

CRESCIMENTO RADICULAR DE HÍBRIDOS DE SORGO ISOGÊNICOS AVALIADOS QUANTO A TOLERÂNCIA AO ALUMÍNIO TÓXICO

Lidianne Assis Silva¹, Geraldo Afonso de Carvalho Júnior², Flávio Dessaune Tardin³, Jurandir Vieira Magalhães³, José Avelino dos Santos Rodrigues³ e Robert Eugene Schaffert³.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dosagem de alelos do gene *Alt_{SB}* no Crescimento de Raiz Seminal (CRS) de 16 híbridos isogênicos de sorgo avaliados em cinco níveis de alumínio tóxico. O ensaio foi conduzido em Câmara de Crescimento da Embrapa Milho e Sorgo. Avaliou-se 16 híbridos isogênicos ao longo de sete dias (168h), quanto ao Comprimento Raiz Inicial (CRI), Comprimento Raiz Final (CRF), Crescimento Líquido Diário de Raiz (CLDR), Comprimento Relativo Raiz Seminal (CRRS) e CRRS relativo ao nível 0 μ M de Al. Os resultados foram significativos para os híbridos isogênicos que apresentaram um (Tt) e dois (TT) alelos de tolerância do gene *Alt_{SB}*. Com estes resultados fica claro a vantagem do uso de alelos do gene *Alt_{SB}* que controla a tolerância ao Al, em um dos progenitores ou em ambos de híbridos isogênicos.

Introdução

O sorgo é o quinto cereal mais importante no mundo depois das culturas do milho, trigo, arroz e cevada. De acordo com a Conab (2008), nos últimos 18 anos, houve crescimento linear da produtividade do sorgo. Na área plantada, o aumento foi de 333%, ao alcançar a média de 8,5% ao ano e, na produção, o aumento foi de 576%, ao considerar a safra de 1990/1991. O Brasil é responsável por 3,2%, sendo a região Centro-Oeste produtora de 67,8%. A safra mundial de 2008/2009 está projetada em 55 milhões de toneladas.

No Brasil, 127 milhões de hectares do cerrado são viáveis para a utilização agrícola e estes são compostos por solos ácidos, dos quais uma das principais limitações à produção vegetal é a toxidez de alumínio. O ápice radicular é o sítio primário da ação tóxica desse metal, que ocasiona uma inibição do crescimento do sistema radicular, restringindo a absorção de água e de nutrientes pela planta. Estudos realizados por Magalhães *et al.* (2007), na cultura do sorgo, identificaram e clonaram o gene *Alt_{SB}*, que condiciona tolerância ao Al. Este gene é um transportador de ácido orgânico, em sorgo o ácido orgânico transportado é o citrato. O gene é pertencente à família *Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE)*, se expressa no ápice das raízes do sorgo, onde atua formando uma espécie de barreira que impede que o alumínio tóxico se associe à planta. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dosagem de alelos do gene *Alt_{SB}* no Crescimento de Raiz Seminal (CRS) de 16 híbridos isogênicos de sorgo avaliados em cinco níveis de alumínio tóxico (0, 11, 20, 27 e 39 μ M Al³⁺).

Material e métodos

O ensaio foi conduzido em Câmara de Crescimento da Embrapa Milho e Sorgo, sendo os 16 híbridos crescidos em recipientes contendo solução nutritiva em cinco níveis de Al tóxico ({0}, {11}, {20}, {27} e {39} μ M, onde os parênteses indicam a atividade de Al³⁺). A atividade de alumínio de {27} μ M é normalmente usada para detectar diferenças entre genótipos de sorgo tolerantes e susceptíveis ao alumínio. Genótipos de sorgo altamente susceptíveis mostram um forte efeito negativo no crescimento da raiz na concentração de alumínio de {11} μ M. Os híbridos foram avaliados ao longo de sete dias (168h) quanto ao CRI (Comprimento Raiz Inicial), CRF (Comprimento Raiz Final), CLDR

1. Primeira Autora é Doutoranda em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, CEP 14884-900. E-mail: lidisagro@yahoo.com.br

2. Segundo Autor é Graduando em Agronomia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP: 36570-000. E-mail: geraldoaerj@uol.com.br

3. Terceiro Autor é Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, CEP: 35701-970. E-mail: schaffer@cuprns.embrapa.br
Apoio Financeiro: Fundação M^o Knight

(Crescimento Líquido Diário de Raiz), CRRS (Comprimento Relativo Raiz Seminal) e CRRS relativo ao nível $0\mu\text{M}$ de Al^{3+} . Os materiais genéticos foram desenvolvidos da seguinte forma: linhagens fêmeas isogênicas foram desenvolvidas pelo cruzamento de duas linhagens B, ou seja, não restauradoras de fertilidade (BR007B x SC283), sendo a primeira linhagem susceptível e a segunda tolerante ao Al^{3+} . A seleção foi realizada para identificar plantas tolerantes e susceptíveis ao Al^{3+} que segregaram em famílias F5 derivadas de uma única planta F_{2,4}. Esta segregação foi realizada por autopolinização para gerar linhagens semi-isogênicas contrastantes e homocigotas para o alelo *Alt_{SB}*. Dois pares isogênicos contrastantes, ATF8B/ATF10B e ATF13B/ATF14B, susceptíveis e tolerantes ao Al^{3+} , foram identificados e usados para fazer linhagens fêmeas contrastantes e macho estéreis por seis ciclos de retrocruzamentos com uma linhagem A macho estéril, BR007A. Linhagens restauradoras de fertilidade (linhagens R) foram desenvolvidas por retrocruzamento por seleção assistida por marcador (SAM) usando a linhagem elite BR012R susceptível ao Al^{3+} como parental recorrente com duas fontes de linhagens R tolerantes ao Al^{3+} , SC549 e CMSXS225. Três linhagens R isogênicas foram desenvolvidas depois de seis ciclos de retrocruzamento por SAM e foram selecionadas plantas homocigotas tolerantes. Estas quatro linhagens isogênicas restauradoras: (BR012R) susceptível e (BR012R(SC549), BR012R(CMSXS225)1 e BR012R(CMSXS225)2) tolerantes, foram usadas para polinizar as quatro linhagens fêmeas isogênicas para desenvolver dezesseis híbridos isogênicos com zero (tt), um (Tt) e dois (TT) alelos para tolerância Al^{3+} tóxico. As sementes dos dezesseis híbridos foram escarificadas por 5 minutos com areia esterilizada. Posteriormente, as sementes foram esterilizadas com hipoclorito de sódio (0,525%) por 5 minutos, e enxaguadas 8 vezes com água destilada. As mesmas foram germinadas em rolos de papel de germinação por um período de quatro dias em câmara de crescimento com temperatura diurna média de $27 \pm 3^\circ\text{C}$ e noturna de $20 \pm 3^\circ\text{C}$. As plântulas foram então transferidas para copos plásticos perfurados, acomodados em placas de PVC, dentro de bandejas plásticas. Esta transferência foi realizada de forma a montar um DBC com três repetições, num esquema fatorial 16x5, sendo cada parcela experimental constituída de sete plântulas. As plântulas foram mantidas por 24h em solução nutritiva completa sem Al de acordo com Magnavaca (1987). Após este período, o comprimento da raiz seminal das plântulas foi medido, sendo que, em seguida, a solução nutritiva foi substituída por outra com a mesma constituição anterior, porém com a adição de $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, de forma a atingir os cinco níveis de Al tóxico desejados e pH 4,0.

Além do CRI, obtido antes da aplicação do estresse por Al, foi medido o CRS de cada plântula às 48, 96, 144 e 168 horas após ocorrência do estresse, este último medido considerado como (CRF). Esses valores foram utilizados posteriormente para calcular o CLDR e o CRRS. O (CLDR) foi obtido para cada intervalo de leitura e calculado pela fórmula: $\text{CLDR} = \text{CRT}_i - \text{CRT}_{i-1}$, onde CRT_i é o comprimento de raiz no tempo i e CRT_{i-1} é o comprimento de raiz medido anteriormente ao tempo i . O (CRRS) foi obtido pela fórmula: $\text{CRRS} = [(\text{CRF} - \text{CRI})/\text{CRI}] * 100$ e já o CRRS relativo ao nível zero de Al foi calculado dividindo o CRRS de cada nível de alumínio {11}, {20}, {27} e {39} μM pelo CRRS no nível {0} μM de Al multiplicado por 100. Para análise estatística dos dados, foi considerada a média aritmética dos comprimentos das sete plântulas por parcela. As características mensuradas foram submetidas a uma análise de variância e as médias dos híbridos foram avaliadas pelo teste de Tukey, ao nível de ($P < 0,05$). O aplicativo Genes (Cruz, 2001) foi usado para a realização das análises estatísticas, foi utilizado.

Resultados e Discussão

Um resumo da média do crescimento líquido diário de raiz (CLDR) e o CRRS relativo ao nível {0} μM de Al, para híbridos isogênicos contrastantes para zero (tt) e um (Tt) alelo para tolerância ao alumínio está apresentado na Figura 1. A Figura 2 mostra as médias do crescimento radicular diário e o CRRS relativo ao nível {0} μM de Al, de híbridos isogênicos contrastantes para um (Tt) e dois alelos (TT) para a tolerância ao Al^{3+} . Estes resultados estão resumidos para os períodos de 0-3, 3-5 e 5-7 dias de exposição das raízes aos níveis de Al^{3+} . Normalmente a paralisação do crescimento radicular, em qualquer um dos períodos de crescimento está associada aos graves danos sofridos nas raízes pela exposição aos níveis tóxicos de Al^{3+} , levando as mesmas até a morte. Um resumo da média do crescimento radicular dos dezesseis híbridos isogênicos no intervalo do 5-7 dias de exposição aos níveis tóxicos de Al^{3+} está apresentado na Tabela 1.

O crescimento radicular de híbridos isogênicos tradicionais susceptíveis (tt) na Figura 1 é significativamente reduzido no período de 0-3 dias para os níveis {20}, {27} e {39} μM de Al^{3+} onde, os híbridos heterozigóticos com um alelo para tolerância (Tt) têm desenvolvimento radicular normal no nível {20} μM de Al^{3+} e apenas uma ligeira redução de desenvolvimento no nível {27} μM de Al^{3+} . Isto demonstra claramente o efeito positivo do gene *Alt_{SB}* no desenvolvimento radicular em solução nutritiva com Al^{3+} . A diferença significativa de crescimento radicular entre híbridos isogênicos com um (Tt) e dois alelos (TT) (Figura 2 e Tabela 1) foi observado em alguns casos, mas não em todos os casos uma dominância parcial do gene *Alt_{SB}*. Resultados anteriores do nosso programa (CANIATO, *et al.*, 2007) indicam que uma classe de linhagens de sorgo que incluem a linhagem parental (BR007B) de linhagens fêmeas isogênicas, tem o crescimento radicular inibido significativamente no nível {11} μM de Al^{3+} em solução nutritiva. A linhagem restauradora de fertilidade macho utilizada neste experimento manifesta desenvolvimento radicular normal no nível {11} μM de Al^{3+} indicando que aparentemente tem um grau de tolerância que não seja controlado por *Alt_{SB}*. Mesmo com esta ligeira queda no grau de tolerância ao Al^{3+} nós somos capazes de demonstrar a contribuição significativa do alelo de *Alt_{SB}* no desenvolvimento do crescimento radicular na presença de níveis tóxicos de alumínio. Nossos resultados tem também mostrado (dados não publicados) que na avaliação dos pares de híbridos isogênicos, derivados de linhagens fêmeas descritas neste estudo e linhagens restauradoras machos (BR012R) e Tx430R no campo em nível de 40% de saturação de alumínio, os híbridos com presença de um alelo do gene *Alt_{SB}* (a partir de um só progenitor) apresentaram rendimento superior de 1,0 a 1,5 t.ha⁻¹ na produção de grãos comparado com os híbridos sem o alelo *Alt_{SB}*.

Conclusão

Pode-se concluir com estes resultados e juntamente com os outros resultados já obtidos na Embrapa Milho e Sorgo às vantagens significativas na produtividade podem ser obtidas na utilização de híbridos de sorgo com apenas um dos progenitores tolerantes a toxicidade do alumínio em áreas onde os solos se caracterizam como ácidos ou onde esse tipo de estresse pode ocorrer nas camadas mais profundas do solo, além disso, genótipos com sistemas radiculares mais profundos são desejáveis. Recomenda-se também a utilização de híbridos onde ambos os progenitores tenham tolerância ao alumínio tóxico.

Referências

- Companhia Nacional de Abastecimento – Conab. Levantamento produção agrícola 2008/2009. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em 29 abril, 2009.
- Magalhães JV, Liu J, Guimarães CT, Lana UGP, Alves VMC, Wang Y, Schaffert RE, Hoekenga O, Piñeros MA, Schaff JE, Klein PE, Carneiro NP, Coelho CM, Trick HN, Kochian LV. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*, London, n. 44 p. 1156-1161, 2007.
- Magnavaca R, Gardner CO, Clark RB. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: Gableman HW, Loughman BC. (Ed.). *Genetic aspects of plant mineral nutrition*. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, p. 201-212, 1987.
- Schaffert RE, McCrate AJ, Trevisan WL, Bueno A, Meira JL, Rhykerd CL. Genetic variation in *Sorghum bicolor* (L.) Moench for tolerance to high levels of exchangeable aluminum in acid soils of Brazil. Pp. 92-93 International Sorghum Workshop, 1975. University of Mayaguez, Mayaguez, PR.
- Caniato FF, Guimarães CT, Schaffert RE, Alves VMC, Kochian LV, Borem A, Klein PE, Magalhães JV. Genetic diversity for aluminum tolerance in sorghum. *Theoretical and Applied Genetics*, n. 14 p. 863-876, 2007.

Tabela 1: Médias de crescimento radicular (mm) do intervalo entre o 5-7 dias de 16 híbridos isogênicos, avaliados em cinco níveis de concentração de Al^{3+} , valores obtidos pelo Teste de Tukey.

Genótipos de Híbridos Isogênicos	Níveis de Al^{3+} (μM)				
	0	11	20	27	39
ATF8A*BR012R (tt)	18,2 abc	17,6 b	2,3 de	0,7 h	0,6 a
ATF13A*BR012R (tt)	12,7 bcd	20,4 ab	5,8 cde	0,2 h	0,0 a
ATF10A*BR012R (Tt)	19,1 a	21,8 ab	17,4 a	11,6 bcdef	1,0 a
ATF14A*BR012R (Tt)	17,4 abcd	19,7 ab	18,4 a	12,8 abcde	0,9 a
ATF8A* (BR012R(SC549) (Tt)	12,4 bcd	22,3 ab	16,4 a	8,7 def	0,1 a
ATF13A* (BR012R(SC549) (Tt)	12,3 bcd	24,0 a	15,7 a	9,2 cdef	0,1 a
ATF10A* (BR012R(SC549) (TT)	13,3 abcd	18,8 ab	19,3 a	15,9 ab	0,5 a
ATF14A* (BR012R(SC549) (TT)	11,8 d	21,0 ab	18,7 a	15,5 abc	0,6 a
ATF8A* (BR012R(CMSXS225)1 (Tt)	12,3 cd	22,1 ab	14,4 ab	6,3 fgh	0,2 a
ATF13A* (BR012R(CMSXS225)1 (Tt)	17,7 abcd	17,6 b	19,7 a	10,8 bcdef	0,3 a
ATF10A* (BR012R(CMSXS225)1 (TT)	16,7 abcd	17,4 b	17,1 a	18,0 a	2,3 a
ATF14A* (BR012R(CMSXS225)1 (TT)	17,8 abcd	19,1 ab	19,6 a	15,2 abc	2,2 a
ATF8A* (BR012R(CMSXS225)2 (Tt)	17,6 abcd	18,3 ab	17,3 a	12,2 abcdef	0,6 a
ATF13A* (BR012R(CMSXS225)2 (Tt)	18,6 ab	18,9 ab	14,9 ab	9,9 bcdef	0,3 a
ATF10A* (BR012R(CMSXS225)2 (TT)	16,1 abcd	18,2 ab	17,7 a	15,7 ab	2,9 a
ATF14A* (BR012R(CMSXS225)2 (TT)	15,8 abcd	16,7 b	15,8 a	14,7 abcd	3,7 a

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a ($P < 0,05$).

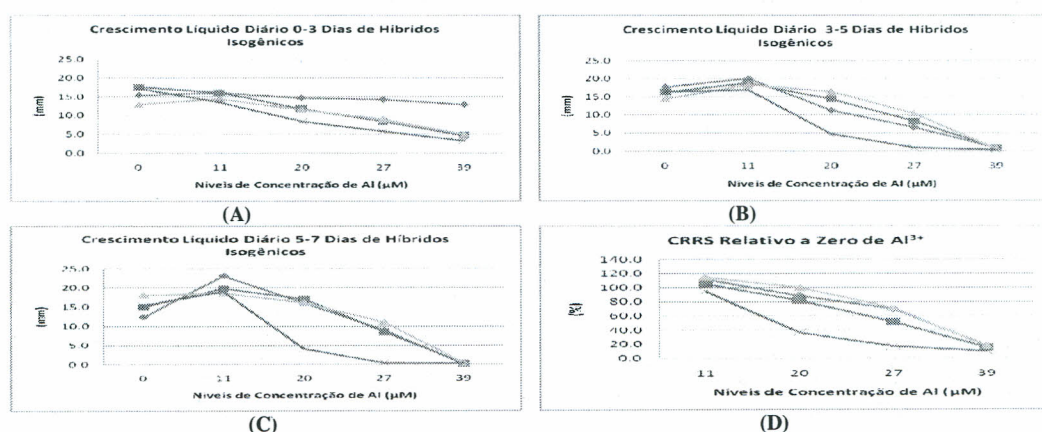


Figura 1: Comparação de crescimento de raiz, entre híbridos isogênicos com zero (tt) e um (Tt) alelo do gene Alt_{SB} que condiciona tolerância ao Al^{3+} , em solução nutritiva com cinco níveis de Al ; e crescimento líquido diário de raiz de híbridos isogênicos entre 0-3 dias (A), 3-5 dias (B), 5-7 dias (C) e CRRS relativo ao nível $0 \mu M$ de Al^{3+} (D). Parentais machos de híbridos isogênicos (---[BR012R(SC549) (Tt) —[BR012R(CMSXS225)1 (Tt) - -[BR012R(CMSXS225)2 (Tt) - ·-[BR012R (Tt))

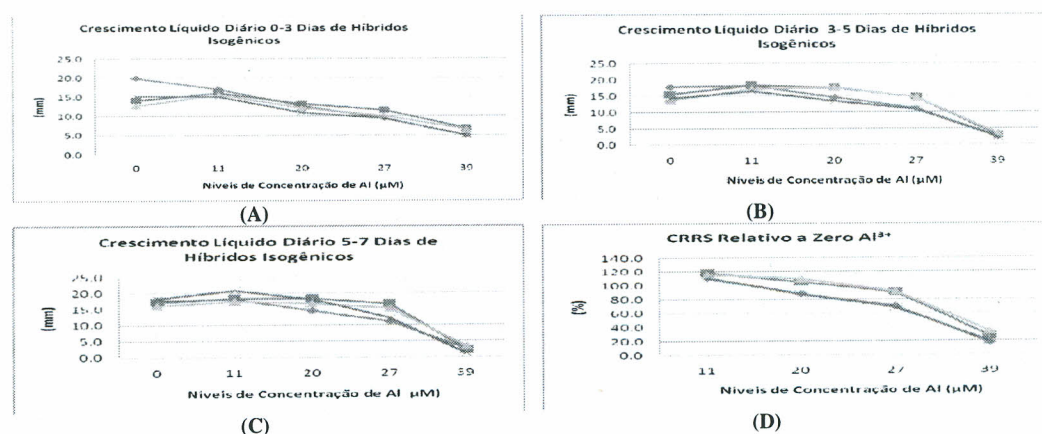


Figura 2: Comparação de crescimento de raiz, entre híbridos isogênicos com um (Tt) e dois (TT) alelos do gene Alt_{SB} que condiciona tolerância ao Al^{3+} , em solução nutritiva com cinco níveis de Al ; e crescimento líquido diário de raiz de híbridos isogênicos entre 0-3 dias (A), 3-5 dias (B), 5-7 dias (C) e CRRS relativo ao nível $0 \mu M$ de Al^{3+} (D). Parentais machos de híbridos isogênicos (---[BR012R(SC549) (Tt) —[BR012R(CMSXS225)1 (Tt) - -[BR012R(CMSXS225)2 (Tt) - ·-[BR012R (Tt))