

Final

Contributo da Exsudação de Ácidos Orgânicos para a Tolerância ao Alumínio em Duas Variedades de Trigo da Madeira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marta Rodrigues

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA



UNIVERSIDADE da MADEIRA

A Nossa Universidade

www.uma.pt

setembro | 2015

M
7
D Con
D-R

T/M
514
ROD Con
+ED-R

Fioral

**Contributo da Exsudação de Ácidos Orgânicos
para a Tolerância ao Alumínio em Duas Variedades
de Trigo da Madeira**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE DA MADEIRA
BIBLIOTECA

Marta Rodrigues

MESTRADO EM BIOQUÍMICA APLICADA

ORIENTADOR

Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho

Agradecimentos

A realização desta dissertação envolveu direta e indiretamente diversas pessoas às quais expresse o meu profundo agradecimento:

- Ao Prof. Dr. Miguel Ângelo de Carvalho, na qualidade de orientador, por todo o apoio e disponibilidade na realização e revisão de todo o trabalho;
- Aos meus colegas de laboratório do Banco de Germoplasma ISOplexis, em especial ao Filipe Ganança e ao Emanuel da Silva, por todo o apoio, amizade e aconselhamento ao longo de toda a dissertação;
- À minha família, pelo encorajamento que sempre manifestaram ao longo de todos estes anos de estudo;
- Por fim, ao Banco de Germoplasma ISOplexis e à Universidade da Madeira, pela disponibilização dos meios para a realização deste trabalho.

Resumo

O trigo encontra-se em terceiro lugar entre os cereais mais produzidos em todo o mundo. Um dos principais entraves ao seu cultivo e produção é a acidez dos solos, que proporciona a biodisponibilidade do alumínio, com a formação de catiões facilmente absorvidos que afetam o desenvolvimento radicular e podem levar à morte da planta. Algumas variedades de trigo desenvolveram a capacidade de tolerar a presença do alumínio. Esta tolerância pode resultar de diferentes estratégias, através da ação de diversos mecanismos, sendo que o presente trabalho pretende avaliar a importância da exsudação de ácidos orgânicos na tolerância ao alumínio por algumas variedades de trigo na Madeira.

Ao longo deste trabalho foram analisados vários caracteres, cuja variação permite discriminar o comportamento de duas variedades regionais de trigo (*Triticum aestivum erithropermum* Körn e *Triticum aestivum* var. *milturum* (Alef.) Velican) em condições de stress provocado pelo alumínio. As amostras de trigo foram colocadas em vasos herméticos na presença ou ausência de alumínio e o meio de crescimento final foi analisado para determinar a capacidade das plantas para exsudar malato e citrato. As plantas foram analisadas em relação a cinco marcadores moleculares para detetar a presença ou ausência do gene ALTM1 que codifica a proteína transmembranar de transporte do malato.

Em resultado deste trabalho, conclui-se que uma das variedades regionais (*T. aestivum erithropermum*) é tolerante ao alumínio e a outra (*T. aestivum* var. *milturum*) moderadamente tolerante. Ambas as variedades têm capacidade de exsudar ácidos orgânicos, ainda que a primeira tivesse uma exsudação mais proeminente. A variedade moderadamente tolerante apresentou uma taxa de alongamento radicular inferior e uma produção de calose superior devido à sua maior suscetibilidade ao alumínio. O gene ALMT1, responsável pelo transporte do malato do citoplasma para o exterior das células, foi detetado em ambas as variedades, levando a concluir que o que difere entre as variedades é a sua expressão.

Palavras-chave: Trigo; Alumínio; Stress; Exsudação; Ácidos orgânicos; Gene ALMT1.

Abstract

Wheat is the third most harvested cereal worldwide. One of the main obstacles of its cultivation and production is the soil's acidity, which provides the bioavailability of aluminum with the formation of cations that affect root development and can lead to the plant's death. Some varieties of wheat developed the ability to tolerate the presence of aluminum. This tolerance may result of different strategies, throughout several mechanisms. This work intends to evaluate the importance of organic acid exudation to tolerate aluminum in some varieties of Madeira's wheat.

Several features were analysed throughout this work, distinguishing the behaviour of two varieties of regional wheat (*Triticum aestivum erithropermum* Körn e *Triticum aestivum var. milturum* (Alef.) Velican) in stress conditions caused by aluminum. Wheat samples were put in hermetic vessels in presence or absence of aluminum, and the growth medium was analysed to determine the ability of plants to exude malate and citrate. Plants were analysed with five molecular markers to determine the presence or absence of the gene ALMT1 that encodes the transmembranal protein that is able to transport malate.

As a result, it was possible to conclude that one of the varieties in study (*T. aestivum erithropermum*) is aluminum tolerant, while the other (*T. aestivum var. milturum*) is moderately tolerant. Both had the capacity to exude organic acids, but the first had the most prominent exudation. The variety of wheat that was moderately tolerant to aluminum presented a lower root elongation rate and a higher callose formation, due to its susceptibility to aluminum. Both varieties have the ALMT1 gene, responsible for the malate transport from the cytosol to the cell exterior, which leads to the conclusion that the difference between them is the gene's expression.

Keywords: Wheat; Aluminum; Stress; Exudation; Organic acids; ALMT1 gene.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Lista de Abreviaturas.....	vi
Lista de Equações.....	vii
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1. A cultura do trigo na Região Autónoma da Madeira.....	2
1.1.1. Classificação do trigo utilizado.....	2
1.2. Toxicidade e tolerância ao alumínio.....	4
1.2.1. Toxicidade do alumínio.....	4
1.2.2. Tolerância ao alumínio.....	5
1.2.2.1. Tolerância por exclusão.....	6
1.2.2.2. Tolerância por destoxificação interna do alumínio.....	7
1.2.2.3. Mecanismo de tolerância do trigo ao alumínio.....	8
1.3. Ácidos orgânicos.....	10
1.3.1. Malato.....	10
1.3.2. Citrato.....	12
1.4. Genes do trigo associados à tolerância ao alumínio.....	13
1.5. Rastreio da tolerância ao alumínio.....	14
1.5.1. Alongamento radicular.....	15
1.5.2. Teste do ericromo cianido R.....	15
1.5.3. Acumulação de calose.....	15
1.5.4. Doseamento dos ácidos málico e cítrico.....	16
1.5.5. Determinação da presença de proteínas nos exsudatos.....	17
1.5.6. Detecção de marcadores genéticos.....	18
2. Materiais e métodos.....	21
2.1. Seleção e desinfeção do material vegetal.....	21
2.2. Germinação das sementes.....	21

2.3. Cultura hidropónica e recolha dos exsudatos.....	21
2.4. Doseamento do ácido málico nos exsudatos.....	23
2.5. Doseamento do ácido cítrico nos exsudatos.....	23
2.6. Teste do ericromo cianido R.....	23
2.7. Determinação da calose.....	24
2.8. Determinação da presença de proteínas nos exsudatos.....	25
2.9. Extração de DNA.....	25
2.10. Deteção de marcadores genéticos.....	26
2.11. Tratamento estatístico dos resultados.....	27
3. Resultados e Discussão.....	28
4. Conclusões e Perspetivas Futuras.....	48
5. Referências.....	50
Anexo 1: Composição das soluções nutritivas A, B, C e D.....	55
Anexo 2: Soluções experimentais.....	55
Anexo 3: Soluções de extração de DNA.....	56
Anexo 4: Análise <i>Post hoc</i> (Bonferroni) – Alongamento radicular.....	56
Anexo 5: Análise <i>Post hoc</i> (Bonferroni) – Malato e Citrato.....	58
Anexo 6: Análise <i>Post hoc</i> (Bonferroni) – Calose.....	60

Lista de Abreviaturas

- ❖ Acetil-CoA: Acetil-coenzima A
- ❖ Al³⁺: Alumínio catiónico
- ❖ Al-(Ox)₃: Complexo de alumínio-oxalato
- ❖ Al-Cit: Complexo alumínio-citrato
- ❖ ANOVA: *Analysis of variance*
- ❖ AO: Ácido orgânico
- ❖ BSA: Albumina de soro bovino
- ❖ CAPS: *Cleavage Amplification Polymorphism Sequence*
- ❖ CL: Citrato liase
- ❖ DH: Haplodipóide
- ❖ D-LDH: D-lactato desidrogenase
- ❖ DMSO: Dimetilsulfóxido
- ❖ DNA: *Deoxyribonucleic acid*
- ❖ EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- ❖ GOT: Glutamato-oxaloacetato transaminase
- ❖ H⁺-ATPase: Protão da adenosina trifosfatase
- ❖ Indel: Inserção/deleção
- ❖ Ir intergeração: Índice de resistência intergeração
- ❖ Ir intrageração: Índice de resistência intrageração
- ❖ Is: Índice de suscetibilidade
- ❖ L-MDH: L-malato desidrogenase
- ❖ LPF: *Long Promoter Fragment*
- ❖ MP: Membrana plasmática
- ❖ MS: Murashige e Skoog
- ❖ NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido
- ❖ pb: Pares de bases
- ❖ PCR: *Polymerase Chain Reaction*
- ❖ PMMA: Polimetil metacrilato
- ❖ RCF: *Relative centrifugal force*
- ❖ SDS: *Sodium dodecyl sulfate*
- ❖ SDS PAGE: *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*
- ❖ SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*
- ❖ SPF: *Short Promotor Fragment*
- ❖ SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*
- ❖ SSR: *Simple Sequence Repeat*
- ❖ TaALMT: *Triticum aestivum Aluminum-activated Malate Transporter*
- ❖ TE: Tris-EDTA
- ❖ Tris-HCl: Tris-hidrocloreto

Lista de Equações

<u>Equação 1:</u> $\text{Al}^{3+}_{(aq)} + \text{C}_4\text{H}_3\text{O}_5^{3-}_{(aq)} \rightleftharpoons \text{Al}(\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_5)_{(aq)}$	11
<u>Equação 2:</u> $\text{Al}^{3+}_{(aq)} + \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}_{(aq)} \rightleftharpoons \text{Al}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_{(aq)}$	13
<u>Equação 3:</u> $\text{Ácido } L - \text{málico} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{(L\text{-MDH})} \text{oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+$	16
<u>Equação 4:</u> $\text{Oxaloacetato} + L - \text{glutamato} \xrightarrow{(GOT)} L - \text{aspartato} + 2 - \text{oxoglutarato}$	16
<u>Equação 5:</u> $\text{Citrato} \xrightarrow{(CL)} \text{oxaloacetato} + \text{acetato}$	17
<u>Equação 6:</u> $\text{Oxaloacetato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{(L\text{-MDH})} L - \text{malato} + \text{NAD}^+$	17
<u>Equação 7:</u> $\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{(D\text{-LDH})} D - \text{lactato} + \text{NAD}^+$	17

Lista de Figuras

<u>Figura 1:</u> Raízes de <i>Pachyrhizus ahipa</i> expostas a diferentes concentrações de alumínio, coradas com hematoxilina: (A) exposição a 5,5 μM de alumínio; (B) exposição a 11 μM de alumínio. As setas indicam zonas de rutura da rizoderme. Adaptado de [17]......	5
<u>Figura 2:</u> Modelo da secreção de ácidos orgânicos (AO) por parte das raízes de plantas tolerantes ao alumínio. Adaptado de [4]......	7
<u>Figura 3:</u> Destoxificação, transporte e armazenamento do alumínio no trigo-sarraceno. O processo inclui a absorção do alumínio na membrana plasmática (MP) da raiz, formação do complexo alumínio-oxalato ($\text{Al}(\text{Ox})_3$), transporte xilémico sob a forma de alumínio-citrato (Al-Cit) e armazenamento no vacúolo das folhas sob a forma de alumínio-oxalato ($\text{Al}(\text{Ox})_3$). Adaptado de [4]......	8
<u>Figura 4:</u> Secreção de malato e citrato no trigo Carazinho tolerante ao alumínio. As linhas contínuas representam a secreção do respetivo ácido orgânico pelo trigo, numa solução com 50 μM de AlCl_3 enquanto as linhas tracejadas referem-se à secreção no trigo controle (numa solução nutriente sem AlCl_3). Adaptado de [22]......	9
<u>Figura 5:</u> Representação da molécula de ácido málico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$) [25]......	10
<u>Figura 6:</u> Funções do malato no interior das células vegetais [26]......	11

<u>Figura 7</u> : Representação do complexo formado entre o ácido málico (4 moléculas) e o alumínio (4 catiões) em meio aquoso: $[Al_4(C_4H_3O_5)_4(OH)_2(H_2O)_4]^{2-}$. A preto estão representados os átomos de alumínio, a cinzento-escuro os átomos de carbono e a branco os átomos de oxigénio. Os átomos de hidrogénio não se encontram representados na figura [24].	11
<u>Figura 8</u> : Representação da molécula de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) [27].	12
<u>Figura 9</u> : Funções do citrato no interior das células vegetais [4].	12
<u>Figura 10</u> : Representação do complexo molecular formado entre um catião de alumínio e uma molécula de ácido cítrico em meio aquoso: $[Al(C_6H_5O_7)(H_2O)_3]$. A roxo está representado o átomo de alumínio, a vermelho o oxigénio, a verde o carbono e a cor branca simboliza o hidrogénio [27].	13
<u>Figura 11</u> : Proteína transmembranar codificada pelo gene ALMT1. Adaptado de [32].	14
<u>Figura 12</u> : Estrutura do gene ALMT1, onde a região a cinzento representa o promotor, as zonas a branco são os exões e as áreas a preto os intrões. A região a tracejado indica a zona do promotor, onde ocorrem repetições de blocos da sequência de ácidos nucleicos, que está associada à maior ou menor expressão do gene. Adaptado de [30].	18
<u>Figura 13</u> : Sementes em caixa de Petri, com meio de cultura, após 48 horas. É possível verificar que existem 2 sementes contaminadas e 4 aparentemente saudáveis, mas que tiveram de ser descartadas devido à possibilidade de transferência de contaminações.	29
<u>Figura 14</u> : Cultura hidropónica das sementes da variedade 239 F3: (A) primeiro dia da cultura; (B) segundo dia da cultura; (C) terceiro dia da cultura hidropónica.	29
<u>Figura 15</u> : Caixas Petri, com meios de cultura, com as soluções de cultivo hidropónico adicionadas para despistagem de contaminações e incubadas durante 48 horas: à esquerda apresenta-se uma caixa cuja solução experimental estava contaminada; à direita, a solução experimental incubada não apresentava contaminações.	30
<u>Figura 16</u> : Representação gráfica do alongamento radicular das diferentes gerações em cada variante experimental. Barras a azul dizem respeito ao controlo (C), barras a laranja referem-se às plantas expostas a 100 μ M de alumínio (Al I) e barras verdes representam as plantas expostas a 200 μ M de alumínio (Al II).	30
<u>Figura 17</u> : Resultados percentuais do teste do Ericromo cianido R em cada uma das linhas submetidas a 200 μ M de alumínio.	33

Figura 18: Representação gráfica da exsudação de ácido málico pelas diferentes linhas das variedades regionais 76 e 239 e do padrão Maringá. Os valores da concentração de malato nos exsudatos foram determinados por espectrofotometria com recurso ao *kit* L-Malic Acid, Megazyme..... 36

Figura 19: Exsudação de ácido cítrico pelas diferentes linhas das variedades regionais 76 e 239 e do padrão Maringá. Os valores da concentração de citrato nos exsudatos foram determinados por espectrofotometria com recurso ao *kit* Citric acid, Megazyme..... 38

Figura 20: Gel de eletroforese obtido através da tecnologia de *chip* microfluídico. L- Marcador; 1- 76 F₀ Controlo; 2- 76 F₀ Alumínio I; 3- 76 F₀ Alumínio II; 4- 76 F₃ Controlo; 5- 76 F₃ Alumínio I; 6- 76 F₃ Alumínio II; 7- 76 DH Controlo; 8- 76 DH Alumínio I; 9- 76 DH Alumínio II; 10- 239 F₀ Controlo; 11- 239 F₀ Alumínio I; 12- 239 F₀ Alumínio II; 13- 239 F₃ Controlo; 14- 239 F₃ Alumínio I; 15- 239 F₃ Alumínio II; 16- 239 DH Controlo; 17- 239 DH Alumínio I; 18- 239 DH Alumínio II; 19- Maringá Controlo; 20- Maringá Alumínio I; 21- Maringá Alumínio II..... 43

Figura 21: Gel de eletroforese (2,2% agarose) com as amostras após a restrição com a enzima XmnI para o marcador CAPS, onde L é o marcador, CS é o padrão de trigo Chinese Spring e M representa o padrão Maringá..... 46

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificações taxonómicas do trigo utilizado, bem como dados referentes à sua colheita. A expressão “ISOP” refere-se ao código alfanumérico do sistema de informação e documentação e serve para identificar o acesso e a sua afiliação no Banco de Germoplasma ISOPlexis [14]..... 3

Tabela 2: Características dos marcadores mais comuns no estudo do gene *TaALMT1* [30, 45]. F: *Forward*; R: *Reverse*..... 19

Tabela 3: Doseamento do ácido málico, volume dos reagentes pipetados para as cuvets..... 23

Tabela 4: Doseamento do ácido cítrico, volumes dos reagentes pipetados para as cuvets..... 23

Tabela 5: Condições otimizadas para a amplificação de cada *primer* dos marcadores moleculares..... 26

Tabela 6: Percentagem de sementes germinadas e contaminadas em cada lote de sementes das gerações das variedades de trigo utilizadas..... 28

<u>Tabela 7</u> : Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração para as diversas linhas testadas para o alongamento radicular.....	31
<u>Tabela 8</u> : Resultados obtidos pelo teste <i>Two-Way</i> ANOVA com os valores do alongamento radicular por linha e tratamento. A expressão “linha” refere-se às gerações e/ou linhas haplodiplóides de cada variedade e a expressão “tratamento” diz respeito às variantes experimentais (controle, alumínio I e alumínio II).....	32
<u>Tabela 9</u> : Valores médios de produção de calose no padrão Maringá e nas amostras experimentais, após 24 horas de exposição ao alumínio [14].....	34
<u>Tabela 10</u> : Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração para as diversas linhas testadas para a acumulação de calose.....	35
<u>Tabela 11</u> : Análise estatística dos resultados da acumulação de calose por linha e tratamento, utilizando o teste <i>Two-Way</i> ANOVA.....	35
<u>Tabela 12</u> : Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração para as diversas linhas testadas para a exsudação de malato.....	37
<u>Tabela 13</u> : Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração para as diversas linhas testadas para a exsudação de citrato.....	39
<u>Tabela 14</u> : Análise estatística dos resultados da exsudação de malato e citrato por linha e tratamento, utilizando o teste <i>Two-Way</i> ANOVA.....	40
<u>Tabela 15</u> : Análise de correlações entre os diversos testes realizados: alongamento radicular, concentrações de malato e citrato nos exsudatos e síntese de calose nas raízes, utilizando o coeficiente de Spearman.....	41
<u>Tabela 16</u> : Resultados das amplificações dos 5 marcadores moleculares específicos em cada variedade e respectivas linhas. V – amplificação positiva; X – ausência de amplificação.....	44
<u>Tabela 17</u> : Pesos moleculares dos produtos da amplificação dos marcadores específicos SPF e LPF, com a identificação dos tipos de promotores do gene ALMT1.....	44
<u>Tabela 18</u> : Análise <i>Post hoc</i> (teste de Bonferroni) que compara os valores médios do alongamento radicular de acordo com as variantes experimentais.....	56
<u>Tabela 19</u> : Análise <i>Post hoc</i> (teste de Bonferroni) que compara os valores médios do alongamento radicular nas diferentes linhas.....	57
<u>Tabela 20</u> : Análise <i>Post hoc</i> (teste de Bonferroni) que compara os valores médios das concentrações de malato e citrato nas variantes experimentais.....	58
<u>Tabela 21</u> : Análise <i>Post hoc</i> (teste de Bonferroni) que compara os valores médios das concentrações de malato e citrato nas diferentes linhas.....	59

<u>Tabela 22</u> : Análise <i>Post hoc</i> (teste de Bonferroni) que compara os valores médios da quantidade de calose produzida nas variantes experimentais.....	60
<u>Tabela 23</u> : Análise <i>Post hoc</i> (teste de Bonferroni) que compara os valores médios da quantidade de calose produzida nas diferentes linhas.....	61

1. Introdução

O trigo (*Triticum* sp.) é uma das espécies agrícolas mais antigas, tendo o seu processo de domesticação ocorrido há cerca 10.000 anos, aquando da transição do estilo de vida nómada para sedentário. Esta domesticação deverá ter acontecido na zona do Crescente Fértil (região que compreende essencialmente o Iraque e a antiga Mesopotâmia) e poderá ter ocorrido em paralelo com a domesticação de outros cereais, nomeadamente da cevada [1].

Segundo Shewry [2], atualmente o trigo é o terceiro cereal mais produzido em todo o mundo, sendo ultrapassado apenas pelo arroz e milho. Contudo, tem a vantagem de poder ser cultivado numa região muito mais vasta do que os últimos, particularmente entre os paralelos 67° Norte (Escandinávia e Rússia) e 45° Sul (Argentina), pois apresenta inúmeras variedades (cerca de 25.000) que se adaptaram às condições agroecológicas específicas de onde são cultivadas.

A acidez dos solos é um dos principais obstáculos ao cultivo e produção do trigo, pois afeta cerca de 40% dos solos aráveis. Os solos ácidos podem ter diversas origens, incluindo as naturais, como por exemplo os solos de origem vulcânica, ou antropológicas, em resultado da poluição causada pela queima de combustíveis fósseis [3].

O alumínio (Al) é um elemento químico presente na crosta terrestre e perfaz um total de 7% da sua composição. Nos solos, o alumínio encontra-se normalmente sobre a forma de óxidos ou alumino-silicatos, não estando biodisponível para as plantas. Estes solos podem sofrer processos de acidificação, que solubilizam e tornam biodisponível o alumínio, transformando-o na sua forma catiónica (Al^{3+}) [4]. Estes catiões, após absorção, interferem em inúmeros processos fisiológicos e celulares, provocando a inibição do crescimento das raízes e a sua destruição. A planta perde a capacidade para absorver água e nutrientes, afetando o seu crescimento, produtividade e levando à sua morte [5, 6].

Os objetivos deste trabalho eram avaliar a tolerância ou sensibilidade ao alumínio de duas variedades regionais de trigo, e determinar a importância dos mecanismos de exsudação na resposta da planta ao fator de stress. Para tal, seria importante recolher os exsudatos das suas culturas hidropónicas, na presença ou ausência de alumínio, e analisar e identificar os seus constituintes, nomeadamente em relação à presença de ácidos orgânicos (malato e citrato) e/ou de peptídeos. Simultaneamente, proceder à medição do alongamento radicular, enquanto teste de discriminação da tolerância das plantas. Por fim, tinha como objetivo detetar o gene ALMT1

através de microssatélites específicos, a fim de confirmar a importância do seu mecanismo na tolerância ao alumínio destas variedades de trigo.

1.1. A cultura do trigo na Região Autónoma da Madeira

O arquipélago da Madeira localiza-se no oceano Atlântico, a cerca de 630 km a oeste da costa do norte de África, cuja latitude é de 33°10 a 32°20 Norte e longitude de 16°10 a 17°20 Oeste, tendo uma origem vulcânica [7, 8]. Os principais solos na ilha da Madeira são constituídos por andossolos, que derivam de rochas basálticas e materiais piroclásticos, onde o conteúdo de alumínio pode variar entre 1 e 34 g por kg de solo. Este tipo de solos caracterizam-se por serem ácidos, com pH inferior a 5,5. As condições climáticas variam em altitude, sendo que a temperatura média anual ao nível do mar é de 19 °C e acima dos 1.200 metros de 9 °C. Também a precipitação é afetada pela altitude, atingindo valores entre 500 e 3.000 mm em elevações baixas e altas respetivamente [9].

O trigo foi introduzido na ilha da Madeira há aproximadamente 500 anos, tendo sido cultivado de forma a fornecer alimento para os colonos dos arquipélagos da Madeira, Açores e Canárias [10]. Durante 60 anos foi a principal cultura realizada na ilha, sendo posteriormente ultrapassada pela cana-de-açúcar, cuja produção aumentou exponencialmente durante os anos 70 do século XV. Nessa altura, o trigo passou a ser cultivado nos terrenos mais pobres, com o objetivo de alimentar as populações locais, contribuindo para o desenvolvimento de variedades regionais resistentes a vários tipos de stresses, nomeadamente o stress metálico [11].

De acordo com Pinheiro de Carvalho [12], o estudo de novas formas de resistência ao alumínio poderá ser feito na ilha da Madeira devido à sua origem vulcânica, às características do solo (pH baixo, elevada concentração de alumínio), ao isolamento geográfico do arquipélago, e à tradição e história do cultivo de trigo.

1.1.1. Classificação do trigo utilizado

O trigo é uma planta da família das poáceas (gramíneas), tal como o centeio, o arroz, o milho, entre outros. O genoma do trigo é constituído por 7 cromossomas distintos e caracteriza-se por poder ter diferentes níveis de plóidia: pode ser diplóide ($2n= 14$ cromossomas), tetraplóide ($2n= 28$) ou hexaplóide ($2n= 42$) [13].

O trigo diplóide é o mais ancestral de todos, tendo sido provavelmente domesticado e selecionado inconscientemente por agricultores no Neolítico. O trigo tetraplóide possui maior variabilidade e é composto por espécies cultivadas e outras silvestres. O trigo hexaplóide é constituído por duas espécies, *Triticum aestivum* L. e *Triticum vavilovii* Jakubz, sendo o primeiro o mais cultivado a nível mundial [13]. Na ilha da Madeira estão presente trigo tetraplóides (*Triticum turgidum* L.) e hexaplóides (*Triticum aestivum* L.). Na espécie tetraplóide existem ainda duas subespécies presente na ilha: *durum* Desf. (Husn.) e *turgidum*. Por outro lado, a espécie hexaplóide apresenta as seguintes subespécies na região: *aestivum* e *compactum* Host..

O trigo apresenta maior taxa germinação e vigor quando a semente se encontra entre 20 e 25 °C, humidade superior a 35% de massa seca da semente e quando o pH do solo varia entre 6,2 e 6,8. Os trigos utilizados neste trabalho são ambos provenientes da Região Autónoma da Madeira. Na tabela 1, está sumarizada a informação sobre as amostras de trigo utilizadas, assim como os dados referentes à sua origem e data de colheita das populações iniciais.

Tabela 1: Classificações taxonómicas do trigo utilizado, bem como dados referentes à sua colheita. A expressão “ISOP” refere-se ao código alfanumérico do sistema de informação e documentação e serve para identificar o acesso e a sua afiliação no Banco de Germoplasma ISOPlexis. [14]

ISOP	Espécie	Variedade	Nome comum	Ano de colheita
76	<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>erithrospermum</i> Körn	Trigo da Serra	1997
239	<i>Triticum aestivum</i> L.	var. <i>milturum</i> (Alef.) Velican	Trigo Rapado Branco	2000

Ambas as variedades de trigo são *landraces* (variedades locais), ou seja, são variedades heterogéneas (constituídas por diferentes genótipos) “selecionadas” pelos agricultores e especificamente adaptadas às condições locais [15, 16]. Estudos anteriores revelaram que a variedade 76 é tolerante ao alumínio, enquanto a variedade 239 é sensível [12].

A partir da população inicial (*landraces*, geração F₀) foi apurada a geração F₃ e obtidas as linhas haplodiplóides (DH), estas últimas construídas com ajuda do Instituto Polaco de Aclimação das Plantas. A amostra F₀ refere-se à população inicial, a geração F₃ é obtida através da seleção contínua de plantas tolerantes/ sensíveis até à terceira geração do trigo ISOP 76 e 239, respetivamente. Por fim, as linhas DH foram obtidas através da duplicação dos cromossomas do pólen (células sexuais masculinas após o processo de meiose) de forma a obter células diplóides homozigóticas em relação a todos os cromossomas. Por norma, seria de esperar que a tolerância ao alumínio no trigo 76 fosse menor na geração F₀ e atingisse a máxima

nas linhas DH. Da mesma forma, a sensibilidade ao alumínio deverá ser menor no trigo 239 F₀ e maior no 239 DH [14].

1.2. Toxicidade e tolerância ao alumínio

1.2.1. Toxicidade do alumínio

De acordo com Poschenrieder [17], diversos íons metálicos, incluindo o alumínio (Al³⁺), são tóxicos devido à sua interação com as biomoléculas que contêm oxigênio. Estes íons têm preferência para formar ligações com os grupos fosfatos, sulfatos e carboxilos. Deste modo, os efeitos tóxicos do alumínio podem ser visíveis ao nível da parede celular, da membrana plasmática e também no interior das células. Atualmente os estudos têm se focado principalmente na ação do alumínio sobre os grupos carboxilo das pectinas presentes na parede celular, os fosfolípidos das membranas celulares e os nucleótidos, enquanto outros principais afetados pela presença deste cátion metálico.

O alumínio tem a capacidade de afetar o alongamento radicular, mas também a arquitetura das raízes, levando nomeadamente à formação de inúmeras raízes secundárias. O ápice da raiz principal, onde ocorre a divisão celular e o seu alongamento, é o local mais afetado pelo alumínio, particularmente na zona de transição. Esta zona é responsável pelas propriedades indispensáveis ao alongamento das células pós-mitóticas, nomeadamente as propriedades mecânicas das paredes celulares, formação dos vacúolos e reorganização do citoesqueleto [17].

Vários aspetos da ação do alumínio estão documentados, nomeadamente a inibição do transporte de auxinas (hormonas vegetais que regulam o crescimento da planta) na zona de transição do ápice radicular. Esta inibição é causada pelo ácido naftilftalâmico e deverá ser a principal causa de inibição do crescimento da raiz principal e da indução da formação de um maior número de raízes secundárias. Como consequência, a extensão lateral das raízes superficiais pode tornar a planta mais sensível à seca [17].

As paredes celulares e o apoplasto (espaço intercelular) são as primeiras estruturas da planta a entrar em contato com o alumínio fitotóxico. Segundo Poschenrieder [17], a diminuição da fluidez da parede celular poderá ser causada pelo Al³⁺, o qual se liga aos compostos sintetizados durante o processo de alongamento celular, diminuindo as propriedades mecânicas da parede celular e provocando a rutura da epiderme da raiz (rizoderme). Esta rutura pode ser observada na figura 1.

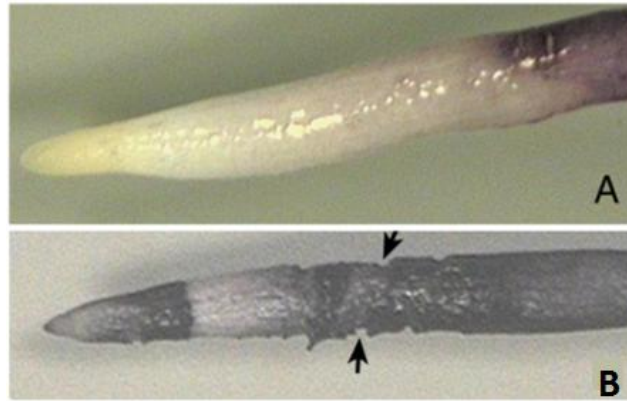


Figura 1: Raízes de *Pachyrhizus ahipa* expostas a diferentes concentrações de alumínio, coradas com hematoxilina: (A) exposição a 5,5 μM de alumínio; (B) exposição a 11 μM de alumínio. As setas indicam zonas de rutura da rizoderme. Adaptado de [17].

Apesar da maioria do alumínio se encontrar no apoplasto, não significa que a parede celular seja o principal alvo deste elemento. A membrana celular é também um potencial local de ligação do alumínio com os grupos carboxilo e fosfato presentes nesta estrutura. A ligação entre este cátion e a membrana pode resultar na modificação da fluidez desta, que por sua vez poderá levar à alteração do potencial membranar e da atividade dos canais iônicos, com a consequente alteração da homeostasia do cálcio, inibição do transporte do próton pela adenosina trifosfatase (H^+ -ATPase) e peroxidação lipídica na membrana. Estes são os principais sintomas associados ao síndrome de toxicidade do alumínio [17].

Inicialmente, pensava-se que a membrana celular era impermeável aos cátions trivalentes e que o alumínio só conseguiria atravessá-la após um longo período de exposição. No entanto, 20 a 250 $\text{pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de alumínio no citoplasma são suficientes para que se manifeste a sua toxicidade, e tendo em conta que concentrações nanomolares de alumínio têm capacidade de competir com o magnésio na ligação com o ATP, a carga energética celular é comprometida [17].

1.2.2. Tolerância ao alumínio

Ao longo da evolução, as plantas têm vindo a desenvolver diversos mecanismos de adaptação aos solos ácidos, contendo alumínio biodisponível na forma catiónica. Atualmente são conhecidas diferenças na resposta da planta à presença de alumínio que variam com espécies vegetais, e mesmo, entre variedades da mesma espécie [18].

O trigo é considerado uma espécie sensível à ação tóxica do alumínio, contudo têm sido detetadas variedades e cultivares com elevada tolerância. Trigos com origem no Brasil são por norma os mais resistentes, uma vez que sofreram um intenso processo de seleção em solos ácidos, resultando no uso destes trigos como variedades e padrões de tolerância ou resistência ao alumínio [18].

Os mecanismos de tolerância ao alumínio podem ser de dois tipos: tolerância por exclusão (que preveem a precipitação do alumínio no solo ou a sua imobilização apoplástica) e destoxificação interna (com a imobilização e neutralização do alumínio no interior da célula e reparação dos danos da sua ação fitotóxica) [19].

1.2.2.1. Tolerância por exclusão

Os mecanismos de tolerância ao alumínio foram investigados ao longo dos anos e, atualmente, pensa-se que estarão associados à exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes, com a sua libertação para o solo. Os aniões dos ácidos orgânicos libertados formam complexos com os catiões de alumínio, protegendo dessa forma as raízes e os seus tecidos. O malato é o ácido orgânico libertado pelas raízes do trigo tolerante, enquanto o citrato é exsudado por espécies como o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e o milho (*Zea mays* L.). Na maioria dos casos, a secreção destes ácidos encontra-se localizada no ápice da raiz (zona mais sensível ao alumínio), uma vez que não é possível neutralizar todo o alumínio biodisponível do solo. À medida que a raiz cresce, é necessário que a planta exsude novas moléculas de ácidos orgânicos que acompanhem o crescimento radicular [4].

O processo de exsudação pode ser explicado de duas estratégias distintas: através do padrão I, que compreende a exsudação imediata no momento de adição do alumínio (podendo ocorrer um pequeno atraso, por exemplo, de 15 minutos após a exposição ao alumínio), ou através do padrão II, quando se observa a secreção e exsudação algumas horas após a exposição ao alumínio.

No padrão I, a rapidez de resposta poderá indicar que o alumínio ativa um mecanismo pré-existente, por exemplo uma proteína membrana de transporte, que irá secretar o ácido orgânico. Por outro lado, no padrão II poderá ser necessário a indução de determinado gene que irá ser transcrito numa proteína [20].

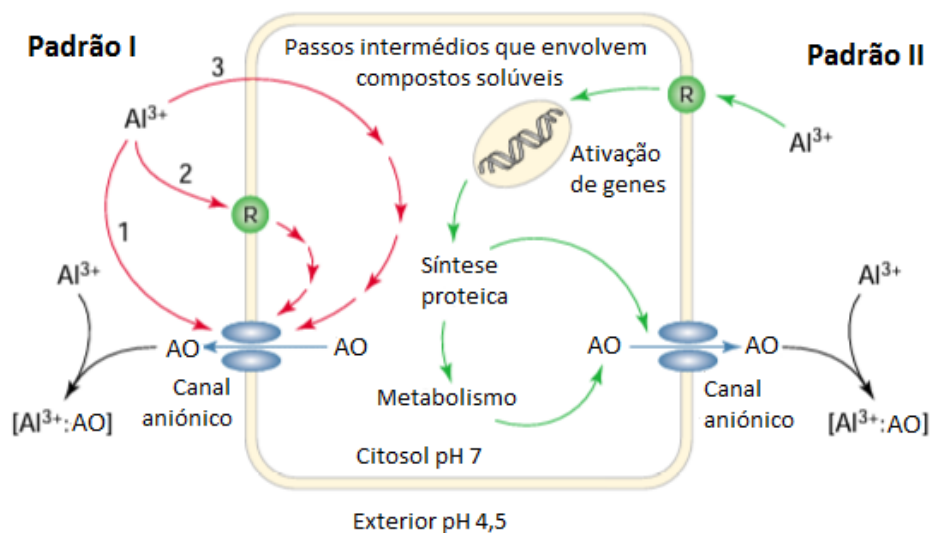


Figura 2: Modelo da secreção de ácidos orgânicos (AO) por parte das raízes de plantas tolerantes ao alumínio. Adaptado de [4].

Na figura 2, no padrão I ocorre a ativação do canal aniônico na membrana celular permeável a determinados ácidos orgânicos. Esta estimulação poderá ocorrer por 3 vias distintas: (1) o alumínio interage diretamente com a proteína transportadora, desencadeando a sua abertura; (2) o alumínio interage com um recetor específico (R) da membrana celular, que desencadeia uma cascata de mensageiros secundários, os quais provocam a abertura dos canais aniônicos; (3) o alumínio atravessa a membrana celular e entra no citoplasma, ativando diretamente os canais aniônicos [4].

No padrão II ocorre a interação do alumínio com a célula através de um recetor específico localizado na membrana celular. Esse recetor por sua vez ativa a transcrição de genes, cujas proteínas poderão estar envolvidas no metabolismo dos ácidos orgânicos ou no seu transporte, através da membrana plasmática [4].

1.2.2.2. Tolerância por detoxificação interna do alumínio

Apesar do alumínio inibir o crescimento radicular, algumas espécies têm a capacidade de acumulá-lo nas partes superiores da planta, como por exemplo nas folhas, sem que estas apresentem qualquer tipo de sintomas. Estudos recentes indicaram que algumas plantas de chá podem acumular até 30 mg de alumínio por g de peso seco, pelo que a presença do metal estimula o seu crescimento, conduzindo a uma taxa superior de fotossíntese e ao aumento da produção de antioxidantes. No entanto, os mecanismos concretos que permitem à planta obter este benefício necessitam de elucidação [21].

No caso do trigo-sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench), cuja acumulação de alumínio pode atingir valores de 12,2 mg por cada g de folha fresca, já se conhece o seu mecanismo de destoxificação interna, que se encontra representado na figura 3. Por um lado, esta espécie secreta oxalato pelo ápice da raiz que irá quelar o alumínio, destoxificando-o externamente, e por outro lado, as raízes captam o alumínio, complexando-o internamente com oxalato a uma forma não fitotóxica. De seguida, o alumínio é transferido para os caules, sofrendo uma troca de ligando, passando a se encontrar na forma de alumínio-citrato na seiva xilémica. Por fim, já nas folhas, o alumínio é capturado para os vacúolos, novamente na forma de um complexo de alumínio-oxalato, ficando imóvel nas folhas indefinidamente. Contudo, o mecanismo exato pelo qual se realizam estas transformações ainda não é conhecido [21].

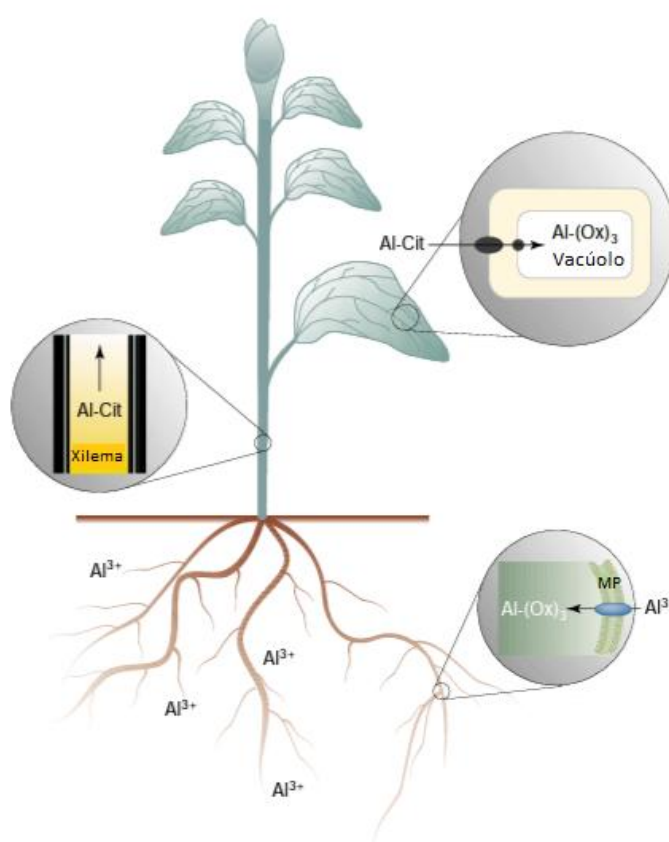


Figura 3: Destoxificação, transporte e armazenamento do alumínio no trigo-sarraceno. O processo inclui a absorção do alumínio na membrana plasmática (MP) da raiz, formação do complexo alumínio-oxalato ($\text{Al}-(\text{Ox})_3$), transporte xilémico sob a forma de alumínio-citrato (Al-Cit) e armazenamento no vacúolo das folhas sob a forma de alumínio-oxalato ($\text{Al}-(\text{Ox})_3$). Adaptado de [4].

1.2.2.3. Mecanismo de tolerância do trigo ao alumínio

O trigo exsuda ácidos orgânicos como forma de proteção em relação ao alumínio biodisponível no solo. A espécie adota um comportamento de tolerância por exclusão, não

acumulando quantidades significativas de alumínio nos tecidos e nas partes aéreas da planta. O principal ácido orgânico exsudado por esta espécie é o malato, cuja secreção é detetada entre 15 a 30 minutos após a exposição da raiz ao alumínio. Segundo Ma [4], a resposta do trigo ocorre segundo o padrão I, não sendo necessária a ativação dos genes responsáveis pela síntese dos ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos encontram-se acumulados no interior da célula, sob a forma de aniões, sendo o malato libertado no momento em que as raízes entram em contato com o alumínio. O malato é secretado através de um sistema de transporte passivo, utilizando um canal aniônico. Estes canais são compostos por proteínas transmembranares, que permitem a passagem do malato a favor do gradiente eletroquímico. A diferença de potencial elétrico existente entre o interior e o exterior de célula assegura que os ácidos orgânicos sob a forma de aniões sejam transportados do citosol para o apoplasto [4].

O estudo realizado por Ryan [22] demonstrou que o citrato também poderá ser exsudado pelo trigo de forma a atenuar os efeitos do alumínio (figura 4).

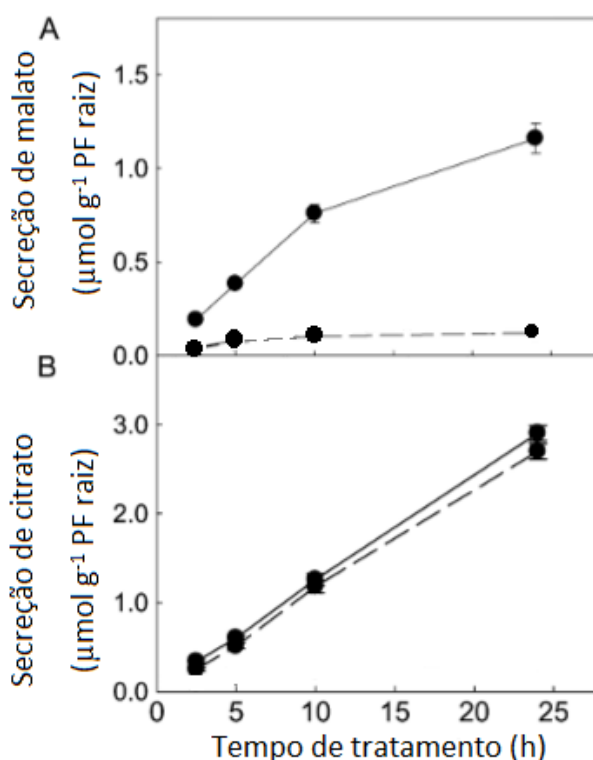


Figura 4: Secreção de malato e citrato no trigo Carazinho tolerante ao alumínio. As linhas contínuas representam a secreção do respetivo ácido orgânico pelo trigo, numa solução com 50 μM de AlCl_3 enquanto as linhas tracejadas referem-se à secreção no trigo controle (numa solução nutritiva sem AlCl_3). Adaptado de [22].

Ryan [22] determinou que o citrato é exsudado pelo trigo em maiores quantidades que o malato. No entanto, a exsudação de malato aumenta significativamente quando o trigo é exposto ao alumínio, enquanto a libertação de citrato mantém-se constante, independentemente da exposição a este catião. Esta investigação concluiu que o mecanismo responsável pela exsudação do malato deverá ser indutível, ou seja, induzido por um estímulo, enquanto o mecanismo de secreção do citrato é constitutivo e decorre continuamente [22].

1.3. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são biomoléculas, com propriedades ácidas, os quais participam nos processos metabólicos das células vegetais e animais, nomeadamente no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), onde a acetil-coenzima A (acetil-CoA) é condensada com o oxaloacetato, dando origem a ácido cítrico; na glicólise, onde a glicose é transformada em piruvato; e na gluconeogénese, onde o piruvato e o oxaloacetato são convertidos em glicose. Nas células vegetais, os ácidos orgânicos participam também no ciclo de Calvin (transformação do CO₂ em açúcares como a glicose ou o amido) e no ciclo do Glioxilato, que converte os ácidos gordos em acetil-CoA [23].

1.3.1. Malato

O malato (ácido málico na forma ionizada) é um ácido orgânico, com a fórmula química C₄H₆O₅. O ácido málico é uma molécula quiral, contudo apenas o enantiómero L-ácido málico tem importância biológica, uma vez que esta forma é a que ocorre naturalmente [24]. Na figura 5 encontra-se representada a estrutura molecular do malato.

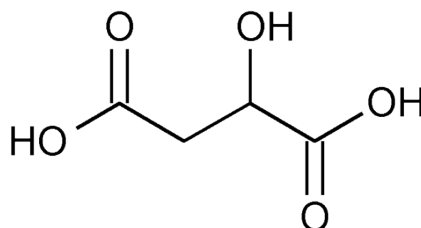


Figura 5: Representação da molécula de ácido málico (C₄H₆O₅) [25].

O malato tem inúmeras funções na célula, das quais se salientam a sua participação no ciclo de Krebs (células animais e vegetais) e no ciclo de Calvin (células vegetais). Na figura 6 estão esquematizadas algumas das funções do malato nas células vegetais.

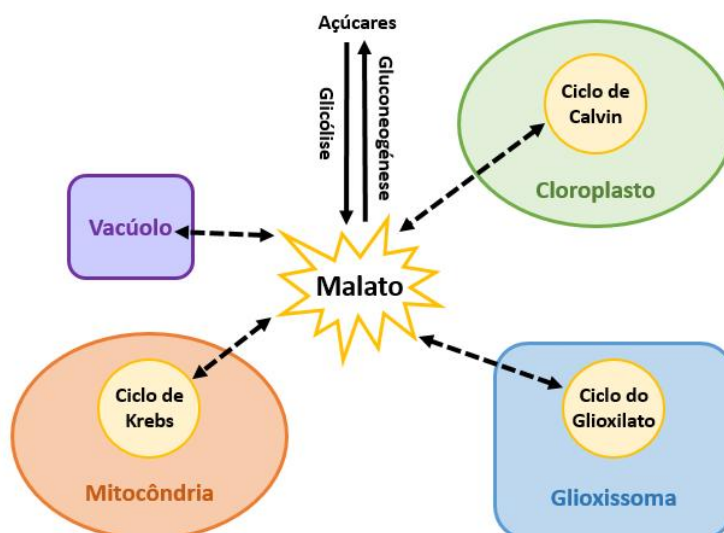
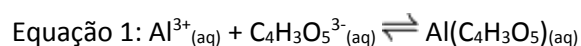


Figura 6: Funções do malato no interior das células vegetais [26].

A figura 6 ilustra além da intervenção do malato nas diversas vias metabólicas, a sua acumulação nos vacúolos. O malato presente nos vacúolos é libertado, quando necessário, e pode ser utilizado no metabolismo celular, mas também na defesa contra o alumínio. Na equação 1 está representada a reação do ácido málico exsudado pelas raízes com o alumínio catiónico (1:1) presente no apoplasma [24, 26].



De acordo com a equação 1, sabemos que o alumínio reage com o malato na proporção de 1:1. No entanto, segundo Happel [24], tendem a formar-se complexos constituídos por 4 moléculas de ácido málico com 4 catiões de alumínio. Estes complexos podem ser visualizados na figura 7.

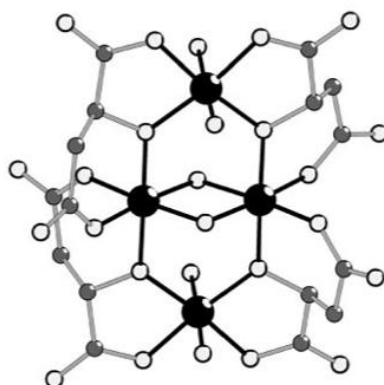


Figura 7: Representação do complexo formado entre o ácido málico (4 moléculas) e o alumínio (4 catiões) em meio aquoso: $[\text{Al}_4(\text{C}_4\text{H}_3\text{O}_5)_4(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^{2-}$. A preto estão representados os átomos de alumínio, a cinzento-escuro os átomos de carbono e a branco os átomo de oxigênio. Os átomos de hidrogénio não se encontram representados na figura [24].

Estes complexos precipitam-se no solo, deixando o alumínio de estar disponíveis para reagir com grupos como fosfatos, sulfatos e carboxilos presentes nas biomoléculas da célula. Dessa forma, as plantas conseguem destoxificar/ neutralizar externamente o alumínio [17].

1.3.2. Citrato

O citrato ($C_6H_8O_7$) é uma molécula de grande importância biológica. Quando presente na sua forma aniônica (ácido cítrico) influencia de forma drástica a biodisponibilidade do Al^{3+} , tanto nas plantas (através dos exsudatos ou no interior das células) como nos animais (no plasma sanguíneo) [27]. Na figura 8 encontra-se representada a estrutura molecular do citrato.

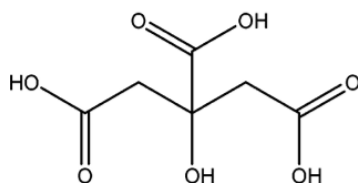


Figura 8: Representação da molécula de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) [27].

À semelhança do malato, também o citrato participa em diversas vias metabólicas, tal como o ciclo do Glioxilato. As funções do ácido cítrico têm sido intensamente estudadas, nomeadamente no que concerne à sua participação no ciclo de Krebs, contudo apenas mais recentemente tem sido associado à tolerância ao alumínio [28]. A figura 9 apresenta um esquema com algumas das funções do citrato nas células vegetais.

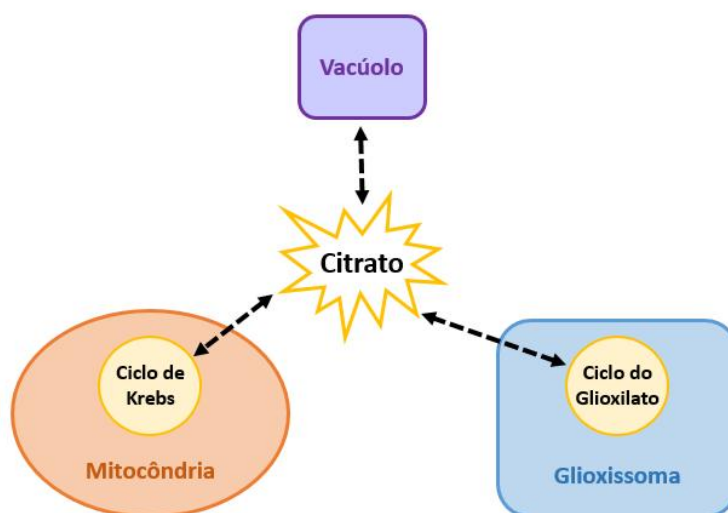
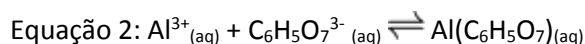


Figura 9: Funções do citrato no interior das células vegetais [4].

O citrato interage com o alumínio nas proporções 1:1 e 2:1, no entanto, segundo Noronha [27], a espécie predominante é a primeira. A sua formação é descrita na equação 2.



Ao contrário do malato que tende a formar complexos com 4 catiões de alumínio, o citrato forma complexos com apenas 1 catião. Esse complexo está representado na figura 10 [27].

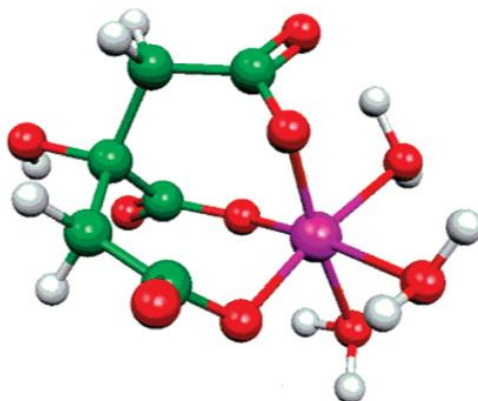


Figura 10: Representação do complexo molecular formado entre um catião de alumínio e uma molécula de ácido cítrico em meio aquoso: $[\text{Al}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)(\text{H}_2\text{O})_3]$. A roxo está representado o átomo de alumínio, a vermelho o oxigênio, a verde o carbono e a cor branca simboliza o hidrogênio [27].

Tal como acontece com o malato, o alumínio biodisponível é precipitado no solo, através da formação deste complexo, anulando a sua toxicidade para a planta [22].

1.4. Genes do trigo associados à tolerância ao alumínio

Diversos estudos indicam que a resistência ao alumínio por parte do trigo deve-se principalmente à existência de um gene específico que codifica uma proteína transportadora do malato. O gene ALMT1 (Aluminum-Activated Malate Transporter) é apontado como sendo esse gene, estando localizado no braço longo (L) do cromossoma 4D entre os pontos de quebra 4DL-2 e 4DL-14 e aparecendo conservado em trigos com diversas origens [22,29].

O gene ALMT1 é constituído por um promotor, seguido de 6 exões e 5 intrões alternados [30]. Raman [31] analisou a estrutura genética do gene ALMT1 e verificou existirem pelo menos 44 polimorfismos de um único nucleótido (SNPs) ou de uma pequena inserção/ deleção (indel) com 1 a 15 pares de bases.

O gene ALMT1 codifica a proteína *TaALMT1* (*Triticum aestivum* Aluminum-Activated Malate Transporter) do canal iônico que permite a passagem do malato para o apoplasma. Para tal, é necessário que a proteína seja ativada pela presença de alumínio catiónico. A perda de aniões de malato é acompanhada pela libertação de K^+ por outro canal iônico, de forma a manter a homeostasia celular. Além disso, segundo Ryan [32], o ácido málico exsudado também poderá ativar a proteína *TaALMT1*, ou seja, a presença no exterior deste anião poderá conduzir ao aumento da sua própria exsudação.

A estrutura secundária da proteína codificada pelo gene ALMT1 (com 459 aminoácidos) é constituída por 6 domínios transmembranares próximos da N-terminação e um domínio extracelular localizado na C-terminação da proteína. A estrutura desta proteína pode ser observada na figura 11 [32].

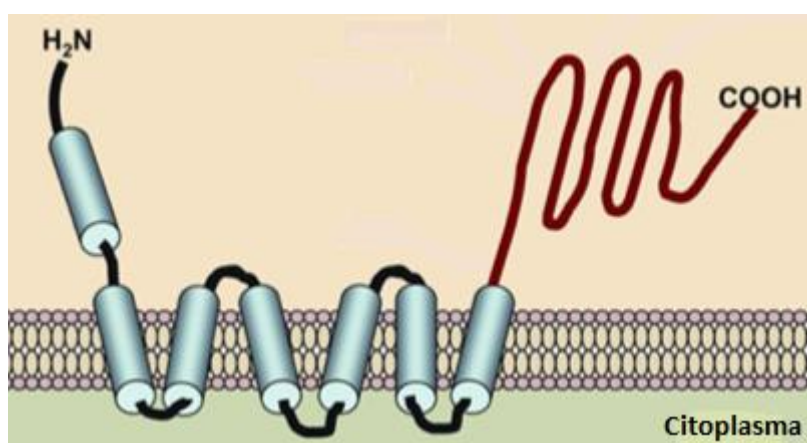


Figura 11: Proteína transmembranar codificada pelo gene ALMT1. Adaptado de [32].

De acordo com estudos recentes, a proteína transportadora do malato poderá ainda necessitar de ser fosforilada. Dessa forma, poderá ocorrer uma alteração da estrutura terciária da proteína, levando à formação de um local de ligação com o alumínio [32].

1.5. Rastreamento da tolerância ao alumínio

O rastreamento da tolerância ao alumínio nas plantas pode ser feito direta ou indiretamente. No rastreamento direto da tolerância são usados indicadores como o aumento do rácio Al/Ca, inibição do desenvolvimento ou do alongamento radicular, acumulação da calose e coloração específica dos tecidos. Estes testes usualmente apresentam valores expressos em unidades relativas, usando como comparação controlos que não foram expostos ao alumínio [17]. Por outro lado, o rastreamento também poderá ser feito indiretamente, analisando os exsudatos das plantas expostas ao

alumínio, nomeadamente quantificando os ácidos orgânicos libertados, como o malato e o citrato [33].

1.5.1. Alongamento radicular

A estimativa da inibição do alongamento radicular é comumente usada para avaliar a toxicidade do alumínio. As raízes de plantas expostas devem ser medidas e comparadas com outras não expostas ao alumínio [17]. Desse modo, é possível determinar o Índice de suscetibilidade (Is) que se baseia no rácio entre o alongamento radicular das variantes experimentais e o alongamento do controlo. Este teste permite determinar também os Índices de resistência intrageração (Ir intrageração) e intergeração (Ir intergeração), sendo que o primeiro é o rácio entre os alongamentos radiculares da variante exposta a 200 μM de alumínio e da variante exposta a 100 μM de alumínio e o segundo é calculado através do rácio entre alongamento radicular de uma determinada variante da geração F_3 ou linha DH e o alongamento da mesma variante na geração F_0 .

1.5.2. Teste do ericromo cianido R

O teste do ericromo cianido R é um método de coloração específica dos tecidos, que deteta a ação ou presença do alumínio. O ericromo cianido R (de cor laranja) reage com o alumínio, originando um complexo vermelho [17,34].

A presença do alumínio na solução de crescimento ou no solo pode levar à cessação do alongamento radicular (plantas sensíveis) ou não afetar o seu desenvolvimento (plantas tolerantes). As plantas submetidas à presença do alumínio, quando transferidas para uma solução de ericromo cianido R, poderão manter a coloração natural (inicial) no ápice radicular, demonstrando que a raiz continuou a crescer e as plantas são tolerantes, ou adquirir uma coloração, mais escura, indicando que não houve crescimento da raiz na solução de alumínio e portanto as planta são sensíveis ao metal [8, 35].

1.5.3. Acumulação de calose

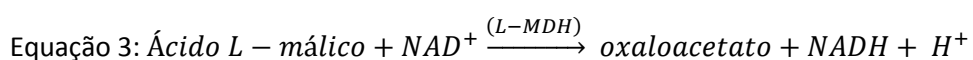
A formação de 1,3- β -D-glucano ou calose (polímero de glicose) é uma resposta típica das plantas quando expostas a diversos tipos de stress, como o stress mecânico, químico e biológico [36]. O aumento da produção de calose foi observado após a exposição das plantas a

elementos, como o cobalto e o magnésio. Estão também documentados estudos que comprovam que o alumínio induz a síntese deste polímero [36]. A calose é sintetizada pela 1,3-β-D-glucano sintase (EC 2.4.1.34), que é ativada sob condições de stress, especialmente quando ocorrem danos na membrana plasmática [37]. A determinação do teor de calose nos tecidos de uma planta sob stress em comparação com as plantas controlo pode ser utilizada como indicativo do estado da planta, no que diz respeito ao facto desta ser suscetível ou não ao stress [36, 37]. Com estes dados é possível determinar os Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração da mesma forma que no alongamento radicular, usando desta vez os valores de calose determinados.

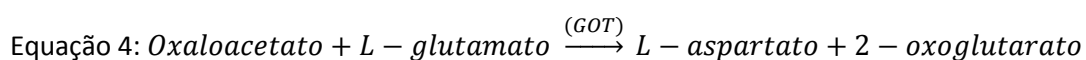
1.5.4. Doseamento dos ácidos málico e cítrico

A presença de ácidos orgânicos nos exsudatos do trigo, particularmente os ácidos málico e cítrico, poderão indicar a sua tolerância ao alumínio. A recolha e quantificação dos ácidos orgânicos libertados no solo é difícil, por isso, normalmente, este tipo de teste é realizado em cultura hidropónica das plantas em estudo [38]. A deteção e quantificação dos ácidos orgânicos presentes nos exsudatos pode ser feita através de vários métodos, sendo o mais comum a utilização de métodos enzimáticos [22, 33]. Nestes métodos são utilizados *kits* específicos para cada tipo de ácido orgânico.

A deteção do ácido málico neste método requer duas reações. A primeira é catalisada pela enzima L-malato desidrogenase (L-MDH, EC.1.1.1.37), onde o ácido L-málico é oxidado em oxaloacetato na presença do cofator nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺). [39] Esta reação está representada na equação 3.

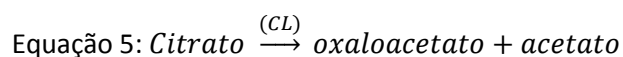


A segunda reação permite garantir que não se forma novamente ácido L-málico e NAD⁺, uma vez que o equilíbrio químico da primeira reação tende a formar estes compostos. Na segunda reação o oxaloacetato é convertido em L-aspartato e 2-oxoglutarato pela glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT, EC 2.6.1.1), na presença de L-glutamato [39]. Esta reação encontra-se reproduzida na equação 4.

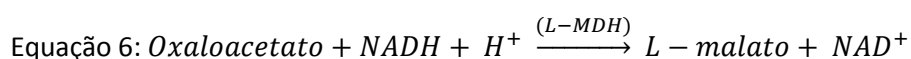


O NADH formado encontra-se na mesma estequiometria que o ácido L-málico, pelo que ao ser detetado o seu aumento nos 340 nm de absorvância é possível determinar a concentração do ácido L-málico no exsudato [39].

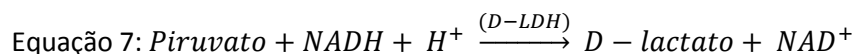
A determinação do ácido cítrico pelo respetivo *kit* realiza-se em três etapas consecutivas. Na primeira, ocorre a transformação do citrato em oxaloacetato e acetato pela enzima citrato liase (CL, EC 2.7.7.61) [40]. Esta reação encontra-se representada na equação 5.



De seguida, o oxaloacetato é convertido em L-malato e NAD⁺ na presença de NADH e da L-MDH, como se pode observar na equação 6 [40].



Contudo, se na mistura reagente a oxaloacetato descarboxilase (ODC, EC 4.1.1.3) estiver presente, parte do oxaloacetato poderá ser convertido em piruvato. De forma a garantir que todo o ácido cítrico é quantificado, é necessário adicionar à mistura reagente D-lactato desidrogenase (D-LDH, EC 1.1.1.28) de modo a converter o piruvato em D-lactato e NAD⁺ [40]. Esta reação está de acordo com a equação 7.



A quantidade de NAD⁺ formado pelas equações 6 e 7 está em estequiometria com a quantidade de citrato. Dessa forma, é medido o consumo de NADH que se irá transformar em NAD⁺ pela diminuição da absorvância a 340 nm de forma a obter a concentração de ácido cítrico.

Os índices de suscetibilidade e de resistência podem ser calculados usando também as quantidades de ácidos orgânicos determinadas.

1.5.5. Determinação da presença de proteínas nos exsudatos

As raízes têm a capacidade de exsudar diversos tipos de compostos tais como hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas e enzimas. O sistema radicular das plantas encontra-se constantemente exposto a diferentes stresses bióticos e abióticos, motivo pela qual alguns desses compostos são secretados [41]. Segundo Hamilton [42] existem proteínas induzidas pelo alumínio ao nível das membranas, no citoplasma e também nos exsudatos produzidos pelo trigo.

A detecção da presença de proteínas nos exsudatos é, por conseguinte, importante para caracterizar os mecanismos envolvidos na resposta ao alumínio. Esta detecção pode ser feita de modo tradicional, através da separação e análise do exsudato num gel de poliacrilamida, na presença de SDS (SDS PAGE). No entanto, este é um método demorado e não-quantitativo. A tecnologia de *chip* microfluídico, que se baseia na eletroforese capilar, pode também ser utilizada, permitindo uma análise rápida, com detecção quantitativa e qualitativa de peptídeos e proteínas nas amostras [43]. Desta forma é possível detetar a presença de proteínas e quantificá-las nos exsudatos dos trigos cultivados na presença de alumínio, e comparar as variantes experimentais e os controlos, determinando se a exposição ao alumínio induz a exsudação de proteínas específicas.

1.5.6. Deteção de marcadores genéticos

A detecção da tolerância ao alumínio e da exsudação dos ácidos orgânicos pelas raízes das variedades trigo permite implicar este mecanismo na resposta da planta e na neutralização do alumínio biodisponível. Além disso, o rastreio molecular utilizando marcadores moleculares específicos, permite comprovar o fundamento molecular deste mecanismo, confirmando a sua importância. Como referido anteriormente, o gene ALMT1 tem vindo a ser implicado na maioria dos casos de tolerância ao alumínio por parte do trigo [22, 29].

De forma a determinar a presença do gene ALMT1 nos tecidos das variedades regionais de trigo podem ser utilizados marcadores genéticos. Alguns dos marcadores utilizados com maior frequência para detetar a presença deste gene nos tecidos encontram-se assinalados na figura 12.

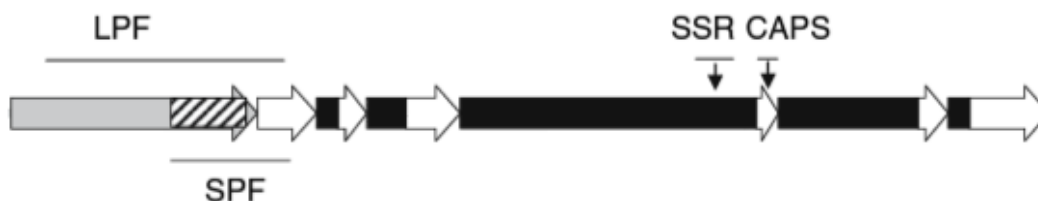


Figura 12: Estrutura do gene ALMT1, onde a região a cinzento representa o promotor, as zonas a branco são os exões e as áreas a preto os intrões. A região a tracejado indica a zona do promotor, onde ocorrem repetições de blocos da sequência de ácidos nucleicos, que está associada à maior ou menor expressão do gene. Adaptado de [30].

Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microssatélites baseiam-se no facto de existirem sequências simples repetidas em tandem ao longo dos genes, com tamanhos inferiores a 6 pb. Estes marcadores utilizam *primers* que flanqueiam de forma exclusiva essas sequências repetidas, de modo a revelar o polimorfismo do gene uma vez que informam sobre o número/ frequência de repetições [44]. Neste trabalho foram utilizados 2 microssatélites para detetar o gene ALMT1 e avaliar o seu polimorfismo: SSR3a e SSR3b (tabela 2).

Tabela 2: Características dos marcadores mais comuns no estudo do gene ALMT1 [30, 45]. F: *Forward*; R: *Reverse*.

Marcador	Sequência de nucleótidos	Tamanho do fragmento esperado (pb)	Tipo de informação	Necessidade de Digestão
CAPS	F: 5'-GGA ATG GAA TTC AAC TGC TTT GGC G-3'	107	Homozigotia ou Heterozigotia	Sim. Fragmentos: -Alelo ALMT1-1: 107 pb (não há digestão) - Alelo ALMT1-2: 50 pb e 57 pb
	R: 5'-TCC TCA GTG GCC TTC GAA TTA AGG-3'			
SSR3a	F: 5'-CTC GTC ACA AAA GCC ACT CA - 3'	235	Polimorfismo	Não
	R: 5'-GAC GCA ATC AAG GGG AAT AA -3'			
SSR3b	F: 5'-ATG CCA TTT CTT CTG TAC TGA CA-3'	173	Polimorfismo	Não
	R: 5'-AAA GAG TCC TCA GTG GCC TTC GAA-3'			
SPF	F: 5'-GCT CCT ACC ACT ATG GTT GCG -3'	612	Promotor do tipo I	Não
	R: 5'-CCA GGC CGA CTT TGA GCG AG -3'	643	Promotor do tipo II	
LPF	F: 5'-CCT GGT TTT CTT GAT GGG GGC ACA -3'	1190	Promotor do tipo I	Não
		1470	Promotor do tipo IV	
	1600	Promotor do tipo VI		
	1750	Promotor do tipo V		
	1993	Promotor do tipo III		
	R: 5'-TGC CCA CCA TCT CGC CGT CGC TCT CTC T -3'			

A detecção do marcador CAPS (*Cleavage Amplification Polymorphism Sequence*) envolve dois passos. No primeiro há amplificação da sequência de DNA utilizando um par de *primers* específicos com recurso a uma PCR (*Polymerase Chain Reaction*). De seguida realiza-se a digestão dos produtos da PCR, com uma enzima de restrição. Este tipo de marcador tem a vantagem de poder distinguir entre homozigóticos e heterozigóticos (tabela 2) [44].

Os marcadores SPF (*Short Promotor Fragment*) e LPF (*Long Promotor Fragment*) identificam o tipo de promotor presente no gene. O marcador SPF permite distinguir entre os tipos I e II do promotor, enquanto o marcador LPF identifica a presença dos promotores do tipo I, III, IV, V e VI. A forma como os diferentes tipos de promotores influenciam, e em que condições, a transcrição do gene ALMT1 é desconhecida. No entanto, o tipo de promotor varia quanto ao número de repetições presentes, resultando em bandas de diferentes pesos moleculares [30]. Os pesos moleculares esperados para cada um dos marcadores mencionados anteriormente estão presentes na tabela 2.

2. Materiais e métodos

2.1. Seleção e desinfecção do material vegetal

A desinfecção das sementes foi adaptada de Ganança [8], selecionando-se 80 sementes da geração F₀, ISOP 76, saudáveis e sem contaminações. Estas sementes provieram da coleção de trigo do Banco de Germoplasma ISOPlexis. As sementes foram colocadas em hidratação em água com fungicida (Benlate) durante 30 minutos. Após este período foram lavadas com água ultrapura autoclavada, secaram-se parcialmente as sementes com papel absorvente e transferiram-se para a câmara de fluxo laminar vertical (Steril GUARD III Advanced, The Baker Company). Nesta câmara as sementes foram desinfetadas, durante 20 minutos, em hipoclorito de sódio a 0,01% (Lavax Plus), e com etanol a 70% (AGA), por 3 minutos. Por fim, as sementes foram passadas 3 vezes por água ultrapura autoclavada. O mesmo procedimento foi repetido para a geração F₃ e linha DH ISOP 76, para todas as amostras (geração F₀, geração F₃ e linha DH) do ISOP 239, e para a amostra do padrão de tolerância, variedade Maringá [46].

2.2. Germinação das sementes

A germinação das sementes foi adaptada de Ganança [8], tendo previamente sido preparadas 12 caixas de Petri, com meio de cultura composto por sais MS (Sigma) a 0,22%, sacarose (BDH) a 1% e agar-agar (Merck) a 1,33%, onde se realizaram as sementeiras. As caixas foram previamente incubadas, durante 24 horas, à temperatura ambiente, a fim de despistar a existência de contaminações bacteriológicas.

Após a despistagem do meio das sementeiras, as caixas de Petri não contaminadas foram utilizadas para semear 6 sementes desinfetadas, tendo o cuidado de colocar a zona dorsal da semente em contato com o meio. As caixas com as sementes foram incubadas, durante 2 dias, na ausência de luz.

2.3. Cultura hidropónica e recolha de exsudatos

Na cultura hidropónica das sementes foi utilizado um método adaptado de Pinheiro de Carvalho [12]. Depois da germinação das sementes, foram transferidas três plântulas para cada vaso magenta (vasos próprios para cultura hidropónica), com 60 mL de solução nutritiva completa, num total de 9 vasos magenta por geração de cada variedade. As plântulas transferidas foram previamente analisadas, não apresentando contaminações. Os vasos

magenta foram previamente desinfetados e esterilizados, através da sua imersão em ácido nítrico (Fluka) a 2%, durante 24 horas, sendo de seguida imersos em água destilada, durante mais 24 horas e autoclavados (Uniclave 88). Estes recipientes possuem um orifício tapado, com um filtro de porosidade 0,025 μm (Millipore), de forma a permitir trocas gasosas, sem o risco de contaminações. A solução nutritiva completa era constituída por 0,05% de solução nutritiva A, 0,05% de solução nutritiva B, 0,05% de solução nutritiva C e 0,05% de solução nutritiva D (a composição das soluções nutritivas A, B, C e D encontra-se no Anexo 1), pH 4,3.

Os vasos magenta foram colocados num agitador orbital (C1 Platform Shaker, New Brunswick Scientific), sob agitação lenta, durante 48 horas. A experiência decorreu com um fotoperíodo de 9 horas de período luminoso, seguido de 15 horas de período noturno. A temperatura média durante a experiência atingiu $21,7 \pm 0,7$ °C.

Ao fim de 2 dias procedeu-se à substituição das soluções nutritivas completas nos 9 vasos magenta por geração de cada variedade, sendo adicionados 60 mL de solução controlo a 3 magentas (controlo), 60 mL de solução de alumínio I (3 vasos) e 60 mL de solução de alumínio II (3 vasos) nas restantes magentas (variantes experimentais). A composição destas soluções está descrita no Anexo 2. Os vasos magenta foram novamente colocados no agitador orbital, pelo período de 9 dias, sob o mesmo regime de fotoperíodo e temperatura.

Ao fim dos 9 dias, as soluções nutrientes dos vasos foram recolhidas, tendo sido retirado 1 mL de cada vaso para controlo microbiológico para caixas de Petri, com meio de cultura semelhante ao descrito anteriormente. A despistagem de microrganismos realizou-se através da incubação das caixas de Petri, durante 2 dias, à temperatura ambiente. Ao restante volume das soluções foram adicionados 90 μL de azida de sódio (Sigma-Aldrich) a 10% (m/v) como conservante. As soluções foram armazenadas a -20 °C, para posterior análise. As raízes das plantas foram medidas e as folhas foram cortadas e guardadas a -20 °C para posterior extração de DNA e análise molecular.

Depois de terem sido obtidas todas as soluções de crescimento, com os exsudatos, estas foram liofilizadas (Cool Safe, Scanvac) e os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 2 mL de água ultrapura autoclavada. De seguida, foram novamente congelados a -20 °C, até posterior análise.

2.4. Doseamento do ácido málico os exsudatos

O doseamento do ácido málico nos exsudatos liofilizados foi feito com ajuda do *kit* L-Malic Acid, Megazyme, de acordo com o protocolo do fornecedor [39]. A mistura reagente foi pipetada para cuvetes de plástico (PMMA), de acordo com a tabela 3. O conteúdo de ácido málico foi calculado pela variação das absorvâncias, determinada num espectrofotómetro (UV 2401 PC, Shimadzu), nos 340 nm contra o branco.

Tabela 3: Doseamento do ácido málico, volume dos reagentes pipetados para as cuvetes.

Soluções	Branco	Amostra
Água destilada	2,1 mL	2 mL
Amostra	-	0,1 mL
Solução 1 (tampão)	0,1 mL	0,1 mL
Solução 2 (NAD ⁺ /PVP)	0,1 mL	0,1 mL
Suspensão 3 (GOT)	0,02 mL	0,02 mL
Misturou-se e foi lida a absorvância após 3 minutos (A1)		
Suspensão 4 (L-MDH)	0,02 mL	0,02 mL
Misturou-se e foi lida a absorvância após 3 minutos (A2)		

2.5. Doseamento do ácido cítrico nos exsudatos

No doseamento do ácido cítrico exsudado foi utilizado o procedimento recomendado pelo fornecedor do *kit* Citric acid, Megazyme [40]. A mistura reagente foi pipetada para as cuvetes de plástico (PMMA), de acordo com a tabela 4. As absorvâncias foram medidas mais uma vez a 340 nm, no espectrofotómetro, contra o branco.

Tabela 4: Doseamento do ácido cítrico, volumes dos reagentes pipetados para as cuvetes.

Soluções	Branco	Amostra
Água destilada	2 mL	1,8 mL
Amostra	-	0,2 mL
Solução 1 (tampão)	0,5 mL	0,5 mL
Solução 2 (NADH/PVP)	0,2 mL	0,2 mL
Suspensão 3 (L-MDH/D-LDH)	0,02 mL	0,02 mL
Misturou-se e foi lida a absorvância após 4 minutos (A1)		
Solução 4 (CL)	0,02 mL	0,02 mL
Misturou-se e foi lida a absorvância após 5 minutos (A2)		

2.6. Teste do ericromo cianido R

O teste do ericromo cianido R foi realizado de acordo com Pinheiro de Carvalho [12]. Amostras de sementes das gerações e linhas dos trigos ISOP 76, ISOP 239, Maringá e Chinese

Spring (30 plantas de cada) foram colocadas a germinar numa solução nutritiva completa, na ausência de luz, durante 48 horas. A solução nutriente foi substituída pela solução de alumínio II, ficando nesta durante 4 dias, com fotoperíodo de 9 horas de período luminoso, seguido de 15 horas de período noturno. Por fim, a solução foi novamente substituída por solução nutritiva completa por um dia. As plantas foram retiradas das redes e colocadas durante 10 minutos numa solução de 0,1% (m/v) de ericromo cianido R₂₅₀ (Sigma-Aldrich) e de seguida passadas por água destilada para retirar o excesso de reagente. As raízes foram observadas e classificadas em tolerantes (caso apresentassem a zona apical branca) ou sensíveis (quando a zona apical estava corada de laranja escuro).

2.7. Determinação da calose

A determinação da calose foi realizada de acordo com dos Santos [46]. As sementes das variedades 76 e 239 e do padrão Maringá foram germinadas da mesma forma que no teste do ericromo cianido R. De seguida as amostras experimentais foram expostas à solução de alumínio II durante 24 horas enquanto que as amostras controlo permaneceram na solução nutritiva completa.

Passadas 24 horas, o conteúdo de calose foi medido. Os ápices das raízes foram excisados (cerca de 5 mm) colocados em tubos com etanol a 95% durante 1 hora. De seguida, o etanol foi decantado e adicionou-se 200 µl de hidróxido de sódio 1 M (Sigma-Aldrich). As raízes foram maceradas, os tubos colocados num banho de água a 80 °C por 15 minutos e por fim centrifugados (Biofuge pico, Heraeus) a 15.000 RCF por 4 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi incubado com 800 µl de azul de anilina 0,1% (Sigma-Aldrich), 420 µl de ácido clorídrico 1 M (Sigma-Aldrich) e 1.180 µl de tampão glicina-hidróxido de sódio pH 9,5 (Sigma-Aldrich) por 20 minutos a 50 °C e 30 minutos à temperatura ambiente. O azul de anilina estabelece uma ligação com a calose que pode ser detetada através da fluorescência que o primeiro composto emite. Dessa forma, a calose foi determinada usando um espectrofluorímetro (Aminco-Bowman spectrofluorometer) com excitação a 398 nm e emissão a 495 nm. Como padrão externo foi utilizado o composto Pachyman (Calbiochem) e por fim o conteúdo de calose foi expresso em mg equivalente Pachyman (PE) por g de raiz fresca.

2.8. Determinação da presença de proteínas nos exsudatos

A detecção da presença de proteínas nos exsudatos efetuou-se com recurso à tecnologia de *chip* microfluídico (Experion Pro260, Bio-Rad). O procedimento realizou-se de acordo com o protocolo recomendado pelo fornecedor [47]. Tanto os géis como as amostras e o marcador foram colocados no *chip* (Bio-Rad) e inseridos na estação de eletroforese automática. A corrida foi realizada automaticamente e os resultados obtidos foram registados pelo software Experion Pro260.

2.9. Extração de DNA

A extração de DNA foi feita com base no procedimento de Chao e Somers [48]. O processo de extração iniciou-se com o aquecimento do tampão de extração, à temperatura de 65 °C (Anexo 3). Adicionou-se 500 µL de tampão a 250 mg de folhas congeladas, por amostra, num tubo e procedeu-se à maceração. A extração foi realizada a partir de plantas de cada geração das variedades 76 e 239 e dos padrões Maringá e Chinese Spring de todas as variantes experimentais. De seguida, agitou-se vigorosamente, utilizando um vórtex (Genie 2, Scientific Industries) e incubou-se num banho a 65 °C, durante 30 minutos (Julabo). Os tubos foram posteriormente arrefecidos até atingirem a temperatura ambiente. 250 µL de acetato de amónia 6M (Sigma) foram adicionados a cada tubo e estes foram agitados vigorosamente. Após a agitação, os tubos ficaram em repouso, durante 15 minutos, a 4 °C e posteriormente foram centrifugados a 2.380 RCF (Biofuge pico, Heraeus), durante 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionou-se 400 µL de uma mistura de clorofórmio (Merck): álcool isoamílico (Sigma-Aldrich), na proporção de 24:1. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 13.709 RCF, durante 10 minutos. De seguida, o sobrenadante foi recolhido para um tubo com 360 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich), agitou-se suavemente e deixou-se precipitar, durante 15 minutos. Após a precipitação, as extrações foram centrifugadas a 2.380 RCF por 15 minutos e o sobrenadante descartado. De forma a confirmar que todo o sobrenadante foi eliminado, os tubos foram invertidos sobre papel durante 1 minuto. Após este passo, o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol frio a 70%, centrifugado a 2.380 RCF, durante 15 minutos e o sobrenadante descartado. O etanol foi deixado a evaporar ao ar livre e ressuspendeu-se o precipitado em 100 µL de tampão TE, pH 8,0 (Anexo 3). Os extratos foram deixados em repouso, durante a noite, a 4 °C e recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo. Os extratos finais de DNA foram conservados a -20°C.

2.10. Detecção de marcadores genéticos

A deteção dos marcadores começou com a otimização da temperatura de *annealing* (temperatura onde há emparelhamento do *primer* com a cadeia de DNA desnaturada) de cada marcador. Depois de otimizada, realizou-se a amplificação de todas as amostras com recurso a um termociclador (PxE 0.2, Thermohybrid), com os ciclos referidos na tabela 5. Tanto nas otimizações de temperatura, como na amplificação das amostras, foram utilizados *kits* de amplificação iProof High-Fidelity Master Mix (Bio-Rad), que contêm a enzima polimerase, desoxirribonucleótidos fosfatados e cloreto de magnésio (cofator da enzima).

Tabela 5: Condições otimizadas para a amplificação de cada *primer* dos marcadores moleculares.

Marcador	Solução de amplificação	Programa de PCR
CAPS	12,5 µL iProof High-Fidelity Master Mix (HF) + 5,5 µL H ₂ O + 5 µL DNA + 1 µL <i>Primer Forward</i> (F) + 1 µL <i>Primer Reverse</i> (R)	1 x (98°C 1'), 40 x (98°C 10" - 67,5°C 30" - 72°C 30"), 1 x (72°C 10')
SSR3a		1 x (98°C 1'), 40 x (98°C 10" - 56,5°C 30" - 72°C 30"), 1 x (72°C 10')
SSR3b		1 x (98°C 1'), 35 x (98°C 10" - 61,5°C 30" - 72°C 30"), 1 x (72°C 10')
SPF	12,5 µL iProof High-Fidelity Master Mix (GC) + 5,5 µL H ₂ O + 5 µL DNA + 1 µL <i>Primer F</i> + 1 µL <i>Primer R</i>	1 x (98°C 1'), 40 x (98°C 10" - 64°C 30" - 72°C 30"), 1 x (72°C 10')
LPF	12,5 µL iProof High-Fidelity Master Mix (GC) + 4,5 µL H ₂ O + 5 µL DNA + 1 µL <i>Primer F</i> + 1 µL <i>Primer R</i> + 1 µL DMSO	1 x (98°C 1'), 35 x (98°C 10" - 70,5°C 30" - 72°C 30"), 1 x (72°C 10')

Após a amplificação em cadeia da polimerase, os produtos da amplificação foram analisados, através de eletroforese em géis de agarose (Bio-Rad) a 1,4%, com brometo de etídio (Sigma). A calibração dos géis foi realizada com a utilização de marcadores de peso molecular

(Amplisize Molecular Ruler, Bio-Rad). As amostras de DNA foram submetidas a amplificação em 5 replicandos, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados e garantir a despistagem de falsos negativos. Posteriormente os géis foram fotografados e o peso molecular dos produtos de amplificação determinada.

No caso específico do marcador CAPS, foi realizada uma restrição enzimática aos produtos da PCR. 2 µL da enzima XmnI (New England BioLabs) foi utilizada na reação, juntamente com 5 µL de tampão (NE Buffer 4, New England BioLabs), 5 µL de BSA, 20 µL do produto da PCR e 8 µL de água ultrapura. Esta mistura foi incubada por 5 horas a 37 °C e ao fim desse tempo, parou-se a reação aquecendo a mistura até 65 °C, durante 20 minutos. Por fim, foi feita uma eletroforese de modo a verificar os resultados da restrição com um gel de agarose 2,2% com brometo etídeo.

2.11. Tratamento estatístico dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada, com recurso ao Microsoft Excel e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). As médias, desvios padrão e gráficos foram construídos usando o primeiro software. O SPSS foi utilizado na realização dos testes estatísticos, nomeadamente testes *One-Way* e *Two-Way* ANOVA, análises *Post hoc* (Bonferroni) e correlações de Spearman entre os diversos parâmetros testados.

3. Resultados e Discussão

Este trabalho pretendeu determinar a tolerância ou sensibilidade ao alumínio em duas variedades de trigo regionais. Diversos testes para determinar o comportamento das variedades foram realizados, cujos resultados e interpretação são apresentados de seguida.

Numa primeira fase, as sementes foram germinadas em caixas de Petri. Este passo é de grande importância, pois permite separar na fase inicial as sementes contaminadas das saudáveis. As sementes com contaminação (bacteriológica ou fúngica) poderiam conduzir a falsos resultados por poderem, tanto os fungos como as bactérias, secretar determinados compostos de forma a tolerarem o alumínio. Logo nesta etapa foram encontradas algumas barreiras, nomeadamente na germinação das sementes. Algumas das variedades, por seleção e apuramento das características, perderam alguma viabilidade. Na tabela 6 encontram-se descritas as taxas germinativas encontradas nas diferentes variedades.

Tabela 6: Percentagem de sementes germinadas e contaminadas em cada lote de sementes das gerações das variedades de trigo utilizadas.

Lote de sementes	Sementes germinadas (%)	Sementes contaminadas (%)
76 F₀	100	9,7
76 F₃	37,5	0
76 DH	48,6	0
239 F₀	98,6	0
239 F₃	50,8	10
239 DH	30	5
Maringá	100	77,5

As contaminações estiveram também presentes, maioritariamente no padrão Maringá (tabela 6). Quando alguma semente presente na caixa de Petri estava contaminada, todas as restantes eram eliminadas de forma a garantir que não havia transferência de contaminações. Na figura 13 encontra-se uma caixa, cujas 6 sementes tiveram de ser descartadas uma vez que duas delas apresentavam contaminações fúngicas.



Figura 13: Sementes em caixa de Petri, com meio de cultura, após 48 horas. É possível verificar que existem 2 sementes contaminadas e 4 aparentemente saudáveis, mas que tiveram de ser descartadas devido à possibilidade de transferência de contaminações.

Ao longo da cultura hidropónica (figura 14), todas as sementes foram verificadas diariamente de forma a confirmar que não haviam contaminações. A deteção de contaminações implicava que todo o procedimento para esse lote fosse repetido de modo a garantir que as sementes eram cultivadas em condições idênticas e livres de microrganismos.

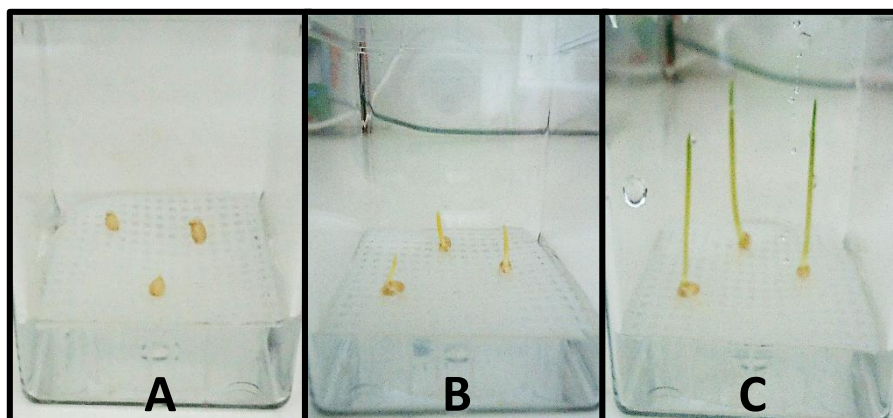


Figura 14: Cultura hidropónica das sementes da variedade 239 F₃: (A) primeiro dia da cultura; (B) segundo dia da cultura; (C) terceiro dia da cultura hidropónica.

No fim da cultura, as soluções eram recolhidas e uma parte era incubada novamente em meio de cultura (figura 15). Se o meio apresentasse contaminações, o lote teria de ser germinado novamente; se o meio estivesse livre de microrganismos, então as soluções hidropónicas obtidas no fim do cultivo eram utilizadas para posterior análise dos exsudatos.

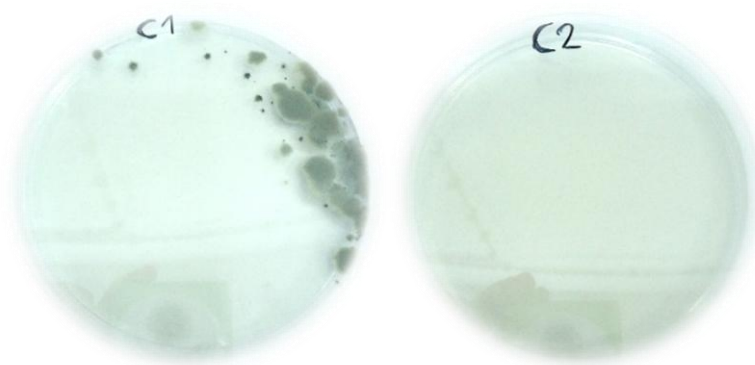


Figura 15: Caixas Petri, com meios de cultura, com as soluções de cultivo hidropónico adicionadas para despistagem de contaminações e incubadas durante 48 horas: à esquerda apresenta-se uma caixa cuja solução experimental estava contaminada; à direita, a solução experimental incubada não apresentava contaminações.

As plantas recolhidas no final do cultivo em solução hidropónica foram utilizadas em paralelo para determinar o alongamento radicular. O alongamento radicular é um teste para avaliar o comportamento tolerante ou suscetível das variedades e/ou das suas gerações ou linhas. Os resultados obtidos relativamente a este parâmetro encontram-se representados na figura 16.

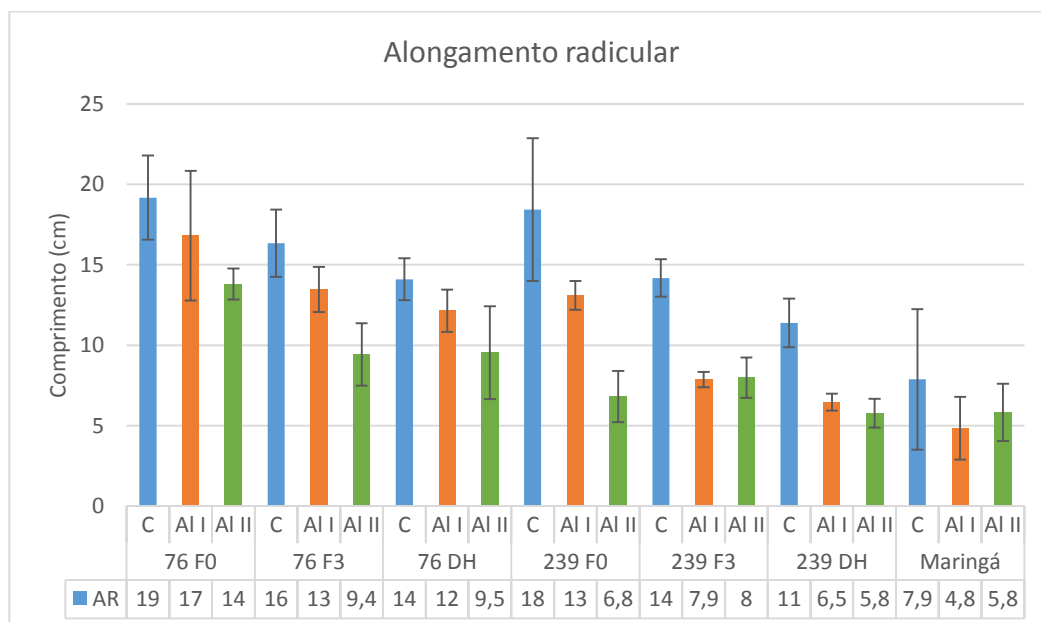


Figura 16: Representação gráfica do alongamento radicular das diferentes gerações em cada variante experimental. Barras a azul dizem respeito ao controlo (C), barras a laranja referem-se às plantas expostas a 100 μ M de alumínio (Al I) e barras verdes representam as plantas expostas a 200 μ M de alumínio (Al II).

A partir destes valores foram calculados os Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração. Os resultados encontram-se na tabela 7.

Tabela 7: Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração para as diversas linhas testadas para o alongamento radicular.

Linha	Tratamento	Is	Ir intrageração	Ir intergeração
76 F₀	C	-	0,82	-
	Al I	0,88		
	Al II	0,72		
76 F₃	C	-	0,70	-
	Al I	0,82		0,80
	Al II	0,58		0,68
76 DH	C	-	0,79	-
	Al I	0,86		0,72
	Al II	0,68		0,69
239 F₀	C	-	0,52	-
	Al I	0,71		
	Al II	0,37		
239 F₃	C	-	1,02	-
	Al I	0,55		0,6
	Al II	0,56		1,17
239 DH	C	-	0,89	-
	Al I	0,57		0,49
	Al II	0,51		0,85
Maringá	C	-	1,20	-
	Al I	0,61		
	Al II	0,74		

De uma forma geral, foi possível verificar que as plantas colocadas nas condições controlo tinham um desenvolvimento radicular superior, uma vez que todos os índices de suscetibilidade têm valores inferiores a um. É possível afirmar que quanto maior for a concentração de alumínio, menor será o alongamento radicular à exceção do ISOP 239 F₃ e do padrão Maringá, onde houve maior crescimento da raiz na solução de alumínio II do que na solução de alumínio I, que resulta num índice de resistência intrageração superior a um. Verificou-se pelo índice de resistência intergeração que tanto a variedade 76 como na 239, houve uma diminuição da resistência com o apuramento das gerações e formação das linhas DH, com exceção do ISOP 239 F₃, onde se verifica que na variante alumínio II há um aumento do alongamento radicular comparativamente com a variante alumínio II do ISOP 239 F₀. Este resultado poderá indicar que houve apuramento na geração F₃ de outro mecanismo de

tolerância ao alumínio em elevadas concentrações. De um modo generalizado, as plantas da variedade 76 demonstraram possuir maior alongamento radicular do que a variedade 239, o que vem de acordo com o descrito anteriormente, onde a primeira variedade seria mais tolerante ao alumínio e a segunda seria mais sensível a este catião [14].

Os dados do alongamento radicular foram analisados estatisticamente de forma a confirmar a sua significância. Na tabela 8 encontram-se os resultados do teste estatístico ANOVA, onde é possível verificar a significância dos resultados do alongamento radicular ou a probabilidade destes terem sido obtidos ao acaso.

Tabela 8: Resultados obtidos pelo teste *Two-Way* ANOVA, com os valores do alongamento radicular por linha e tratamento. O termo “linha” refere-se às diferentes gerações ou linhas haplodiplóides de cada uma das variedades e a expressão “tratamento” diz respeito às variantes experimentais (controlo, alumínio I e alumínio II).

Origem	ANOVA (Z)	p
Linha	54,642*	0,000
Tratamento	116,870*	0,000
Linha x Tratamento	4,942*	0,000

* A correlação é significativa no nível 0,01.

De acordo com o teste estatístico, existem diferenças significativas ($p \leq 0,01$) entre as diferentes linhas, os diferentes tratamentos e entre os tratamentos dentro da mesma linha. Isto significa que o alumínio está realmente a colocar as plantas sobre stress, e este stress aumenta com o aumento da concentração de alumínio. Como resposta, as raízes não conseguem manter um crescimento e alongamento radicular normal. Segundo Wang [49], estes são resultados típicos de plantas que estão sobre stress. No mesmo estudo, foi demonstrado que uma variedade de trigo tolerante ao alumínio apresentou maior alongamento radicular com o aumento da concentração deste catião no meio hidropónico e com o consequente aumento da acumulação de alumínio nas raízes. Uma reação semelhante ocorreu no presente estudo, onde o padrão Maringá teve um desenvolvimento radicular superior na solução de alumínio II comparativamente com a solução de alumínio I. É possível especular que a variedade Maringá seja acumuladora e resistente ao alumínio e que portanto, se desenvolva melhor na presença

deste catiño, enquanto as variedades regionais sejam apenas tolerantes e demonstrem em termos comparativos diferentes graus de tolerância ou sensibilidade.

Analisando ainda os teste estatísticos *Post hoc* relativos ao alongamento radicular (Anexo 4), é possível verificar que apesar de no geral (tabela 8) haver significância entre todos os testes, analisando especificamente os tratamentos dentro da cada uma das linhas, existem amostras que se comportaram de forma semelhante pois apresentaram níveis de significância elevados ($p > 0,05$). Estes são os casos das amostras 76 F₃, 76 DH e 239 F₀. O facto destas amostras terem alongamentos radiculares relativos semelhantes poderá indicar que a tolerância ao alumínio por parte da variedade 76, ao contrário do que se pensava inicialmente, poderá não ter aumentado com o apuramento e criação da linha haplodiplóide e que a base genética da variedade foi submetida a um efeito de gargalo, durante a seleção, diminuindo a tolerância e aproximando-a da amostra 239 F₀.

Além do parâmetro mencionados anteriormente, foi também realizado o teste do Ericromo cianido R como teste de tolerância ou sensibilidade ao alumínio e para avaliar quais as variedades e respetivas linhas, cujos ápices radiculares das plantas se mantém viáveis ou sofrem ação nociva e apoptose celular. Os resultados deste teste são apresentados na figura 17.

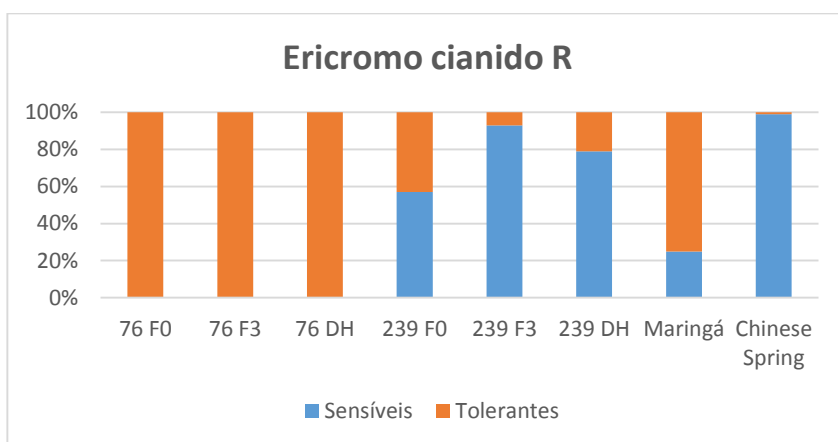


Figura 17: Resultados percentuais do teste do Ericromo cianido R em cada uma das linhas submetidas a 200 μ M de alumínio.

De acordo com os resultados obtidos nos testes do ericromo cianido R, todas as gerações da variedade 76 são tolerantes ao alumínio. Por outro lado, a maior parte dos indivíduos da variedade 239 são sensíveis, sendo que a sensibilidade aumenta ao longo das gerações. Estes resultados estão de acordo com a literatura e em conformidade com os restantes resultados obtidos nos diferentes parâmetros testados [12]. O padrão Maringá apresentou também, a

maioria dos indivíduos resistentes ao alumínio. Este resultado era expectável uma vez que, de acordo com a literatura, o trigo Maringá é bastante resistente ao alumínio [50]. Neste teste foi também avaliada outra variedade padrão, Chinese Spring, cuja tolerância ao alumínio é referida na literatura como moderada [51]. Esta variedade demonstrou que é bastante sensível na presença de 200 μM de alumínio, uma vez que cerca de 100% dos seus indivíduos sofreram apoptose celular após a exposição a esta concentração do catião.

A determinação da calose nas raízes de trigo foi realizada previamente, de acordo com dos Santos [46], para as variedades 76 e 239 e o padrão Maringá. Como padrão na determinação da calose foi utilizado o composto Pachyman. O conteúdo de calose nos tecidos foi expresso em mg equivalente Pachyman (PE) por g de raiz fresca. Os dados obtidos estão sumarizados na tabela 9.

Tabela 9: Valores médios para a produção de calose no padrão Maringá e nas amostras experimentais após 24 horas de exposição ao alumínio [14].

Amostra	Calose (mg PE/mg peso fresco)					
	Controlo	σ (Controlo)	100 μM AlCl_3	σ (100 μM AlCl_3)	200 μM AlCl_3	σ (200 μM AlCl_3)
Maringá	52,38	42,78	309,6	97,04	1310,26	112,81
76F₀	39,51	9,91	377,04	16,75	1755,12	285,84
76F₃	33,3	15,76	1136,58	140,77	2883,98	358,79
76DH	28,83	13,04	1382,45	28,36	2648,71	312,84
239F₀	101,84	28,27	4050,99	1231,21	4918,32	589,85
239F₃	63,9	14,04	4376,81	1322,44	6107,29	1304,56
239DH	74,24	12,47	3270,51	365,33	6982,63	985,92

Através dos resultados obtidos na tabela 9, foram calculados os Índices de suscetibilidade e de resistência para a calose, que se encontram na tabela 10.

Através do índice de suscetibilidade verifica-se que, em todas as linhas, houve um aumento considerável da produção de calose entre o controlo e as amostras expostas ao alumínio. Observa-se ainda que, quando expostas ao stress, as variedade 76 e Maringá produzem menor quantidade de calose comparativamente à variedade 239 pois apresentam índices de resistência intrageração superiores. Os índices de resistência intergeração informam que existem maiores diferenças entre as gerações do ISOP 76 do que entre as gerações da variedade 239.

Tabela 10: Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração para as diversas linhas testadas para a acumulação de calose.

Linha	Tratamento	Is	Ir intrageração	Ir intergeração
76 F ₀	C	-	4,65	-
	AI I	9,54		
	AI II	44,43		
76 F ₃	C	-	2,54	-
	AI I	34,13		3,01
	AI II	86,59		1,64
76 DH	C	-	1,92	-
	AI I	47,95		3,67
	AI II	91,87		1,51
239 F ₀	C	-	1,21	-
	AI I	39,78		
	AI II	48,29		
239 F ₃	C	-	1,40	-
	AI I	68,50		1,08
	AI II	95,58		1,24
239 DH	C	-	2,14	-
	AI I	44,05		0,81
	AI II	94,05		1,42
Maringá	C	-	4,23	-
	AI I	5,91		
	AI II	25,01		

Os resultados obtidos na produção de calose foram também analisados estatisticamente. Esses dados estão descritos na tabela 11.

Tabela 11: Análise estatística dos resultados da acumulação de calose por linha e tratamento, utilizando o teste *Two-Way* ANOVA.

Origem	ANOVA (Z)	p
Linha	79,585*	0,000
Tratamento	470,610*	0,000
Linha x Tratamento	27,725*	0,000

* A correlação é significativa no nível 0,01.

A tabela 11 demonstra que existem diferenças significativas ($p \leq 0,05$) na produção e acumulação de calose entre cada linha, entre cada tratamento e entre tratamentos da mesma linha. De acordo com Bhuja [37], a deposição de calose aumenta em plantas sensíveis com o aumento da concentração de alumínio. Os resultados obtidos para a produção de calose nas variedades 76, 239 e Maringá estão em concordância com esse estudo, uma vez que a primeira e última são variedades consideradas tolerantes e de facto apresentaram menor conteúdo de calose do que a segunda que é considerada sensível ao alumínio.

Ao analisar os dados estatísticos *Post hoc* presentes no Anexo 6, verificamos que as diferenças não são significativas ($p > 0,05$) entre as diferentes gerações do trigo 76 e o padrão Maringá. O mesmo acontece entre as distintas gerações do trigo 239. No entanto, ao observar a média dos valores obtidos para a produção de calose, parece evidente que existem diferenças entre cada geração. A discrepância entre os valores médios e os resultados obtidos estatisticamente poderão ser explicados pelas diferenças individuais de cada planta que se devem ao facto destas variedades se tratarem de *landraces*.

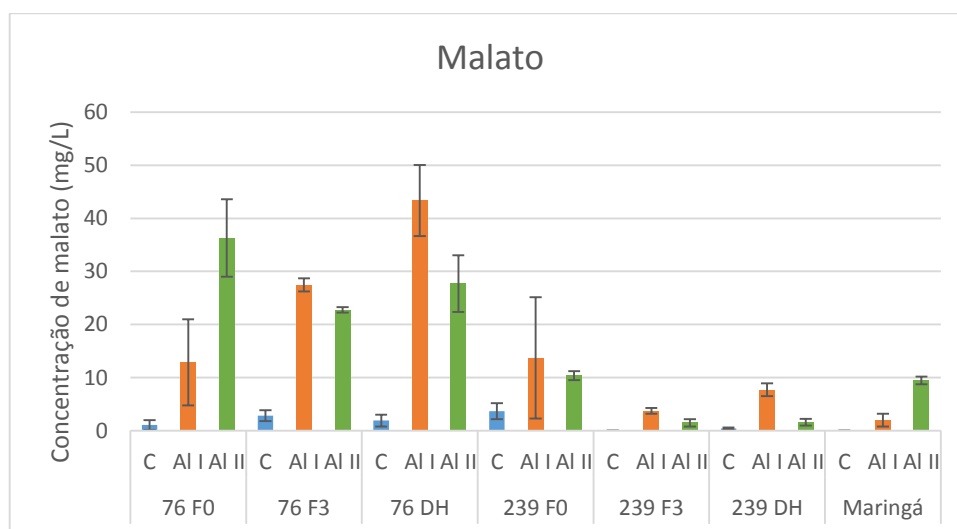


Figura 18: Representação gráfica da exsudação de ácido málico pelas diferentes linhas das variedades regionais 76 e 239 e do padrão Maringá. Os valores da concentração de malato nos exsudatos foram determinados por espectrofotometria com recurso ao *kit* L-Malic Acid, Megazyme.

Apesar desta situação, a variedade ISOP 76 na sua população inicial apresenta maior tolerância ao alumínio do que a variedade ISOP 239, e um comportamento em relação à presença ao alumínio que se aproxima do padrão de tolerância, Maringá, sendo que era objetivo deste trabalho compreender os fundamentos e o possível mecanismo dessa tolerância. As soluções das culturas hidropónicas das linhas e tratamento foram analisadas em relação à exsudação de ácidos orgânicos e proteínas. A exsudação de ácidos orgânicos foi determinada,

através de métodos enzimáticos. A concentração de malato exsudada para a solução de cultivo encontra-se representada na figura 18.

Através da determinação da concentração de malato presente nos exsudatos, foram calculados os respetivos índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração, apresentados na tabela 12.

Tabela 12: Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração para as diversas linhas testadas para a exsudação de malato.

Linha	Tratamento	Is	Ir intrageração	Ir intergeração
76 F₀	C	-	2,82	-
	Al I	11,92		
	Al II	33,58		
76 F₃	C	-	0,83	-
	Al I	9,74		2,14
	Al II	8,06		0,63
76 DH	C	-	0,64	-
	Al I	22,69		3,37
	Al II	14,51		0,76
239 F₀	C	-	0,76	-
	Al I	3,75		
	Al II	2,84		
239 F₃	C	-	0,40	-
	Al I	0		0,27
	Al II	0		0,14
239 DH	C	-	0,20	-
	Al I	18,38		0,56
	Al II	3,76		0,15
Maringá	C	-	4,75	-
	Al I	0		
	Al II	0		

De acordo com os dados obtidos para a concentração de malato presente nos exsudatos, de entre as variedades regionais analisadas, a variedade 76 em todas as suas gerações ou linhas foi a que demonstrou ter maior capacidade de exsudar malato (maior índice de resistência intrageração). As amostras controlo apresentaram concentrações muito reduzidas de malato, de modo que se pode afirmar que a exsudação de malato foi induzida pelo stress provocado pelo alumínio. De acordo com a literatura, a exsudação de malato pelo trigo é o principal mecanismo de tolerância ao alumínio em plantas resistentes [4, 22, 33]. Dessa forma, podemos afirmar que o ISOP 76 trata-se de uma variedade de trigo resistente a este catião. O padrão Maringá apresentou uma baixa exsudação de malato (figura 18), o que poderá significar

que esta variedade de trigo não se encontra sob stress na presença destas concentrações deste catião, ou então poderá possuir outros mecanismos de neutralização do alumínio que não passam pela exsudação deste ácido orgânico. Ao contrário do que seria de esperar, as gerações F₃ e DH da variedade 76 exsudaram maior quantidade de malato quando expostas a 100 µM de alumínio do que na presença de 200 µM deste catião (baixos valores de índice de resistência intrageração quando comparados com a linha 76 F₀ e maiores índices de resistência intergeração no tratamento Al I comparativamente com Al II). Este facto poderá indicar que estas gerações ou linhas ainda possuem alguma capacidade para tolerar o alumínio, utilizando o mecanismo de exsudação, quando se encontram numa concentração baixa (100 µM), mas que este não será tão eficaz na presença de uma concentração mais elevada (200 µM). Estes dados vêm de acordo com o que tinha sido observado para o alongamento radicular, onde se verificava que estas mesmas gerações tinham respostas semelhantes à amostra 239 F₀. Mais uma vez, os dados relativos à exsudação de malato indicam que a tolerância ao alumínio foi diminuída com o passar das gerações.

Da mesma forma, os exsudatos foram utilizados para determinar as quantidades de citrato exsudadas pelas diferentes variedades na presença do alumínio na solução hidropónica de cultivo. Os resultados dessas análises estão representados na figura 19.

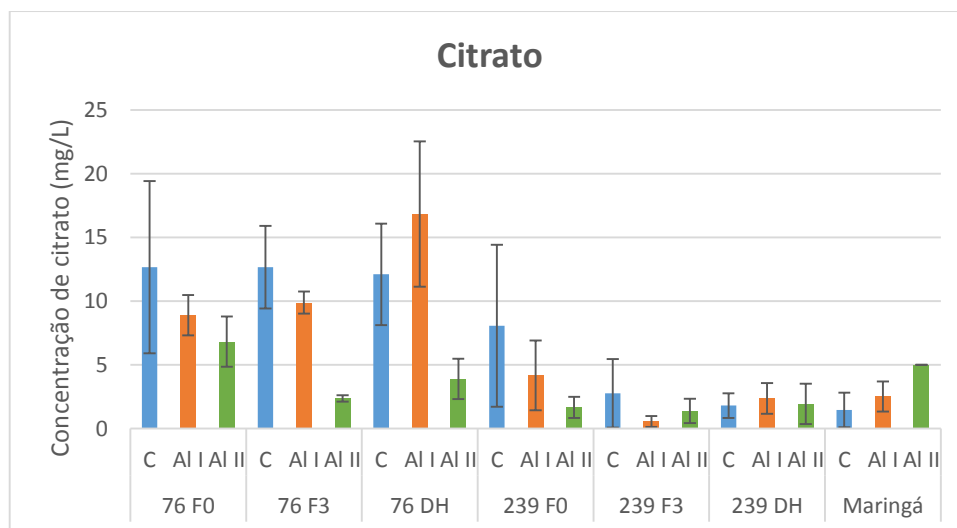


Figura 19: Exsudação de ácido cítrico pelas diferentes linhas das variedades regionais 76 e 239 e do padrão Maringá. Os valores da concentração de citrato nos exsudatos foram determinados por espectrofotometria com recurso ao *kit* Citric acid, Megazyme.

Com os valores da figura 19 foram calculados os índices de suscetibilidade e de resistência apresentados na tabela 13.

Tabela 13: Índices de suscetibilidade e de resistência intrageração e intergeração para as diversas linhas testadas para a exsudação de citrato.

Linha	Tratamento	Is	Ir intrageração	Ir intergeração
76 F ₀	C	-	0,77	-
	Al I	0,70		
	Al II	0,54		
76 F ₃	C	-	0,24	-
	Al I	0,78		1,11
	Al II	0,19		0,35
76 DH	C	-	0,23	-
	Al I	1,39		1,89
	Al II	0,32		0,57
239 F ₀	C	-	0,40	-
	Al I	0,52		
	Al II	0,21		
239 F ₃	C	-	2,48	-
	Al I	0,20		0,13
	Al II	0,50		0,83
239 DH	C	-	0,82	-
	Al I	1,31		0,57
	Al II	1,08		1,17
Maringá	C	-	2,00	-
	Al I	1,72		
	Al II	3,43		

No que diz respeito ao citrato, de forma geral as variedades apresentaram maior exsudação deste ácido orgânico no controlo (índices de suscetibilidade na sua maioria inferiores a um), o que demonstra que esta exsudação será realizada pela planta com outros objetivos, por exemplo promover a biodisponibilidade e absorção de nutrientes, e um decréscimo da sua exsudação ocorre nas amostras sob condições experimentais de stress.

De acordo com Ryan [22], o citrato é continuamente exsudado pelo trigo em condições normais (ausência de stresses). Wang [41] demonstrou que quando expostas ao alumínio, algumas variedades de trigo diminuem a produção e exsudação de citrato. Nestes casos a exposição ao alumínio leva a que a planta mobilize a sua energia para a produção e exsudação de malato, diminuindo consideravelmente a exsudação de citrato. No Maringá, observou-se um aumento da exsudação de citrato (índices de suscetibilidade superiores a um). Este incremento poderá estar relacionado com a baixa exsudação de malato, havendo recursos por parte da planta para a exsudação do citrato.

Os índices de suscetibilidade intrageração são, na maioria das vezes, inferiores a um, o que significa que a planta diminui a sua capacidade de exsudação com o aumento da concentração de alumínio presente na solução nutritiva.

Os resultados dos testes estatísticos realizados com os valores da quantidade de malato e citrato presentes nos exsudatos estão representados na tabela 14.

Tabela 14: Análise estatística dos resultados da exsudação de malato e citrato por linha e tratamento, utilizando o teste *Two-Way* ANOVA.

Origem	Malato		Citrato	
	ANOVA (Z)	p	ANOVA (Z)	p
Tratamento	19,550*	0,000	8,121*	0,001
Linha	9,559*	0,000	11,559*	0,000
Linha x Tratamento	3,685*	0,001	2,626**	0,011

* A correlação é significativa no nível 0,01.

** A correlação é significativa no nível 0,05.

Em geral existem diferenças significativas entre os tratamentos, entre as diferentes linhas e entre tratamentos na mesma linha ($p \leq 0,05$), tanto na quantidade de malato exsudado, como também na quantidade de citrato libertado pelas raízes. No entanto, se se analisarem os resultados *Post hoc* para estes testes (Anexo 5), podemos verificar que essas diferenças não ocorrem entre todas as linhas e tratamentos. Por exemplo, entre as linhas 76 F₃ e 76 DH, as diferenças não são significativas ($p > 0,05$) para o malato nem para o citrato, ou seja, a exsudação entre as duas não apresenta diferenças que nos permita considerar que as gerações apresentam diferenças no papel do mecanismo, na resposta ao metal. Apesar destes dados parecerem contraditórios, tendo em atenção o que é observado nas figuras 18 e 19, os gráficos são construídos com valores médios, enquanto os dados estatísticos baseiam-se na análise da variância de todos os valores observados. Para as amostras 76 F₃ e 76 DH, existe um desvio padrão elevado ($\sigma > 10,0$) em cada uma delas, o que faz com que a significância dos resultados esteja comprometida. O facto de terem sido obtidos resultados cujo desvio padrão é elevado poderá ser explicado pelo facto das amostras serem *landraces* e portanto serem constituídas por várias genéticas distintas [15, 16]. Desse modo, apesar de dentro de cada linha se considerar que todos os indivíduos são iguais, pode existir grande variabilidade genética que se traduz na variação do comportamento e tolerância de cada planta. Por sua vez, estas diferenças levarão à

existência de desvios padrões elevados e conseqüentemente à diminuição da significância observada entre os resultados.

Após os testes estatísticos mencionados anteriormente, foram feitos testes de correlações de Spearman para verificar a relação entre cada um dos parâmetros analisados. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 15.

Tabela 15: Análise de correlações entre os diversos testes realizados: alongamento radicular, concentrações de malato e citrato nos exsudatos e síntese de calose nas raízes, utilizando o coeficiente de Spearman.

		Alongamento radicular	Malato	Citrato	Calose
Alongamento radicular	Coeficiente de Correlação	1,000	-0,025	0,583*	-0,554*
	p	-	0,852	0,000	0,000
Malato	Coeficiente de Correlação	-0,025	1,000	0,290*	0,302*
	p	0,852	-	0,024	0,020
Citrato	Coeficiente de Correlação	0,583*	0,290*	1,000	-0,470*
	p	0,000	0,024	-	0,000
Calose	Coeficiente de Correlação	-0,554*	0,302*	-0,470*	1,000
	p	0,000	0,020	0,000	-

* A correlação é significativa no nível 0,05.

Tendo em atenção apenas os valores significativos ($p \leq 0,05$) podemos observar que com o aumento do alongamento radicular ocorre também o aumento da exsudação de citrato e diminuição da produção de calose. Por sua vez, o acréscimo da libertação de malato pelas raízes é acompanhado por um aumento ligeiro da exsudação de citrato e da produção de calose. Para além disso, o aumento da exsudação de citrato ocorre em simultâneo com o decréscimo da acumulação da calose nas raízes.

A análise da literatura permite perceber que em situações de stress o trigo aumenta a exsudação de malato e a produção de calose, diminuindo o alongamento radicular e aumentando ou decrescendo a exsudação de citrato, consoante a variedade analisada [4, 17, 22, 36]. Para as variedades em estudo foi observada uma reação típica das plantas sob stress

que apresentam alguma tolerância ao alumínio, com a diminuição do alongamento radicular uma vez que os ápices das raízes devem ser afetados, o aumento da produção de calose ois deveria haver ruptura da membrana celular, o aumento da exsudação de malato numa tentativa de proteger as raízes do alumínio e a diminuição da exsudação de citrato possivelmente porque todos os esforços são aplicados na produção e liberação de malato. Esta cadeia de acontecimentos ocorreu tanto no trigo 76 como no 239, apesar de ter maior intensidade na primeira variedade, o que nos leva a crer que esta apresenta maior tolerância ao alumínio. De acordo com Nunes-Nesi [52] também as plantas sensíveis ao alumínio têm a capacidade de exsudar ácidos orgânicos, sendo que este não é, por si só, um mecanismo de tolerância, mas sim o resultado de reações bioquímicas requeridas para a resistência ao alumínio. Segundo o mesmo estudo, o stress provocado pelo alumínio induz a síntese de piruvato, que conduz à produção de acetil-CoA, que por sua vez é o substrato do ciclo do ácido cítrico. Este ciclo leva à produção dos ácidos orgânicos secretados pelas raízes. Se assim for, o alumínio induz a produção de piruvato e indiretamente a de ácidos orgânicos em todas as plantas e a exsudação deverá depender totalmente da proteína transportadora, que neste caso é codificada pelo gene ALMT1.

Por seu lado, o padrão Maringá teve um comportamento ligeiramente diferente uma vez que não aumentou significativamente a exsudação de malato mas também não houve uma grande produção de calose, nem um decréscimo acentuado do alongamento radicular. Estes dados levam-nos a acreditar que o trigo Maringá é o mais tolerante de todos os trigos e linhas estudadas, uma vez que uma exsudação baixa de ácidos orgânicos é suficiente para assegurar o desenvolvimento da planta.

No estudo da composição dos exsudatos foi também analisada a possibilidade de exsudação de proteínas induzida pela presença do alumínio nas soluções da cultura hidropónica. Os resultados são apresentados na figura 20.

De acordo com Hamilton [42], podem ser exsudadas proteínas pela raiz em resultado do stress provocado pelo alumínio. No entanto, no presente estudo, a análise eletroforética, com a tecnologia de *chip* microfluídico, não detetou uma presença evidente de proteínas nos exsudatos, apesar de existirem indícios dessa possibilidade nalgumas linhas do ISOP 239. Esta possibilidade necessita de confirmação e estudo posterior, de modo a se poder afirmar que o stress induzido pelo alumínio não resulta na exsudação de proteínas. As bandas presentes no gel, assinaladas na figura 20 resultam do sistema e aparecem constantemente, quer no controlo, quer nas amostras expostas ao alumínio. Desse modo podemos aferir que, para estas variedades

de trigo, a exsudação de proteínas não se encontra envolvida como mecanismo significativo na neutralização e tolerância ao alumínio.

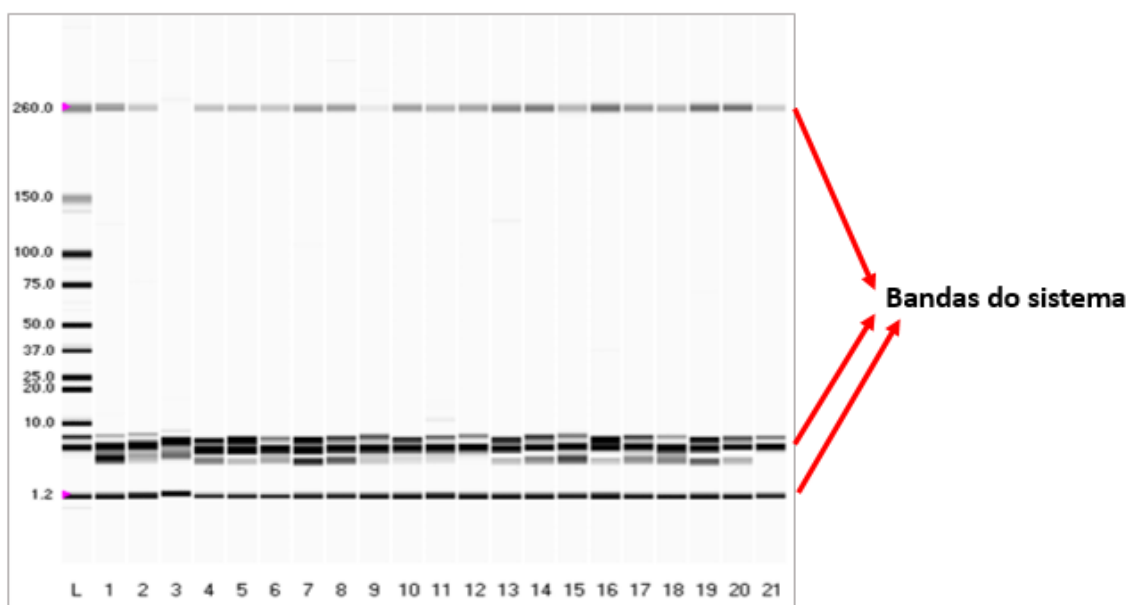


Figura 20: Gel de eletroforese obtido através da tecnologia de *chip* microfluídico. L- Marcador; 1- 76 F₀ Controle; 2- 76 F₀ Alumínio I; 3- 76 F₀ Alumínio II; 4- 76 F₃ Controle; 5- 76 F₃ Alumínio I; 6- 76 F₃ Alumínio II; 7- 76 DH Controle; 8- 76 DH Alumínio I; 9- 76 DH Alumínio II; 10- 239 F₀ Controle; 11- 239 F₀ Alumínio I; 12- 239 F₀ Alumínio II; 13- 239 F₃ Controle; 14- 239 F₃ Alumínio I; 15- 239 F₃ Alumínio II; 16- 239 DH Controle; 17- 239 DH Alumínio I; 18- 239 DH Alumínio II; 19- Maringá Controle; 20- Maringá Alumínio I; 21- Maringá Alumínio II.

Numa fase posterior à análise dos mecanismos de tolerância ao alumínio procedeu-se à extração de DNA e à deteção do gene *ALMT1*, com ajuda de marcadores moleculares específicos. Os resultados obtidos nas amplificações dos marcadores específicos são apresentados na tabela 16.

O marcador *SSR3a* que amplifica uma região de um intrão, foi amplificado nas amostras Chinese Spring, 76 F₀ e 239 F₀. Por outro lado, o marcador *SSR3b* apenas foi amplificado nas amostras 239 F₀ e F₃. Os resultados obtidos para a presença destes marcadores moleculares no padrão Chinese Spring estão de acordo com Raman [29]. No entanto, este autor refere a possibilidade de existir co-segregação de ambos os marcadores tanto em plantas sensíveis como em plantas tolerantes. No mesmo estudo é referido que o marcador específico *SSR3b* não amplifica no padrão Maringá, o que também foi observado no nosso estudo. A interpretação que poderá ser feita dos dados obtidos no presente estudo é que provavelmente existem sequências repetidas em tandem ao longo do intrão 3 do gene que codifica a proteína *TaALMT1*,

mas que, com a transição de uma geração para outra, essa característica foi perdida nas linhas F₃ e DH.

Tabela 16: Resultados das amplificações dos 5 marcadores moleculares específicos em cada variedade e respectivas linhas. **V** – amplificação positiva; **X** – ausência de amplificação.

Amostra	CAPS	SPF	LPF	SSR3a	SSR3b
Chinese Spring	V	V	V	V	X
Maringá	V	X	V	X	X
76 F ₀	V	X	V	V	X
76 F ₃	V	X	V	X	X
76 DH	V	X	X	X	X
239 F ₀	V	X	V	V	V
239 F ₃	V	V	V	X	V
239 DH	V	X	X	X	X

Tendo em atenção os dados relativos à exsudação de ácido málico e ao que foi observado nos testes de tolerância, pode-se perceber que, tanto no caso da variedade 76 como na variedade 239, houve uma diminuição da tolerância ao alumínio entre gerações e linhas haplodiplóides, e podemos pressupor que ambos os fenómenos estão associados, ou seja, que o desaparecimento das repetições de sequências, que estavam a ser marcadas com os marcadores moleculares SSR3a e SSR3b, poderão induzir a uma menor expressão do gene ALMT1, o que por sua vez resulta no decréscimo de tolerância ao alumínio.

Na tabela 17 são apresentados os pesos moleculares das bandas resultantes da amplificação dos marcadores SPF e LPF. Estes marcadores dizem respeito ao tipo de promotor presente no gene ALMT1.

Tabela 17: Pesos moleculares dos produtos da amplificação dos marcadores específicos SPF e LPF, com a identificação dos tipos de promotores do gene ALMT1.

Linhas	Peso das bandas (pb)	Peso das bandas (pb)	Tipo de promotor
	- SPF	- LPF	
Chinese Spring	612	1190 e 1993	I e III
Maringá	-	1600	VI
76 F ₀	-	1470	IV
76 F ₃	-	1470	IV
239 F ₀	-	1750	V
239 F ₃	612	1190	I

De acordo com Sasaki [53], o promotor do tipo I é o menor de todos, pois não apresenta a repetição de certas sequências e é, por essa razão, o que tem menor expressão e aparece menos associado à resistência ao alumínio. Por outro lado, os promotores V e VI têm 3 repetições de sequências que lhes conferem uma elevada expressão e tolerância ao alumínio às plantas que apresentam estes promotores. Os restantes promotores (II, III e IV) têm sequências repetidas por 2 vezes, o que resulta numa expressão intermédia. Segundo o mesmo estudo, o padrão Maringá deverá ter um promotor do tipo VI e o padrão Chinese Spring do tipo III, característica que foi confirmada pelo nosso estudo.

No atual estudo, verificou-se que o padrão Maringá e a amostra 239 F₀ tinham o promotor do tipo VI e V respetivamente, e que portanto deveriam ter uma elevada expressão do gene ALMT1. De acordo com os dados da exsudação do ácido málico não são estas amostras que apresentam maior exsudação de ácidos orgânicos, o que indica que deverão existir outros fatores que influenciam a expressão deste gene. As amostras 76 F₀ e F₃ apresentaram um promotor do tipo IV, ou seja, com uma expressão intermédia, enquanto a amostra 239 F₃ demonstrou ter um promotor do tipo I, com baixa expressão. Estes resultados são coerentes com o que foi observado na exsudação de ácidos orgânicos, muito embora o promotor do tipo IV seja referido por Sasaki [53] como transmitindo uma expressão e tolerância intermédia. Este facto poderá apontar para uma participação maior do promotor IV na expressão do gene ALMT1 ou para a existência na variedade 76 de outros mecanismos que potenciem a expressão do gene e a exsudação. O padrão Chinese Spring amplificou duas bandas diferentes, que foram identificadas como o promotor I e III. Segundo Raman [29], a presença de 2 ou mais promotores poderá indicar que esta variedade resulta da hibridização de trigos tetraploides com hexaploides. Ambos os promotores identificados para o trigo Chinese Spring não promovem a elevada expressão do gene, levando-nos a deduzir que este deverá ser o motivo pela qual esta variedade é considerada moderadamente tolerante ao alumínio.

Nas plantas das linhas haplodiplóides, não se detetaram amplificações dos marcadores moleculares SPF e LPF. De acordo com a análise feita aos exsudatos e ao alongamento radicular, estas linhas são as que apresentam menor tolerância ao alumínio em ambas as variedades. Esta ausência de amplificação poderá dever-se à inexistência de promotores no gene que codifica a proteína transportadora do malato, que nestas linhas é transmitido apenas pelo progenitor masculino (as linhas são obtidas a partir do pólen).

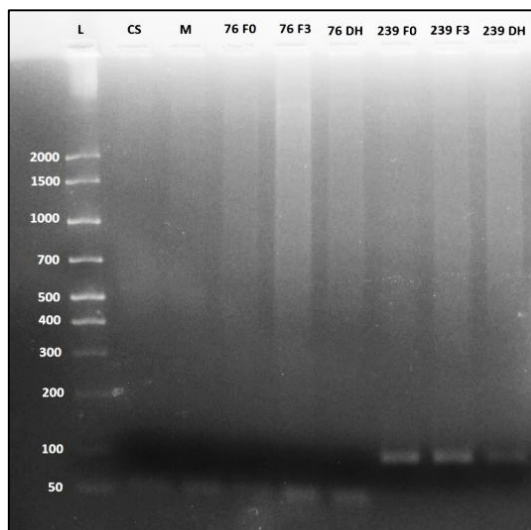


Figura 21: Gel de eletroforese (2,2% agarose) com as amostras após a restrição com a enzima XmnI para o marcador CAPS, onde L é o marcador, CS é o padrão de trigo Chinese Spring e M representa o padrão Maringá.

No que diz respeito ao marcador molecular CAPS, este foi amplificado em todas as amostras. Os produtos da amplificação do CAPS foram submetidos a uma posterior digestão enzimática e os produtos da dessa digestão são apresentados no gel da figura 17. De acordo com Sasaki [46], a digestão enzimática dos produtos de PCR do marcador CAPS permite distinguir entre plantas homozigóticas e heterozigóticas em relação ao gene que codifica a proteína *TaALMT1*. Após a digestão, no gel poderá aparecer uma banda a 107pb, ou seja, o DNA amplificado não foi digerido, ou duas banda com 57 e 50 pb. O primeiro resultado indica a homozigotia do alelo ALMT1-1. As 2 bandas, uma com 50 pb e outra com 57 pb, que resultam da digestão, não são muitas vezes passíveis de separar num gel de agarose, pois têm pesos moleculares muito semelhantes. A presença destas bandas indica que o alelo existente é o ALMT1-2 em homozigotia. Se o resultado forem 3 bandas, uma com 107 pb, outra com 57 pb e a restante com 50 pb, significa que a variedade é heterozigótica. Ainda de acordo com o mesmo estudo, o alelo ALMT1-1 aparece majoritariamente em trigos tolerantes, mas também pode estar presente em plantas sensíveis, enquanto o alelo ALMT1-2 encontra-se frequentemente ligado à suscetibilidade da planta ao alumínio.

Segundo um estudo levado a cabo por Raman [30], apesar do alelo ALMT1-2 estar comumente associado à sensibilidade ao alumínio, é este o alelo presente nas variedades Chinese Spring e Maringá que apresentam alguma tolerância a este catião. No presente estudo, observou-se ainda que também as diferentes gerações da variedade 76 são homozigóticas para este alelo pois apresentaram bandas na região dos 50 pb. Por outro lado, a variedade 239 não

sofreu restrição, ou seja, parece ser homozigótica para o alelo ALMT1-1. De acordo com Zhou [54], mais de metade das plantas resistentes ao alumínio não apresentam o alelo ALMT1-1 possivelmente devido a mutações que possam ocorrer em diversos sítios do gene ALMT1. Devido à existência destas e outras discrepâncias, este autor defende que, nem o marcador CAPS, nem os marcadores SSR3a e SSR3b podem ser usados no diagnóstico ou rastreio da tolerância ao alumínio.

O estudo da presença destes marcadores moleculares permite-nos afirmar que a variedade 76 é geneticamente mais semelhante aos padrões de tolerância Maringá e Chinese Spring do que a variedade 239. Juntamente com os dados obtidos pelo estudo do alongamento radicular, produção de calose e ericromo cianido R e análise dos exsudatos veio a confirmar-se que a variedade 76 tem realmente maior tolerância ao alumínio catiónico do que a variedade 239, não significando que esta não apresente alguma tolerância a este catião em baixas concentrações. Algumas disparidades apresentadas nos dados moleculares poderão dever-se ao facto de existirem outros genes que poderão modelar a expressão do gene ALMT1 e que não foram tidos em conta neste trabalho por ainda não se saber exatamente quais são e como atuam.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Após a realização deste trabalho verificamos que, de um modo geral, a variedade 239, mas também a variedade 76, em menor proporção demonstraram um comportamento típico de resposta ao stress nomeadamente o aumento da produção de calose (provavelmente devido à disrupção da membrana celular) e diminuição do alongamento radicular. Ambas aumentaram a exsudação de malato de forma a precipitar o alumínio, sendo que a variedade 76 demonstra ser mais eficiente na utilização deste mecanismo ou estratégia. A partir destes dados foi possível concluir que a variedade 76 tinha uma maior capacidade de tolerar este catião. Foi também observado que, ao contrário do que seria de esperar, a capacidade de tolerar o alumínio no trigo 76 diminuiu com os processos de apuramento (transição da geração F_0 para F_3) e com obtenção de linhas homozigóticas haplodiplóides, aproximando-se da geração 239 F_0 . Isto deverá significar que a hereditariedade da tolerância ao alumínio é mais complexa ou que o processo de seleção de uma variedade de trigo tolerante não decorreu da forma desejada e que será necessário recomeçar a seleção desde a geração inicial. Apurou-se ainda que o trigo Maringá teve um comportamento distinto das variedades regionais em estudo, uma vez que este não apresentou diferenças significativas nos parâmetros estudados entre as plantas controlo e as plantas sujeitas a alumínio. Neste padrão a tolerância ao alumínio não parece estar associada à exsudação de elevada quantidade de ácidos orgânicos, podendo ter outros mecanismos de tolerância ou capacidade de acumular alumínio sem que este prejudique o seu desenvolvimento e produtividade.

Nas variedades regionais não se detetou de forma evidente e comprovada a exsudação de proteínas, o que nos leva a concluir que a exsudação de ácidos orgânicos é o principal mecanismo de exsudação envolvido na tolerância ao alumínio destas variedades. Comparando os dados relativos à exsudação de malato e citrato, foi observado que quando a exsudação do primeiro aumenta, o segundo tende a diminuir, ocorrendo um efeito antagónico. Isto deverá significar que os esforços por parte da planta são mobilizados para a exsudação de malato, possivelmente porque este deverá ser mais eficaz a precipitar o alumínio.

No que concerne ao rastreio da tolerância ao alumínio utilizando marcadores moleculares, este indicaram que a variedade 76 é a que obteve resultados mais próximos dos padrões de tolerância Maringá e Chinese Spring. Estes dados vêm a reforçar a ideia de que esta variedade tem uma tolerância superior ao alumínio comparativamente com a variedade 239. As linhas DH não mostraram evidências de possuírem algum tipo de promotor para o gene ALMT1, motivo pela qual deverão ser menos tolerantes. Algumas discrepâncias foram encontradas para os

marcadores SSR e CAPS, que podem acontecer devido a pequenas mutações que ocorrem no DNA ou devido à existência de outros genes que modelam a tolerância ao alumínio. Dessa forma, concluiu-se que os marcadores SSR e CAPS não podem ser utilizados exclusivamente como diagnóstico de tolerância, mas que devem ser complementados com outros marcadores e com o estudo da exsudação de ácidos orgânicos.

Como perspectivas futuras ficam a possibilidade de repetir o ensaio da cultura hidropônica de modo a verificar a reprodutibilidade dos métodos utilizados e diminuir ou entender as discrepâncias que se observam no comportamento de alguns indivíduos considerados iguais quando expostos ao mesmo stress. Dessa forma haveriam desvios padrões menores que originariam resultados com maior significância. Num próximo estudo, deveria também ser analisada a expressão do gene ALMT1, uma vez que este foi detetado em todas as amostras e no entanto a quantidade de malato exsudada foi diferente consoante a linha.

5. Referências

1. Peleg Z, Fahima T, Korol A, Abbo S, Saranga Y. Genetic analysis of wheat domestication and evolution under domestication. *J Exp Bot* 2011; 62: 5051-5061.
2. Shewry PR. Wheat. *J Exp Bot* 2009; 60: 1537-1553.
3. Yang Y, Ji C, Ma W, Wang S, Wang S, Han W, Mohammat A, Robinson D, Smith P. Significant soil acidification across northern China's grasslands during 1980s–2000s. *Global Change Biol* 2012; 18: 2292–2300.
4. Ma JF, Ryan PR, Delhaize E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci* 2001; 6: 1360-1385.
5. Matonyei TK, Cheprot RK, Liu J, Piñeros MA, Shaff JE, Gudu S, Were B, Magalhaes JV, Kochian LV. Physiological and molecular analysis of aluminium tolerance in selected Kenyan maize lines. *Plant Soil* 2014; 377: 357-367.
6. Delhaize E, Gruber BD, Ryan PR. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Letters* 2007; 581: 2255-2262.
7. dos Santos TMM, Ganança F, Slaski JJ, Pinheiro de Carvalho MÂA. Morphological characterization of wheat genetic resources from the Island of Madeira, Portugal. *Genet Resour Crop Evol* 2009; 56: 363-375.
8. Ganança JFT, Abreu I, Sousa NF, Paz RF, Caldeira P, dos Santos TMM, Costa G, Slaski JJ, Pinheiro de Carvalho MÂA. Soil conditions and evolution of aluminium resistance among cultivated and wild plant species on the Island of Madeira. *Plant Soil Environ* 2007; 6: 239-246.
9. Madeira M, Furtado A, Jeanroy E, Herbillon AJ. Andisols of Madeira Island (Portugal). Characteristics and classification. *Geoderma* 1994; 62: 363-383.
10. Vieira A. A Madeira na Rota dos Descobrimento e a Expansão Atlântica vol. XXXIV. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical - Separata da Revista da Universidade de Coimbra, 1988. p. 571-580.
11. dos Santos TMM, Nóbrega H, Ganança JFT, Silva E, Afonso D, Gutiérrez AFM, Slaski JJ, Khadem M, Pinheiro de Carvalho MÂA. Genetic variability of high molecular weight glutenin subunits in bread wheat from continental Portugal, Madeira and Canary Islands. *Genet Resour Crop Evol* 2012; 59: 1377-1388.

12. Pinheiro de Carvalho MÂA, Slaski JJ, dos Santos TMM, Ganança FT, Abreu I, Taylor GJ, Clemente Vieira MR, Popova T, Franco E. Identification of Aluminum Resistant Genotypes Among Madeiran Regional Wheats. *Commun Soil Sci Plant Anal* 2003; 34: 2973-2985.
13. Castro PRC, Kluge RA. *Ecofisiologia de Cultivos Anuais*. São Paulo: Livraria Nobel S.A., 1999. p. 14-22.
14. Banco de Germoplasma ISOPlexis, Universidade da Madeira, 2015.
15. Bellucci E, Bitocchi E, Rau D, Nanni L, Ferradini N, Giardini A, Rodriguez M, Attene G, Papa R. Population Structure of Barley Landrace Populations and Gene-Flow with Modern Varieties. *PLos One* 2013; 8: 1-11.
16. Cebolla-Cornejoa J, Roselló S, Nueza F. Phenotypic and genetic diversity of Spanish tomato landraces. *Sci Hortic* 2013; 162: 150-164.
17. Poschenrieder C, Gunsé B, Corrales I, Barceló J. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Sci Total Environ* 2008; 400: 356-368.
18. Carver BF, Ownby JD. Acid soil tolerance in wheat. *Adv Agron* 1995; 54: 117-173.
19. Taylor JT. Current views of the Aluminum stress response; The physiological basis of tolerance. *Curr Top Plant Biochem and Phys* 1991; 10: 57-93.
20. Ma JF. Role of organic acids in detoxification of aluminum in higher plants. *Plant Cell Physiol* 200; 41: 383-390.
21. Wang H, Chen RF, Iwashita T, Shen RF, Ma JF. Physiological characterization of aluminium tolerance and accumulation in tartary and wild buckwheat. *New Phytol* 2015; 205: 273-279.
22. Ryan PR, Raman H, Gupta S, Horst WJ, Delhaize E. A Second Mechanism for Aluminum Resistance in Wheat Relies on the Constitutive Efflux of Citrate from Roots. *Plant Physiol* 2009; 149: 340-351.
23. Nelson D, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. Nova Iorque: Freeman and Company, 4ª ed., 2005. p. 601, 754, 791 e 792.
24. Happel O, Harms K, Seubert A. Synthesis and Structural Characterization of Two Aluminium Malate Complexes. *Z Anorg Allg Chem* 2007; 633: 1952-1958.
25. Sheehan CS. Malic Acid. *US Pharmacopeia*. Consultado em http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m47117.html no dia 23/06/2015.

- 26.** Sweetman C, Deluc LG, Cramer GR, Ford CM, Soole KL. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* 2009; 70: 1329-1344.
- 27.** de Noronha ALO, Guimarães L, Duarte HA. Structural and Thermodynamic Analysis of the First Mononuclear Aqueous Aluminum Citrate Complex Using DFT Calculations. *J Chem Theory Comput* 2007; 3: 930-937.
- 28.** Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L, Taylor GJ. Modulation of Citrate Metabolism Alters Aluminum Tolerance in Yeast and Transgenic Canola Overexpressing a Mitochondrial Citrate Synthase. *Plant Physiol* 2003; 132: 2205-2217.
- 29.** Raman H, Raman R, Wood R, Martin P. Repetitive indel markers within the ALMT1 gene conditioning aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breeding* 2006; 18: 171-183.
- 30.** Raman H, Ryan PR, Raman R, Stodart BJ, Zhang K, Martin P, Wood R, Sasaki T, Yamamoto Y, Mackay M, Hebb DM, Delhaize E. Analysis of TaALMT1 traces the transmission of aluminum resistance in cultivated common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 2008; 16: 343-354.
- 31.** Raman H, Raman R, Wood R, Martin P. Repetitive indel markers within the ALMT1 gene conditioning aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breeding* 2006; 18: 171-183.
- 32.** Ryan PR, Tyerman SD, Sasaki T, Furuichi T, Yamamoto Y, Zhang WH, Delhaize E. The identification of aluminium-resistance genes provides opportunities for enhancing crop production on acid soils. *J Exp Bot* 2011; 62: 9-20.
- 33.** Delhaize E, Ryan PR, Randall PJ. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiol* 1993; 103: 695-702.
- 34.** Borst KE, McNulty R. Analysis of aluminum(III) in water. Eastern Michigan University. Consultado em <https://www.emich.edu/chemistry/genchemLab/index.php> no dia 14/07/2015.
- 35.** Jones LH, Thurman DA. The determination of aluminium in soil, ash and plant materials using eriochrome cyanine R.A.. *Plant and Soil* 1957; IX: 131-142.
- 36.** Zhang G, Hoddinitt J, Taylor GJ. Characterization of 1,3-β-D-Glucan (Callose) Synthesis in Roots of *Triticum aestivum* in Response to Aluminum Toxicity. *J Plant Physiol* 1994; 144: 229-234.

- 37.** Bhujra P, McLachlan K, Stephens J, Taylor G. Accumulation of 1,3- β -D-glucans, in Response to Aluminum and Cytosolic Calcium in *Triticum aestivum*. *Plant Cell Physiol* 2004; 45: 543-549.
- 38.** Domingues AM, da Silva E, Freitas G, Ganança JF, Nóbrega H, Slaski JJ, Pinheiro de Carvalho MA. Aluminium tolerance in bean traditional cultivars from Madeira. *Revista de Ciências Agrárias* 2013; 36: 148-156.
- 39.** Megazyme International Ireland. L-Malic Acid Assay Procedure. Irlanda, 2012. p. 1-15.
- 40.** Megazyme International Ireland. Citric Acid Assay Procedure. Irlanda, 2014. p. 1-15.
- 41.** Badri D, Vivanco J. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ* 2009; 32: 666-681.
- 42.** Hamilton CA, Good AG, Taylor GJ. Induction of Vacuolar ATPase and Mitochondrial ATP Synthase by Aluminum in an Aluminum-Resistant Cultivar of Wheat. *Plant Physiol* 2001; 125: 068-2077.
- 43.** Bradová J, Matějová E. Comparison of the Results of SDS PAGE and Chip Electrophoresis of Wheat Storage Proteins. *Chromatographia* 2008; 67: S83-S88.
- 44.** Jones N, Ougham H, Thomas H, Pašakinskienė I. Markers and mapping revisited: finding your gene. *New Phytol* 2009; 183: 935-966.
- 45.** Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, Ryan PR, Delhaize E, Matsumoto H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *The Plant Journal* 2004; 37: 645-653.
- 46.** dos Santos TMM, Slaski JJ, Pinheiro de Carvalho MAA, Taylor GJ, Clemente Vieira MR. Evaluating the Madeiran wheat germplasm for aluminum resistance using aluminium-induced callose formation in root apices as a marker. *Acta Physiol Plant* 2005; 27: 297-302.
- 47.** Experion Pro260 Analysis Kit Instruction Manual. Bio-Rad Laboratories, Inc. P. 1-18.
- 48.** Chao S, Somers D. Wheat and Barley DNA Extraction in 96-well Plates. MAS Wheat. Consultado em http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/general_protocols/DNA_extraction_003.htm a 23/07/2015.
- 49.** Wang P, Bi S, Wang S, Ding Q. Variation of Wheat Root Exudates under Aluminum Stress. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 10040-10046.

50. Basu U, Godbold D, Taylor GJ. Aluminum Resistance in *Triticum aestivum* Associated with Enhanced Exudation of Malate. *J Plant Physiol* 1994; 144: 747-753.
51. Ma H, Bai G, Lu W. Quantitative trait loci for Aluminum resistance in wheat cultivar Chinese Spring. *Plant and Soil* 2006; 283: 239-249.
52. Nunes-Nesi A, Santos Brito D, Inostroza-Blancheteau C, Fernie AR, Araújo WL. The complex role of mitochondrial metabolism in plant aluminum resistance. *Trends Plant Sci* 2014; 19: 399-407.
53. Sasaki T, Ryan PR, Delhaize E, Hebb DM, 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 Physiol* 2006; 47: 1343-1354.
54. Zhou L, Bai G, Carver B. Identification of new sources of aluminum resistance in wheat. *Plant Soil* 2007; 297: 105-118.

Anexo 1: Composição das soluções nutritivas A, B, C e D.

Solução Nutritiva A

- 2 M Nitrato de cálcio tetrahidratado (Sigma-Aldrich);
- 0,6 M Nitrato de magnésio hexahidratado (Fluka);
- 0,6 M Nitrato de amónio (Sigma).

Solução nutritiva B

- 0,2 M Fosfato de dipotássio (Sigma-Aldrich);
- 0,2 M Sulfato de potássio (Sigma-Aldrich);
- 0,8 M Nitrato de potássio (Merck).

Solução nutritiva C

- 4 mM Cloreto de magnésio tetrahidratado (Merck);
- 12 mM Ácido bórico (Sigma-Aldrich);
- 1 mM Sulfato de zinco heptahidratado (Fluka);
- 0,3 mM Sulfato de cobre pentahidratado (Merck);
- 0,2 mM Molibdato de sódio dihidratado (Fluka).

Solução nutritiva D

- 20 mM Cloreto de ferro hexahidratado (Sigma)
- 20 mM EDTA dissódico (Fluka)

Anexo 2: Soluções experimentais

Solução Controlo:

- 1 mM Nitrato de cálcio tetrahidratado;
- 300 µM Nitrato de magnésio hexahidratado;
- 3,3 mM Nitrato de amónio.

Solução de alumínio I:

- 100 µM Cloreto de alumínio;
- 1 mM Nitrato de cálcio tetrahidratado;
- 300 µM Nitrato de magnésio hexahidratado;

- 3,3 mM Nitrato de amónio.

Solução de alumínio II:

- 200 µM Cloreto de alumínio;
- 1 mM Nitrato de cálcio tetrahidratado;
- 300 µM Nitrato de magnésio hexahidratado;
- 3,3 mM Nitrato de amónio.

Anexo 3: Soluções de extração do DNA

Tampão de extração:

- 0,1 M Tris-HCl (Sigma) pH 7,5
- 0,1 M EDTA (BDH) pH 8,0
- SDS (Fluka) a 1,25%

Tampão Tris-EDTA (TE) pH 8,0:

- 0,01 M Tris-HCl pH 8,0
- 1 mM EDTA pH 8,0

Anexo 4: Análise *Post hoc* (Bonferroni) – Alongamento radicular

Tabela 18: Análise *Post hoc* (teste de Bonferroni) que compara os valores médios do alongamento radicular de acordo com as variantes experimentais.

Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	p
Controlo	Alumínio I	4,055*	0,3993	0,000
	Alumínio II	6,775*	0,4011	0,000
Alumínio I	Controlo	-4,055*	0,3993	0,000
	Alumínio II	2,720*	0,4028	0,000
Alumínio II	Controlo	-6,775*	0,4011	0,000
	Alumínio I	-2,720*	0,4028	0,000

* A diferença média é significativa no nível 0,05.

Tabela 19: Análise *Post hoc* (teste de Bonferroni) que compara os valores médios do alongamento radicular de acordo com as diferentes linhas.

Linha (I)	Linha (J)	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	p
76 F₀	76 F ₃	3,797*	0,6128	0,000
	76 DH	4,949*	0,6128	0,000
	239 F ₀	4,097*	0,6128	0,000
	239 F ₃	7,008*	0,6128	0,000
	239 DH	8,875*	0,6128	0,000
	Maringá	10,716*	0,7031	0,000
76 F₃	76 F ₀	-3,797*	0,6128	0,000
	76 DH	1,152	0,5878	1,000
	239 F ₀	0,3	0,5878	1,000
	239 F ₃	3,211*	0,5878	0,000
	239 DH	5,078*	0,5878	0,000
	Maringá	6,919*	0,6814	0,000
76 DH	76 F ₀	-4,949*	0,6128	0,000
	76 F ₃	-1,152	0,5878	1,000
	239 F ₀	-0,852	0,5878	1,000
	239 F ₃	2,059*	0,5878	0,013
	239 DH	3,926*	0,5878	0,000
	Maringá	5,767*	0,6814	0,000
239 F₀	76 F ₀	-4,097*	0,6128	0,000
	76 F ₃	-0,3	0,5878	1,000
	76 DH	0,852	0,5878	1,000
	239 F ₃	2,911*	0,5878	0,000
	239 DH	4,778*	0,5878	0,000
	Maringá	6,619*	0,6814	0,000
239 F₃	76 F ₀	-7,008*	0,6128	0,000
	76 F ₃	-3,211*	0,5878	0,000
	76 DH	-2,059*	0,5878	0,013
	239 F ₀	-2,911*	0,5878	0,000
	239 DH	1,867*	0,5878	0,038
	Maringá	3,708*	0,6814	0,000
239 DH	76 F ₀	-8,875*	0,6128	0,000
	76 F ₃	-5,078*	0,5878	0,000
	76 DH	-3,926*	0,5878	0,000
	239 F ₀	-4,778*	0,5878	0,000
	239 F ₃	-1,867*	0,5878	0,038
	Maringá	1,841	0,6814	0,161
Maringá	76 F ₀	-10,716*	0,7031	0,000
	76 F ₃	-6,919*	0,6814	0,000
	76 DH	-5,767*	0,6814	0,000
	239 F ₀	-6,619*	0,6814	0,000
	239 F ₃	-3,708*	0,6814	0,000
	239 DH	-1,841	0,6814	0,161

* A diferença média é significativa no nível 0,05.

Anexo 5: Análise *Post hoc* (Bonferroni) – Malato e Citrato

Tabela 20: Análise *Post hoc* (teste de Bonferroni) que compara os valores médios das concentrações de malato e citrato de acordo com as variantes experimentais.

Teste	Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	p
Malato	Controlo	Alumínio I	-15,041*	2,6209	0,000
		Alumínio II	-14,493*	2,6209	0,000
	Alumínio I	Controlo	15,041*	2,6209	0,000
		Alumínio II	0,548	2,6209	1,000
	Alumínio II	Controlo	14,493*	2,6209	0,000
		Alumínio I	-0,548	2,6209	1,000
Citrato	Controlo	Alumínio I	1,003	1,0493	1,000
		Alumínio II	4,449*	1,0493	0,000
	Alumínio I	Controlo	-1,003	1,0493	1,000
		Alumínio II	3,446*	1,0493	0,006
	Alumínio II	Controlo	-4,449*	1,0493	0,000
		Alumínio I	-3,446*	1,0493	0,006

* A diferença média é significativa no nível 0,05.

Tabela 21: Análise *Post hoc* (teste de Bonferroni) que compara os valores médios das concentrações de malato e citrato de acordo com as diferentes linhas.

Linha (I)	Linha (J)	Malato			Citrato		
		Diferença média (I-J)	Erro Padrão	p	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	p
76 F ₀	76 F ₃	-0,941	3,9070	1,000	1,160	1,5642	1,000
	76 DH	-7,581	3,9070	1,000	-1,485	1,5642	1,000
	239 F ₀	7,498	3,9070	1,000	4,827	1,5642	0,078
	239 F ₃	14,997*	3,9070	0,009	7,891*	1,5642	0,000
	239 DH	13,503*	3,9070	0,028	7,427*	1,5642	0,001
	Maringá	12,922	4,3682	0,110	6,475*	1,7488	0,014
76 F ₃	76 F ₀	0,941	3,9070	1,000	-1,160	1,5642	1,000
	76 DH	-6,641	3,9070	1,000	-2,646	1,5642	1,000
	239 F ₀	8,439	3,9070	0,777	3,667	1,5642	0,509
	239 F ₃	15,938*	3,9070	0,005	6,730*	1,5642	0,002
	239 DH	14,443*	3,9070	0,014	6,266*	1,5642	0,006
	Maringá	13,862	4,3682	0,062	5,315	1,7488	0,089
76 DH	76 F ₀	7,581	3,9070	1,000	1,485	1,5642	1,000
	76 F ₃	6,641	3,9070	1,000	2,646	1,5642	1,000
	239 F ₀	15,079*	3,9070	0,009	6,313*	1,5642	0,005
	239 F ₃	22,578*	3,9070	0,000	9,376*	1,5642	0,000
	239 DH	21,084*	3,9070	0,000	8,912*	1,5642	0,000
	Maringá	20,503*	4,3682	0,001	7,960*	1,7488	0,001
239 F ₀	76 F ₀	-7,498	3,9070	1,000	-4,827	1,5642	0,078
	76 F ₃	-8,439	3,9070	0,777	-3,667	1,5642	0,509
	76 DH	-15,079*	3,9070	0,009	-6,313*	1,5642	0,005
	239 F ₃	7,499	3,9070	1,000	3,063	1,5642	1,000
	239 DH	6,005	3,9070	1,000	2,599	1,5642	1,000
	Maringá	5,424	4,3682	1,000	1,648	1,7488	1,000
239 F ₃	76 F ₀	-14,997*	3,9070	0,009	-7,891*	1,5642	0,000
	76 F ₃	-15,938*	3,9070	0,005	-6,730*	1,5642	0,002
	76 DH	-22,578*	3,9070	0,000	-9,376*	1,5642	0,000
	239 F ₀	-7,499	3,9070	1,000	-3,063	1,5642	1,000
	239 DH	-1,494	3,9070	1,000	-0,464	1,5642	1,000
	Maringá	-2,075	4,3682	1,000	-1,416	1,7488	1,000
239 DH	76 F ₀	-13,503*	3,9070	0,028	-7,427*	1,5642	0,001
	76 F ₃	-14,443*	3,9070	0,014	-6,266*	1,5642	0,006
	76 DH	-21,084*	3,9070	0,000	-8,912*	1,5642	0,000
	239 F ₀	-6,005	3,9070	1,000	-2,599	1,5642	1,000
	239 F ₃	1,494	3,9070	1,000	0,464	1,5642	1,000
	Maringá	-0,581	4,3682	1,000	-0,952	1,7488	1,000
Maringá	76 F ₀	-12,922	4,3682	0,110	-6,475*	1,7488	0,014
	76 F ₃	-13,862	4,3682	0,062	-5,315	1,7488	0,089
	76 DH	-20,503*	4,3682	0,001	-7,960*	1,7488	0,001
	239 F ₀	-5,424	4,3682	1,000	-1,648	1,7488	1,000
	239 F ₃	2,075	4,3682	1,000	1,416	1,7488	1,000
	239 DH	0,581	4,3682	1,000	0,952	1,7488	1,000

* A diferença média é significativa no nível 0,05.

Anexo 6: Análise *Post hoc* (Bonferroni) – Calose

Tabela 22: Análise *Post hoc* (teste de Bonferroni) que compara os valores médios da quantidade de calose produzida de acordo com as variantes experimentais.

Tratamento (I)	Tratamento (J)	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	p
Controlo	Alumínio I	-2160,461*	127,2464	0,000
	Alumínio II	-3744,616*	125,1773	0,000
Alumínio I	Controlo	2160,461*	127,2464	0,000
	Alumínio II	-1584,155*	146,3379	0,000
Alumínio II	Controlo	3744,616*	125,1773	0,000
	Alumínio I	1584,155*	146,3379	0,000

* A diferença média é significativa no nível 0,05.

Tabela 23: Análise *Post hoc* (teste de Bonferroni) que compara os valores médios da quantidade de calose produzida de acordo com as diferentes linhas.

Linhas (I)	Linhas (J)	Diferença média (I-J)	Erro Padrão	p
76 F ₀	76 F ₃	-453,022	195,5088	0,500
	76 DH	-453,435	195,5088	0,498
	239 F ₀	-1724,476*	195,5088	0,000
	239 F ₃	-2084,203*	195,5088	0,000
	239 DH	-2031,635*	195,5088	0,000
	Maringá	137,616	195,5088	1,000
76 F ₃	76 F ₀	453,022	195,5088	0,500
	76 DH	-0,413	191,2114	1,000
	239 F ₀	-1271,453*	191,2114	0,000
	239 F ₃	-1631,181*	191,2114	0,000
	239 DH	-1578,613*	191,2114	0,000
	Maringá	590,638	191,2114	0,063
76 DH	76 F ₀	453,435	195,5088	0,498
	76 F ₃	0,413	191,2114	1,000
	239 F ₀	-1271,0408*	191,2114	0,000
	239 F ₃	-1630,769*	191,2114	0,000
	239 DH	-1578,201*	191,2114	0,000
	Maringá	591,051	191,2114	0,063
239 F ₀	76 F ₀	1724,476*	195,5088	0,000
	76 F ₃	1271,453*	191,2114	0,000
	76 DH	1271,041*	191,2114	0,000
	239 F ₃	-359,728	191,2114	1,000
	239 DH	-307,160	191,2114	1,000
	Maringá	1862,092*	191,2114	0,000
239 F ₃	76 F ₀	2084,203*	195,5088	0,000
	76 F ₃	1631,181*	191,2114	0,000
	76 DH	1630,769*	191,2114	0,000
	239 F ₀	359,728	191,2114	1,000
	239 DH	52,568	191,2114	1,000
	Maringá	2221,820*	191,2114	0,000
239 DH	76 F ₀	2031,635*	195,5088	0,000
	76 F ₃	1578,613*	191,2114	0,000
	76 DH	1578,201*	191,2114	0,000
	239 F ₀	307,160	191,2114	1,000
	239 F ₃	-52,568	191,2114	1,000
	Maringá	2169,252*	191,2114	0,000
Maringá	76 F ₀	-137,616	195,5088	1,000
	76 F ₃	-590,638	191,2114	0,063
	76 DH	-591,051	191,2114	0,063
	239 F ₀	-1862,092*	191,2114	0,000
	239 F ₃	-2221,820*	191,2114	0,000
	239 DH	-2169,252*	191,2114	0,000

* A diferença média é significativa no nível 0,05.