

219

Circular
TécnicaSete Lagoas, MG
Dezembro, 2016**Autores****Jurandir Vieira Magalhães**

Eng.-Agrôn., PhD, Pesquisador em Genética Molecular e Genômica de Plantas, Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, 35701-970 Sete Lagoas, MG, jurandir.magalhaes@embrapa.br

Barbara Hufnagel Maciel

Bióloga, D.S., Biologia Molecular de Plantas, Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, 35701-970 Sete Lagoas, MG, bararahufnagel@gmail.com

Sylvia Moraes de Sousa

Bióloga, D.S., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424, km 45, 35701-970 Sete Lagoas, MG, sylvia.sousa@embrapa.br

Lidiane Assis Silva

Eng.-Agrôn., D.S., Genética e Melhoramento de Plantas, Univers. Federal do Acre, Rio Branco, AC, lidisagro@gmail.com

Robert E. Schaffert

Eng.-Agrôn., PhD, Genética e Melhoramento de Plantas, Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, 35701-970 Sete Lagoas, MG, robert.schaffert@embrapa.br

Maria Marta Pastina

Eng.-Agrôn., D.S., Pesquisadora em Genética e Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, 35701-970 Sete Lagoas, MG, marta.pastina@embrapa.br

Beatriz de Almeida Barros

Bióloga, D.S., Genética e Melhoramento, Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, 35701-970 Sete Lagoas, MG, beatriz.barros@embrapa.br

Claudia Teixeira Guimaraes

Eng.-Agrôn., D.S., Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Rod. MG 424 km 45, 35701-970 Sete Lagoas, MG, claudia.guimaraes@embrapa.br

Barbara Negri

Estudante de Doutorado em Bioengenharia, bolsista CAPES; Universidade Federal de São João del Rei, São João del-Rei, MG; barbarafrnegri@gmail.com

Gabriel Azevedo, D.S.

Biólogo, D.S., Genética, Embrapa Milho e Sorgo, Rod MG 424 km 45, 35701-970 Sete Lagoas, MG gabriel_portoreal@yahoo.com.br

Joao Herbert Moreira Viana

D.S. em Solos e Nutrição de Plantas, Embrapa Milho e Sorgo, joao.herbert@embrapa.br

Embrapa

Validação de Marcadores Moleculares para Eficiência na Utilização de Fósforo com Base em Genes *SbPSTOL1* em Sorgo

Eficiência na Utilização de Fósforo em Solos Ácidos

A produção de alimentos é um importante desafio, tendo em vista a expansão contínua da população mundial e a consequente demanda crescente para alimentá-la (GODFRAY et al., 2010). Uma das maiores limitações para o aumento da produção das culturas é a deficiência de fósforo (P) causada pela sua fixação em óxidos de ferro e de alumínio na fração argila do solo. Aproximadamente metade das áreas agricultáveis do mundo ocorrem em solos com baixa disponibilidade de P (LYNCH, 2011), o que transforma a deficiência de P em uma limitação à segurança alimentar global. Esse problema torna-se ainda mais sério considerando-se que as rochas fosfatadas são um recurso limitado, que está sendo intensamente utilizado para a produção de fertilizantes.

Em solos tropicais, mesmo quando o conteúdo total de P é alto, a disponibilidade desse nutriente para as culturas é baixa em função da fixação de fósforo em óxidos de ferro e de alumínio (MARSCHNER, 1995), que estão presentes na fração argila desses solos. Além disso, particularmente em solos ácidos altamente intemperizados, a difusão de P em direção à superfície radicular é altamente dependente do teor de umidade do solo. Sendo assim, o fluxo difusivo de P é praticamente interrompido quando há diminuição no teor de umidade do solo, mesmo ainda permanecendo em níveis elevados no tocante à disponibilidade de água para as plantas (NOVAIS; SMYTH, 1999). Portanto, o suprimento de P para as plantas e, conseqüentemente, a absorção de P, especialmente em solos com alta capacidade de fixação desse nutriente, são descontínuos em função do teor de umidade do solo (NOVAIS; SMYTH, 1999).

As plantas utilizam diferentes mecanismos para se adaptarem à baixa disponibilidade de P. Alguns, que melhoram a utilização interna de P, envolvem alterações no sistema de transporte, partição e remobilização de P na planta, enquanto outros mecanismos atuam para aumentar a absorção de P, como alterações no sistema radicular, interações com microrganismos e modificações químicas na rizosfera (VANCE et al., 2013). As plantas podem mobilizar P via exsudação de ácidos orgânicos e fosfatases (revisado por HUFNAGEL et al., 2014), resultando em maior disponibilidade desse nutriente e maior absorção dele. Associações com micorrizas podem também facilitar a absorção de P (SMITH; SMITH, 2012).

Considerando que a baixa disponibilidade de P em solos tropicais resulta de fluxos difusivos extremamente lentos, mecanismos adaptativos que atuam para facilitar a difusão de P do solo para a superfície radicular têm especial importância na adaptação das plantas ao suprimento insuficiente de P. Alterações na morfologia e na arquitetura do sistema radicular, algumas delas em resposta ao estresse de P, podem aumentar a superfície de absorção, facilitando o fluxo difusivo de fósforo. Alterações estruturais no sistema radicular que levam a uma maior absorção de P incluem aumento no número e tamanho dos pelos radiculares e aumento do crescimento de raízes laterais (LÓPEZ-ARREDONDO et al., 2014).

Ainda que haja evidências claras indicando que alterações na morfologia e na arquitetura do sistema radicular constituem mecanismos importantes para a adaptação de plantas a solos com baixo P, ainda são raros os casos de genes que afetam o sistema radicular levando à maior adaptação das culturas a solos com baixo P, pelo menos em um contexto agrônomico. Em arroz, o gene *phosphorus starvation tolerance 1* (*OsPSTOL1*) é uma das exceções. Inicialmente, um QTL relacionado com a absorção de P, denominado *phosphorus uptake 1* (*Pup1*), foi mapeado no cromossomo 12 de arroz, sendo o alelo positivo doado pela variedade Kasalath (WISSUWA et al., 1998). Posteriormente, um trabalho de clonagem posicional levou ao isolamento de uma quinase do tipo serina/treonina que aumenta a absorção de P e a produção de grãos de arroz sob baixo P por um mecanismo relacionado com o aumento do crescimento radicular de arroz (GAMUYAO et al., 2012). Esse gene, denominado *phosphorus starvation tolerance 1* em arroz (*OsPSTOL1*), é o gene que controla o loco *Pup1* previamente mapeado no cromossomo 12 de arroz.

O presente trabalho teve como objetivo identificar homólogos de sorgo do gene

OsPSTOL1, validar o efeito desses genes na absorção de P e na produção de grãos de sorgo cultivado em solos ácidos e gerar marcadores moleculares para seleção assistida com base em genes *PSTOL1* em *Sorghum bicolor* (*SbPSTOL1*).

Metodologia

Material Vegetal

Um subconjunto do painel associativo descrito por Casa et al. (2008), com 287 acessos contendo linhagens tropicais convertidas para sensibilidade ao fotoperiodismo e porte baixo (185) e de melhoramento (102), foi utilizado neste estudo. As linhagens tropicais convertidas foram produzidas pela introgressão nas linhagens exóticas de regiões genômicas que conferem florescimento precoce e porte baixo (*dwarfing genes*), a partir de um doador elite (STEPHENS et al., 1967). As linhagens do painel foram selecionadas para representar de forma ampla a diversidade genética do sorgo cultivado. As linhagens de melhoramento são comumente utilizadas em programas de melhoramento de sorgo do Brasil e dos Estados Unidos.

Avaliação da Performance Agrônômica sob Baixa Disponibilidade de P

Os experimentos de campo foram conduzidos com 243 linhagens 3-anão oriundas do painel associativo descrito acima. A concentração de P no solo foi de 5 ppm na camada superficial do solo (0 a 20 cm) e variou de 0 a 5 ppm na camada de 20 a 40 cm de profundidade. Os experimentos de campo foram conduzidos em sítio de fenotipagem estabelecido na Embrapa Milho e Sorgo, em solo argiloso, altamente intemperizado, representativo daqueles encontrados na região central do Brasil.

Os experimentos foram estabelecidos segundo um delineamento de blocos incompletos 9 x 9 com 3 repetições, sendo que cada bloco continha 9 linhagens do

painel associativo e duas testemunhas. Foram conduzidos experimentos em 2010 e 2011. A análise estatística foi conduzida com um modelo considerando os dois anos conjuntamente, utilizando-se o software GenStat v16 (PAYNE et al., 2012). No modelo fenotípico, os fatores genótipo e bloco dentro de repetições foram considerados aleatórios, enquanto os fatores ano, experimento, repetição e testemunha foram considerados fixos. Quando significativos, os efeitos de altura de planta, florescimento e estande foram considerados como covariáveis no modelo, sendo obtidos preditores lineares não viesados (*best linear unbiased predictors*, BLUPs) para produção de grãos e outras variáveis.

Avaliação da Morfologia do Sistema Radicular

Dados de morfologia do sistema radicular foram obtidos em um sistema de pastas para as linhagens do painel associativo, como descrito por Sousa et al. (2012), sendo os experimentos organizados segundo um delineamento de blocos casualizados com 3 repetições. As sementes foram esterilizadas em hipoclorito de sódio (0,5%) por 5 min e após 4 dias as plântulas foram transferidas para pastas cobertas com papel como descrito por Hund et al. (2009). Cada unidade experimental consistiu de uma pasta com três plântulas. As pastas foram colocadas em recipientes plásticos (10 pastas por recipiente) de maneira que os 3 centímetros inferiores das pastas ficassem imersos na solução nutritiva descrita por Magnavaca et al. (1987), com uma concentração de P de 2,5 μM . O pH da solução foi mantido constante no valor de 5,6 e a solução foi trocada a cada 3 dias. Os recipientes foram colocados em câmara de crescimento sob condições controladas (27 °C de temperatura diurna, 20 °C de temperatura noturna e um fotoperíodo de 12 horas).

Após 13 dias, imagens das raízes foram capturadas com câmera digital e analisadas

com os softwares RootReader2D (CLARK et al., 2013) e WinRHIZO (http://regent.qc.ca/assets/winrhizo_about.html).

Identificação de Homólogos de Sorgo do Gene *OsPSTOL1* e Descoberta de SNPs

Para a identificação de genes *SbPSTOL1*, foram inicialmente conduzidas análises de similaridade de sequência com base no gene de arroz, *OsPSTOL1*, utilizando-se as bases de dados Phytozome (version 1.4, www.phytozome.net) e NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Foram feitas análises tanto com base na sequência aminoacídica (BLASTP) quanto nucleotídica (BLASTN) de *OsPSTOL1*. Uma árvore filogenética foi construída com sequências altamente similares a *OsPSTOL1* de sorgo, *Arabidopsis*, arroz e milho. A árvore filogenética foi construída com o software MEGA6 (TAMURA et al., 2013), como descrito por Hufnagel et al. (2014).

Primers foram desenhados para sequenciamento de 6 genes *SbPSTOL1* utilizando-se Primer-blast (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi), tendo o genoma do sorgo como referência (v1.4). Essa ferramenta permite o desenho de primers específicos para cada sequência, o que foi confirmado via inspeção visual dos alinhamentos entre as respectivas sequências. Um painel de descoberta de poliformismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) com 22 acessos de sorgo foi utilizado para a descoberta de SNPs, seguindo-se as condições de amplificação e sequenciamento descritas em Hufnagel et al. (2014). SNPs com frequência mínima de 0,1 foram convertidos ao sistema *Kompetitive Allele Specific PCR genotyping system* (KASP, LGC Genomics) e então genotipados em todo o painel associativo.

Mapeamento Associativo

Inicialmente o software STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado para o estudo de estrutura populacional (Q), com base nos 310 marcadores SNP descritos por Murray et al. (2009). A matriz de relacionamento (K) foi estimada com o software TASSEL 4.0 com base na proporção de SNPs divergentes entre cada par de acessos, com posterior conversão para matriz de similaridade. Um modelo misto considerando conjuntamente a estrutura populacional (Q) e a matriz de relacionamento (K) foi ajustado aos dados (YU et al., 2006), sendo selecionado o modelo contendo somente a matriz de relacionamento, que corrigiu eficientemente o erro tipo I.

Resultados

Análise Fenotípica no Painel de Associação

As análises fenotípicas revelaram valores de herdabilidade entre 0,42 e 0,72 para as diferentes características analisadas,

indicando precisão experimental adequada para estimativa dos efeitos genéticos, tanto para as características avaliadas em campo quanto para morfologia do sistema radicular avaliada em solução nutritiva.

A área superficial radicular foi altamente correlacionada com comprimento radicular ($r=0.95$, $P < 0.001$) e com volume de raízes finas ($r=0.77$, $P < 0.001$, Figura 1). O volume de raízes finas foi também correlacionado com comprimento, área superficial e diâmetro radicular, enquanto o diâmetro radicular variou de forma independente de comprimento radicular. Tanto o comprimento radicular quanto a área superficial radicular foram positivamente correlacionados com produção de grãos sob baixa disponibilidade de P no solo ($r=0.11$ e 0.12 , com $P < 0.10$), sugerindo que a morfologia radicular avaliada em plântulas persiste em condições de campo, com a maior área superficial radicular contribuindo para a absorção de P e para a produção de grãos sob baixa disponibilidade de P no solo.

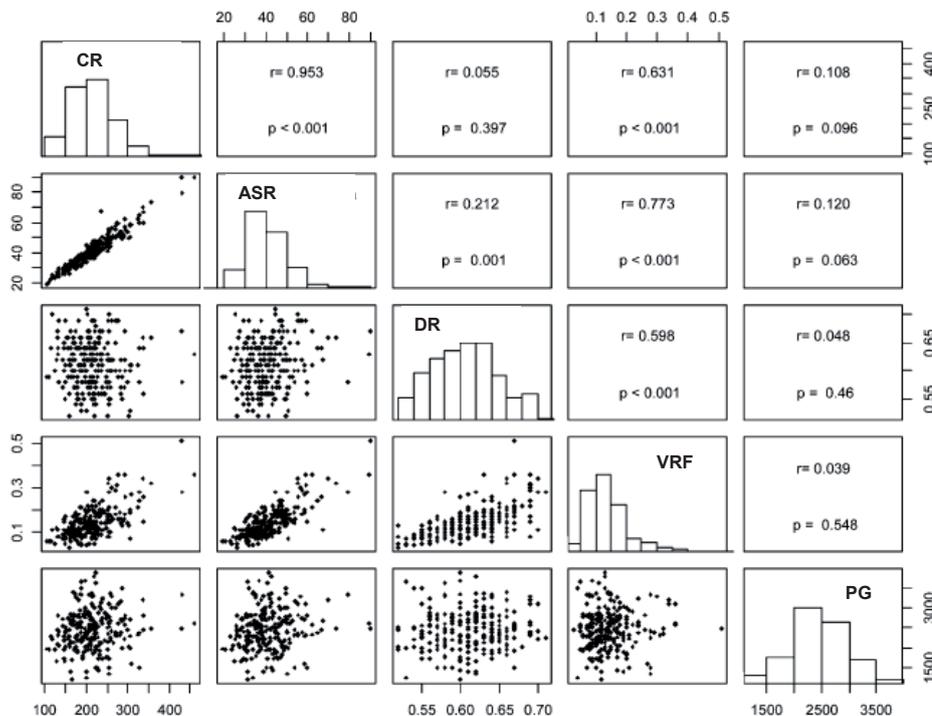


Figura 1. Matriz de correlação entre comprimento radicular (CR, mm), área superficial radicular (ASR, cm²), diâmetro radicular (DR, mm), volume de raízes finas (VRF, mm³) e produção de grãos (PG, kg ha⁻¹). Fonte: Hufnagel et al. (2014).

Identificação de Genes *SbPSTOL1* em Sorgo

Análises de similaridade de sequência tomando como base o gene *OsPSTOL1* de arroz levaram à seleção dos seis genes mostrados na Tabela 1. O gene Sb03g006765 encontra-se no início do cromossomo 3 enquanto quatro outros genes *SbPSTOL1* foram identificados na posição ~60 Mpb, na porção terminal do mesmo cromossomo. O gene *SbPSTOL1*, com maior similaridade com *OsPSTOL1*, Sb07g002840, localiza-se no início do cromossomo 7.

associados com aumento na absorção de P, o que é consistente com um aumento na área total de absorção caracterizado pela emissão de raízes mais finas. Os mesmos alelos que aumentaram a superfície radicular foram associados a um aumento na absorção de P, o que também é consistente com o papel positivo do aumento da superfície radicular na absorção P. O resultado mais relevante dessa análise foi uma série de associações entre SNPs no gene Sb03g006765 e produção de grãos sob baixa disponibilidade de P

Tabela 1. Posições físicas em pares-de-bases (pb) dos genes *SbPSTOL1* selecionados nos cromossomos 3 e 7 do sorgo. *E-value*: valor esperado (*expected value*: parâmetro que descreve o número de “hits” esperados de forma aleatória). Fonte: Hufnagel et al. (2014).

Gene	Localização (pb)	Tamanho (pb)	BLASTN		BLASTP	
			E-value	Identidade (%)	E-value	Identidade (%)
Sb03g006765	7009497 – 7012497	3001	2.00e-37	83	2.00e-108	55
Sb03g031670	60080358 – 60084458	4100	2.00e-123	71	1.00e-129	70
Sb03g031680	60085127 – 60088181	3054	3.00e-121	71	2.00e-130	70
Sb03g031690	60103142 – 60107812	4670	7.00e-73	73	6.00e-76	69
Sb03g031700	60110148 – 60113362	3214	9.00e-78	68	1.0 e-115	63
Sb07g002840	3011700 – 3016004	4304	0.0	76	6.0 e-143	73

A análise filogenética revelou a presença de três clades distintas. Todas as proteínas *SbPSTOL1* foram agrupadas na clade com maior número de membros, que também inclui proteínas de milho, *Arabidopsis* e arroz (Figura 2). Dentro dessa clade, um ramo incluindo 5 das 6 proteínas *SbPSTOL1* foi identificado (divisão mostrada pelo asterisco na Figura 2). A análise também mostrou a grande proximidade entre *OsPSTOL1* e o gene Sb07g002840 no cromossomo 7.

A Figura 3 mostra um resumo esquemático dos resultados da análise associativa entre SNPs em genes *SbPSTOL1* e características de morfologia radicular e performance de sorgo cultivado sob baixo P, em solução nutritiva e em campo. Nota-se que os mesmos alelos que reduziram diâmetro radicular foram

no solo, o que é consistente com o alto desequilíbrio de ligação entre SNPs dentro desse gene. Tanto para o gene Sb03g006765 quanto para o gene Sb03g031680, os mesmos alelos aumentaram a produção de grãos e a área superficial de raízes. Esses resultados são consistentes com a correlação positiva entre área superficial de raízes e a produção de grãos (Figura 1). À semelhança do que foi previamente observado em arroz por Gamuyao et al. (2012), esses resultados mostram que genes *SbPSTOL1* em sorgo modificam a morfologia do sistema radicular, com a maior superfície radicular levando a uma maior produção de grãos sob baixo P no solo.

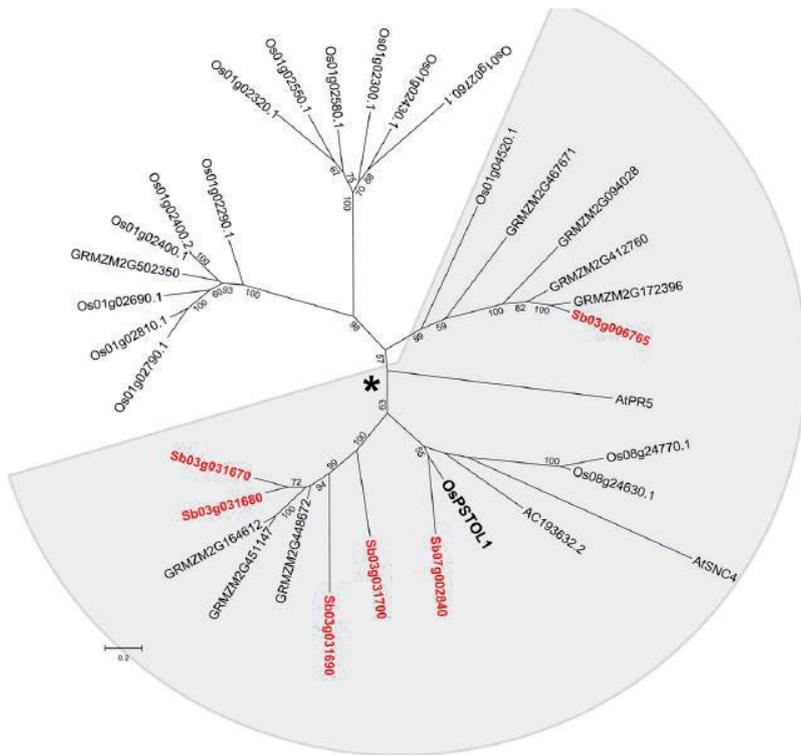


Figura 2. Relacionamento entre proteínas SbPSTOL1 em sorgo (Sb), milho (GRMZM e AC), *Arabidopsis* (At) e arroz (Os). A árvore filogenética sem raiz foi construída com o método da máxima verossimilhança, utilizando-se o software MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/index.html>). Fonte: Hufnagel et al. (2014).

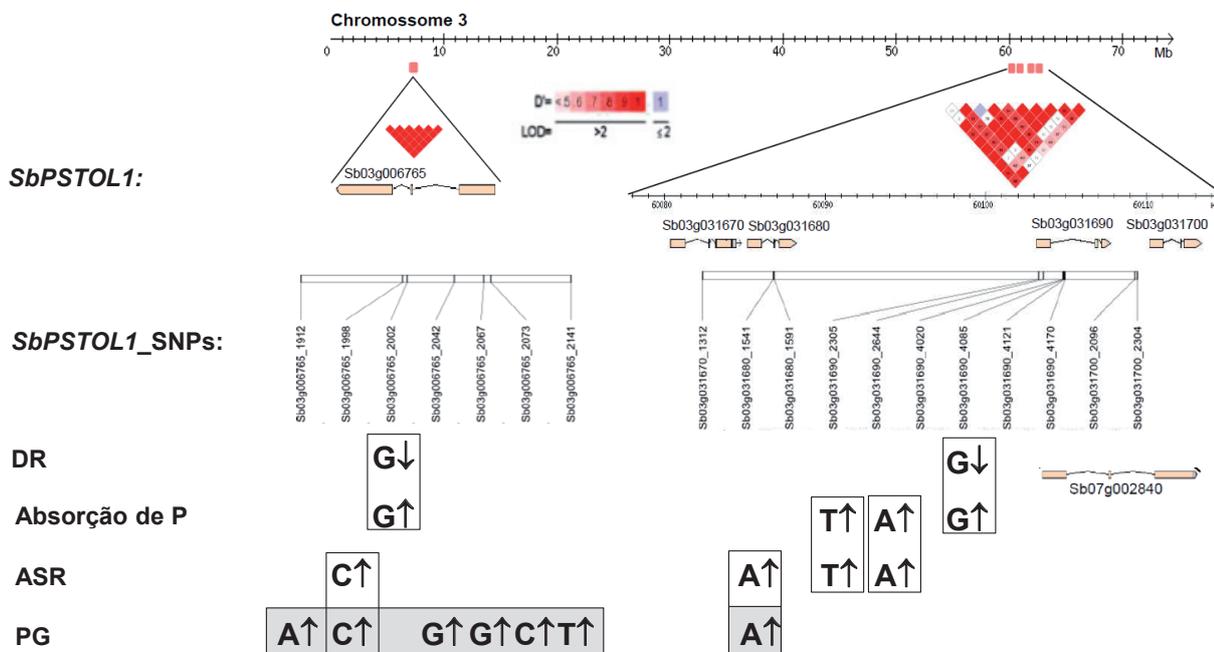


Figura 3. Representação esquemática das associações detectadas entre SNPs dentro de genes *SbPSTOL1* e diferentes características de morfologia radicular e de performance de sorgo sob baixo P. As probabilidades de associação e a variância total explicada por cada SNP estão mostradas na Tabela II de Hufnagel et al. (2014).

A Tabela 2 mostra o efeito dos diferentes SNPs dentro de genes *SbPSTOL1* na produção de grãos de sorgo. Os efeitos individuais variam de aproximadamente 160 a 200 Kg ha⁻¹, mostrando que os marcadores gerados para esses locos SNP são úteis para a seleção assistida visando o aumento da eficiência na utilização de P em sorgo cultivado em solos com baixa disponibilidade do nutriente.

na utilização de P, que estão disponíveis na plataforma KASP para programas de melhoramento assistido.

Particularmente no gene *Sb03g006765*, os mesmos alelos de 5 SNPs foram associados tanto com produção de grãos sob baixo P avaliada no Brasil no painel associativo descrito neste documento quanto com absorção de P e acúmulo de biomassa

Tabela 2. Efeitos na produção de grãos dos marcadores SNP dentro de genes *SbPSTOL1*. O alelo positivo, associado com um aumento na produção de grãos, está marcado em negrito. Fonte: Hufnagel et al. (2014).

Gene	Posição (bp)	Genótipo	Efeito (kg ha ⁻¹)
<i>Sb03g006765</i>	1912	A	173.3
		G	0
	1998	C	169.1
		T	0
	2042	G	158.4
		C	0
	2067	G	181.7
		C	0
	2073	C	154.5
		T	0
2141	T	180.9	
	G	0	
<i>Sb03g031680</i>	1541	A	200.1
		G	0

Os principais resultados desse estudo, publicados em Hufnagel et al. (2014), estão listados a seguir.

Genes *SbPSTOL1* de sorgo aumentam a superfície radicular, a absorção de P e a produção de grãos de sorgo cultivado em solos sob baixa disponibilidade de P no solo.

Foram gerados marcadores moleculares para os SNPs associados com eficiência

avaliados em um outro painel associativo fenotipado no Oeste da África (HUFNAGEL et al., 2014). Isso indica estabilidade de efeito do gene *Sb03g006765* na performance de sorgo sob baixo P, incluindo produção de grãos e de biomassa. Esse resultado enfatiza a utilidade dos marcadores *SbPSTOL1* em programas de melhoramento genético trabalhando com diferentes germoplasmas de sorgo.

Os SNPs no gene *SbPSTOL1* estão em desequilíbrio de ligação completo e há também forte desequilíbrio de ligação entre SNPs no cluster de 4 genes *SbPSTOL1* na porção terminal do cromossomo 3 (Figura 3). Entretanto, os SNPs localizados em genes *SbPSTOL1* na porção inicial (Sb03g006765) e terminal do cromossomo 3 estão em equilíbrio de ligação, o que possibilita a utilização de estratégias de recombinação para seleção de progênies acumulando alelos positivos em diferentes locos *SbPSTOL1*, bem como do gene de tolerância ao alumínio *SbMATE*.

A estratégia acima está em andamento com uma população de recombinação ao acaso de sorgo, o que já permitiu a detecção de efeito positivo dos genes *SbPSTOL1* e *SbMATE*, que confere tolerância ao alumínio (vide circular técnica "Caracterização de uma população de recombinação ao acaso de sorgo para a tolerância ao alumínio e eficiência na utilização de fósforo").

Esses resultados indicam que os marcadores gerados para os genes *SbPSTOL1* podem ser utilizados, tanto pela Embrapa quanto pelos seus parceiros do setor privado, para seleção de progênies de sorgo com maior produção sob baixa disponibilidade de P no solo. A identificação de genes homólogos aos genes *SbPSTOL1* com funções conservadas em outras espécies poderá permitir a utilização de seleção assistida para a eficiência de utilização de fósforo em outras culturas.

Referências

- CASA, M.; PRESSOIR, G.; BROWN, P. J.; MITCHELL, S. E.; ROONEY, W. L.; TUINSTR, M. R.; FRANKS, C. D.; KRESOVICH, S. Community resources and strategies for association mapping in sorghum. **Crop Science**, Madison, v. 48, p. 30-40, 2008.
- CLARK, R. T.; FAMOSO, A. N.; ZHAO, K.; SHAFF, J. E.; CRAFT, E. J.; BUSTAMANTE, C. D.; MCCOUCH, S. R.; ANESHANSLEY, D. J.; KOCHIAN, L. V. High-throughput two-dimensional root system phenotyping platform facilitates genetic analysis of root growth and development. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 36, p. 454-466, 2013.
- GAMUYAO, R.; CHIN, J. H.; PARIASCA-TANAKA, J.; PESARESI, P.; CATAUSAN, S.; DALID, C.; LOEDIN, I. S.; TECSON-MENDOZA, E. M.; WISSUWA, M.; HEUER, S. The protein kinase Pstol1 from traditional rice confers tolerance of phosphorus deficiency. **Nature**, London, v. 488, p. 535-539, 2012.
- GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, Washington, v. 327, p. 812-818, 2010.
- HUFNAGEL, B.; SOUSA, S. M.; ASSIS, L.; GUIMARÃES, C. T.; LEISER, W.; CORRADI, G.; NEGRI, B.; LARSON, B. G.; SHAFF, J. E.; PASTINA, M. M.; WELTZIEN, E.; RATTUNDE, F.; VIANA, J. H.; CLARK, R.; FALCÃO, A.; GAZAFFI, R.; GARCIA, A. A. F.; SCHAFFERT, R. E.; KOCHIAN, L. V.; MAGALHÃES, J. V. Duplicate and conquer: multiple homologs of phosphorus-starvation tolerance 1 enhance phosphorus acquisition and sorghum performance on low-P soils. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 166, p. 659-677, 2014.
- HUND, A.; TRACHSEL, S.; STAMP, P. Growth of axile and lateral roots of maize. I. Development of a phenotyping platform. **Plant and Soil**, The Hague, v. 325, p. 335-349, 2009.
- LÓPEZ-ARREDONDO, D. L.; LEYVA-GONZÁLEZ, M. A.; GONZÁLEZ-MORALES, S. I.; LÓPEZ-BUCIO, J.; HERRERA-ESTRELLA, L. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 65, p. 95-123, 2014.

LYNCH, J. P. Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 156, p. 1041-1049, 2011.

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

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. London: Academic Press, 1995.

MURRAY, S. C.; ROONEY, W. L.; HAMBLIN, M. T.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. Sweet sorghum genetic diversity and association mapping for brix and height. **Plant Genome**, v. 2, n. 1, p. 48-62, 2009.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. F. Difusão. In: NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. F. (Ed.). **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 213-234.

PAYNE, R.; MURRAY, D.; HARDING, S.; BAIRD, D.; SOUTAR, D. **Introduction to GenStat for windows**. 15 ed. Hemel Hempstead: VSN International, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; ROSENBERG, N. A.; DONNELLY, P. Association mapping in structured populations. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 67, p. 170-181, 2000.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. **Mycologia**, New York, v. 104, p. 1-13, 2012.

SOUSA, S.; CLARK, R.; MENDES, F. de; OLIVEIRA, A. C. de; VASCONCELOS, M. J. V. de; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHAES, J. V. A role for root morphology and related candidate

genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012.

STEPHENS, J.; MILLER, F.; ROSENOW, D. Conversion of alien sorghums to early combine genotypes. **Crop Science**, Madison, v. 7, p. 396, 1967.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

VANCE, C.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, p. 423-447, 2003.

WISSUWA, M.; YANO, M.; AE, N. Mapping of QTLs for phosphorus-deficiency tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 777-783, 1998.

YU, J.; PRESSOIR, G.; BRIGGS, W. H.; VROH, B. I. I.; YAMASAKI, M.; DOEBLEY, J. F.; MCMULLEN, M. D.; GAUT, B. S.; NIELSEN, D. M.; HOLLAND, J. B.; KRESOVICH, S.; BUCKLER, E. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. **Nature Genetics**, New York, v. 38, p. 203-208, 2006.

**Circular
Técnica, 219**

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

www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição

Versão Eletrônica (2016)

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

**Comitê de
publicações**

Presidente: Presidente: Sidney Netto Parentoni.

Secretário-Executivo: *Elena Charlotte Landau.*

Membros: *Antonio Cláudio da Silva Barros,
Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia
Ferreira Simeone, Monica Matoso Campanha,
Roberto dos Santos Trindade e Rosângela Lacerda
de Castro.*

Expediente

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

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de
Castro.*

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

Editoração eletrônica: *Tânia Mara A. Barbosa.*