

155

Circular
TécnicaSete Lagoas, MG
Setembro, 2010

Autores

Belkiss Cristina F.S. Oliveira
Graduanda em ciências biológicas
pela UNIFEMM, bolsista de biologia
molecular (FAPEMIG), belkiss71@
yahoo.com.br

Paula Márcia Abreu Moura
Graduanda em ciências biológicas
pela UNIFEMM, bolsista de
biologia molecular (CNPq-PIBIC),
paulinhamarcia71@hotmail.com

Bárbara Hufnagel Maciel,
Mestranda em Genética UFMG,
bolsista de Biologia Molecular
(FAPEMIG), barbarahufnagel@
gmail.com

Cláudia Teixeira Guimarães
Eng.-Agrônoma, Doutora em
Melhoramento Genético Vegetal,
Pesquisadora em Genética Molec.
e Genó. da Embrapa Milho e Sorgo,
Sete Lagoas, MG, claudia@cnpms.
embrapa.br

Fernanda Fátima Caniato Doutora
em Genética, bolsista FAPEMIG.

Robert Eugene Schaffert
Eng.-Agrônomo, Ph.D em Genét.
e Melhor. de Plantas, Pesquisador
da Embrapa Milho e Sorgo, Sete
Lagoas, MG, schaffert@cnpms.
embrapa.br

Silvio Castro Fonseca Júnior
bolsista UNIFEMM. Sete Lagoas,
MG

Silvia Neto Jardim
Doutora em Genética,
Pesquisadora da Embrapa Milho e
Sorgo, Sete Lagoas, MG,
silvia@cnpms.embrapa.br

Jurandir Vieira de Magalhães
Eng.-Agrônomo, Ph.D. em Biologia
Molecular, Pesquisador da Embrapa
Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG,
jurandir@cnpms.embrapa.br.
Autor Correspondente.



Utilização de Marcadores Moleculares na Seleção Assistida para Tolerância ao Alumínio em Sorgo

Toxidez causada pelo alumínio em sorgo

O sorgo, denominado cientificamente de *Sorghum bicolor* L. Moench, é uma gramínea de origem africana pertencente à família Poaceae que apresenta adaptação a uma gama de ambientes. O sorgo apresenta desempenho superior à maioria das culturas em condições de deficiência hídrica. Em grande parte da África, sul da Ásia e América Central, o sorgo é utilizado como principal fonte de alimento, além de ser um componente importante da alimentação animal nos Estados Unidos, na Austrália e na América do Sul. Seus grãos podem ser empregados na produção de farinha para panificação, amido industrial, álcool e forragem (TARDIN e RODRIGUES, 2008).

Devido à rusticidade natural do sorgo e à grande versatilidade de utilização de seus grãos e forragem, a cultura é frequentemente implantada em condições de estresses. Nos ambientes tropicais é comum o cultivo de sorgo em solos com alta saturação de alumínio, causando toxidez às plantas. O alumínio é um dos metais mais abundantes na crosta terrestre, sendo liberado na solução do solo em condições ácidas, assumindo formas fitotóxicas, como o Al^{3+} . A toxidez causada pelo Al afeta o desenvolvimento das plantas e, em particular, inibe o crescimento radicular, tornando as raízes curtas e grossas; o ápice radicular é o alvo primário do Al (KOCHIAN et al., 2004).

Em vista disso, há um crescente interesse na seleção de plantas tolerantes que possam ser utilizadas em áreas que apresentam problemas de toxidez de Al. As anomalias e os danos causados ao sistema radicular implicam na exploração de menor volume de solo (FOY et al., 1993), comprometendo a absorção de nutrientes e tornando as culturas mais sensíveis à deficiência hídrica. Em razão da rápida expansão das fronteiras agrícolas brasileiras e do plantio de sorgo na época da safreina na região do cerrado, a seleção de genótipos de sorgo com tolerância ao alumínio torna-se fundamental para assegurar a estabilidade de produção nessas áreas.

O gene de tolerância ao Al Alt_{SB} em sorgo

O gene de tolerância ao alumínio, denominado Alt_{SB} , foi mapeado por Magalhães et al. (2004) na porção terminal do cromossomo 3 de sorgo e foi subsequentemente clonado por clonagem posicional (MAGALHAES et al., 2007). O gene que condiciona o loco Alt_{SB} , denominado *SbMATE*, é membro da família multigênica MATE e em sorgo foi localizado em uma região de 24,6 kpb. O loco Alt_{SB} é flanqueado por marcadores moleculares co-dominantes do tipo STS (*Sequence Tagged Sites*), M181 e CTG29, que estão ligados ao loco de tolerância a 0,1 e 0,5 cM, respectivamente (CANIATO et al., 2007). Durante a clonagem posicional do gene *SbMATE*, outros marcadores STS, S17 e S73, foram desenvolvidos a partir de sequências no mesmo cromossomo artificial de bactéria (BAC) que contém o gene *SbMATE*. O marcador S17 está localizado a 32,1 Kpb (1 kpb = 1000 pares de base) do loco Alt_{SB} do mesmo lado que o CTG29,

enquanto S73 está localizado a 22,4 Kpb do Alt_{SB} do mesmo lado que M181. A Figura 1 representa de forma esquemática a posição dos marcadores CTG29, M181, S17 e S73 em relação ao loco Alt_{SB} .

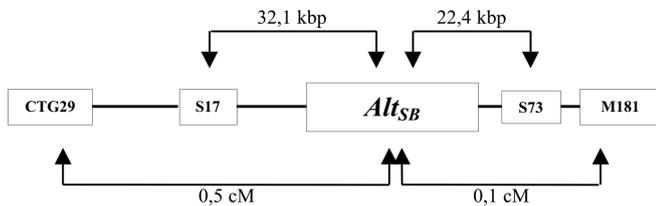


Figura 1. Mapa genético (cM, centimorgans) e físico (Kbp, 1.000 pares de bases) da região do gene Alt_{SB} no cromossomo 3 de sorgo.

Seleção assistida para a tolerância ao Al em sorgo

A fim de se obter maior eficiência na transferência de genes de interesse, a seleção assistida por marcadores moleculares tem sido utilizada no melhoramento genético de plantas. Quando associados a diferentes características de importância econômica, os marcadores moleculares permitem a seleção precoce de características desejáveis em gerações segregantes (GUIMARÃES et al., 2009), e a eliminação de ciclos de retrocruzamento, com ganhos na recuperação do genoma recorrente. No caso do loco Alt_{SB} , há disponibilidade de duas importantes informações para programas de seleção assistida. Primeiramente, a clonagem do gene Alt_{SB} nos permitiu desenvolver marcadores gene-específicos que são úteis para a mineração de alelos do gene de tolerância. Além disso, a disponibilidade da sequência completa do genoma do sorgo (<http://www.phytozome.net/sorghum>) nos permite identificar ou desenvolver marcadores para monitorar, de maneira detalhada, a região do gene Alt_{SB} , para reduzir o arraste genético provocado pela pressão seletiva no loco.

Um exemplo drástico de arraste genético foi relatado para o loco $Tm-2$, que confere resistência ao vírus do mosaico do fumo. Nesse caso, o fragmento introgridido juntamente ao loco por seleção assistida chegou a 51 cM em extensão, correspondendo à totalidade do braço curto do cromossomo 9 (YOUNG; TANKSLEY, 1989). Isso indica que a região flanqueando o loco sob introgressão deve ser cuidadosamente monitorada, de maneira a reduzir o arraste genético.

Assim, a seleção assistida para o gene Alt_{SB} foi realizada com base nos marcadores indicados na Figura 1, além de marcadores gene específicos. A linhagem 90SN-7, proveniente do programa de melhoramento do *Institute National de La Recherche Agronomique Du Niger* (INRAN - Niger), sensível ao alumínio, foi utilizada como parental recorrente e a linhagem SC566-14, tolerante ao alumínio, como doadora.

O cruzamento entre as linhagens doadora e recorrente foi realizado na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas – MG, em 2009/2010. O híbrido F1 obtido pelo cruzamento entre os parentais foi retrocruzado com o parental recorrente para obtenção da família RC1F1. Devido ao fato das linhagens do programa do INRAN serem sensíveis ao fotoperíodo, o florescimento somente é esperado quando o comprimento do dia torna-se menor do que 12 horas e 20 minutos. Para assegurar o florescimento durante o período de verão na latitude de Sete Lagoas, foi construído um sistema automático de controle de fotoperíodo, que foi instalado no interior de uma casa de vegetação (Figura 2).



Figura 2. Câmara de controle de fotoperíodo utilizada para induzir o florescimento das linhagens do programa de melhoramento do INRAN (Niger). O sistema de cortinas plásticas é fechado e aberto automaticamente com controle via timers, de maneira a manter o comprimento do dia constante, com incidência de 10 horas de luz por dia.

O primeiro passo para a seleção visando à maximização da recuperação do genoma recorrente (seleção background) foi o de obter as posições físicas dos marcadores disponíveis no genoma do sorgo.

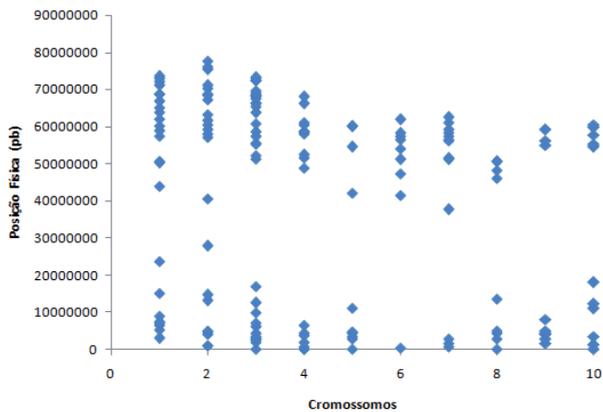


Figura 3. Distribuição física dos marcadores SSR utilizados para seleção background no genoma do sorgo. As posições foram obtidas por análise de similaridade de sequência (BLAST) dos *primers* SSR com o genoma do sorgo (<http://www.phytozome.net/sorghum>).

A Figura 3 indica uma boa distribuição dos marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) ao longo do genoma do sorgo, com menor representação, como esperado, nas regiões centroméricas. Foram então compiladas todas as informações de posições genéticas disponíveis para esses marcadores utilizando-se como base o mapa consenso de sorgo publicado por Mace et al. (2009). As distâncias genéticas para marcadores com informações indisponíveis foram inferidas com base nas distâncias físicas e genéticas de locos vizinhos. A partir dessas análises foi gerado um mapa genético contendo todas as posições dos marcadores SSR de sorgo disponíveis na Embrapa Milho e Sorgo, conforme apresentado na Figura 4.

Frisch et al. (1999) chamam a atenção para a importância do controle do arraste genético em programas de retrocruzamento assistido, o

que leva a uma redução sensível no número de marcadores necessários para recuperação do genoma recorrente. A Tabela 1 mostra a região física do loco Alt_{SB} com os marcadores disponíveis para seleção de recombinantes contendo o alelo da linhagem recorrente 90SN-7 no loco marcador. As etapas adotadas para introgressão assistida do loco Alt_{SB} na linhagem recorrente 90SN-7 estão descritas abaixo.

Seleção para o loco Alt_{SB} (seleção foreground)

A seleção foreground, para introgressão do alelo favorável $Alt_{SB'}$, foi conduzida em 255 progênies RC1F1 com o marcador S17 e também confirmada com o marcador gene específico, 6083 (HUFNAGEL, 2009). Foram selecionados 133 progênies em heterozigose para os locos marcadores, de maneira consistente com a razão esperada de segregação 1:1 (heterozigotos:homozigotos para o alelo da linhagem recorrente, $\chi^2 = 0.47$, $p[x > 0.47] = 0.49$).

Seleção de recombinantes para redução do arraste genético

As progênies heterozigotas para o loco Alt_{SB} foram selecionadas e genotipadas com o marcador M1762 (Tabela 1), que está localizado a 18.1 cM do loco Alt_{SB} (posição física 74.1 – 74.2, à direita do loco Alt_{SB}). A proporção de recombinantes simples esperada para a classe contendo o loco Alt_{SB} em heterozigose e o loco marcador em homozigose para o alelo da linhagem recorrente é de 0,5 x a frequência de recombinação entre os locos. Em 255 progênies RC1F1, seriam, portanto, esperados 23 indivíduos recombinantes para essa classe, o que foi extremamente próximo dos 27 que foram de fato detectados. Esses indivíduos recombinantes, com menor arraste genético do genoma doador na região do loco $Alt_{SB'}$, foram selecionados para a etapa subsequente.

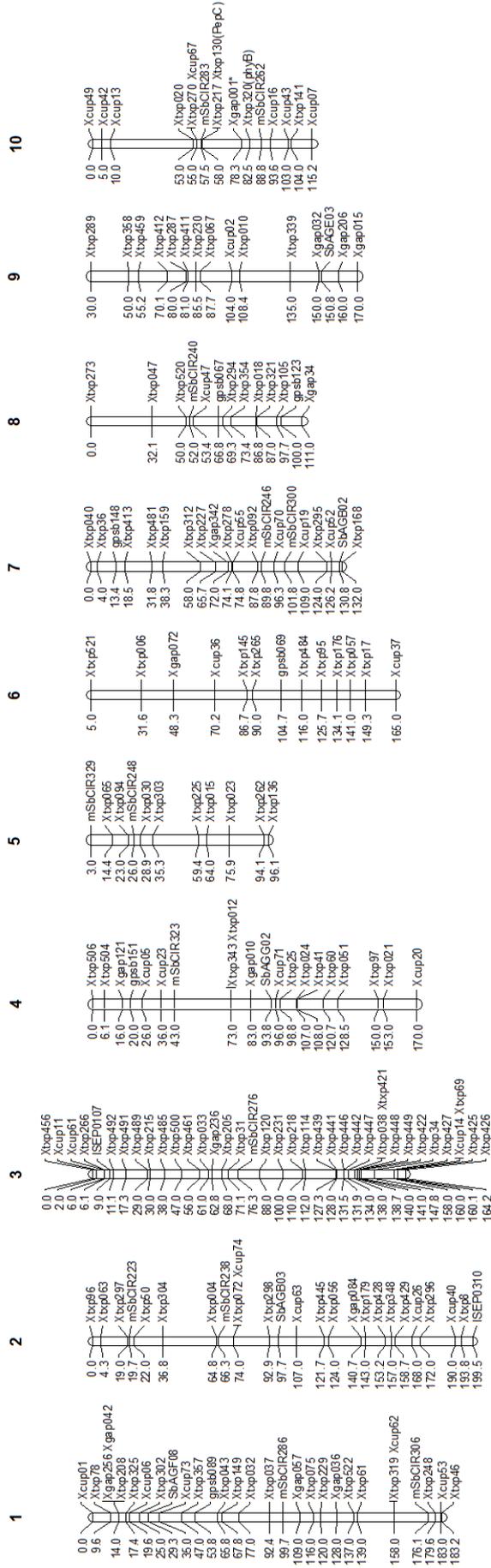


Figura 4. Mapa genético dos marcadores SSR de sorgo. As distâncias genéticas em centimorgans (cM) estão mostradas à esquerda dos grupos de ligação, em frente aos respectivos locos marcadores. A designação cromossômica encontra-se acima de cada grupo de ligação.

Mpb	65	66	68	71	72	73	74
Kpb	300 - 400	100 - 200 400 - 500	100 - 200 400 - 500 700 - 800 800 - 900 600 - 700 800 - 900 900 - 1000	100 - 200	300 - 400 400 - 500 0 - 100 200 - 300 300 - 400	500 - 600	100 - 200
Locos	txp441	txp446 txp442	txp449 txp448	txp427 txp69	txp427 txp69	txp425 txp426	EM1 - M9612 M1762 - MIBP
		Xtxp38	STOP1	S17 - AITSB - S73 - M181	Xcup14	DG1	
		txp421	txp422	isu52	txp429		
		txp447	txp448	txp34			

Tabela 1. Posição física dos locos marcadores na região do loco *Alt_{SG}* no cromossomo 3 de sorgo. Mpb: Mega (1.000.000) pares de bases. Kbp: Kilo (1.000) pares de bases.

Seleção com marcadores distribuídos aleatoriamente no genoma do sorgo para aceleração da recuperação do genoma recorrente (seleção background)

Um subconjunto dos marcadores SSR mostrados na Figura 1 foi selecionado com base na presença de polimorfismo entre as linhagens parentais e em sua distribuição no genoma. Para blocos de locos sob forte ligação genética dentro do grupo de ligação foi mantido somente um marcador SSR para recuperação do genoma do parental recorrente. As 27 progênie RC1F1 foram então genotipadas com 36 marcadores SSR. A média de recuperação do genoma recorrente considerando-se as 27 progênie foi de 72%, bastante próxima à proporção de 75% esperada após uma geração de retrocruzamento (Figura 5a). No entanto, foi possível selecionar 4 progênie RC1F1 que recuperaram em média 85% do genoma recorrente (Figura 5b) e a proporção do

genoma recorrente em uma dessas progênie foi de 87%. O genótipo gráfico dessa progênie está mostrado na Figura 5c.

Uma nova população RC1F1 foi gerada com a mesma linhagem doadora, SC566, mas com uma nova linhagem recorrente, NR360, pertencente ao programa de melhoramento do INRAN. A etapa 1 foi similar àquela descrita para o retrocruzamento tendo a linhagem 90SN-7 como parental recorrente. Entretanto, no caso das progênie RC1F1 NR360 x SC566, foi utilizado o marcador CTG29 (Tabela 1), que está fortemente ligado ao gene *Alt_{SB'}* para redução do arraste genético (etapa 2). Devido à alta intensidade de ligação entre CTG29 e *Alt_{SB'}* foram detectadas somente 6 progênie com eventos de recombinação simples entre os locos e, por conseguinte, que apresentavam o alelo proveniente da linhagem NR360 no loco marcador. A seleção para recuperação do genoma recorrente está em andamento.

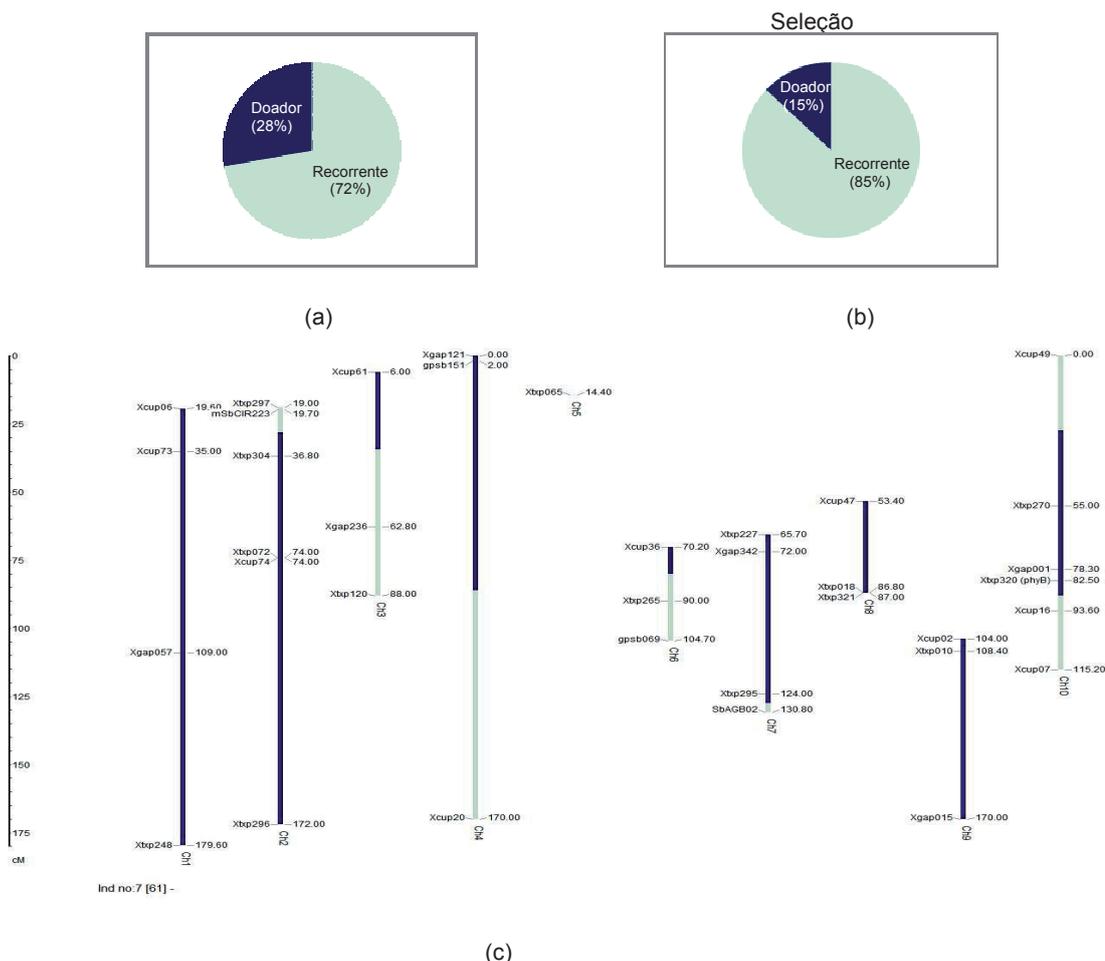


Figura 5. Média de recuperação do genoma recorrente das 27 progênie 90SN-7 x SC566 RC1F1 com eventos de recombinação entre o gene *Alt_{SB'}* e o marcador M1762 (a). Média do genoma recorrente em 4 progênie RC1F1 selecionadas (b) (c) Genótipo gráfico da progênie que apresentou maior proporção do genoma recorrente (87%). Legenda: Em azul está representado o genoma homocigoto para o parental recorrente e em cinza os alelos em heterocigose.

Aplicações e perspectivas

A seleção assistida por marcadores permitiu, na primeira geração de retrocruzamento, a seleção de progênies que recuperaram até 87% do genoma recorrente. Essa proporção é significativamente maior do que a média esperada após uma geração de retrocruzamento (75%), sendo compatível com aquela esperada após duas gerações de retrocruzamento. Portanto, espera-se com isso eliminar ao menos uma geração de retrocruzamento considerando-se um programa compreendendo três ciclos de retrocruzamentos sem o auxílio de marcadores. Provavelmente esses resultados favoráveis devem-se, em grande parte, a um controle eficiente da região flanqueando o gene *Al_t_{SB}* com a seleção de progênies recombinantes.

Referencias

- CANIATO, F. F.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; ALVES, V. M. C.; KOCHIAN, L. V.; BORÉM, A.; KLEIN, P. E.; MAGALHAES, J. V. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 114, p. 863-876, 2007.
- FRISCH, M.; BOHN, M.; MELCHINGER, A. E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1295-1301, 1999.
- FOY, C. D.; DUNCAN, R. R.; WASKOM, R. M.; MILLER, D. R. Tolerance of sorghum genotypes to an acid, aluminum toxic tatum subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 16, p. 97-127, 1993.
- GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I.; MAGALHÃES, J. V.; SOUZA JÚNIOR, C. L. de. Marcadores moleculares no melhoramento. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2009. cap. 4, p. 129-175.
- HUFNAGEL, B. M. **Mineração e caracterização de alelos do gene de tolerância ao alumínio *Al_t_{SB}* em sorgo**. 2009. 77 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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.
- MACE, E. S.; RAMI, J. F.; BOUCHET, S.; KLEIN, P. E.; KLEIN, R. R.; KILLIAN, A.; WENZL, P.; XIA, L.; HALLORAN, K.; JORDAN, D. A consensus genetic map of sorghum that integrates multiple component maps and high-throughput Diversity Array Technology (DArT) markers. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 13, 2009.
- MAGALHÃES, J. V.; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.-H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, 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, p. 1156-1161, 2007.
- MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; 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.
- PHYTOZOME v.6.0. **Sorghum bicolor (Cereal grass)**. Disponível em: < <http://www.phytozome.net/sorghum> >. Acesso em: 10 out. 2010.
- TARDIN, F. D.; RODRIGUES, J. A. S. Cultivares. In: RODRIGUES, J. A. S. (Ed.). **Cultivo do sorgo**. 4. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 2).
- YOUNG, N. D.; TANKSLEY, S. D. RFLP analysis of the size of the chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 77, p. 353-359, 1989.

**Circular
Técnica, 155**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Rod. MG 424 km 45 Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027 1100
Fax: (31) 3027 1188
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br
1ª edição
1ª impressão (2010): on line

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**



**Comitê de
Publicações**

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira.
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau.
Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida
Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana,
Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro.

Supervisão editorial: Adriana Noce.

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros.

Expediente

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro.
Tratamento das ilustrações: Tânia Mara A. Barbosa.
Editoração eletrônica: Tânia Mara A. Barbosa.