order and one major chromosomal rearrangement. **Plant Journal**, Oxford, v. 34, p. 605-621, 2003.

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

KOCHIAN, L. V.; PENCE, N. S.; LETHAM, D. L.; PINEROS, M. A.; MAGALHAES, J. V.; HOEKENGA, O. A., GARVIN, D. F. Mechanisms of Metal Resistance in Plants: Aluminum and Heavy Metals. **Plant and Soil**, The Hague, v. 247, p. 109-119, 2002.

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

KRESOVICH, S.; BARBAZUK, B.; BEDELL, J.A.; BORRELL, A.; BUELL, R.C.; BURKE, J.; CLIFTON, S.; CORDONNIER-PRATT, M. et al. Toward sequencing the sorghum genome. A US National Science Foundation-Sponsored Workshop Report. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 138, p. 1898-1902, 2005.

LARSEN, P. B.; TAI, C. Y.; KOCHIAN, L. V.; HOWELL, S. H. Arabidopsis mutants with increased sensitivity to aluminum. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 110, p. 743-751, 1996.

LARSEN, P.B.; DEGENHARDT, J.; TAI, C.Y.; STENZLER, L. M.; HOWELL, S. H.; KOCHIAN, L. V. Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 117, p. 09-18, 1998.

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

LINDSAY, W. L. **Chemical equilibria in soils**. New York: Wiley-Interscience, 1979. 499 p.

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

MA, J. F.; HIRADATE, S.; NOMOTO, K.; IWASHITA, T.; MATSUMOTO, H. Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea. Identification of Al form in the leaves. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 113, p. 1033-1039, 1997.

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

MA, J. F. Role of organic acids in detoxification of Al in higher plants. **Plant Cell Physiology**, Minneapolis, v. 44, p. 482-488, 2000a.

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

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

MAGALHÃES, J. V. **Molecular genetic and physiological investigations of aluminum tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench)**. 2002. 192 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Cornell University, Ithaca.

MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Maryland, v.167, p.1905-1914, 2004.

MAGALHAES, J. V. Aluminum tolerance genes are conserved between monocots and dicots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, p. 9749-9750, 2006.

MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARES, C. T.; ALVES, V. M.; LANA, U. G. P.; WANG, Y-H; COELHO, C. M.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; KLEIN, P. E.; KOCHIAN, L. V. Positional cloning and characterization of *Alt<sub>SB</sub>*: A novel membrane transporter and major aluminum tolerance gene in *Sorghum bicolor*. 2007 **(In preparation)**.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O. E.; CLARK, R. B. Inheritance of aluminium tolerance in maize. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.) **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 201-212.

MARTIN, R. B. Aluminum speciation in biology. In: CHADWICK, D. J., WHELAN, L. (Ed.) **Aluminum in Biology and Medicine**. John Wiley and Sons: New York, 1992. p. 5-25.

MATOS, M.; CAMACHO, M. V.; PÉREZ-FLORES, V.; PERNAUTE, B.; PINTO-CARNIDE, O.; BENITO, C. A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 111, p. 360-369, 2005.

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

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

MIYASAKA, S. C.; HAWES, M. C. Possible role of root border cells in detection and avoidance of aluminum toxicity. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, p. 1978-1987, 2001.

MULLET, J. E.; KLEIN, R. R.; KLEIN, P. E. *Sorghum bicolor* - an important species for comparative grass genomics and a source of beneficial genes for agriculture. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 5, p. 118-121, 2002.

NAGATA, T.; HAYATSU, M.; KOSUGE, N. Identification of aluminium forms in tea leaves by <sup>27</sup>Al NMR. **Phytochemistry**, Emsford, v. 31, p. 1215-1218, 1992.

NELSON, R. J.; NAYLOR, R. L.; JAHN, M. M. The role of genomics research in improvement of "orphan" crops. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1901-1904, 2004.

NGUYEN, V. T.; BUROW, M. D.; NGUYEN, H. T.; LE, B. T.; LE, T. D. PATERSON, A. H. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, p. 1002-1010, 2001.

NGUYEN, V. T.; NGUYEN, B. D.; SARKARUNG, S.; MARTINEZ, C.; PATERSON, A. H.; NGUYEN, H. T. Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 267, p. 772-780, 2002.

NGUYEN, B. D.; BRAR, D. S.; BUI, B. C.; NGUYEN, T. V.; PHAM, L. N.; NGUYEN, H. T. Identification and mapping of the QTL for aluminum tolerance introgressed from new source, *Oryza rufipogon* Griff., into indica rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, p. 583-593, 2003.

NINAMANGO-CÁRDENAS, F. E.; GUIMARÃES, C. T.; MARTINS, P. R.; PARENTONI, S. N.; CARNEIRO, N. P.; PAIVA, E. Mapping QTLs for aluminum tolerance in maize. **Euphytica**, Wageningen, v. 130, p. 223-232, 2003.

OFEI-MANU, P.; WAGATSUMA, T.; ISHIKAWA, S.; TAWARAYA, K. The plasma membrane strength of the root-tip cells and root phenolic compounds are correlated with Al tolerance in several common woody plants. **Soil Science Plant Nutrition**, Tokyo, v. 47, p. 359-375, 2001.

PARENTONI, S. N.; ALVES, V. M. C.; MILACH, S. K.; CANÇADO, G. M. A.; FILHO, A. F. C. O melhoramento para tolerância ao alumínio como fator de adaptação a solos ácidos. In: NASS, L. L.; et al. (Ed.) **Recursos Genéticos & Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 783-852.

PARKER, D. R.; NORVELL, W. A.; CHANEY, R. L. GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible computers. In: LOEPPERT, R. H.; et al. (Ed.) **Chemical equilibrium and reaction models**. Madison: Soil Science Society of America, 1995. p. 253-269.

PELLET, D. M.; GRUNES, D. L.; KOCHIAN, L. V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). **Planta**, New York, v. 196, p. 788-95, 1995.

PELLET, D. M.; PAPERNIK, L. A.; KOCHIAN, L. V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 112, p. 591-597, 1996.

PIÑEROS, M. A.; MAGALHÃES, J. V.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V. The physiology and biophysics of an aluminum tolerance mechanism based on root citrate exudation in maize. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 29, p. 1194-1206, 2002.

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

PRICE, H. J.; DILLON, S. L.; HODNETT, G.; ROONEY, W. L.; ROSS, L.; JOHNSTON, J. S. Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 219-227, 2005.

RAMAN, H.; ZHANG, K.; CAKIR, M.; APPELS, R.; GARVIN, D. F.; MARON, L. G.; KOCHIAN, L. V.; MORONI, J. S.; RAMAN, R.; IMTIAZ, M.; DRAKE-BROCKMAN, F.; WATERS, I.; MARTIN, P.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H.; HEBB, D. M.; DELHAIZE, E.; RYAN, P. R. Molecular characterization and mapping of *ALMT1*, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Genome**, Ottawa, v. 48, p. 781-791, 2005.

RENGEL, Z. Uptake of aluminum by plant cells. **New Phytologist**, Oxford, v. 134, p. 389-406, 1996.

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

ROCHA, C. M. C. A região dos cerrados e as pesquisas desenvolvidas pela EMBRAPA CERRADOS. In: SIMPÓSIO SOBRE OS CERRADOS DO MEIO NORTE, 1., 1997, Teresina. **Anais...** Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1997. p. 57-80.

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

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; RANDALL, P. J. Characterization of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 103-110, 1995a.

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

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

RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; JONES, D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 527-560, 2001.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SAMAC, D. A.; TESFAYE, M. Plant improvement for tolerance to aluminum in acid soils: a review. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 75, p. 189-207, 2003.

SANTOS, F. G. **Cultivares de sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. 46 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 77).

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: statistics**. 5<sup>a</sup> edition. Cary, NC. SAS. Institute Inc. 1985, 956p.

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

SASAKI, T.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; HEBB, D. M; OGIHARA, Y.; KAWAURA, K.; NODA, K.; KOJIMA, T.; TOYODA, A.; MATSUMOTO, H.; YAMAMOTO, Y. Sequence upstream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) ALMT1 gene and its relationship to aluminum resistance. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v.47, p. 1343-1354, 2006.

SAWAZAKI, E. Sorgo forrageiro ou misto, sorgo granífero, sorgo vassoura - *Sorghum bicolor* L. Moench. In: FALH, J. L., et al. (Ed.) **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. Campinas: IAC, 1998. p. 44-49. (IAC. Boletim, 200).

SCHMID, K. J.; RAMOS-ONSINS, S.; RINGYS-BECKSTEIN, H.; WEISSHAAR, B.; MITCHELL-OLDS, T. A multilocus sequence survey in *Arabidopsis thaliana* reveals a genome-wide departure from a neutral model of DNA sequence polymorphism. **Genetics**, Maryland, v.169, p. 1601-1611, 2005.

SUHAYDA, C. G.; HAUG, A. Citrate chelation as a potential mechanism against aluminum toxicity in cells: the role of calmodulin. **Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 63, p. 1167-1175, 1985.

TAKEDA, K.; KARIUDA, M.; ITOI, H. Blueing of sepal colour of *Hydrangea macrophylla*. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 24, p. 2251-2254, 1985.

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

TAYLOR, G. J. The physiology of aluminum tolerance in higher plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 19, p. 1179-1194, 1988.

TEIXEIRA, C. G.; JARDINE, J. G.; BEISMAN, D. A. Utilização do sorgo sacarino como matéria-prima complementar à cana-de-açúcar para obtenção de etanol em micro destilaria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, p. 221-229, 1997.

TESFAYE, M.; TEMPLE, S. J.; ALLAN, D. J.; VANCE, C. P.; SAMAC, D. A. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, p. 1836-1844, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

UEXKULL, H. R. von; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. In: Date, R. A.; Grundon, N. J.; Raymet, G. E.; Probert, M. E. (Eds.) **Plant-Soil Interactions at low pH: Principles and Management**, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic, 1995. p. 5-19.

WATERSON, G. A. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theoretical Population Biology**, San Diego, v. 7, p. 256-275, 1975.

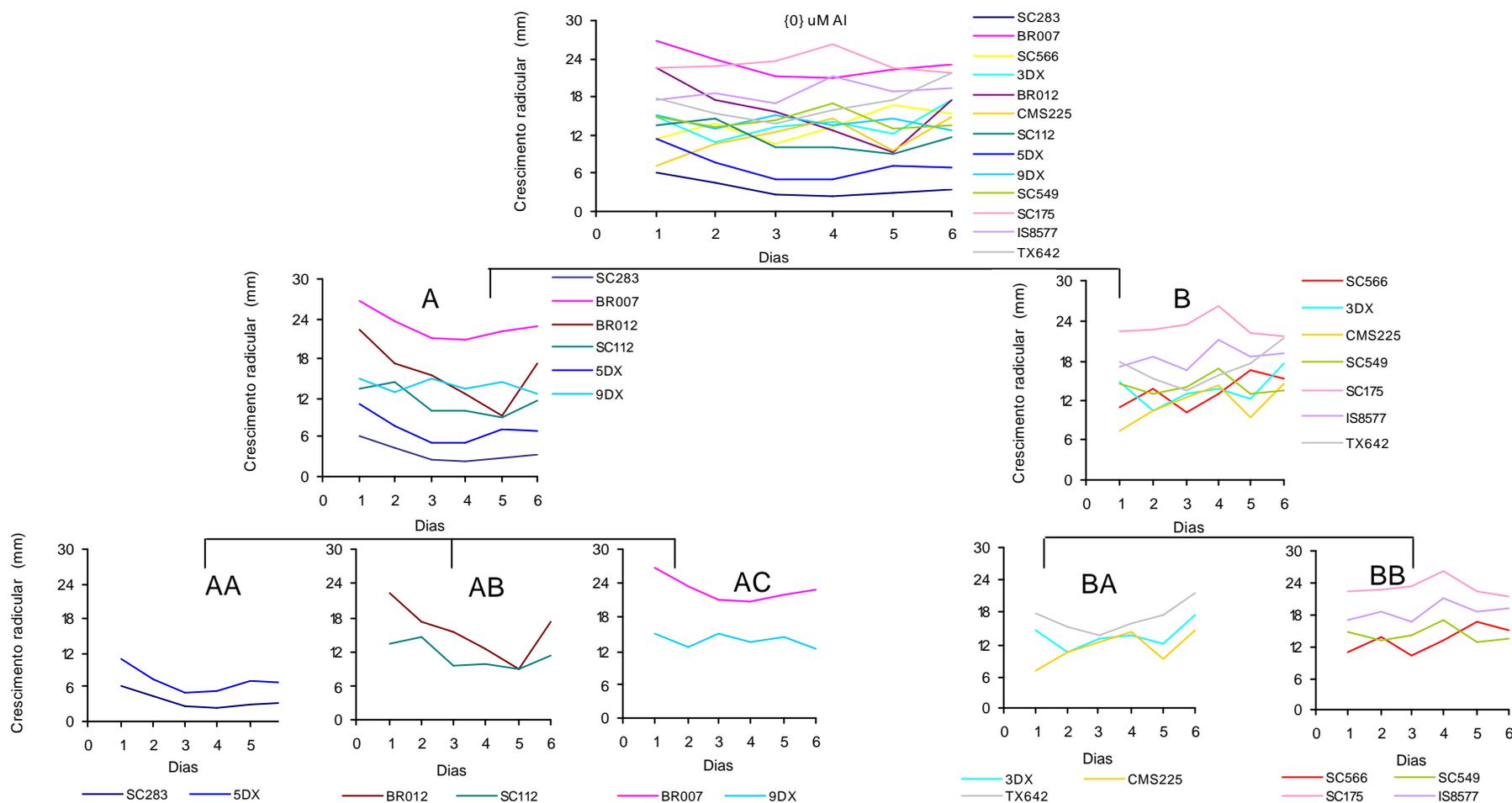
WU, P.; LIAO, C. Y.; HU, B.; YI, K. K.; Ni, J. J.; He, C. QTLs and epistasis for aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) at different seedling stages. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 1295-1303, 2000.

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

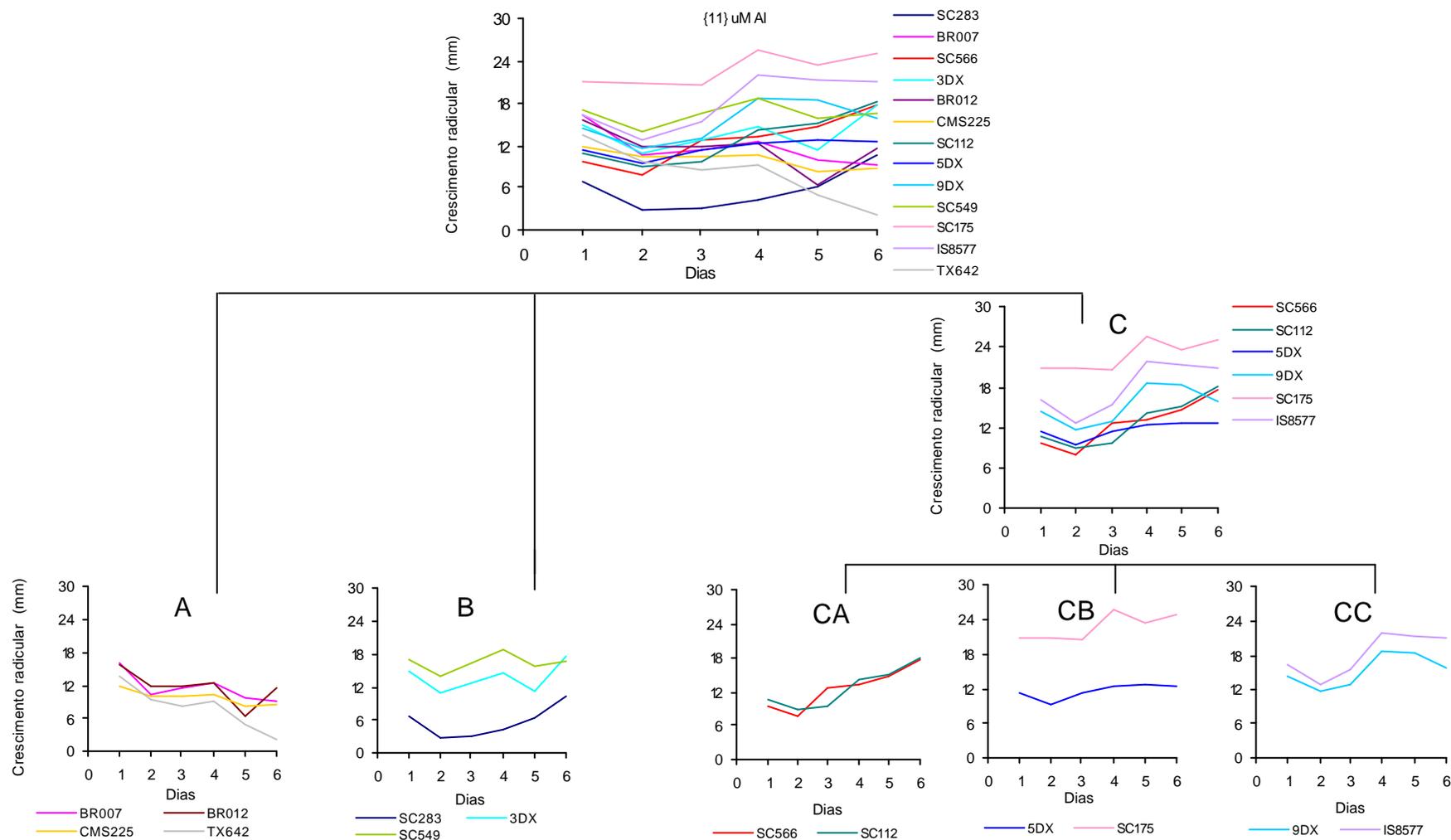
ZHANG, W. H.; RYAN, P. R.; TYERMAN, S. D. Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 125, p. 1459-1472, 2001.

ZHENG, S. J.; MA, J. F.; MATSUMOTO, H. High aluminum resistance in buckwheat: I. Al-induced special secretion of oxalic acid from root tips. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 117, p. 745-751, 1998.

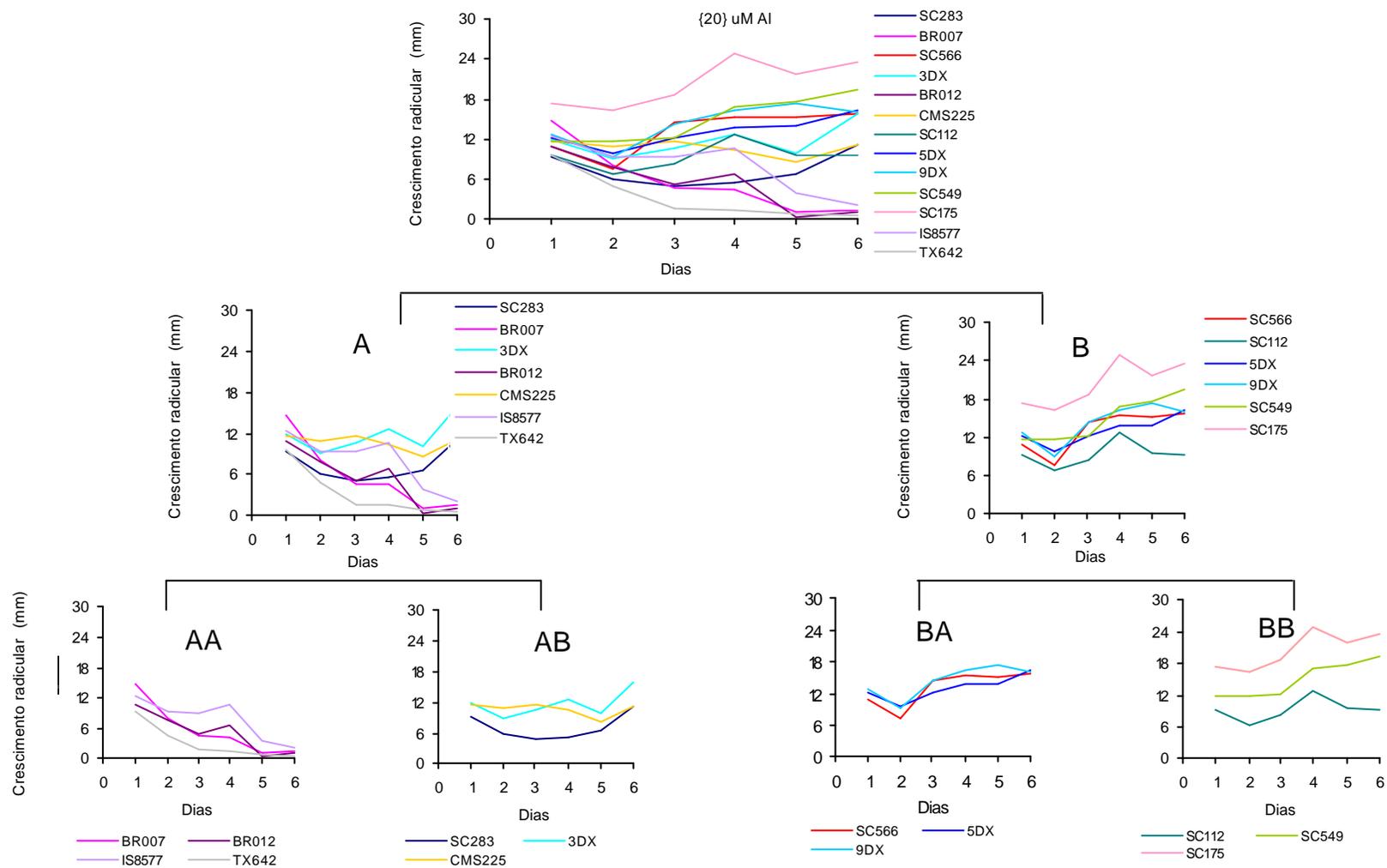
## 7. ANEXOS



**Figura 1.** Padrões de crescimento radicular de 13 genótipos de sorgo em solução nutritiva na ausência de alumínio ao longo de seis dias. Valores no gráfico representam médias de 14 plântulas. As letras representam grupos hierárquicos.



**Figura 2.** Padrões de crescimento radicular de 13 genótipos de sorgo em solução nutritiva na presença de  $\{11\} \mu\text{M}$  de alumínio ao longo de seis dias. Valores no gráfico representam médias de 14 plântulas. As letras representam grupos hierárquicos.



**Figura 3.** Padrões de crescimento radicular de 13 genótipos de sorgo em solução nutritiva na presença de  $\{20\} \mu\text{M}$  de alumínio ao longo de seis dias. Valores no gráfico representam médias de 14 plântulas. As letras representam grupos hierárquicos.