

Mapeamento e Validação de Marcadores Microssatélites Associados à Restauração da Fertilidade em Sorgo



Panícula de sorgo normal (esquerda) e panícula de sorgo macho-estéril (direita).

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

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 110

Mapeamento e Validação de Marcadores Microssatélites Associados à Restauração da Fertilidade em Sorgo

Marcos de Oliveira Pinto
Crislene Vieira dos Santos
Cícero Beserra de Menezes
Rafael Augusto da Costa Parrela
Robert Eugene Schaffert
Jurandir Vieira Magalhães

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2014

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: Antonio Claudio da Silva Barros, Dagma Dionísia da

Silva, Maria Marta Pastina, Monica Matoso Campanha, Paulo

Eduardo de Aquino Ribeiro e Rosângela Lacerda de Castro

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: Marcos de Oliveira Pinto

1ª edição

1ª impressão (2014): 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

Mapeamento e validação de marcadores microssatélites associados à restauração da fertilidade em sorgo / Marcos de Oliveira Pinto... [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2014.

25 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1619- 0154; 110).

1. *Sorghum bicolor*. 2. Marcador molecular. 3. Melhoramento. I. Pinto, Marcos de Oliveira. II. Série.

CDD 633.174 (21. ed.)

© Embrapa 2014

Sumário

Resumo	4
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	14
Conclusões	22
Referências	23

Mapeamento e Validação de Marcadores Microssatélites Associados à Restauração da Fertilidade em Sorgo

Marcos de Oliveira Pinto¹

Crislene Vieira dos Santos²

Cícero Beserra de Menezes³

Rafael Augusto da Costa Parrella⁴

Robert Eugene Schaffert⁵

Jurandir Vieira Magalhães⁶

Resumo

Os locos *Rf1*, *Rf2* e *Rf5* são responsáveis pela restauração da fertilidade em genótipos de sorgo em citoplasma A1. O objetivo desse trabalho foi mapear e validar marcadores moleculares associados com a restauração da fertilidade em genótipos-elite de sorgo do programa de melhoramento de sorgo sacarino da Embrapa Milho e Sorgo. Foram avaliados 37 locos microssatélites (*Simple Sequence Repeats*, SSR) na região cromossômica dos locos *Rf*. Para o mapeamento foram utilizados 166 progênies F_2 (CMSXS222B x BR505R) e para a validação foram utilizadas 90 famílias $F_{2:4}$ (CMSXS157B

¹Analista D.S., Embrapa Milho e Sorgo, CPostal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG.
marcos.deoliveira@embrapa.br

²Graduanda Universidade Federal de São João del-Rei - cris-vieira15@hotmail.com

³Pesquisador D.S., Embrapa Milho e Sorgo, CPostal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG.
cicero.menezes@embrapa.br

⁴Pesquisador D.S., Embrapa Milho e Sorgo, CPostal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG.
rafael.parrella@embrapa.br

⁵Pesquisador Ph.D., Embrapa Milho e Sorgo, CPostal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG.
robert.schaffert@embrapa.br

⁶Pesquisador Ph.D., Embrapa Milho e Sorgo, CPostal 151. 35701-970 Sete Lagoas, MG.
jurandir.magalhaes@embrapa.br

x BR505R). Apenas os marcadores localizados em uma janela de 47,4 cM, a qual inclui o loco *Rf1*, apresentaram associação com a restauração da fertilidade na população F_2 (CMSXS222B x BR505R), tendo sido este loco mapeado entre os marcadores xtxp400 (50.751.457 pb e 87,7 cM, MACE; JORDAN, 2010) e xtxp105 (52.281.931 pb e 97,7 cM, MACE; JORDAN, 2010) no cromossomo 8. A predição do fenótipo de macho-esterilidade com base nos marcadores xtxp400 e xtxp406 foi bem sucedida na população $F_{2:4}$ (CMSXS157B x BR505R), com uma taxa de correspondência com o fenótipo esperado de aproximadamente 80%. Dessa forma, a seleção assistida a partir dos marcadores moleculares descritos neste estudo pode ser utilizada para o desenvolvimento de híbridos de sorgo pela identificação precoce de linhagens contendo genes de restauração da fertilidade.

Termos para indexação: *Sorghum bicolor*, locos *Rf*, marcadores moleculares, SSR, mapeamento genético, seleção assistida.

Mapping and Validation of Microsatellite Markers Associated with Fertility Restoration in Sorghum

Marcos de Oliveira Pinto¹

Crislene Vieira dos Santos²

Cícero Beserra de Menezes³

Rafael Augusto da Costa Parrela⁴

Robert Eugene Schaffert⁵

Jurandir Vieira Magalhães⁶

Abstract

Fertility restoration loci, *Rf1*, *Rf2* and *Rf5*, are responsible for fertility restoration in cytoplasm A1 of commercial sorghum genotypes. The aim of this study was to map and validate for breeding purposes molecular markers associated with fertility restoration in sweet sorghum genotypes. We evaluated 37 microsatellites loci (*Simple Sequence Repeats*, SSR) located in the chromosomal regions harboring *Rf* loci. For the genetic mapping, 166 F₂ progeny derived from the cross CMSXS222B x BR505R and 90 CMSXS157B x BR505R F_{2:4} families were used for validation. SSRs located within a 47.4 cM window encompassing *Rf1* were the only ones associated with fertility restoration in the CMSXS222B x BR505R F₂ population. *Rf1* mapped between markers xtxp400 (50,751,457bp and 87.7cM, MACE; JORDAN, 2010) and xtxp105 (52,281,931 bp and 97.7 cM, MACE; JORDAN, 2010) on chromosome 8. The prediction of the male sterility phenotype based on the genotype of markers xtxp400 and xtxp406 was successful in the CMSXS157B x BR505R F_{2:4} population, with 80% of accuracy. Thus, a marker

assisted selection process, based on the SSR markers validated in this study, can be used for the development of sorghum hybrids through the early identification of genotypes harboring fertility restoration genes.

Index terms: *Sorghum bicolor*, *Rf* loci, molecular markers, SSR, linkage map, marker assisted selection.

Introdução

Restauração da Fertilidade em Sorgo

A produção de híbridos de sorgo é facilitada pela utilização do sistema de macho-esterilidade citoplasmática (*cytoplasmic male sterility* ou CMS). As plantas com CMS, ou linhagens A, são caracterizadas pela ausência do pólen funcional. Alguns genótipos, denominados restauradores ou R, possuem genes nucleares de restauração de fertilidade (*fertility restoration* ou *Rf*) que podem reverter o processo da CMS. Os genótipos que não possuem os alelos *Rf* dominantes são denominados mantenedores ou B (HORN et al., 2014). O sucesso para a exploração desse sistema requer o entendimento detalhado dos mecanismos moleculares da macho-esterilidade citoplasmática e dos fatores que promovem a restauração da fertilidade (ROONEY, 2004).

A linhagem A apresenta citoplasma macho-estéril e os alelos recessivos para os genes nucleares de restauração da fertilidade (*rfrf*). A linhagem B é isogênica da linhagem A, diferenciando-se apenas por possuir citoplasma fértil. A linhagem R também apresenta citoplasma fértil, porém apresenta alelos dominantes para os genes nucleares de restauração da fertilidade (*Rf*_),

permitindo a restauração da produção de pólen na formação de híbridos em cruzamentos com linhagens A. Portanto, do ponto de vista da CMS, a linhagem B e a linhagem R se diferenciam em relação ao loco *Rf*, apresentando alelos recessivos e dominantes para esses genes, respectivamente. Com base apenas no fenótipo, para a identificação de linhagens B e R são necessários cruzamentos testes com linhagens A e posterior avaliação dos híbridos F_1 quanto à esterilidade ou fertilidade. Dessa forma, para a identificação visual de linhagens B e R são necessárias duas gerações, o que torna o processo demorado e trabalhoso (ROONEY, 2004).

A CMS é uma característica de herança materna em que o desenvolvimento do pólen ou deiscência da antera funcional é impedido, mas a fertilidade feminina é normal (PRING et al., 1995). A CMS é atribuída a uma perturbação na interação entre genes mitocondriais e nucleares. Em geral, a CMS ocorre por causa de rearranjos no DNA mitocondrial, levando à formação de uma nova *ORF* (*open reading frame*) contendo fragmentos derivados de outros genes e/ou regiões não codificadoras (LINKE; BORNER, 2005; HORN et al., 2014). Essas alterações podem provocar modificações no perfil de expressão de genes homeóticos que estão relacionados com o desenvolvimento dos órgãos masculinos nas flores, levando assim ao fenótipo de macho-esterilidade (CHASE, 2006). O primeiro sistema de CMS em sorgo descoberto foi caracterizado como citoplasma milo (ou A1), em um *background* nuclear *kafir*. Outras fontes adicionais de CMS já foram descritas em sorgo. No entanto, A1 continua a ser o principal CMS utilizado para a produção de sementes de híbridos comerciais no mundo (REDDY et al., 2008).

A fertilidade masculina pode ser restaurada por uma série de genes nucleares denominados restauradores de fertilidade (*fertility restoration* ou *Rf*) (HORN et al., 2014). O primeiro gene de restauração da fertilidade identificado em sorgo, denominado *Rf1*, foi inicialmente mapeado no cromossomo 8 por Klein et al. (2001), sendo posteriormente clonado (KLEIN et al., 2005). A análise da sua sequência evidenciou que a proteína codificada possui uma repetição de pentatricopeptídeo (*pentatricopeptiderepeat* ou *PPR*), que cossegrega com o fenótipo de restauração da fertilidade. As PPRs possuem um domínio de ligação ao RNA e estão envolvidas em eventos pós-transcricionais de RNAs presentes em mitocôndrias e cloroplastos como edição, splicing, clivagem e transporte do RNA (LINNEWEBER; SMALL, 2008). Os marcadores ligados ao loco *Rf1* foram úteis para prever o fenótipo de restauração da fertilidade em progênies geradas pelo cruzamento com a linhagem RTx432, mas não permitem a classificação sem ambiguidade de todas as fontes conhecidas de restauração em germoplasmas-elite (JORDAN et al., 2010). Essas observações se devem à existência de pelo menos dois genes maiores de restauração da fertilidade no germoplasma de sorgo. Jordan et al. (2010) relataram o mapeamento de alta resolução do loco *Rf2* no cromossomo 2 do sorgo, identificando marcadores moleculares que, quando utilizados em conjunto com os marcadores ligados ao loco *Rf1*, aumentam a confiabilidade das predições. Mais recentemente, Jordan et al. (2011) descreveram a existência de um terceiro loco de efeito maior, denominado *Rf5*, que possui a capacidade de restaurar citoplasmas do tipo A1 e A2. Além disso, foi caracterizada a presença de um loco de efeito menor no cromossomo 4, capaz de restaurar parcialmente a fertilidade em citoplasmas do tipo A1.

Além de seu uso na alimentação animal, o sorgo vem adquirindo importância na participação no agronegócio de bioenergia. O interesse pela produção de etanol a partir do sorgo sacarino é crescente, tanto por parceiros nacionais quanto internacionais, em função da flexibilidade do sorgo para finalidades diversas. A Embrapa Milho e Sorgo lançou variedades de polinização aberta (BRS 506 e BRS 511) com altos teores de açúcar no colmo, as quais estão sendo utilizadas atualmente pelas usinas. Existem híbridos de sorgo sacarino no mercado, obtidos a partir do cruzamento de linhagens macho-estéreis de sorgo forrageiro (de baixo teor de açúcar no colmo) com linhagens restauradoras de sorgo sacarino (de alto teor de açúcar no colmo). Estes híbridos têm apresentado maior produção de massa verde, mas com teor de brix bem abaixo das variedades.

No desenvolvimento de híbridos de sorgo sacarino é essencial que ambos os parentais do híbrido possuam açúcar no colmo. Diante deste problema o programa de melhoramento da Embrapa iniciou pesquisas para o desenvolvimento de linhagens mantenedoras (linhagens B) com alto teor de açúcar no colmo. Ao fenotipar as linhagens mantenedoras disponíveis, observou-se que todas tinham baixos teores de açúcar, sendo necessário o cruzamento com linhagens R, de altos teores de açúcar, para transmitir este caráter às linhagens fêmeas. Assim, para obtenção de linhagens B e A com elevados teores de açúcares torna-se necessário o cruzamento de linhagens B de sorgo granífero com linhagens R de sorgo sacarino, com posterior conversão da linhagem B em linhagem A, o que requer 6 ciclos de retrocruzamento pelos métodos convencionais.

O processo de obtenção de novas linhagens B e A com elevado teor de açúcar no colmo pode ser facilitado com a utilização de marcadores moleculares associados aos genes *Rf*, evitando-se a necessidade de realização de cruzamentos-testes para determinação do fenótipo quanto à restauração da fertilidade. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi mapear e validar marcadores moleculares associados com a restauração da fertilidade nos genótipos-elite de sorgo do programa de melhoramento de sorgo da Embrapa Milho e Sorgo.

Materiais e Métodos

Material Genético

Foram utilizadas duas populações derivadas do cruzamento entre linhagens B e R para a associação dos marcadores moleculares com a restauração da fertilidade em sorgo. Para o mapeamento foram utilizadas 166 progênies F_2 (CMSXS222B x BR505R) e para a validação foram utilizadas 90 famílias $F_{2:4}$ (CMSXS157B x BR505R).

Fenotipagem

A fenotipagem da restauração de fertilidade na população de mapeamento foi realizada por meio de cruzamentos testes de cada progênie F_2 (CMSXS222B x BR505R) com a linhagem A macho estéril, CMSXS222A. Foram avaliadas de dez a vinte plantas por cruzamento-teste. O fenótipo das progênies foi dividido em 3 classes: i) progênies capazes de restaurar a fertilidade em todas as linhagens A do cruzamento-teste; ii) progênies que restauravam a fertilidade em algumas linhagens A do cruzamento-teste; e iii) progênies que não restauravam a

fertilidade nas linhagens A do cruzamento-teste. Na população de validação, a fenotipagem foi realizada avaliando-se de três a cinco cruzamentos testes de cada família $F_{2:4}$ (CMSXS157B x BR505R) com a linhagem A macho-estéril, CMSXS157A.

Extração de DNA

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de oito discos foliares de 6 mm de diâmetro de cada progênie F_2 (CMSXS222B x BR505R) e de cada família $F_{2:4}$ (CMSXS157B x BR505R). As amostras foram liofilizadas por 48 horas e a extração foi realizada em placas de 96 orifícios utilizando o aparelho GenoGrinder 2000, seguindo o protocolo descrito por Lana et al. (2010). Ao pó macerado foram adicionados 400 μ L do tampão CTAB (2% CTAB; 0,2 M Tris-HCl pH 7,5; 1,4M NaCl, 0,02 M EDTA pH 8,0; e 2% β -mercaptoetanol). As amostras foram mantidas em banho-maria a 65 °C durante 1 hora, com homogeneização a cada 15 min. Em seguida foram adicionados 300 μ L de solução de clorofórmio-octanol (24:1) e realizada a homogeneização por inversão por 30 vezes. O material foi centrifugado a 2.500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 300 μ L de isopropanol. As amostras foram mantidas em -20 °C por uma hora e posteriormente centrifugadas a 4.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 200 μ L de etanol 70%. O precipitado final foi seco em estufa 65 °C e posteriormente ressuspensionado com 100 μ L de tampão TE contendo RNase A (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 8,0; e 0,1 μ g/ μ L RNase A). Ao final as amostras foram quantificadas no NanoDrop 1.000 (Thermo Fisher Scientific, Worcester, MA).

Amplificação dos Marcadores Microssatélites

Foram selecionados 37 marcadores microssatélites na região cromossômica dos locos *Rf*, sendo 20 ligados ao loco *Rf1*, 9 ligados ao loco *Rf2* e 8 marcadores que flanqueiam o loco *Rf5* (MACE; JORDAN, 2010). A reação de amplificação, com os primers fluorescentes, foi realizada com 50 ng de DNA, Tampão 1X, 2,5 mM de $MgCl_2$; 166 μM de cada um dos dNTPs; 0,2 μM de cada um dos primers e 0,5 U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA), em um volume total de 15 μL . Os ciclos de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 8 ciclos a 94 °C por 20 segundos, 60 °C (-1°C/ciclo) por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, mais 35 ciclos de amplificação a 94 °C por 20 segundos, 53 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 minutos.

Eletroforese e Genotipagem

Após as reações de PCR, os produtos da amplificação foram diluídos em água (1:100). O mix de injeção foi preparado com 2 μL de produto de PCR diluído, 0,3 μL de size standard GeneTAB500 (GeneID) e 9,7 μL de Tween 20 0,1%. As amostras foram desnaturadas a 94 °C por 5 minutos e imediatamente transferidas para banho de gelo. A eletroforese capilar foi realizada no Mega Bace 1.000 (Amersham Biosciences) utilizando como parâmetros de injeção 3 kV por 45 segundos e de corrida 10 kV por 75 minutos. Os resultados foram avaliados no software Fragment profile 1.2 (Amersham Biosciences).

Teste de Segregação dos Marcadores Moleculares e a Restauração da Fertilidade

Os locos marcadores e o loco de restauração da fertilidade foram avaliados pelo teste qui-quadrado, considerando nível de significância (α) igual a 0,05. Primeiramente, foi verificado se cada loco apresentava segregação monogênica, como esperado para um loco codominante em uma população F_2 (proporção esperada de 1:2:1). Em seguida, foi verificado se os locos marcadores apresentavam segregação independente em relação ao loco de restauração de fertilidade.

Mapa de Ligação

O mapa de ligação foi construído utilizando o programa Mapmaker (LANDER et al., 1987) e as distâncias genéticas foram estimadas utilizando a função de Kosambi (KOSAMBI, 1944). Para a formação dos grupos de ligação, foi utilizado o comando "*group*", considerando os critérios $LOD=3$ e frequência máxima de recombinação $\theta=0,5$. O ordenamento dos marcadores dentro do grupo de ligação foi realizado utilizando o comando "*compare*".

Resultados e Discussão

Fenotipagem da Restauração da Fertilidade na População F_2

A partir da fenotipagem da população derivada do cruzamento-teste entre as progênies F_2 (CMSXS222B x BR505R) com a linhagem A macho-estéril, CMSXS222A, foi possível verificar a segregação da restauração da fertilidade. Foram encontrados indivíduos capazes de restaurar por completo a fertilidade, de

restaurá-la de forma intermediária e de não restaurá-la (Figura 1). Agrupando os fenótipos para essa característica em três classes, observou-se um ajuste a proporção 1:2:1 ($\chi^2=1,18$, $p> 0,05$), o que suporta a hipótese de que a restauração de fertilidade pode ser controlada por um único gene, com efeito codominante. A partir dessa análise, o fenótipo de restauração de fertilidade (*Rf*) foi codificado como um loco de característica codominante. Os genótipos que foram capazes de promover a restauração da fertilidade foram codificados como A; os que não foram capazes, foram codificados como B e os genótipos da classe intermediária foram codificados como H. Dessa forma, foi possível a utilização do loco *Rf* para a confecção do mapeamento genético juntamente com os locos dos marcadores SSR.

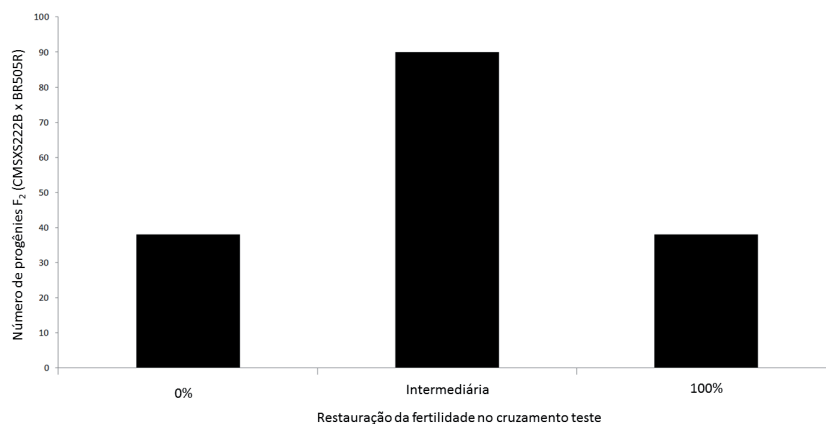


Figura 1. Fenotipagem da restauração da fertilidade na população F₂(CMSXS222B x BR505R).

Identificação de SSR Polimórficos

A partir da amplificação dos 37 marcadores SSR, flanqueando os locos *Rf*, pôde-se observar que nos dois possíveis cruzamentos entre os genótipos do tipo B e R, 23 marcadores SSR eram polimórficos entre CMSXS157B/BR505R e 18 marcadores SSR eram polimórficos entre CMSXS222B/BR505R (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação de SSR polimórficos entre parentais B e R.

Loco	SSR	Cromosomo	Posição física	CMSXS157B/ BR505505R	CMSXS222B/ BR505R
<i>Rf1</i>	txtp294	8	46.084.445		
<i>Rf1</i>	txtp354	8	48.205.763	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	sam55637	8	48.269.600		
<i>Rf1</i>	sam27631	8	48.567.496	Polimórfico	
<i>Rf1</i>	sam60877	8	49.026.366		
<i>Rf1</i>	sam59218a	8	49.369.121	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	sam60576	8	49.403.752		
<i>Rf1</i>	sam70739	8	49.448.146		
<i>Rf1</i>	sam39963	8	49.795.012	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	sam79559	8	50.088.816	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	sam69133b	8	50.090.804		
<i>Rf1</i>	sam53611	8	50.111.865	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	txtp018	8	50.508.547	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	sam35755a	8	50.508.749	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	txtp321	8	50.508.816	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	txtp400	8	50.751.479	Polimórfico	Polimórfico
<i>Rf1</i>	txtp406	8	50.784.559	Polimórfico	
<i>Rf1</i>	txtp250	8	51.000.244	Polimórfico	
<i>Rf1</i>	gpsb123	8	52.281.926		Polimórfico
<i>Rf1</i>	txtp105	8	52.281.951		Polimórfico

Tabela 1 cont. Identificação de SSR polimórficos entre parentais B e R.

Loco	SSR	Cromos-somo	Posição física	CMSXS157B/ BR505505R	CMSXS222B/ BR505R
Rf2	txtp297	2	4.229.787		Polimórfico
Rf2	msbcir223	2	4.654.173	Polimórfico	Polimórfico
Rf2	txtp084	2	4.854.187		
Rf2	txtp050	2	5.079.990	Polimórfico	Polimórfico
Rf2	txtp654	2	5.432.024	Polimórfico	
Rf2	sam69420	2	5.571.806		
Rf2	txtp616	2	5.668.263	Polimórfico	Polimórfico
Rf2	txtp304	2	Não definida	Polimórfico	
Rf2	txtp611	2	6.538.561	Polimórfico	Polimórfico
Rf5	txtp065	5	1.907.547	Polimórfico	
Rf5	sam41302	5	1.916.701	Polimórfico	
Rf5	sam16562	5	3.442.912	Polimórfico	
Rf5	txtp094	5	3.442.840	Polimórfico	
Rf5	txtp112	5	3.909.814		
Rf5	txtp030	5	4.549.532		
Rf5	mSbCIR248	5	4.746.172	Polimórfico	Polimórfico
Rf5	txtp303	5	Não definida		Polimórfico

Mapeamento Genético da Restauração de Fertilidade em Sorgo

A partir do teste de qui-quadrado, realizado com o intuito de verificar se os locos dos marcadores e o loco de restauração de fertilidade segregavam na proporção de 1:2:1, foi possível verificar que 13 marcadores SSR segregaram como esperado para um loco codominante em uma população F_2 (Tabela 2 e 3).

Tabela 2. Teste de segregação individual e conjunta dos marcadores microsatélites ligados ao loco *Rf1* com a restauração de fertilidade nas progênes *F*₂ derivadas do cruzamento de CMSXS222B x BR505R.

FV	GL	Qui-quadrado										
		xtxp354	sam59218a	sam39963	sam79559	sam53611	sam35755a	txbp018	txxp321	txxp400	gpsb123	txxp105
Segregação Total	8	126,38*	164,89*	172,62*	184,95*	148,09*	212,80*	202,00*	218,07*	196,78*	84,27*	99,54*
Segregação A/a (Rf)	2	1,10	1,41	1,51	1,83	0,78	1,70	1,22	1,29	1,83	1,05	1,15
Segregação B/b (SSR)	2	9,21*	0,12	0,95	1,87	4,80	1,94	1,21	1,09	0,79	0,80	2,39
Segregação conjunta	4	116,07*	163,36*	170,16*	181,25*	142,51*	208,17*	199,57*	215,70*	194,16*	82,42*	95,99*

* significativo a 5% de probabilidade

Tabela 3. Teste de segregação individual e conjunta dos marcadores microsatélites ligados aos locos *Rf2* e *Rf5* com a restauração de fertilidade nas progênes *F*₂ derivadas do cruzamento de CMSXS222B x BR505R.

FV	GL	Qui-quadrado							
		xtxp297	msbcl223	txbp050	txxp616	txbp611	msbcl248	txxp303	
Segregação Total	8	16,41	19,90*	13,63	72,37*	14,69*	12,51	8,92	
Segregação A/a (Rf)	2	1,42	0,78	2,13	1,29	1,47	1,37	1,51	
Segregação B/b (SSR)	2	9,58*	14,44*	5,71	70,57*	10,71*	5,60	4,03	
Segregação conjunta	4	5,40	4,68	5,79	0,51	2,51	5,54	3,37	

* significativo a 5% de probabilidade

Com base no teste de qui-quadrado realizado para verificar a existência de segregação independente entre cada marcador e o loco que controla a restauração da fertilidade na população F_2 (CMSXS222B x BR505R), foi possível concluir que apenas os marcadores realmente ligados ao loco *Rf1* apresentaram desvio significativo em relação à segregação independente com o loco da restauração da fertilidade na população avaliada (Tabela 2 e 3). Esses locos foram selecionados para realização da construção do mapa genético mostrado na Figura 2.

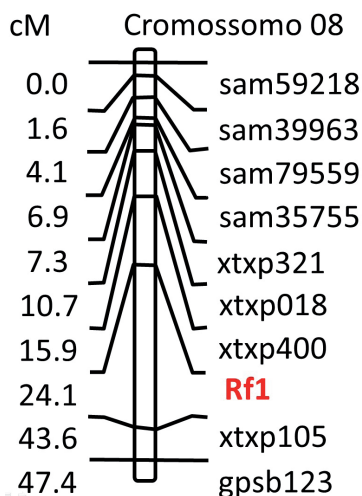


Figura 2. Mapa genético na região que flanqueia o loco *Rf1*. O mapa foi confeccionado utilizando os locos marcadores microssatélites (em preto) e o fenótipo de restauração da fertilidade, codificado como loco codominante (*Rf1*, em vermelho).

Os marcadores xtxp400 e xtxp105 estão localizados no cromossomo 8 nas posições físicas de 50.751.479pb e 52.281.951pb, respectivamente. Esses marcadores flanqueiam a região do loco *Rf1* (aproximadamente 50.762.000pb),

evidenciando controle genético da restauração de fertilidade na linhagem BR505R por meio do loco *Rf1*. Os resultados de mapeamento aqui descritos corroboram com os dados obtidos por Klein et al. (2005) em que, por mapeamento fino, foi possível identificar genes candidatos e clonar o gene *Rf1* localizado na região flanqueada pelos microssatélites xtxp400 e xtxp406 (posição física 50.784.559 pb).

Validação dos Marcadores Moleculares

Para a validação dos marcadores moleculares ligados ao loco *Rf1* com a restauração de fertilidade foram genotipadas 90 famílias $F_{2:4}$ derivadas do cruzamento de CMSXS157B x BR505R. Essa população foi genotipada utilizando os marcadores xtxp400 e xtxp406, que flanqueiam o loco *Rf1* (Tabela 1). Das 90 famílias avaliadas, 39 apresentaram os alelos derivados da fonte de macho-esterilidade. Essas famílias foram selecionadas para a fenotipagem (Figura 3). Das 39 famílias fenotipadas, 30 apresentaram-se como macho-estéreis, correspondendo a um acerto de 77% a partir da predição molecular. Essa porcentagem de indivíduos estéreis é bem superior ao esperado em uma população $F_{2:4}$ sem nenhum processo de seleção (43,75%), o que evidencia a eficácia da utilização dos marcadores moleculares como ferramenta para acelerar o processo de obtenção de linhagens B pelo programa de melhoramento de sorgo sacarino da Embrapa Milho e Sorgo.

Diante da porcentagem de acerto da predição molecular na restauração da fertilidade, sugere-se a existência de outros locos de efeito menor que podem levar à restauração parcial da fertilidade, como aqueles encontrados por Jordan et al.

(2011) no cromossomo 4. Além disso, existe a possibilidade de reversão da macho-esterilidade em alguns genótipos de sorgo.

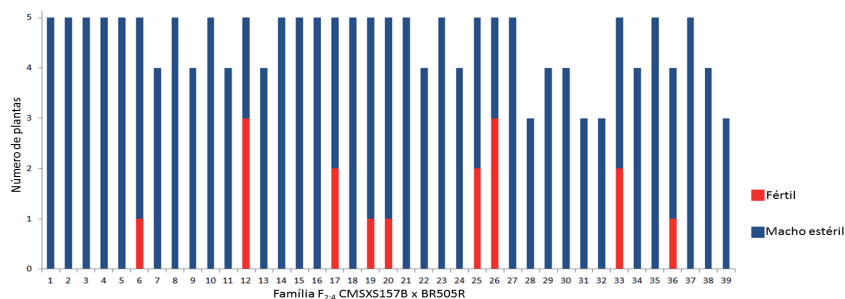


Figura 3. Fenotipagem das famílias $F_{2:4}$ (CMSXS157B x BR505R) retrocruzados com CMSXS157A.

Conclusões

Foi possível verificar associação entre marcadores moleculares ligados ao loco *Rf1* com a restauração de fertilidade proveniente da fonte BR505R. Os marcadores SSR que flanqueiam a região do gene *Rf1* (aproximadamente 50.700.00 pb) podem ser utilizados no programa de melhoramento para acelerar o desenvolvimento de linhagens A/B, utilizando a seleção assistida por marcadores moleculares. Com essa ferramenta será possível fazer uma pré-seleção de plantas A macho-estéreis, e sua linhagem B correspondente, devendo-se a continuidade da esterilização ser realizada apenas nos genótipos que apresentem as marcas desejadas. Dessa forma, esperamos aumentar o número de híbridos desenvolvidos pelo programa de melhoramento de sorgo sacarino da Embrapa Milho e Sorgo e, assim, consolidar sua competência na oferta de produtos superiores.

Referências

CHASE, D. C. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial nuclear interactions. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 23, p. 81-90, 2006.

HORN, R.; GUPTA, K. J.; COLOMBO, N. Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility. **Mitochondrion**, v. 19, p. 198-205, 2014.

JORDAN, D. R.; KLEIN, R. R.; SAKREWSKI, K. G.; HENZELL, R. G.; KLEIN, P. E.; MACE, E. S. Mapping and characterization of Rf5: a new gene conditioning pollen fertility restoration in A1 and A2 cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 123, p. 383-396, 2011.

JORDAN, D. R.; MACE, E. S.; HENZELL, R. G.; KLEIN, P. E.; KLEIN, R. R. Molecular mapping and candidate gene identification of the Rf2 gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 120, p. 279-287, 2010.

KLEIN, R. R.; KLEIN, P. E.; CHHABRA, A. K.; DONG, J.; PAMMI, S.; CHILDS, K. L.; MULLET, J. E.; ROONEY, W. L.; SCHERTZ, K. F. Molecular mapping of the rf1 gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 102, p. 1206-1212, 2001.

KLEIN, R. R.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E.; MINX, P.; ROONEY, W. L.; SCHERTZ, K. F. Fertility restorer locus Rf1 of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein

not present in the colinear region of rice chromosome 12.

Theoretical and Applied Genetics, New York, v. 111, p. 994-1012, 2005.

KOSAMBI, D. D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of Eugenics**, London, v. 12, p. 172-175, 1944.

LANA, U. G. de P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. da S.; OLIVEIRA, B. C. F. S.; GUIMARAES, C. T.; MAGALHAES, J. V. de; OLIVEIRA, B. C. F. S. **Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. 19 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 104).

LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E.; NEWBERG, L. A. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics**, San Diego, v. 1, p. 174-181, 1987.

LINKE, B.; BORNER, T. Mitochondrial effects on flower and pollen development **Mitochondrion**, v. 5, p. 389-402, 2005.

LINNEWEBER, C. S.; SMALL, L. Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. **Cell**, Cambridge, v. 13, p. 663-670, 2008.

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.

PRING, D. R.; VAN, T. H.; SCHERTZ, K. F. Cytoplasmic male sterility and organelle DNAs of sorghum. In: LEVINGS, C. S.; VASIL, I. K. (Ed.). **Advances in cellular and molecular biology of plants**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 461-495.

REDDY, B. V. S.; ASHOK KUMAR, A.; KAUL, S. L. Alternative cytoplasmic male sterility systems in sorghum and their utilization. In: REDDY, B. V. S.; RAMESH, S.; ASHOK KUMAR, A.; GOWDA, C. L. L. (Ed.). **Sorghum Improvement in the New Millennium**. Patancheru: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 2008. p. 132-144.

ROONEY, W. L. Sorghum improvement: integrating traditional and new technology to produce improved genotypes. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 83, p. 38-110, 2004.

SCHERTZ, K. F.; SOTOMAYOR-RIOS, A.; TORRES-CARDONA, S. Cytoplasmic-nuclear male sterility: opportunities in breeding and genetics. **Proceedings of Grain Sorghum Research Utility Conference**, v.16, p.175-186, 1989.