

Melhoramento Molecular da Tolerância ao Alumínio em Sorgo



ISSN 1679-0154
Dezembro, 2013

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 90

Melhoramento Molecular da Tolerância ao Alumínio em Sorgo

Jurandir Vieira Magalhães
Claudia Teixeira Guimarães
Robert Eugene Schaffert

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: cnpms.sac@embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Dagma Dionísia da Silva, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro, Monica Matoso Campanha, Maria Marta Pastina, Rosângela Lacerda de Castro e Antonio Claudio da Silva Barros.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Claudia Teixeira Guimarães

1ª edição

1ª impressão (2013): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Magalhães, Jurandir Vieira.

Melhoramento molecular da tolerância ao alumínio em sorgo / Jurandir Vieira Magalhães, Cláudia Teixeira Guimarães, Robert Eugene Schaffert. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2013.

24 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1619-0154; 90).

1. *Sorghum bicolor*. 2. Marcador genético. Genética molecular. I. Guimarães, Cláudia Teixeira. II. Schaffert, Robert Eugene. III. Título. IV. Série.

CDD 633.174 (21. ed.)

© Embrapa 2013

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	10
Resultados e Discussão	13
Conclusões	21
Referências	22

Melhoramento Molecular da Tolerância ao Alumínio em Sorgo

Jurandir Vieira Magalhães¹

Claudia Teixeira Guimarães²

Robert Eugene Schaffert³

Resumo

A toxidez causada pelo alumínio (Al) danifica o sistema radicular, restringindo a absorção de água e de nutrientes, resultando em perdas de produção por culturas cultivadas em solos ácidos. A toxidez de Al restringe o aprofundamento do sistema radicular, potencializando ainda os efeitos deletérios do estresse causado pela deficiência hídrica na produção vegetal. Em sorgo, a tolerância ao Al é conferida em grande parte pelo loco Alt_{SB} , mapeado na porção terminal do cromossomo 3. O gene que condiciona o loco Alt_{SB} , denominado *SbMATE*, é um transportador de citrato induzido e ativado pelo Al, que detoxifica o Al pela exclusão do metal de sítios sensíveis nos

¹Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jurandir.magalhaes@embrapa.br

²Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Melhoramento Genético Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, claudia.guimaraes@embrapa.br

³Engenheiro Agrônomo, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, robert.schaffert@embrapa.br

ápices radiculares. Vários marcadores moleculares foram desenvolvidos para o loco Alt_{SB} para permitir o melhoramento molecular da característica. No entanto, para implementação desses programas, torna-se necessária a caracterização fenotípica extensiva do germoplasma à disposição do melhorista, além da elucidação do controle genético da tolerância ao Al. O presente boletim de pesquisa compreende a caracterização fenotípica para a tolerância ao Al de um painel formado por 255 linhagens de sorgo, bem como a caracterização do controle genético da tolerância nas principais fontes de tolerância identificadas no trabalho. De posse dessas informações, e com o auxílio dos marcadores moleculares ligados ao loco Alt_{SB} , pode-se proceder à escolha adequada das fontes de tolerância para programas de retrocruzamento assistido visando à tolerância ao Al em sorgo.

Termos para indexação: tolerância ao Al, sorgo, Alt_{SB} , *SbMATE*, marcadores moleculares, seleção assistida.

Molecular Improvement of Aluminum Tolerance in Sorghum

*Jurandir Vieira Magalhães*¹

*Claudia Teixeira Guimarães*²

*Robert Eugene Schaffert*³

Abstract

Aluminum (Al) toxicity on acid soils damages plant roots impairing water and nutrient absorption, thereby resulting in yield losses. Roots intoxicated by Al remain shallow, with restricted capacity to absorb water present in sub-superficial soil layers. Thus, Al toxicity enhances the deleterious effects of drought stress on crop yield. In sorghum, Al tolerance is conferred by the Alt_{SB} locus, which is located at the end region of sorghum chromosome 3. Within Alt_{SB} , SbMATE, an Al-induced and -activated citrate transporter confers Al tolerance via Al exclusion from sensitive sites in the root apex. Molecular markers tightly linked to the Alt_{SB} locus have been developed for molecular breeding purposes. However, extensive phenotypic characterization of Al tolerance of the germplasma available to the breeder, in addition to insights into the genetic control of Al tolerance are needed to set the stage for molecular breeding approaches based on the Alt_{SB} locus. Here we report on the Al tolerance characterization of 255 sorghum accessions and on the characterization of the genetic control underlying Al

tolerance for the major sources that were identified. With these information and using molecular markers linked to the Alt_{SB} locus, a breeder interested in improving sorghum Al tolerance can make reasonable choices with regards to accessions to be used as donors in backcross breeding programs.

Index terms: aluminum tolerance, sorghum, Alt_{SB} , *SbMATE*, molecular markers, marker assisted selection.

Introdução

A Tolerância ao Al em Sorgo

Com ampla distribuição no mundo (VON UEXKÜLL; MUTERT, 1995), os solos tropicais apresentam comumente valores baixos de pH em função do intemperismo intenso ao qual estão submetidos. Disso resulta a sua baixa fertilidade e a presença de formas iônicas, parcialmente protonadas de alumínio (Al), que causam fitotoxidez. A toxidez de Al provoca dano radicular, restringindo a absorção de água e de nutrientes, causando, finalmente, perdas de produção. Por essa razão, a tolerância ao Al é um componente vital do melhoramento genético de sorgo visando boa performance agrônômica em solos ácidos, sob toxidez de Al.

Estudos fisiológicos mostram que a tolerância à toxidez de Al envolve a exsudação de ácidos orgânicos ativada por Al, a partir de células presentes no ápice radicular (DELHAIZE et al., 2007). Mediante esse mecanismo, ocorre a formação de complexos estáveis entre os ácidos orgânicos e o Al, permitindo a manutenção da função e do crescimento radicular na presença de formas tóxicas de Al (MA et al., 2001; KOCHIAN et al., 2004).

Em sorgo, a tolerância ao Al é conferida pelo loco Alt_{SB} , que foi mapeado na porção terminal do cromossomo 3 (MAGALHÃES et al., 2004). Utilizando-se uma população de mapeamento derivada das linhagens BR007 e SC283, sensível e tolerante ao Al, respectivamente, pôde-se demonstrar que o loco Alt_{SB} controla uma fração significativa da variância para tolerância ao Al. Posteriormente, o gene responsável pelo loco Alt_{SB} foi isolado pela estratégia de clonagem posicional (MAGALHÃES et al., 2007). Esses trabalhos indicaram que um membro da família multigênica *Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family* (MATE), um transportador de citrato ativado e induzido por Al no ápice radicular (*SbMATE*), controla a tolerância ao Al via o loco Alt_{SB} .

Desde o mapeamento e a clonagem do gene de tolerância ao Al, a Embrapa Milho e Sorgo tem dispendido esforços para o desenvolvimento de um kit molecular que permita a implementação da seleção assistida para a tolerância ao Al em sorgo. Esses esforços incluem o desenvolvimento de marcadores moleculares ligados ao gene Alt_{SB} . Esses marcadores, tanto a seleção precisa do alelo tolerante em populações segregantes quanto a minimização do arraste genético em programas de retrocruzamento, pela seleção de eventos de recombinação simples em cada lado do loco de tolerância (CANIATO et al., 2007, 2011; SABADIN et al., 2012; MELO et al., 2013).

Um aspecto relevante que deve ser considerado em programas de melhoramento molecular para a tolerância ao Al em sorgo é a ocorrência de efeitos de *background* genético, que reduzem a expressão do gene *SbMATE* e, por conseguinte, a tolerância ao Al conferida pelo loco Alt_{SB} (MELO et al., 2013). Esse estudo,

conduzido em linhagens semi-isogênicas, indicou que é possível selecionar fontes de tolerância ao Al nas quais os efeitos de *background* genético são menos expressivos. Além disso, observa-se também a ocorrência de uma série alélica no loco Alt_{SB} (CANIATO et al., 2007; MELO et al., 2013), indicando que há potencial para seleção intraloco visando à identificação de alelos associados à alta tolerância ao Al.

Um dos pré-requisitos para programas de melhoramento molecular da tolerância ao Al é a caracterização fenotípica extensiva do germoplasma à disposição do melhorista. Além disso, torna-se necessário obter informações sobre o controle genético da característica, de maneira a garantir que marcadores moleculares ligados ao loco Alt_{SB} serão efetivos na seleção de progênie tolerantes. De posse dessas informações, e com o auxílio dos marcadores moleculares ligados ao loco Alt_{SB} , pode-se proceder a uma escolha adequada das fontes de tolerância para programas de retrocruzamento assistido visando à tolerância ao Al em sorgo.

O presente boletim de pesquisa compreende a caracterização fenotípica de um painel formado por 255 linhagens de sorgo para a tolerância ao Al, bem como a caracterização do controle genético da tolerância nas principais fontes de tolerância identificadas no trabalho. O germoplasma utilizado compreende o painel de referência de sorgo desenvolvido no âmbito do *Generation Challenge Programme* (<http://www.generationcp.org/>) (DEU et al., 2006; BILLOT et al., 2013), e representa grande parte da diversidade genética do sorgo cultivado. Além disso, estão incluídas 45 linhagens utilizadas no programa de melhoramento de sorgo da Embrapa Milho e Sorgo (CANIATO et al., 2007). Portanto, a intenção desse documento é

fornecer um guia contendo as informações necessárias para o estabelecimento de programas de melhoramento molecular da tolerância ao Al com base no loco Alt_{SB} em sorgo.

Materiais e Métodos

Análise de Tolerância ao Alumínio nas Linhagens Parentais e nas Linhagens Isogênicas

O painel de sorgo foi fenotipado para a tolerância ao Al em solução nutritiva seguindo-se os procedimentos descritos em Caniato et al. (2007, 2011), utilizando-se $27 \mu\text{M Al}^{3+}$ de atividade livre de Al em solução nutritiva. O Crescimento Líquido Relativo (CLR) foi calculado pela razão entre o crescimento radicular líquido obtido em solução nutritiva sob estresse de Al e o crescimento líquido na ausência de Al, considerando-se um período de 5 dias. Os valores foram expressos como porcentagem, considerando-se o crescimento do tratamento controle (ausência de Al). Linhagens altamente tolerantes ao Al foram então submetidas a 39 e $60 \mu\text{M Al}^{3+}$ para caracterização detalhada.

Controle Genético da Tolerância ao Al em Sorgo

O controle genético da tolerância ao Al foi inferido com base em diferentes evidências. Primeiramente, foram geradas populações de mapeamento a partir do cruzamento das fontes de tolerância de controle genético desconhecido com uma linhagem sensível ao Al. Procedeu-se então à análise de ligação nas populações segregantes utilizando-se CLR como fenótipo representativo da tolerância ao Al e marcadores ligados fortemente ao loco Alt_{SB} . São esses os

marcadores STS (*sequence tagged sites*) CTG29 e M181, S17 e S73. Os marcadores M181, S17 e S73 estão presentes no mesmo cromossomo artificial de bactéria (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC) no qual se encontra o gene *SbMATE*, estando, portanto, fisicamente ligados ao gene *SbMATE*. O marcador CTG29 está fortemente ligado ao loco Alt_{SB} a 0,5 cM. As associações entre os marcadores e os fenótipos foram estabelecidas por meio de análise de variância das variáveis fenotípicas relacionadas à tolerância ao Al, utilizando-se as classes genotípicas dos marcadores como variáveis de classificação (análise de marca simples), ou por meio de análise de intervalo simples, em populações F_2 , $F_{2:3}$ ou de retrocruzamento. O desenvolvimento e as análises genéticas conduzidas com esses marcadores estão descritos detalhadamente em Magalhães et al. (2007), Caniato et al. (2007, 2011).

Linhagens semi-isogênicas foram geradas pela introgressão assistida do loco Alt_{SB} de diferentes fontes de tolerância em um *background* genético sensível ao Al. As análises desses estoques genéticos para a tolerância ao Al permite validar a funcionalidade do gene *SbMATE* na linhagem doadora e promover a seleção intraloco em busca de alelos superiores. Esses resultados estão descritos detalhadamente em Caniato et al. (2007) e Melo et al. (2013).

Finalmente, para inferir a funcionalidade do gene *SbMATE* em uma dada fonte de tolerância, a expressão do gene de tolerância foi monitorada por RT-PCR quantitativo. Para isso, plântulas de sorgo foram cultivadas em solução nutritiva contendo 0 e 27 μM Al^{3+} de atividade de Al. Resumidamente, as sementes foram esterilizadas com 0,525% NaOCl e lavadas

com água destilada. Após três dias de germinação, as plântulas foram transferidas para copos de polietileno colocados em bandejas contendo 8 L de solução nutritiva sem Al (pH 4,0) sob aeração, em câmara de crescimento com temperaturas diurnas e noturnas de 27 e 20 °C, respectivamente, intensidade luminosa de 330 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e um fotoper\u00edodo de 12h. Ap\u00f3s 24h, a solu\u00e7\u00e3o nutritiva foi substituída por solu\u00e7\u00e3o contendo 27 $\mu\text{M Al}^{3+}$. Ap\u00f3s 5 dias de exposi\u00e7\u00e3o ao Al, o primeiro cent\u00edmetro de 21 \u00e1pices radiculares de cada gen\u00f3tipo foram coletados e imediatamente congelados a -80 °C. O RNA total foi extra\u00eddo utilizando o kit RNeasy Plant Mini (Qiagen), segundo recomenda\u00e7\u00f5es do fabricante, adicionando-se 10U da enzima DNase I, RNase-free (Qiagen), com 15 min de incubação em temperatura ambiente. A primeira fita do cDNA foi sintetizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) para um volume final de 20 μL , utilizando 2 μg de RNA total, RT Random primers e Transcriptase Reversa, conforme instruções do fabricante. A rea\u00e7\u00e3o de s\u00edntese procedeu-se a 25 °C por 10 min, 37 °C por 2h e 85 °C por 5 min. Esses resultados est\u00e3o descritos em Melo et al. (2013).

A express\u00e3o do gene *SbMATE* foi avaliada por meio de RT-PCR quantitativo no equipamento ABI Prism 7500 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando o kit *TaqMan Gene Expression* (Applied Biosystems), com a sonda desenhada para hibridiza\u00e7\u00e3o na jun\u00e7\u00e3o entre os exons 3 e 4, em regi\u00e3o monom\u00f3rfica do gene *SbMATE*. Dilui\u00e7\u00f5es seriadas foram feitas para obten\u00e7\u00e3o da curva padr\u00e3o para *SbMATE* e para RNA ribossomal 18S, utilizado como controle end\u00f3geno. As dilui\u00e7\u00f5es de cDNA que correspondem a 10 ng para analisar a express\u00e3o de *SbMATE* e 0,01 ng para 18S foram utilizadas nas rea\u00e7\u00f5es de PCR em tempo real. As

sequências dos primers e da sonda utilizados são: primers forward (F): 5'-CAGCCATTGCCCATGTTCTTT-3', reverse (R): 5'-ACCAGCTTGCTCAGCATTATCA-3' e sonda: 6FAM CCCAGTACCTGATAACGCTAMRA. A expressão endógena foi quantificada com o controle interno 18S RNA utilizando o *TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents* (Applied Biosystems). A quantificação relativa foi calculada usando o método CT comparativo, denominado $\Delta\Delta CT$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008), sendo adotadas três repetições técnicas nos experimentos.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra os resultados da fenotipagem para a tolerância ao Al no painel de sorgo. A maioria das linhagens, 80%, é sensível ao Al, com CLR<30%. Excluindo-se os derivativos de fontes conhecidas de tolerância, somente 5% das linhagens são altamente tolerantes ao Al. Em termos de escolha de fontes de tolerância para programas de retrocruzamento, recomenda-se que sejam selecionadas linhagens com CLR>60%, ainda que possam ser esperados ganhos em condições de tolerância inferiores a esse limite.

A Tabela 2 mostra os resultados de tolerância em atividades mais altas de Al³⁺, que permitem diferenciar linhagens altamente tolerantes. Os dados dessa tabela bem como trabalhos prévios indicam que as linhagens SC283 e SC566 são fontes preferenciais de tolerância ao Al em sorgo (CANIATO et al., 2007, 2011). Essas linhagens são altamente tolerantes ao Al e os respectivos alelos de tolerância são menos susceptíveis a efeitos de *background* genético (MELO et al., 2013)

Tabela 1. Avaliação da tolerância ao Al por meio do crescimento líquido relativo (CLR) estimado na presença e ausência de 27 μM Al^{3+} em solução nutritiva pH 4,0. A origem geográfica de cada linhagem está apresentada com os seguintes códigos: ARG, Argentina; BEN, Benin; BDI, Burundi; BFA, Burkina Faso; BRA, Brazil; BWA, Botswana; CAF, Central African Republic; CHN, China, CMR, Cameroon; DZA, Algeria; ETH, Ethiopia; GHA, Ghana; GMB, Gambia; IND, India; KEN, Kenya; KOR, South Korea; LKA, Sri Lanka; LSO, Lesotho; MLI, Mali; MWI, Malawi; NER, Niger; NGA, Nigeria; NPL, Nepal; RWA, Rwanda; SDN, Sudan; SEN, Senegal; SLE, Sierra Leone; SOM, Somalia; SWZ, Swaziland; TCD, Chad; TUR, Turkey; TZA, Tanzania; UGA, Uganda; USA, United States of America; YEM, Yemen; ZAF, Republic of South Africa; ZAR, Democratic Republic of the Congo (Zaire), ZMB; Zambia; ZWE, Zimbabwe. Origem racial (raça) de acordo com ICRISAT¹ e CIRAD²: B: bicolor; C: caudatum; D: durra; G: guinea; Gm: guinea margaritifera; K: kafir; DC: intermediate durra-caudatum; BC: intermediate bicolor-caudatum; GC: intermediate guinea-caudatum; KC: intermediate kafir-caudatum. SN indica grupos homogêneos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). ID: identificador para linhagens. Possíveis genitores recomendados para programas de retrocruzamento assistido estão sombreados.

Melhoramento Molecular da Tolerância ao Alumínio em Sorgo

ID	Origem	Raça ¹	Raça ²	CLR ₅₀ (%)	SN	ID	Origem	Raça ¹	Raça ²	RNRG ₅₀ (%)	SN
IS14351	MWI	G	G	262	m	IS14331	ZAF	G	G	30	b
SC283	TZA		G	157	l	IS14417	MWI	G	G	21	b
CMS226	BRA			163	l	IS16044	CMR	C	C	23	b
CMS227	BRA			139	j	IS17658	GHA	G	G	26	b
IS21519	MWI	G	G	113	i	IS20097	SEN	G	G	23	b
IS23142	TZA	D	D	163	i	IS22287	BWA	K	K	20	b
IS25077	GHA	G	G	120	i	IS22330	BWA	D	D	21	b
9929034				113	i	IS22332	BWA		KC	21	b
IS26457	BEN	G	G	97	h	IS22334	BWA	K	K	27	b
IS26554	BEN	G	G	95	h	IS22893	SDN	GC	GC	31	b
IS29691	ZWE	G	G	99	h	IS23178	ZMB	B	B	31	b
SC566	NGA		C	99	h	IS23254	ZMB	B	B	28	b
IS10801	TCD	GC	GC	78	g	IS24481	ZAF	K	K	29	b
5DX	UGA			89	g	IS24503	SEN			22	b
Brandes	USA			82	g	IS24887	NGA	G	G	20	b
SC175	ETH		C	87	g	IS25499	BDI	C	C	23	b
CMS225				85	g	IS25702	MLI	GC	GC	26	b
ATF14	BRA			77	g	IS25733	MLI	G	G	25	b
IS24139	TZA	G	G	66	f	IS26110	MLI	G	G	29	b
IS27490	BFA	G	G	67	f	IS27146	ZWE	D	D	21	b
9DX	UGA			61	f	IS28645	YEM	DC	DC	24	b
SC549	NGA		G	61	f	IS29233	SWZ	K	K	27	b
IS15148	CMR	C	C	51	e	IS29310	SWZ	GC	KC	20	b
IS15443	CMR	C	C	52	e	IS29375	LSO	GC	GC	21	b
IS21622	MWI	G	G	53	e	IS29407	LSO	K	KC	24	b
IS21849	SLE	G	Gm	51	e	IS29409	LSO	K	K	27	b
IS23666	GMB	G	Gm	53	e	IS29606	ZAF	K	K	22	b
IS23777	MWI	G	G	57	e	IS29872	ZWE	C	KC	24	b
IS23100	TZA	G	G	55	e	IS29911	ZWE	C	KC	20	b
IS24072	TZA	G	G	55	e	IS30443	CHN	C	CB	21	b
3DX	UGA			55	e	IS31559	BDI	C	C	25	b
IS3958	NPL	G	G	44	d	SSM232	BFA		G	25	b
IS12931	CHN	G	G	40	d	SSM249	BFA		G	20	b
IS16396	CMR	G	G	44	d	SSM261	BFA		Gm	27	b
IS19455	BWA	G	Gm	40	d	SSM275	BFA		Gm	23	b
IS20016	SEN	G	G	44	d	SSM276	BFA		G	23	b
IS20064	SEN	G	Gm	40	d	SSM501	NER		Gm	24	b
IS23644	GMB	G	Gm	44	d	SSM505	NER		D	28	b
IS23645	GMB	G	Gm	44	d	SSM1103	TCD		C	24	b
IS23669	GMB	G	Gm	46	d	SC112	ETH		C	24	b
IS25596	RWA	C	C	46	d	BR001	USA			23	b
IS19466	LKA	G	G	33	c	IS8577				26	b
IS19685	IND	G	G	33	c	Tx631	USA		KC	21	b
IS22282	BWA	B	B	35	c	V20	UGA			29	b
IS26041	MLI	G	G	33	c	9929020	BRA			29	b
IS27390	BFA	G	G	33	c	ARG1	USA/ARG			27	b
IS29876	ZWE	GC	C	38	c	9929030	BRA			25	b
CMS235	BRA			34	c	CMS182	BRA			25	b
IS2430	NGA	G	Gm	27	b	IS13	USA	B	B	15	a
IS2848	ZAF	C	C	21	b	IS303	CHN	KB	B	18	a
IS3780	CHN	GB	B	24	b	IS929	SDN	D	D	9	a
IS3905	MLI	G	G	27	b	IS1398	SDN	D	D	15	a
IS3957	NPL	G	G	27	b	IS2156	NGA	B	B	15	a
IS3959	NPL	G	G	31	b	IS2262	SDN	KC	C	8	a
IS3967	IND	G	G	30	b	IS2263	SDN	D	D	9	a
IS4963	IND	G	G	21	b	IS2398	ZAF	K	K	17	a
IS6745	BFA	G	G	21	b	IS2416	ZAF	K	K	16	a
IS7861	NGA	G	G	31	b	IS2787	KEN	C	C	16	a
IS7889	NGA	G	G	26	b	IS2807	ZWE	C	C	15	a
IS9597	NER	G	Gm	30	b	IS2814	ZWE	C	C	14	a
IS10194	BFA	GB	B	26	b	IS3073	SDN	C	C	14	a
IS10876	NGA	GC	C	23	b	IS3421	IND	G	G	17	a
IS11119	ETH	C	C	20	b	IS3511	SDN	KC	C	13	a
IS12179	ETH	B	B	22	b	IS3771	CHN	C	CB	13	a
IS12531	ETH	B	B	20	b	IS3971	IND	D	D	13	a
IS13989	ZAF	K	K	22	b	IS4027	IND	B	B	13	a
IS14317	SWZ	G	G	26	b	IS4285	IND	D	D	16	a

ID	Origem	Raça ¹	Raça ²	CLR _{sd} (%)	SN	ID	Origem	Raça ¹	Raça ²	RNRG _{sd} (%)	SN
IS4821	IND	D	D	12	a	IS30436	CHN	C	C	13	a
IS5430	IND	B	B	16	a	IS30441	CHN	C	C	15	a
IS5867	IND	DC	DC	9	a	IS30451	CHN	C	C	18	a
IS5972	IND	D	D	14	a	IS30538	KOR	B	B	10	a
IS6118	IND	DC	DC	19	a	IS31681	DZA	B	B	16	a
IS6193	IND	D	D	9	a	IS32569	SOM	D	D	10	a
IS6351	IND	D	D	11	a	IS33116	CMR	C	C	14	a
IS6828	BFA	G	G	19	a	IS33261	CMR	C	C	15	a
IS7287	NGA	C	G	5	a	IS33353	KEN	C	C	14	a
IS8685	SDN	C	C	10	a	SSM12	CMR		D	14	a
IS8882	UGA	C	C	17	a	SSM19	CMR		D	16	a
IS9303	ZAF	K	K	18	a	SSM29	CMR		D	9	a
IS9331	ZAF	K	C	19	a	SSM205	BFA		G	18	a
IS9468	ZAF	K	K	15	a	SSM215	ETH		C	19	a
IS9527	ZAF	K	K	17	a	SSM379	MLI		DC	15	a
IS10234	CAF	GC	C	13	a	SSM546	NER		C	8	a
IS10844	TCD	G	GC	18	a	SSM547	NER		C	15	a
IS10882	NGA	GC	C	15	a	SSM552	NER		G	19	a
IS11026	ETH	D	D	17	a	SSM557	NER		DC	15	a
IS11827	ETH	D	D	13	a	SSM625	NGA		D	19	a
IS12169	ETH	B	B	16	a	SSM964	SEN		D	12	a
IS12447	SDN	DC	GC	15	a	SSM973	SEN		G	7	a
IS12542	ETH	D	D	15	a	SSM1046	SEN		B	17	a
IS12804	TUR	B	B	16	a	SSM1049	SEN		Gm	16	a
IS13113	IND	B	B	19	a	SSM1057	SEN		DC	19	a
IS13452	ZWE	GC	C	16	a	SSM1102	TCD		DC	13	a
IS13791	ZAF	K	KC	19	a	SSM1123	NER		DC	15	a
IS13845	ZAF	K	K	10	a	SSM1267	CMR		B	17	a
IS13848	ZAF	C	C	19	a	SSM1284	ZAR		B	12	a
IS13926	ZAF	K	KC	20	a	SSM1370	ZAF		D	12	a
IS14414	MWI	G	G	12	a	SSM1592	TCD		D	12	a
IS15752	CMR	C	C	16	a	SSM1611	TCD		D	14	a
IS16101	CMR	D	D	12	a	SC414	SDN		KC	18	a
IS16125	CMR	C	C	15	a	BTx623	USA			16	a
IS16173	CMR	C	C	12	a	IS3620C	NGA		G	18	a
IS16186	CMR	C	D	11	a	9910032	BRA			18	a
IS16545	CMR	C	C	13	a	IS10622				15	a
IS19026	SDN	C	DC	8	a	Tx2785	USA			13	a
IS19132	SDN	GC	CB	12	a	Tx2784	USA			14	a
IS19453	BWA	D	D	12	a	CMS153	UGA			15	a
IS19847	IND	DC	DC	17	a	BR007	USA			12	a
IS19953	SEN	G	Gm	17	a	BR012	BRA			16	a
IS20351	NER	D	D	10	a	BTx644	USA			11	a
IS20689	USA	B	B	15	a	Tx430	USA			19	a
IS20706	USA	B	B	19	a	QL3	AUS			18	a
IS20727	USA	B	B	16	a	BTx643	USA			14	a
IS20864	CHN	C	C	16	a	CMS116	ETH		C	14	a
IS21124	KEN	C	C	15	a	BTx642	ETH		D	15	a
IS21891	USA	C	C	18	a	IS10317				16	a
IS22239	BWA	K	K	11	a	SC748	SDN		GC	13	a
IS22294	BWA	K	K	19	a	CMS156	USA			19	a
IS24009	USA	C	C	14	a	CMS912	USA			14	a
IS26731	ZAF	B	B	19	a	CMS180	BRA			17	a
IS26833	SDN	C	C	15	a	IS10562				16	a
IS27164	ZWE	K	K	18	a						
IS27891	ZAF	GC	GC	19	a						
IS28409	YEM	D	D	13	a						
IS29226	SWZ	GC	KB	12	a						
IS29496	LSO	K	K	17	a						
IS29569	LSO	K	K	18	a						
IS30030	ZWE	K	K	18	a						
IS30175	ZWE	G	G	18	a						
IS30352	CHN	DC	CB	17	a						
IS30385	CHN	C	C	12	a						
IS30400	CHN	C	KC	13	a						
IS30405	CHN	DC	BC	17	a						
IS30417	CHN	DC	BC	14	a						

Tabela 2. Avaliação da tolerância ao Al por meio do crescimento líquido relativo (CLR) estimado na presença e ausência de 39 e 60 $\mu\text{M Al}^{3+}$ em solução nutritiva pH 4,0. SN indica grupos homogêneos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). ID: identificador para linhagens. Fonte: Caniato et al. (2011).

ID	39 $\mu\text{M Al}^{3+}$		60 $\mu\text{M Al}^{3+}$	
	CLR _{5d} (%)	SN	CLR _{5d} (%)	SN
IS14351	103	d	47	c
IS21519	56	b	14	a
IS23142	52	b	18	b
IS25077	22	a	12	a
IS26457	27	a	13	a
IS26554	28	a	12	a
IS29691	29	a	17	b
SC566	78	c	18	b
IS10801	76	c	25	b
IS24139	25	a	16	b
IS27490	16	a	11	a
IS15148	33	a	12	a
IS15443	46	b	16	b
IS21622	25	a	16	b
IS21849	61	b	21	b
IS23666	22	a	12	a
IS23777	20	a	14	b
IS23100	75	c	16	b
IS24072	18	a	11	a
IS16396	32	a	10	a
IS23644	18	a	11	a
IS23645	21	a	12	a
IS23669	17	a	10	a
IS25596	18	a	11	a

A Figura 1 indica que as linhagens altamente tolerantes ao Al presentes no painel apresentam expressão elevada do gene *SbMATE* em ápices radiculares em relação às linhagens sensíveis BR007 e BR012. Isso indica que a tolerância ao Al nessas linhagens deve-se ao loco *Alt_{SB}*, ainda que haja variação alélica extensiva no loco de tolerância (CANIATO et al., 2011). Uma exceção é a linhagem IS29691, que apresenta baixa expressão do gene *SbMATE*. De fato, trabalhos anteriores indicaram que, ainda que o loco *Alt_{SB}* tenha um papel preponderante na tolerância ao Al em sorgo, outros locos de tolerância também existem no genoma da espécie, e podem ser utilizados para se explorar a segregação transgressiva para a tolerância ao Al em sorgo (CANIATO et al., 2007).

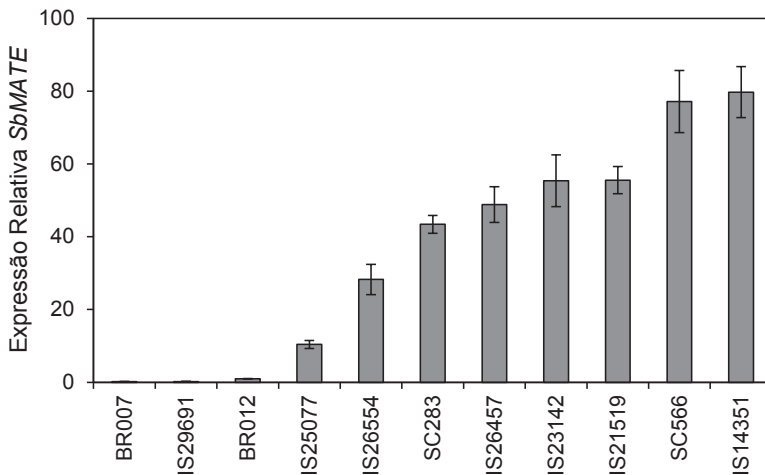


Figura 1. Perfil de expressão do gene *SbMATE* em linhagens de sorgo cultivadas em solução nutritiva pH 4,0 com 27 μM Al^{3+} . As linhagens padrões sensível e tolerante ao Al, BR007 e SC283, estão incluídas. A expressão na linhagem sensível, BR012, tratada com Al, foi utilizada como referência. Fonte: Caniato et al. (2011).

A Tabela 3 resume as evidências disponíveis para controle genético no loco Alt_{SB} para linhagens com CLR > 40%. Particularmente as linhagens com CLR > 60% e com evidências de controle genético da tolerância pelo loco Alt_{SB} podem ser utilizadas para programas de introgressão assistida.

Finalmente, a Tabela 4 resume as informações dos marcadores desenvolvidos para a seleção assistida para a tolerância ao Al baseada no loco Alt_{SB} . Outros marcadores que flanqueiam o loco Alt_{SB} a diferentes distâncias podem ser encontrados na Circular Técnica 162 (MAGALHÃES et al., 2011).

Tabela 3. Sumário das evidências que indicam controle genético da tolerância pelo loco Al/t_{SB} . ¹Magalhães et al. (2004), ²Caniato et al. (2007), ³Caniato et al. (2011), ⁴Melo et al. (2013), ⁵Caniato et al. (2013). A evidência associativa indica que uma dada linhagem possui um SNP associado com a tolerância ao Al (CANIATO et al., 2013).

Identificação	CLRs _{al} (%)	Ligação	Expressão	Isogênicas	Associação	Referência
IS14351	262	x	x		x	3,4,5
SC283	157	x	x	x	x	1,2,3,4,5
CMS226	163	derivativo SC283			x	
CMS227	139	derivativo SC283			x	
IS21519	113	x	x		x	3,5
IS23142	163		x			3
IS25077	120		x			3
9929034	113	derivativo SC283				
IS26457	97		x		x	3,5
IS26554	95		x		x	3,5
SC566	99	x	x	x	x	1,2,3,4,5
IS10801	78				x	5
5DX	89					
Brandes	82				x	5
SC175	87	x	x			2,5
CMS225	85	x	x	x	x	2,4,5
ATF14	77	derivativo SC283			x	
IS24139	66					
IS27490	67					
9DX	61	x				2
SC549	61	x			x	2,5
IS15148	51					
IS15443	52					
IS21622	53					
IS21849	51	x			x	3,5
IS23666	53				x	5
IS23777	57					
IS23100	55				x	5
IS24072	55					
3DX	55	x	x	x		2,4
IS3958	44					
IS12931	40					
IS16396	44				x	5
IS19455	40					
IS20016	44					
IS20064	40					
IS23644	44				x	5
IS23645	44	x			x	3,5
IS23669	46				x	5
IS25596	46					

Tabela 4. Marcadores moleculares para seleção assistida para a tolerância ao Al em sorgo. Detalhes dos marcadores podem ser encontrados nas referências fornecidas, incluindo um mapa global da região do loco Alt_{SB} no cromossomo 3 (SABADIN et al., 2012). “Arraste” indica que o marcador pode ser utilizado para redução do arraste genético enquanto Foreground indica marcadores para seleção do loco Alt_{SB} .

Loco	Primers	Sequencias	Posição (cM)	Uso	Referência
EM1	EM1F	5'-HEX-CATTTCTCCTTGGCCTGTG-3'	~20,0	Arraste	Sabadin et al. (2011)
	EM1R	5'-TATCTAAACGCACGCACTTTGT-3'			
DG1	DG1F	5'-6FAM-AGGAGGCCAAAGCTCAGCGAGTTC-3'	~20,0	Arraste	Sabadin et al. (2011)
	DG1R	5'-CACAGGGCACGGGCACAT-3'			
M1762	M1762F	5'-HEX-GCCTCTCCTCCTCCCTCC-3'	~24,0	Arraste	Sabadin et al. (2011)
	M1762R	5'-TCACGAATCGATCACCCGGTAAC-3'			
M9612	M9612F	5'-6FAM-TGAAACGGGGGAAAACCTCGCTAC-3'	~24,0	Arraste	Sabadin et al. (2011)
	M9612R	5'-CTAAGCGCGGTGAGGCTAGA3'			
CTG29	CTG29F	5'-HEX-ATGCAGTATCTGCAGTATCATT-3'	0,5	Foreground	Caniato et al. (2007)
	CTG29R	5'-AATCCGTCAGGTCAGCAATC-3'			
M181	M181F	5'-6FAM-AAGGCAA CAACTGAGGCACT-3'	0,1	Foreground	Caniato et al. (2007)
	M181R	5'-TCGCTAGAGTG GTGCAAGAA-3'			
S17	S17F	5'-GGCTGCCGTCCTTTCTCTGTCT-3'	0,0	Foreground	Caniato et al. (2011)
	S17R	5'-CCGGGCGCTGGGCTTCCT-3'			
S73	S73F	5'-AAGCGTGGCCAAATGAAATGA-3'	0,0	Foreground	Caniato et al. (2011)
	S73R	5'-GAGCCAACACGGGGAGAACAAGTC-3'			

Conclusões

De posse das informações fenotípicas e genotípicas descritas nesse boletim, foram fornecidos os subsídios necessários para a implementação de programas de seleção assistida para o aumento da produção de grãos de sorgo cultivado em solos ácidos, sob toxidez causada pelo Al.

Referências

BILLOT, C.; RAMU, P.; BOUCHET, S.; CHANTEREAU, J.; DEU, M.; GARDES, L.; NOYER, J.-L.; RAMI, J.-F.; RIVALLAN, R.; LI, Y.; WANG, T.; FOLKERTSMA, R. T.; ARNAUD, E.; UPADHYAYA, H. D.; GLASZMANN, J.-C.; HASH, C. T. Massive sorghum collection genotyped with SSR markers to enhance use of global genetic resources. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. e59714, 2013.

CANIATO, F. F.; HAMBLIN, M.; GUIMARÃES, C. T.; ZHANG, Z.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHAES, J. V. Association mapping provides insights into the origin and the fine structure of the sorghum aluminum tolerance locus, *Alt_{SB}*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, p. e87438, 2013.

CANIATO, F. F.; GUIMARAES, C. T.; HAMBLIN, M.; BILLOT, C.; RAMI, J.-F.; HUFNAGEL, B.; KOCHIAN, L. V.; LIU, J.; GARCIA, A. A. F.; HASH, C. T.; RAMU, P.; MITCHELL, S.; KRESIVICH, S.; OLIVEIRA, A. C. de; AVELLAR, G. de; BORÉM, A.; GLASZMANN, J.-C.; SCHAFFERT, R. E.; MAGALHAES, J. V. The relationship between population structure and aluminum tolerance in cultivated sorghum. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. e20830, 2011.

CANIATO, F. F.; GUIMARAES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V.; BOREM, A.; KLEIN, P. E.; MAGALHAES, J. V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 114, n. 5, p. 836-876, 2007.

DELHAIZE, E.; GRUBER, B. D.; RYAN, P. R. The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2255-2262, 2007.

DEU, M.; RATTUNDE, F.; CHANTEREAU, J. A global view of genetic diversity in cultivated sorghums using a core collection. **Genome**, Ottawa, v. 49, p. 168-180, 2006.

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

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

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

MAGALHÃES, J. V. de; LIU, J.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. de P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.-H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, New York, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007.

MAGALHÃES, J. V.; CANIATO, F. F.; GUIMARAES, C. T.; OLIVEIRA, A. C. de; SCHAFFERT, R. E. **Pré-melhoramento para a tolerância ao alumínio em sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 162).

MELO, J. O.; LANA, U. G. P.; PINEROS, M.; ALVES, V. M. C.; GUIMARÃES, C. T.; LIU, J.; ZHENG, Y.; ZHONG, S.; FEI, Z.; MARON, L. G.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHAES, J. V. Incomplete transfer of accessory loci influencing *SbMATE* expression underlies genetic background effects for aluminum tolerance in sorghum. **The Plant Journal**, Oxford, v. 73, p. 276-288, 2013.

SABADIN, P.; MALOSETTI, M.; BOER, M.; TARDIN, F.; SANTOS, F.; GUIMARÃES, C.; GOMIDE, R.; ANDRADE, C. L. T.; ALBUQUERQUE, P. E. 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.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, London, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

VON UEXKÜLL, H. R.; MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acidsoils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 171, p. 1-15, 1995.



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



CGPE - 11201