

182

Circular
TécnicaSete Lagoas, MG
Janeiro, 2013

Autores

Jurandir Vieira Magalhães
Eng.-Agr., Ph.D. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jurandir.magalhaes@embrapa.br

Claudia Teixeira Guimarães
Eng.-Agr., D.Sc. em Melhoramento Genético Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, claudia.guimaraes@embrapa.br

Flávio Dessaune Tardin
Eng.-Agr., D.Sc. em Produção Vegetal, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, flavio.tardin@embrapa.br

Robert Eugene Schaffert
Eng.-Agr., Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, robert.schaffert@embrapa.br

Reinaldo Lúcio Gomide
Eng.-Agr., Ph.D. em Agricultura de Precisão, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, reinaldo.gomide@embrapa.br

Camilo de Leis Teixeira de Andrade
Eng.-Agr., Ph.D. em Irrigação e Drenagem, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, camilo.andrade@embrapa.br

Paulo Emilio P. de Albuquerque
Eng.-Agric., D.Sc. em Irrigação e Drenagem, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, paulo.albuquerque@embrapa.br



Mapeamento de QTLs para a Tolerância à Seca em Sorgo com Ajustes para Características Fenológicas

A Tolerância à Seca em Sorgo

O sorgo é o quinto cereal mais produzido no mundo (FAO, 2010). Seus grãos são utilizados para a alimentação humana em vários países do continente africano, e no Brasil, o sorgo é destinado predominantemente à alimentação animal. Além disso, o sorgo tem grande potencial para a produção de etanol. Para a safra 2011/2012, estima-se que aproximadamente 1 milhão de hectares do território brasileiro serão dedicados ao cultivo de sorgo, produzindo aproximadamente 2,7 milhões de toneladas de grãos (CONAB, 2012).

Sorghum bicolor é considerada uma espécie que apresenta tolerância a estresses abióticos. Nessa espécie, podem ser encontrados genótipos particularmente tolerantes ao estresse causado pela seca, que têm importância primordial para a segurança alimentar mundial. Tendo em vista o aumento da área utilizada para produção de sorgo no Brasil e a incidência frequente de períodos de seca durante o ciclo da cultura, o desenvolvimento de cultivares adaptadas ao estresse de seca assume importância estratégica no panorama agrícola nacional.

Em sorgo, o estresse de seca pode ocorrer nos períodos vegetativos iniciais, durante o desenvolvimento das panículas e em pós-florescimento, no período entre o preenchimento dos grãos e a maturidade fisiológica (ROSENOW; CLARK, 1995; ROSENOW et al., 1997). No entanto, a fase mais crítica do estresse de seca é no pós-florescimento, podendo resultar em impactos negativos na produção da cultura.

O sorgo é considerado um dos cereais com maior tolerância à seca, o que se deve em parte a mecanismos como o *stay green*, que é caracterizado pela manutenção de caules e folhas verdes sob estresse de seca após o florescimento (SUBUDHI et al., 2000). Em sorgo, vários QTLs que controlam *stay green* foram identificados e esses QTLs conferem efeitos positivos na produção de grãos sob seca (HARRIS et al., 2007). A fonte mais comum de *stay green* tem sido historicamente a linhagem BTx642 (inicialmente chamada de B35), pertencente à raça Durra. Estudos prévios identificaram quatro QTLs de efeito maior para *stay green*, designados *Stg1*, *Stg2*, *Stg3* e *Stg4* (revisado por SABADIN et al., 2012). *Stg1* e *Stg2* estão localizados no cromossomo 3 de sorgo, explicando 20 e 30% da variação fenotípica para a característica, respectivamente. *Stg3* está localizado no cromossomo 2 e *Stg4* no cromossomo 4, respondendo por 16 e 10% da variação fenotípica, respectivamente.

Um impacto positivo da seleção para *stay green* na produção de grãos em condições de seca foi observado (BORRELL et al., 2000; JORDAN et al., 2003; KASSAHUN et al., 2009). Entretanto, poucos estudos relatam a colocalização de QTLs de produção de grãos com QTLs de *stay green*. O

aprofundamento desses estudos é necessário para embasar futuros esforços de seleção assistida com base em *stay green* com vistas à maior produção de grãos de sorgo sob estresse de seca.

O mapeamento de QTLs com base em modelos mistos apresenta vantagens significativas com relação a outras abordagens. Particularmente, esses modelos permitem a adoção de variâncias genéticas heterogêneas e correlações entre ambientes (BOER et al., 2007). Além disso, a estrutura da variância genética residual pode ser modelada em ensaios com múltiplos ambientes. Em consequência, esses modelos permitem a modelagem de relações complexas, como, por exemplo, a interação genótipo x ambiente, o que é particularmente importante em experimentos de tolerância à seca, onde esse tipo de interação é comum (CLARKE et al., 1992). Como resultado, a adoção de modelos mistos no mapeamento de QTLs resulta em estimativas mais confiáveis e realistas dos efeitos genotípicos.

Magalhães et al. (2011) relatam correlações significativas entre as variáveis fenológicas altura de planta e florescimento e as características produção de grãos e *stay green* avaliadas sob estresse seca. Esses resultados indicaram que, em estudos de mapeamento de QTLs ou mesmo na seleção de genótipos tolerantes à seca, medidas devem ser tomadas para evitar um efeito de confundimento de variações fenológicas no fenótipo de tolerância à seca. Como descrito por Pinto et al. (2010), o melhoramento para a tolerância à seca pode ser profundamente influenciado por escape devido a diferenças fenológicas na população. Assim sendo, a intensidade do estresse de seca torna-se variável, dependendo, por exemplo, da época de florescimento dos genótipos quando da imposição e do desenvolvimento do estresse hídrico. De fato, o tempo de florescimento tende a ser correlacionado com a produção de grãos (LUDLOW; MUCHOW, 1990).

O objetivo desse trabalho foi o de estudar a base genética da tolerância à seca em sorgo por meio do mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs), bem como estudar a

possível influência de variações fenológicas nos QTLs detectados. Para tanto, foram utilizadas linhagens recombinantes endogâmicas (*Recombinant Inbred Lines*, RILs) derivadas do cruzamento entre as linhagens de sorgo BR007 e SC283. Os resultados desse trabalho foram publicados na revista *Theoretical and Applied Genetics* (SABADIN et al., 2012).

Fenotipagem em Condições de Campo

Uma população de 90 RILs derivada do cruzamento entre as linhagens BR007 e SC283 foi fenotipada para a tolerância à seca em Janaúba (MG), localizada a 15° 45' 20" de latitude sul e 43° 16' 55" de longitude oeste e 535,37 m de altitude. Foram instalados experimentos em condições-controle e sob estresse de seca em pós-florescimento, no início do mês de junho, nos anos de 2006 e 2007. A irrigação foi aplicada duas vezes por semana, em sistema de aspersão com 12 m x 12 m (espaçamento entre aspersores) e 17 mm h⁻¹ de água. As condições-controle foram obtidas pela aplicação de água para repor completamente a água perdida com base na taxa de evapotranspiração, pela equação modificada de Penman-Monteith. O estresse hídrico foi obtido com base na curva de retenção de água do solo pela interrupção da irrigação 12 dias antes do florescimento, de maneira que a água do solo fosse reduzida para uma condição de estresse hídrico após o florescimento. Cada parcela consistiu de duas fileiras de 5 m, com 0,5 m entre fileiras e 12 plantas por metro. Os experimentos consistiram de blocos completos casualizados com três repetições em 2006 e alfa-lattice com três repetições e 10 blocos incompletos em 2007. Foram avaliados produção de grãos (ton ha⁻¹), *stay green* (% de folhas verdes estimada visualmente), altura de planta (média da distância entre a superfície do solo e a ponta da panícula) e florescimento (número de dias contados da emergência até 50% de florescimento, i.e., período no qual pelo menos 50% das plantas dentro de cada parcela apresentavam 50% de flores abertas).

Construção do Mapa Genético

Um mapa genético saturado foi construído com 344 marcadores moleculares, sendo 255 do tipo DArT (JACCOUD et al., 2001). Os detalhes relativos à construção do mapa genético foram descritos por Sabadin et al. (2012). Em resumo, o mapa genético foi obtido com o software Onemap versão 2.0-1 (MARGARIDO et al., 2007). Inicialmente, foram obtidas as frações de recombinação e estimativas de verossimilhança por meio de análise de dois pontos entre todos os pares de locos marcadores. Posteriormente, os marcadores foram atribuídos aos grupos de ligação com LOD mínimo de 5 e distância máxima de 30 cM com a função de mapeamento Kosambi (KOSAMBI, 1944). As funções “order” e “ripple” foram utilizadas para obter estimativa multiponto das distâncias genéticas e verossimilhanças. As sequências dos marcadores DArT e dos primers SSR foram utilizadas para ancorar os marcadores ao genoma do sorgo (<http://www.phytozome.net/sorghum>) utilizando BLASTN, com a opção filtro ativada. As informações de posição física foram utilizadas para consolidar a ordem e posição dos marcadores durante o desenvolvimento do mapa genético.

Mapeamento de QTLs

As etapas prévias do mapeamento de QTLs envolveram a utilização de mapeamento por intervalo simples, seguido do mapeamento por intervalo composto em ambientes individuais. O procedimento utilizado foi equivalente a uma regressão entre efeitos genéticos de natureza aleatória e preditores genéticos, que representam funções das probabilidades condicionais dos QTLs. Os testes para presença de QTLs foram conduzidos com um intervalo máximo de 2 cM. Os efeitos genotípicos foram particionados entre uma parte devida ao QTL e outra ao resíduo. O modelo final utilizado para a detecção de QTLs foi um modelo de múltiplos ambientes, definidos como combinações entre os tratamentos com disponibilidade hídrica (estresse hídrico/controlado) e o ano de avaliação (dois anos). Mediante

a análise em múltiplos ambientes, os efeitos genotípicos foram novamente particionados entre efeitos ambiente-específicos e resíduos, também ambiente-específicos. Para cada QTL, foi então testada a presença de QTLs com efeitos ambiente-específicos somente ou com interação QTL x ambiente.

Finalmente, para investigar um possível efeito de confundimento entre variações fenológicas e a tolerância à seca, QTLs para florescimento e altura de plantas foram utilizados como cofatores no modelo de detecção de QTLs para *stay green* e produção de grãos. A metodologia completa para a detecção de QTLs pode ser encontrada em Sabadin et al. (2012).

Detecção de QTLs para Características Fenológicas

Foram identificados quatro QTLs para florescimento (Figura 1A) e quatro QTLs para altura de planta (Figura 1B) na população de RILs. Com base na projeção no genoma do sorgo da sequência dos marcadores em regiões de QTLs, o QTL de efeito maior para altura de planta e florescimento localizado no cromossomo 9, provavelmente corresponde ao QTL *Sb-HT9.1* previamente detectado por Brown et al. (2008) na posição aproximada de 57.21 Mb no cromossomo 9. O QTL *Sb-HT9.1* apresenta interação epistática com *Dw3*, um dos quatro genes de nanismo identificados em sorgo (QUINBY, 1974). Por sua vez, o QTL para florescimento detectado no cromossomo 2 provavelmente corresponde ao loco de maturidade, *Ma5* (MACE; JORDAN, 2010). O loco de nanismo, *Dw2*, está ligado ao loco de maturidade, *Ma1*, no cromossomo 6 de sorgo (KLEIN et al., 2008), em região correspondente àquela do QTL para altura de planta identificado no cromossomo 6. Como não foi identificado um QTL também para florescimento na mesma região na população BR007 x SC283, infere-se que o loco *Ma1* é provavelmente monomórfico entre os parentais.

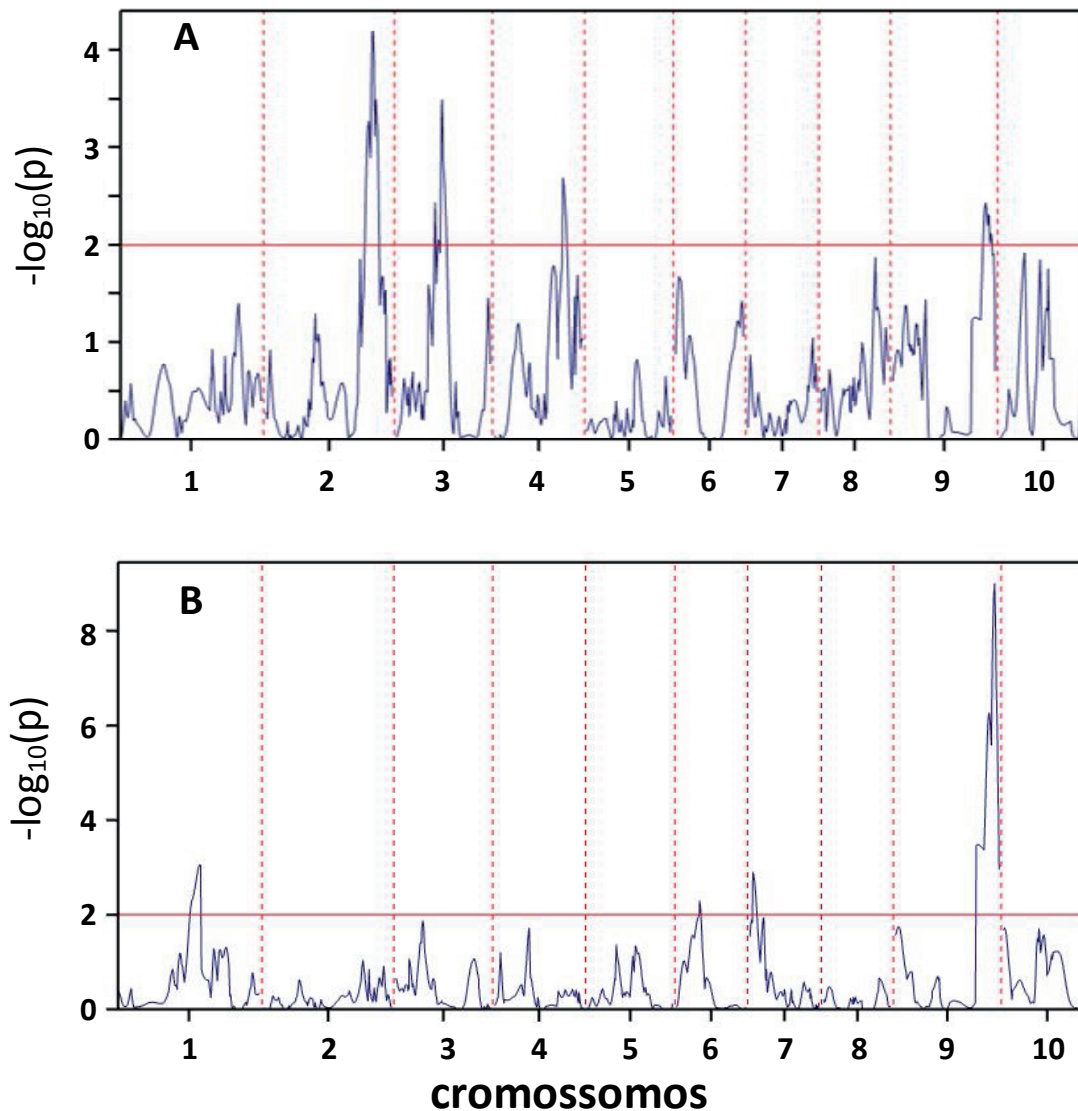


Figura 1. Representação gráfica dos QTLs para florescimento (A) e altura de planta (B) detectados por meio do modelo em múltiplos ambientes. A linha horizontal representa o limiar de 1% adotado para declaração de QTLs significativos.

Detecção de QTLs para Produção de Grãos e *Stay Green*

Foram detectados nove QTLs para produção de grãos e oito QTLs para *stay green*, considerando-se o modelo que integra todos os ambientes de forma simultânea (Figura 2). De maneira interessante, todos os QTLs de florescimento foram localizados em regiões próximas a QTLs de produção de grãos, e três foram localizados próximos a QTLs para *stay green*. Destaca-se o QTL para produção de grãos no cromossomo 9, que foi detectado com alto $-\log_{10}(p)$, tendo

efeito fenotípico pronunciado ($\sim 0.3 \text{ ton ha}^{-1}$) e explicando uma fração substancial da variação genética. Esse QTL também foi detectado para *stay green*.

Isolamento da Influência Fenológica no Mapeamento de QTLs para Produção de Grãos e *Stay Green*

A colocalização entre QTLs para florescimento/altura de planta e QTLs para *stay green* e produção de grãos sugere que variações em fenologia de fato podem ser a base de alguns dos QTLs detectados para tolerância à seca.

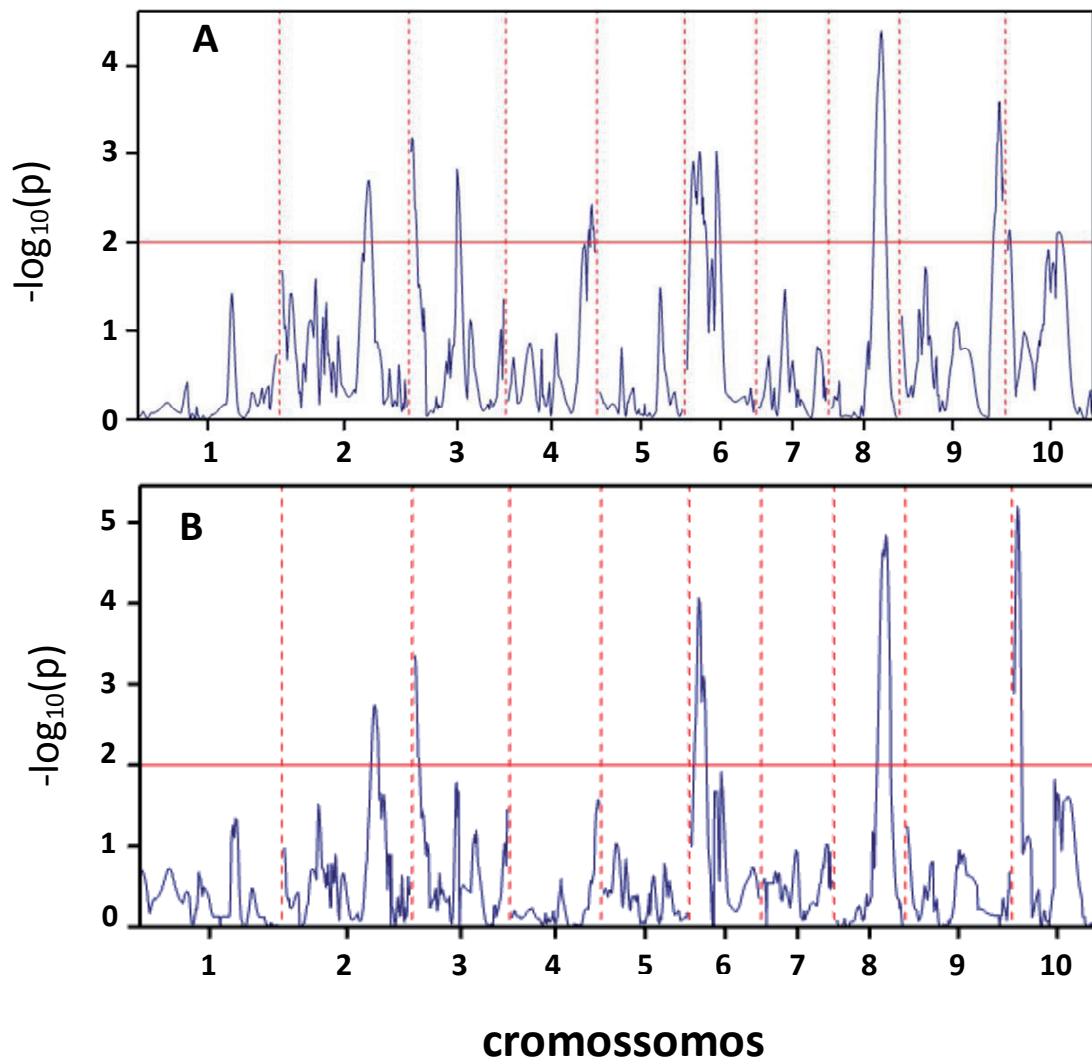


Figura 3. Representação gráfica dos QTLs para produção de grãos na ausência (A) e com a inclusão (B) de cofatores fenológicos. A linha horizontal representa o limiar de 1% adotado para declaração de QTLs significativos.

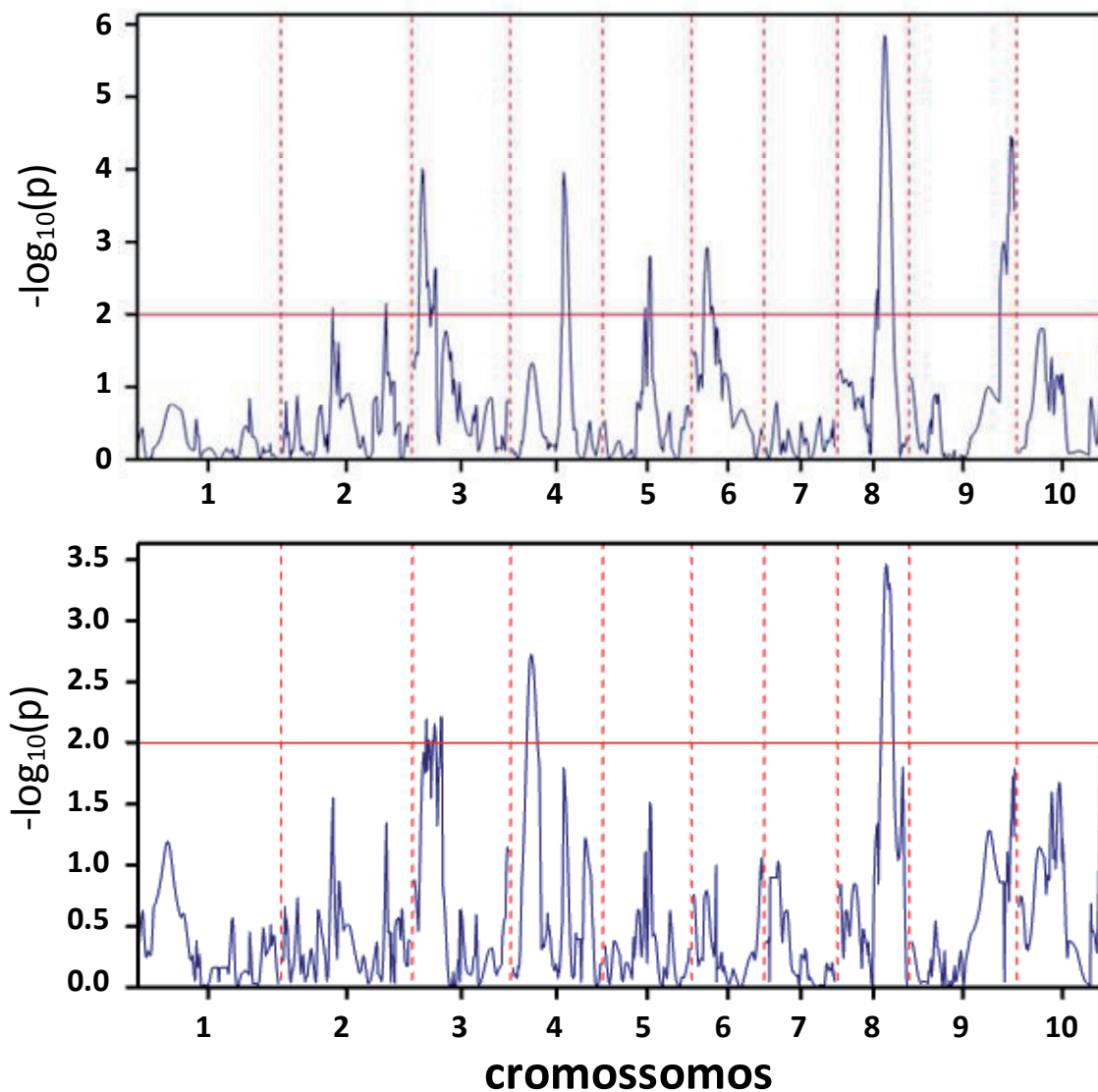


Figura 4. Representação gráfica dos QTLs para *stay green* na ausência (A) e com a inclusão (B) de cofatores fenológicos. A linha horizontal representa o limiar de 1% adotado para declaração de QTLs significativos.

Significância dos Resultados na Detecção de QTLs para Tolerância à Seca e Perspectivas Futuras de Melhoramento Molecular

Os resultados desse trabalho indicam que variações fenológicas podem exercer um forte efeito de confundimento na detecção de QTLs para tolerância à seca. Pela ancoragem dos marcadores em regiões de QTLs no genoma do sorgo, o loco *Sb-HT-9.1*, que está associado a variações em altura de planta e florescimento, exerce influência profunda nas características produção de grãos e *stay green* sob estresse hídrico. Além deste, o loco *Dw2*, que também controla altura de planta, bem como o loco de maturidade, *Ma5*, influenciam acentuadamente a detecção e QTLs para a tolerância à seca.

Um possível desdobramento desse estudo é o desenvolvimento de um programa de seleção recorrente assistida para a tolerância à seca em sorgo. Para implementação desse programa, torna-se necessário avaliar o fenótipo com tamanhos populacionais ampliados e em diferentes regiões geográficas, para que se tenha alta confiabilidade dos QTLs de tolerância a serem utilizados para a seleção recorrente assistida. Essa estratégia permite, ainda, o estudo da interação QTL x ambiente, o que é informação indispensável na elaboração de futuros programas de seleção assistida.

Conclusões

Os resultados aqui apresentados mostram claramente que, na ausência de controle para variações fenológicas, vários QTLs para *stay green* e produção de grãos são provavelmente consequência de escape, não sendo assim alvos preferenciais para programas de melhoramento molecular. A adoção de uma metodologia estatística específica permitiu o isolamento dessas variações fenológicas, permitindo a detecção de QTLs não relacionados com fenologia, e que podem se tornar candidatos preferenciais para programas de seleção assistida. Um exemplo é o QTL para *stay green* detectado no cromossomo 3, que está

colocalizado com um QTL para produção de grãos, com alelos associados a um aumento do fenótipo provenientes do mesmo parental, SC283. Deve-se notar que os parentais da população não diferem acentuadamente para altura de plantas e florescimento (SABADIN et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2011). Portanto, mesmo selecionando-se os parentais de maneira a minimizar diferenças fenológicas, a segregação transgressiva na progênie produz efeitos de confundimento acentuados. Medidas como escalonamento de plantio de maneira a uniformizar a introdução do estresse hídrico são desejáveis, mas de difícil aplicação prática. Dessa maneira, em conjunto com medidas para minimizar escapes, a metodologia apresentada representa uma estratégia altamente recomendável na detecção de QTLs relacionados com mecanismos de tolerância à seca em sorgo.

Referências

- BOER, M. P.; WRIGHT, D.; FENG, L.; PODLICH, D. W.; LUO, L.; COOPER, M.; VAN EEUWIJK, F. A. A mixed-model quantitative trait loci (QTL) analysis for multiple-environment trial data using environmental covariables for QTL-by-environment with an example in maize. **Genetics**, Austin, v. 177, p. 1801-1813, 2007.
- BORRELL, A. K.; HAMMER, G. L.; HENZEL, R. G. Does maintaining green leaf area in sorghum improve yield under drought? II. Dry matter production and yield. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1037-1048, 2000.
- BROWN, P. J.; ROONEY, W. L.; FRANKS, C.; KRESOVICH, S. Efficient mapping of plant height quantitative trait loci in a sorghum association population with introgressed dwarfing genes. **Genetics**, Austin, v. 180, p. 629-637, 2008.
- CLARKE, J. M.; DEPAUW, R. M.; TOWNLET-SMITH, T. F. Evaluation of methods for quantification of drought tolerance in wheat. **Crop Science**, Madison, v. 32, p. 723-728, 1992.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sétimo levantamento**, abril 2012.

- Brasília, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_11_15_04_18_boletim_abril_2012.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2012.
- FAO. **Statistical Database**. Roma, 2010. Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 17 nov. 2012.
- HARRIS, K.; SUBUDHI, P. K.; BORRELL, A.; JORDAN, D.; ROSENOW, D.; NGUYEN, H.; KLEIN, P.; KLEIN, R.; MULLET, J. Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 58, p. 327-338, 2007.
- JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 25, 2001.
- JORDAN, D. R.; TAO, Y.; GODWIN, I. D.; HENZELL, R. G.; COOPER, M.; McINTYRE, C. L. Prediction of hybrid performance in grain sorghum using RFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 106, p. 559-567, 2003.
- KASSAHUN, B.; BIDINGER, F. R.; HASH, C. T.; KURUVINASHETTI, M. S. Stay-green expression in early generation sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] QTL introgression lines. **Euphytica**, Wageningen, v. 172, p. 351-362, 2009.
- KLEIN, R. R.; MULLET, J. E.; JORDAN, D. R.; MILLER, F. R.; ROONEY, W. L.; MENZ, M. A.; FRANKS, C. D.; KLEIN, P. E. The effect of tropical sorghum conversion and inbred development on genome diversity as revealed by high-resolution genotyping. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. S12-S26, 2008.
- KOSAMBI, D. D. The estimation of map distance from recombination values. **Annals of Eugenics**, London, v. 12, n. 3, p. 172-175, 1944.
- LUDLOW, M. M.; MUCHOW, R. C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. **Advances in Agronomy**, New York, v. 43, p. 107-153, 1990.
- MACE, E. S.; JORDAN, D. R. Location of major effect genes in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 121, p. 1339-1356, 2010.
- MAGALHÃES, J. V.; SABDIN, P. K.; GUIMARÃES, C. T.; TARDIN, F.; SANTOS, F. G. dos; SCHAFFERT, R. E.; GOMIDE, R. L.; ANDRADE, C. de L. T. de; ALBUQUERQUE, P. E. P. de. **A influência de características fenológicas na avaliação da tolerância à seca em sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 165).
- MARGARIDO, G. R. A.; SOUZA, A. P.; GARCIA, A. A. F. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. **Hereditas**, Lund, v. 144, p. 78-79, 2007.
- PINTO, R. S.; REYNOLDS, M. P.; MATHEWS, K. L.; McINTYRE, C. L.; OLIVARES-VILLEGAS, J.-J.; CHAPMAN, S. C. Heat and drought adaptive QTL in a wheat population designed to minimize confounding agronomic effects. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 121, p. 1001-1021, 2010.
- QUINBY, J. R. **Sorghum improvement and the genetics of growth**. Texas: A & M University, 1974.
- ROSENOW, D. T.; EJETA, G.; CLARK, L. E.; GILBERT, M. L.; HENZELL, R. G.; BORRELL, A. K.; MUCHOW, R. C. Breeding for pre- and post-flowering drought stress resistance in sorghum. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GENETIC IMPROVEMENT OF SORGHUM AND PEARL MILLET, 1996, Lubbock, Texas. **Proceedings**. Cali: INTSORMIL: ICRISAT, 1997. p. 400-411.
- ROSENOW, D. T.; CLARK, L. E. Drought and lodging resistance for a quality sorghum crop. In: ANNUAL CORN AND SORGHUM INDUSTRY RESEARCH CONFERENCE, 5., 1995, Chicago. **Proceedings**... Chicago: American Seed Trade Association, 1995. p. 82-97.
- SABADIN, P.; MALOSETTI, M.; BOER, M.; TARDIN, F.; SANTOS, F.; GUIMARÃES, C.; GOMIDE, R.; CAMILO, A.; ALBUQUERQUE, P.; CANIATO, F.; MOLLINARI, M.; MARGARIDO, G.; OLIVEIRA, B.; SCHAFFERT, R.; GARCIA,

A.; EEUWIJK, F.; MAGALHAES, J. V. Studying the genetic basis of drought tolerance in sorghum by managed stress trials and adjustments for phenological and plant height differences.

Theoretical and Applied Genetics, New York, v. 124, p. 1389-1402, 2012.

SUBUDHI, P. K.; ROSENOW, D. T.; NGUYEN, H. T. Quantitative trait loci for the stay green trait in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): consistency across genetic backgrounds and environments. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, p. 733-741, 2000.

**Circular
Técnica, 182**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027 1100

Fax: (31) 3027 1188

E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2012): on line

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



**Comitê de
publicações**

Presidente: Presidente: Sidney Netto Parentoni.

Secretário-Executivo: *Elena Charlotte Landau.*

Membros: Flávia Cristina dos Santos Flávio
Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,
Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana
e Rosângela Lacerda de Castro.

Expediente

Revisão de texto: *Antonio Claudio da Silva Barros.*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro.*

Tratamento das ilustrações: *Tânia Mara A. Barbosa.*

Editoração eletrônica: *Tânia Mara A. Barbosa.*