



FERNANDA F. CANIATO¹, CLAUDIA T. GUIMARÃES², VERA M. C. ALVES²,
ROBERT E. SCHAFFERT², UBIRACI G.P. LANA², ALUÍZIO BORÉM¹ e JURANDIR
V. MAGALHÃES²

¹Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 35570-000.

²Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG 35701-970

INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 40% dos solos potencialmente aráveis no mundo correspondam a solos ácidos (von Uexküll e Mutert, 1995), que se caracterizam por pH abaixo de 5,0, baixa saturação de bases, baixos teores de fósforo e elevados teores de alumínio. Diferentes formas de alumínio ocorrem na solução do solo e a proporção relativa dessas formas depende principalmente dos valores de pH. Entretanto, abaixo de pH 5,0, formas iônicas de alumínio encontram-se solubilizadas na solução do solo, inibindo o crescimento radicular e limitando a absorção de água e nutrientes pelas plantas.

Práticas de manejo do solo visando à correção da acidez, como a calagem, são eficientes somente em camadas superficiais, não sendo essa uma opção econômica e/ou uma estratégia eficaz no controle da acidez do subsolo. Assim sendo, o entendimento do controle genético da tolerância ao alumínio é uma importante informação a ser explorada pelos melhoristas visando ao desenvolvimento de genótipos tolerantes a esse estresse.

De maneira geral, a tolerância ao Al em sorgo é controlada por um número pequeno de genes maiores com efeito dominante, provavelmente um gene com dominância parcial e vários genes menores com pelo menos algum efeito aditivo (Borgonovi et al. 1987). Entretanto, para características fenotípicas relacionadas à tolerância ao Al, distribuições de frequência bimodais resultantes da avaliação de progênies derivadas do cruzamento de parentais tolerantes e sensíveis ao Al (Furlani & Bastos 1990) indicam a existência de genes maiores em determinadas fontes de tolerância em sorgo. Dentre essas, a linhagem SC 283 (IS 7173) é o padrão de tolerância ao Al mais amplamente aceito nessa cultura (Duncan, 1988; Duncan et al., 1983; Foy et al., 1993). Estudos de herança e mapeamento molecular conduzidos em populações derivadas de SC 283 indicaram a presença de um gene maior de tolerância ao Al na região terminal do cromossomo 3, *Alt_{SB}*, que foi responsável por 80% da variação fenotípica para essa característica (Magalhães et al. 2004). Além disso, dados preliminares indicaram uma base genética possivelmente limitada para controle de altos níveis de tolerância ao Al em sorgo. Com o objetivo de isolar o gene *Alt_{SB}* via clonagem posicional, o grupo responsável pelo mapeamento de *Alt_{SB}* desenvolveu um conjunto de marcadores STS (*sequenced-tagged sites*) fortemente

ligados ao gene *Alt_{SB}* a uma distância genética inferior a 0,5 cM.

O presente trabalho visa identificar, por meio desses marcadores moleculares, novas fontes de tolerância ao Al em sorgo que contenham genes distintos de tolerância daquele identificado em SC 283. Essas fontes seriam de grande utilidade para programas de seleção recorrente visando à piramidação de genes de tolerância e produção de genótipos superiores para cultivo em solos com toxidez de Al.

MATERIAL E MÉTODOS

Doze linhagens de sorgo foram avaliadas para tolerância ao Al em solução nutritiva, utilizando-se cinco níveis de Al tóxico com as seguintes atividades (entre chaves) e concentrações (entre colchetes) respectivamente, {0}[0], {11}[60], {20}[110], {27}[148] e {39}[222] μM Al. Adicionalmente, a linhagem de sorgo SC 175-14, tolerante ao Al, foi cruzada com BR 012R, uma linhagem elite sensível ao Al do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. Os parentais e 210 indivíduos F_2 , derivados desse cruzamento, foram avaliados na dose de {27}[148] μM Al. Sementes das linhagens parentais e da população F_2 foram escarificadas para quebra de dormência, sendo posteriormente tratadas com hipoclorito de sódio (0,525%) por 10 minutos sob agitação constante, e enxaguadas oito vezes com água destilada. As sementes foram germinadas em papel toalha umedecidos em água por um período de quatro dias (temperatura média diurna de $27 \pm 3^\circ\text{C}$, temperatura média noturna de $20 \pm 3^\circ\text{C}$). Plântulas uniformes foram transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC dentro de bandejas plásticas com capacidade para 8,5 litros de solução nutritiva. As plântulas foram mantidas por 48 h em solução nutritiva completa (Magnavaca *et al.* 1982) sem Al, com pH ajustado para pH 4,0. Após esse período, foi adicionada solução nutritiva contendo Al, suprido por uma solução estoque de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

O comprimento controle da raiz seminal de cada plântula foi medido após 24 ($C_{24\text{h}}$) e 48 h ($C_{48\text{h}}$) de crescimento em solução nutritiva completa sem alumínio ($C_c = C_{48\text{h}} - C_{24\text{h}}$) e após cinco dias de crescimento em solução nutritiva contendo {27} μM Al ($C_{120\text{h}+\text{Al}}$), onde as chaves indicam atividade de Al livre correspondente a [148] μM Al, estimada com o software GEOCHEM-PC (Parker *et al.* 1995). A atividade de {27} μM Al foi adotada por possibilitar clara diferenciação nos valores de inibição do crescimento entre os parentais SC 175-14 e BR 012R. As plântulas foram mantidas em câmara de crescimento, sob condições controladas de temperatura e umidade, durante todo o experimento. Foram determinados os seguintes índices para progênies F_2 : CL (crescimento radicular líquido) = $C_{120\text{h}+\text{Al}} - C_{48\text{h}}$; CRR (% crescimento radicular relativo) = $[(C_{120\text{h}+\text{Al}} - C_{48\text{h}}) / C_{48\text{h}}] \times 100$. Para as linhagens parentais, para as quais foi possível a adoção de um controle (-Al) independente durante todo o período experimental, foi obtido o crescimento líquido num período de 5 dias em cada concentração de Al. Valores percentuais de crescimento (% do controle -Al) foram obtidos dividindo-se o crescimento líquido na presença de Al pelo crescimento líquido na ausência de Al.

Após a avaliação fenotípica, 100 plântulas F₂ foram transferidas para vasos, em casa de vegetação, isolando-se o DNA a partir de 5g de tecido foliar, segundo Saghai-Marrof *et al.* (1984). As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 20µL, consistindo de 2mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase, 125 µM dos dNTPs, 87,5 nM de cada um dos *primers* e 30 ng de DNA. Dois locos STS m181 e ctg29, ligados ao gene *Alt_{SB}* a 0 e 0,2 cM, respectivamente (estimativa obtida previamente em uma população de 354 linhagens recombinantes derivadas de SC 283), foram avaliados na população. As reações de PCR foram montadas em formato multiplex e resolvidas no seqüenciador automático de DNA ABI377. As amplificações seguiram-se mediante às seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C/1 min, 30 ciclos de 94°C/30s, 55°C/1min. e 72°C/1min., e elongação final a 72°C/5min. Uma alíquota de 2 µL dos produtos finais da reação de PCR, diluídos 100 vezes em água, foi misturada com 1 µL de formamida HI-DI e 0,5µL do corante *blue dextran*. As amostras foram desnaturadas durante 5 minutos a 95°C e mantidas em gelo até o carregamento do gel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos (Tabela 1) demonstram a existência de variabilidade acentuada quanto aos níveis de tolerância ao Al entre as linhagens de sorgo. Com o aumento da atividade de Al houve quebra na tolerância (assim considerada quando houve crescimento <70% do crescimento do controle -Al) de determinadas linhagens. Entretanto, as linhagens SC 175-14, CMSXS 225R, SC 566-14 e SC 283 mantiveram altos níveis de tolerância mesmo na mais alta atividade de Al, sendo que a linhagem SC 283 apresentou o maior nível de tolerância dentre todos os genótipos. A observação de linhagens que mantiveram altos níveis de crescimento radicular a {39} µM Al, como SC 175-14 e CMSXS 225R, indica a possibilidade de obtenção de genótipos com níveis superiores de tolerância em cruzamentos com SC 283. A viabilidade dessa estratégia depende da existência de genes de tolerância em SC 175-14 e CMSXS 225R que sejam distintos de *Alt_{SB}* em SC 283, e, ainda, que atuem de forma aditiva uma vez em combinação com esse. Tal situação favoreceria a piramidação de genes e de mecanismos fisiológicos para elevar o patamar de tolerância ao estresse de Al na cultura do sorgo.

Tabela 1. Crescimento radicular de 12 linhagens de sorgo avaliadas em quatro atividades de Al (valores relativos a médias de 21 observações). Os valores percentuais foram obtidos dividindo-se o crescimento líquido na presença de Al pelo crescimento líquido na ausência de Al. As atividades de Al a partir das quais houve quebra de tolerância (crescimento <70%) podem ser encontradas acima da área assinalada.

| | Crescimento (% do controle -Al) | | | |
|-----------------|---------------------------------|------|------|------|
| | (11) | (20) | (27) | (39) |
| BR 007B | 45 | 21 | 16 | 9 |
| BR 012R | 87 | 52 | 35 | 20 |
| IS 8577 | 113 | 78 | 55 | 29 |
| SC 112-14 | 105 | 82 | 45 | 18 |
| SC 549 | 100 | 91 | 74 | 50 |
| 3DX 571-1-1-9-D | 116 | 95 | 70 | 52 |
| 5DX 61-6-2 | 125 | 113 | 96 | 55 |
| 9DX 9-11 | 99 | 82 | 70 | 63 |
| SC 175-14 | 104 | 100 | 84 | 78 |
| CMSXS 225R | 94 | 109 | 109 | 82 |
| SC 566-14 | 124 | 103 | 105 | 98 |
| SC 283 | 103 | 114 | 112 | 107 |

A herança da tolerância ao Al na linhagem SC 175-14 foi estudada à $\{27\}$ μM Al em solução nutritiva. Ao examinar os índices de crescimento radicular (CL e CRR) na população F_2 derivada de BR 012R x SC 175-14, obteve-se distribuição normal dos dados fenotípicos, como seria esperado para uma característica poligênica (Figura 1). Tratando-se a segregação para tolerância ao Al como uma característica métrica, procedeu-se à análise de ligação visando verificar a participação do gene *Alt_{SB}* no alto nível de tolerância da linhagem SC 175-14. Estando os marcadores *ctg29* e *m181* associados ao gene *Alt_{SB}* a uma distância menor do que 0,5 cM, esses marcadores deverão indicar com precisão a segregação de *Alt_{SB}*, sendo esperado um número bastante reduzido ou mesmo nenhum indivíduo F_2 com evento de recombinação entre esses marcadores e *Alt_{SB}* entre 210 indivíduos F_2 . A análise de variância do marcador *m181* com a característica CRR indicou que as médias fenotípicas das classes homocigoto para o alelo de SC 175-14, homocigoto para BR012 e heterocigoto, foram significativamente diferentes ($F = 10,87$, $P < 0,0001$), confirmando a ligação com *Alt_{SB}*.

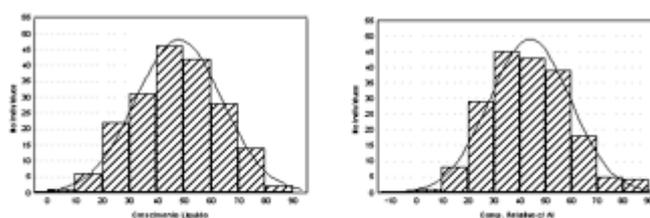


Figura 1. Ajuste da curva de distribuição normal aos dados fenotípicos de crescimento radicular líquido (CL) e porcentagem de crescimento radicular relativo (CRR), avaliados a (27) μM Al em solução nutritiva.

Os resultados apresentados sugerem que o modelo de controle genético simples não explica adequadamente a tolerância ao Al na população F_2 derivada do cruzamento entre SC 175-14 e BR 012R, e que alguma forma alélica do gene de tolerância *Alt_{SB}* está presente em SC 175-14, sendo responsável por no mínimo 21% ($r^2=0,21$) da variação fenotípica para tolerância ao Al tóxico na população F_2 . Contudo, o restante da variação pode ser atribuído à presença de outros genes e/ou à variação experimental causada pela avaliação de plantas individuais na população F_2 . Assim, uma avaliação em progênie $F_{2:3}$ poderá contribuir para um aumento da proporção da variação fenotípica explicado pelos marcadores próximos ao gene *Alt_{SB}*. Adicionalmente, outras populações segregantes serão avaliadas fenotípica e molecularmente, para que seja melhor entendida a diversidade para controle da tolerância ao Al em sorgo.

LITERATURA CITADA

BORGONOV, R. A., SCHAFFERT, R. E., PITTA, G. V. E. Breeding aluminum-tolerant sorghums. In: LM Gourley, JG Salinas, Sorghum for acid soils, eds, **Proceedings of a workshop on evaluating sorghum for tolerance to Al-toxic tropic soils in latin america**, INTSORMIL – ICRISAT – CIAT, Cali, Colombia, pp 271-292, 1987.

DUNCAN, R. R., CLARK, R. B., FURLANI, P. R. Laboratory and field evaluations of sorghum for response to aluminum and acid soil. **Agronomy Journal** 75:1023-1026, 1983.

DUNCAN, R. R. Sequential development of acid soil tolerant sorghum genotypes under field stress conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis** 19:1295-1305, 1988.

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** 16:97-127, 1993.

FURLANI, P. R., BASTOS, C. R., BORGONOV, R. A., SCHAFFERT, R. E. Resposta diferencial de genótipos de sorgo para tolerância ao alumínio em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 22:323-330, 1987.

PARKER, D. R., NORVELL, W. A., CHANEY, R. L. GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible computers. *In*: RH Loeppert, et al., eds, **Chemical Equilibrium and Reaction Models**, Soil Science Society of America Madison, WI, pp 253-269, 1995.

MAGALHAES, 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**, 2004, *In Press*.

MAGNAVACA, R., Gardner, C. O. e Clark, R. B. Inheritance of aluminum tolerance in maize, pp. 201-121 in **Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition**, edited by Gabelman, H. W. and B. C. Loughman. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, 1987.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. A.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, 81:8014-8018, 1984.

VON UEXKÜLL, H. R. e MUTERT, E. Global extent, development and economic impact of acid soils. *In*: RA Date et al., eds, **Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management**, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 5-19, 1995.

