

Seleção Assistida por Marcadores Moleculares para o Desenvolvimento de Sorgo Sacarino Tolerante ao Alumínio

Pricila Araújo Santana⁽¹⁾; Marcos de Oliveira Pinto⁽²⁾; Crislene Vieira dos Santos⁽¹⁾; Cícero Beserra de Menezes⁽³⁾; Jurandir Vieira Magalhães⁽³⁾; Robert Eugene Schaffert⁽³⁾.

⁽¹⁾ Graduanda em Engenharia Agrônômica; Universidade Federal de São João del-Rei; Sete Lagoas, MG; E-mail: pricila.a.santana@hotmail.com; ⁽²⁾ Analista de Pesquisa e Desenvolvimento; Embrapa Milho e Sorgo ; Sete Lagoas, MG;

⁽³⁾ Pesquisador; Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS); Sete Lagoas-MG;

RESUMO: A toxicidade ao alumínio é um dos principais fatores limitantes à expansão da produção de plantas em solos ácidos em diversas culturas, inclusive no sorgo sacarino. O gene *Alt_{SB}* codifica um transportador de citrato localizado na membrana plasmática das células dos ápices radiculares e a partir de análises associativas foi possível identificar 10 polimorfismos associados a características relacionadas à tolerância ao alumínio. Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar a seleção assistida por marcadores moleculares para o gene *Alt_{SB}* para otimizar o processo de desenvolvimento de novos genótipos de sorgo sacarino com porte baixo e tolerante ao alumínio. Foi utilizada uma população F₂ derivada do cruzamento de {ATF54B * [(Tx623B*ATF54B)6-1]}-64-1-1-1-1 (8% de brix) e CMSXS5010BCMSXS5010B (17% de brix). O processo de obtenção de genótipos de sorgo sacarino tolerante ao alumínio seguiu inicialmente três critérios de seleção: i) arquitetura da raiz em solução nutritiva contendo alumínio; ii) porte de planta na fase reprodutiva; e iii) genotipagem para o gene *Alt_{SB}*. Das 320 plantas iniciais, 200 obtiveram bom perfil de arquitetura de raiz; destas, 60 foram selecionadas com porte abaixo de 1,20 metro. Essas plantas de porte baixo foram genotipadas para o gene *Alt_{SB}* e foi verificado que 23 apresentaram alelos na forma homocigota para o gene de tolerância ao alumínio. Esses indivíduos selecionados foram autofecundados e serão avaliados, na próxima etapa de seleção, em famílias F_{2:4} para conteúdo de açúcar no caule, avaliando-se o valor de brix.

Termos de indexação: PCR; *Alt_{SB}*; *Sorghum bicolor*.

INTRODUÇÃO

O sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] apresenta-se como interessante matéria-prima para produção de etanol, tanto do ponto de vista agrônomo quanto industrial. Por apresentar colmos suculentos com açúcares diretamente fermentáveis, assim como a cana-de-açúcar, o sorgo sacarino se enquadra perfeitamente no sistema de produção do setor sucroalcooleiro. Outra possibilidade vislumbra atender o sistema de produção voltado para agricultura familiar e para cooperativas de produtores baseados em micro e minidistilarias de etanol ou produção de aguardente (RIBEIRO FILHO et al., 2008).

A toxicidade do alumínio é um dos principais fatores limitantes do desenvolvimento das plantas em solos ácidos. A utilização de corretivos da acidez do solo possui limitações técnicas e gera um aumento nos gastos com neutralizantes. Dessa forma, a investigação dos mecanismos de tolerância bem como as bases genéticas da tolerância ao Al têm merecido atenção especial pela pesquisa científica (HARTWIG et al., 2007).

O melhoramento genético, ao selecionar variedades mais produtivas, de melhor qualidade industrial, mais tolerantes a estresses e com melhor adaptação ecológica, possibilita aumentar os rendimentos agrícolas e até mesmo reduzir o uso de insumos pelo agricultor, o que ajuda a preservar a saúde humana e o meio ambiente (BRAMMER, 2000).

A Seleção Assistida por Marcadores Moleculares consiste em integrar a genética molecular com a seleção fenotípica, através da procura de alelos desejáveis com o uso de marcadores moleculares, acelerando-se assim o processo de obtenção de novos genótipos superiores (CAVALCANTI, 2009). A mineração e caracterização de alelos do gene *Alt_{SB}* em sorgo permitiu a identificação de SNPs e o desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para diferentes fontes de tolerância ao

alumínio (HUFNAGEL, 2009). Dentro desse contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar a seleção assistida por marcadores moleculares para o gene *Alt_{SB}* para otimizar o processo de desenvolvimento de novos genótipos de sorgo sacarino com porte baixo e tolerante ao alumínio.

MATERIAL E MÉTODOS

Material genético

Desenvolveu-se uma população de 320 plantas F₂ derivadas do cruzamento entre {ATF54B * [(Tx623B*ATF54B)6-1]}-64-1-1-1-1 x CMSXS5010B. O genótipo {ATF54B * [(Tx623B*ATF54B)6-1]}-64-1-1-1-1 possui gene de tolerância ao alumínio e valor de brix de aproximadamente 8%, enquanto o genótipo CMSXS5010B é um sacarino com valor de brix de aproximadamente 18%, mas este último possui porte alto para ser utilizado como parental feminino na produção de híbridos.

Seleção em solução nutritiva com alumínio

Inicialmente as sementes foram germinadas em papel de germinação por 3 dias. As plântulas foram então transferidas para copos plásticos contendo solução nutritiva completa (MAGNAVACA et al., 1987) por um período de 24 horas de aclimatização. Posteriormente foram desenvolvidas em solução nutritiva contendo 27 µM de Al³⁺ por 5 dias. As plantas foram selecionadas quanto a arquitetura da raiz, levando-se em consideração parâmetros como crescimento da raiz seminal, presença de raiz secundária e volume total de raiz.

Seleção para porte

As plantas selecionadas com boa arquitetura de raiz foram transplantadas em canteiro e selecionadas para porte menor que 1,20 metro na fase reprodutiva. Para ser usada como parental feminino, a linhagem deve ser baixa para possibilitar a colheita mecânica das sementes.

Extração de DNA, amplificação do gene *Alt_{SB}* e eletroforese

A extração do DNA genômico foi realizada em discos foliares em placas de 96 orifícios utilizando o aparelho GenoGrinder 2000, segundo Lana et al. (2010). As reações de PCR para discriminação alélica foram realizadas no sistema ARMS-PCR, utilizando os iniciadores específicos para amplificação do gene *Alt_{SB}* e condições de reação desenvolvidos por Hufnagel (2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seleção para a obtenção de novos genótipos de sorgo sacarino tolerante ao alumínio foi realizada de modo sequencial (Tabela 1). A partir de 320 plantas F₂ da população derivada do cruzamento entre {ATF54B * [(Tx623B*ATF54B)6-1]}-64-1-1-1-1 x CMSXS5010B foram selecionadas 200 plantas que possuíam boa arquitetura de raiz. Essas 200 plantas foram transplantadas em canteiro e selecionadas para porte, tendo como ponto de corte 1,20 metro, sendo obtidas 60 plantas com essas características.

Tabela 1 – Número de indivíduos selecionados nos diferentes critérios adotados.

Característica selecionada	Nº de plantas
População F ₂ inicial	320
Arquitetura de raiz	200
Porte	60

A próxima etapa do processo de seleção foi genotipagem com uso de marcadores específicos para o gene *Alt_{SB}* nos 60 indivíduos selecionados para porte baixo. Nas Figuras 1 e 2 é mostrada a genotipagem dos parentais, {ATF54B * [(Tx623B*ATF54B)6-1]}-64-1-1-1-1 (tolerante ao alumínio) e CMSXS5010B, (sacarino sensível ao alumínio), e de 16 indivíduos da população F₂. A genotipagem foi realizada pelo sistema ARMS-PCR, que permite a identificação das diferentes formas alélicas a partir de dois conjuntos de reações, cada um contendo três primers, sendo dois deles específicos para o gene e um para cada alelo. Na Figura 1, o ARMS-PCR foi realizado para identificação do alelo favorável à tolerância ao alumínio derivado do parental {ATF54B * [(Tx623B*ATF54B)6-1]}-64-1-1-1-1, é esperado um fragmento de aproximadamente 250 pb. Dos 60 indivíduos F₂, todos apresentaram o fragmento de interesse. Na Figura 2, o ARMS-PCR foi realizado para identificação do alelo de sensibilidade ao alumínio derivado do parental CMSXS5010B, é esperado um fragmento de aproximadamente 250 pb. Dos 60 indivíduos F₂, 37 apresentaram o fragmento em questão. Dessa forma, podemos inferir que 37 indivíduos F₂ são heterozigotos para o gene *Alt_{SB}* e 23 indivíduos F₂ são homozigotos para a forma alélica que confere tolerância ao alumínio (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de indivíduos observados em cada classe genotípica.

Genótipo	Observado	Frequência
AA	23	38%
Aa	37	62%
aa	-	-
Total	60	100%

Os 23 indivíduos F₂ homozigotos para a forma alélica que confere tolerância ao alumínio

foram selecionados, autofecundados e serão avaliados, em uma próxima etapa de seleção, em famílias F_{2:4} para o conteúdo de açúcar no caule, avaliando-se o valor de brix.

CONCLUSÕES

O uso de marcadores moleculares se mostra uma ferramenta poderosa para acelerar o processo de obtenção de linhagens de sorgo sacarino tolerante ao alumínio.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e Embrapa Milho e Sorgo pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal.** Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 7 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 3).

CAVALCANTI, J. J. V. Importância da seleção assistida por marcadores moleculares. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE FISILOGIA VEGETAL, 12., 2009, Fortaleza. **Desafios para a produção de alimentos e bioenergia:** livro de resumos. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2009.

HARTWIG, I.; OLIVEIRA, A. C.; CARVALHO, F. I. F.; BERTAN, I.; SILVA, J. A. G.; SCHMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; MAIA, L. C.; FONSECA, D. A. R.; REIS, C. E. S. Mecanismos associados à tolerância ao alumínio em plantas. **Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 219-228, abr./jun. 2007.

HUFNAGEL, B. **Mineração e caracterização de alelos do gene de tolerância ao alumínio *ALT_{SB}* em sorgo.** 2009. 76 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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).

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O.; CLARK, R. B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. **Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition**, v. 27 p. 201-212, 1987.

RIBEIRO FILHO, N. M.; FLORÊNCIO, I. M.; ROCHA, A. S.; DANTAS, J. P.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H. Aproveitamento do caldo do sorgo sacarino para produção de aguardente. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 1, p. 9-16, 2008.

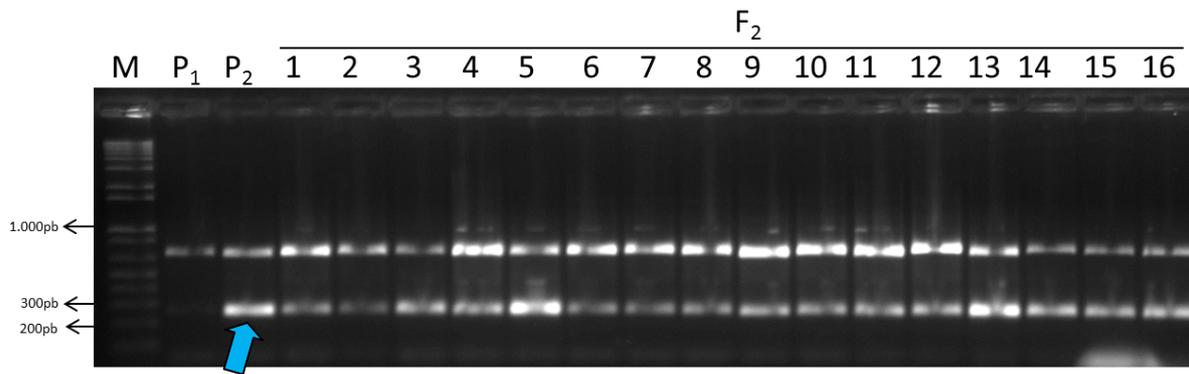


Figura 1. Perfil de amplificação do ensaio para identificação de alelo favorável à tolerância ao alumínio no gene *Alt_{SB}*. P₁ - CMSXS5010B; P₂ - {ATF54B * [(Tx623B*ATF54B)6-1]}-64-1-1-1-1 (amplificação de banda específica de aproximadamente 250 pb, indicado pela seta em azul); 1 a 16 - indivíduos da população F₂.

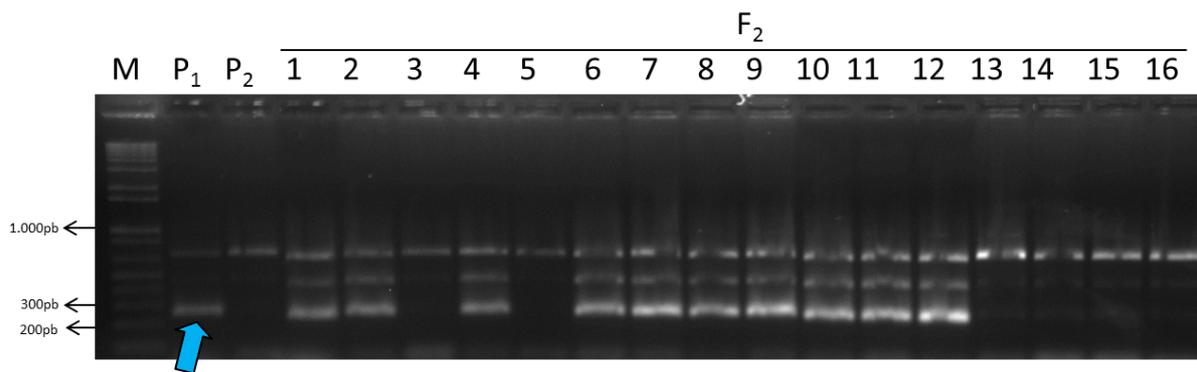


Figura 2. Perfil de amplificação do ensaio para identificação de alelo desfavorável à tolerância ao alumínio no gene *Alt_{SB}*. P₁ - CMSXS5010B (amplificação de banda específica de aproximadamente 250pb, indicado pela seta em azul); P₂ - {ATF54B * [(Tx623B*ATF54B)6-1]}-64-1-1-1-1; 1 a 16 - indivíduos da população F₂.