

184

Circular  
TécnicaSete Lagoas, MG  
Dezembro, 2012

## Autores

**Cynthia M.B. Damasceno**  
Bióloga, Ph.D. em Biologia  
Molecular, Pesquisadora  
da Embrapa Milho e Sorgo,  
Sete Lagoas, MG, [cynthia.damasceno@embrapa.br](mailto:cynthia.damasceno@embrapa.br)

**Rafael A. da Costa Parrella**  
Eng.-Agr., D.Sc. em Genética  
e Melhoramento de Plantas,  
Pesquisador da Embrapa  
Milho e Sorgo, Sete Lagoas,  
MG,  
[rafael.parrella@embrapa.br](mailto:rafael.parrella@embrapa.br)

**José Avelino S. Rodrigues**  
Eng.-Agr., D.Sc. em Genética  
e Melhoramento de Plantas,  
Pesquisador da Embrapa  
Milho e Sorgo, Sete Lagoas,  
MG, [avelino.rodrigues@embrapa.br](mailto:avelino.rodrigues@embrapa.br)

**Robert Eugene Schaffert**  
Eng.-Agr., Ph.D. em Genética  
e Melhoramento de Plantas,  
Pesquisador da Embrapa  
Milho e Sorgo, Sete Lagoas,  
MG,  
[robert.schaffert@embrapa.br](mailto:robert.schaffert@embrapa.br)



## Validação de Marcadores Moleculares para Introgessão da Característica Nervura Marrom (*bmr6*) em Linhagens de Sorgo Biomassa Utilizando Retrocruzamento Assistido

### Etanol de Segunda Geração

A produção do etanol de segunda geração consiste na utilização da biomassa, de origem lignocelulósica, no caso de fontes vegetais, para a conversão biológica da celulose e da hemicelulose em açúcares fermentáveis. Uma das etapas mais caras nesse processo é o pré-tratamento, que pode ser químico, físico ou enzimático, e cuja função é reduzir a interação entre os carboidratos da parede celular e a lignina, um composto polifenólico heterogêneo, que afeta negativamente os processos subsequentes de sacarificação e fermentação (SIMS et al., 2010). Assim, a seleção ou engenharia de culturas vegetais para esse fim deve contemplar alterações na parede celular de maneira que a celulose fique mais acessível às enzimas hidrolíticas, seja por redução dos teores de lignina e/ou menor cristalinidade da fibra de celulose (NAIK et al., 2010; JORDAN et al., 2012). Na tentativa de solucionar esse problema, várias linhas de pesquisa têm focado na identificação, caracterização e manipulação de genes relacionados às vias biossintéticas dos principais polímeros da parede celular, em especial da lignina, para a obtenção de materiais vegetais com características mais adequadas para produção de etanol de segunda geração (SIMMONS; LOQUÉ; RALPH, 2010; DAUWE et al., 2007; CHEN; DIXON, 2007).

Além de várias fábricas piloto instaladas no Brasil, a partir do final de 2013 será construída a primeira planta industrial de biocombustível celulósico do país, no Estado de Alagoas (AL). Apesar dos altos custos de produção de enzimas hidrolíticas, necessárias para o processo de produção de etanol de segunda geração, acredita-se que com a tecnologia atual e utilizando-se biomassa de alta qualidade, a produção de etanol a partir de biomassa disponível, como o bagaço de cana, torna o processo bastante competitivo. Além disso, estima-se que a usina será capaz de produzir 82 milhões de litros de etanol por ano, demonstrando o grande potencial de mercado desta tecnologia (ÚNICA, 2012).

O sorgo de alta biomassa tem grande potencial para ser uma cultura destinada à produção de etanol de segunda geração. Além de possuir acessos genéticos com alta produtividade que em média podem chegar a mais de 30 ton/ha de matéria seca, o sorgo é uma cultura com tolerância a vários tipos de estresses bióticos e abióticos, além de ser mecanizável e propagar-se por semente. Alguns materiais experimentais do programa de melhoramento de sorgo da Embrapa já apresentam produtividade acima de 50 ton/ha de matéria seca. Uma característica importante é que o sorgo

já apresenta naturalmente menores teores de lignina que a cana-de-açúcar, além de possuir mutantes de lignina que podem apresentar até 50% menos lignina que a cultivar original.

## A Característica Nervura Marrom (*brown midrib*)

Mutantes para genes da síntese de lignina já foram descritos em milho e sorgo, e denominados *brown midrib* por causa da formação de tecido vascular marrom-avermelhado nas folhas e nos colmos, fenótipo que está ligado a modificações da lignificação dos tecidos (SATTLER; FUNNELL-HARRIS; PEDERSEN, 2010). Por causa disso, esses mutantes tornaram-se modelos para estudos genéticos e bioquímicos do processo de lignificação em milho, sorgo e outras gramíneas. Enquanto quatro mutantes *brown midrib* em milho (*bm*) se originaram de mutações recessivas espontâneas, os mutantes *brown midrib* de sorgo (*bmr*) foram gerados por mutagênese química em sementes tratadas com dietil sulfato (PORTER et al., 1978). Estudos de alelismo feito por Saballos et al. (2008) com os mutantes *bmr* demonstraram a existência de quatro locos em sorgo, correspondendo às mutações *bmr2*, *bmr6*, *bmr12* e *bmr19*.

Vários mutantes *bmr* em sorgo têm um conteúdo de lignina significativamente menor em colmos e folhas quando comparados às linhagens das quais se originaram, podendo chegar a uma redução de 50%, dependendo do background genético. A Embrapa Milho e Sorgo recentemente lançou um híbrido de sorgo de pastejo, BRS 810, o qual apresenta a característica nervura marrom. Por causa do menor conteúdo de lignina, o híbrido BRS 810 apresenta melhor digestibilidade e conversão alimentar, possibilitando maior produção de carne e leite (RIBAS, 2010; FERREIRA et al., 2012).

Baseado nos dados de aumento de digestibilidade em mutantes *bmr*, foi postulado

que a característica *brown midrib* poderia aumentar a sacarificação enzimática. Esse foi o caso para alguns dos mutantes, em especial *bmr12*, que gerou mais glicose e xilose após a sacarificação enzimática do que o genótipo controle (VERMERRIS et al., 2007). Outros mutantes *bmr* (*bmr6* e *bmr12*) têm sido estudados quanto a sua eficiência na conversão de biomassa, concluindo-se que há maior liberação de açúcares fermentáveis após sacarificação enzimática da biomassa de sorgo em linhagens mutantes *bmr* quando comparadas com as não mutantes correspondentes (SABALLOS et al., 2008; DIEN et al., 2009).

Assim, a redução do conteúdo de lignina pode apresentar um impacto positivo na eficiência de conversão da biomassa de sorgo *bmr* em açúcares simples, o que tornaria o processo de produção de etanol de segunda geração mais eficiente e economicamente mais competitivo.

## Validação de Marcadores Moleculares Tipo CAPS Ligados ao Gene *bmr6* para Utilização em Retrocruzamento Assistido

A fim de auxiliar no desenvolvimento de híbridos de sorgo biomassa com menor teor de lignina e, portanto, com grande potencial para produção de etanol de segunda geração, um protocolo utilizando marcadores tipo CAPS (*Cleaved-Amplified Polymorphic Sequence*), desenvolvido para o gene *bmr6*, foi validado. Esse protocolo consiste na utilização de marcadores moleculares específicos para o gene *bmr6*, a fim de se empregar seleção assistida para a característica nervura-marrom. Resumidamente, após a extração do DNA a partir da folha do indivíduo a ser analisado, é feita uma reação de PCR com os primers específicos para o gene *bmr6*. Os produtos de amplificação são então clivados com uma enzima de restrição específica para o sítio de mutação *bmr6*. Os fragmentos de DNA amplificados e clivados são posteriormente separados por eletroforese em gel de agarose

e visualizados para identificação do genótipo analisado, que pode ser: *Bmr6/Bmr6*; *Bmr6/bmr6*; *bmr6/bmr6*.

Três progênies RC1F1 foram desenvolvidas cruzando-se três linhagens R elite de sorgo (alta biomassa) com a linhagem contendo o alelo *bmr6*. O marcador CAPS *bmr6* foi utilizado para selecionar genótipos heterozigotos nas populações de retrocruzamento 1 (RC1F1) dos referidos cruzamentos. A característica nervura-marrom é recessiva e, por isso, o uso de marcadores moleculares codominantes para identificação de heterozigotos nos ciclos iniciais de retrocruzamentos é bastante útil, não sendo necessária uma geração extra de autofecundação para identificação dos genótipos que contêm o alelo *bmr6*.

O marcador tipo CAPS utilizado foi desenvolvido por Sattler et al. (2009) para verificar a mutação pontual do gene mutante *bmr6*, o qual corresponde ao gene *SbCAD2*, localizado no cromossomo 4. Esse gene codifica para a enzima cinamil álcool desidrogenase (CAD) da via de síntese da lignina (SABALLOS et al., 2009; SATTLER et al., 2009) (Figura 1).

Primers específicos foram desenhados por Sattler et al. (2009) para amplificar um fragmento de 613 pb dos alelos *Bmr6/bmr6* (*bmr6* CAPS-F: CACAACCACTCCACTACTGCGAAC, *bmr6* CAPS-R: GTCACCACAAGGCATCCATACG). A transição C-T que corresponde à mutação *bmr6* gerou um sítio de restrição para a enzima *Bsa*I. Assim, quando o fragmento amplificado é clivado com essa enzima, dois fragmentos podem ser identificados no alelo mutante (333 e 280 pb), enquanto o alelo não mutante permanece intacto (613 pb), o que permite a identificação de genótipos heterozigotos (Figura 2).

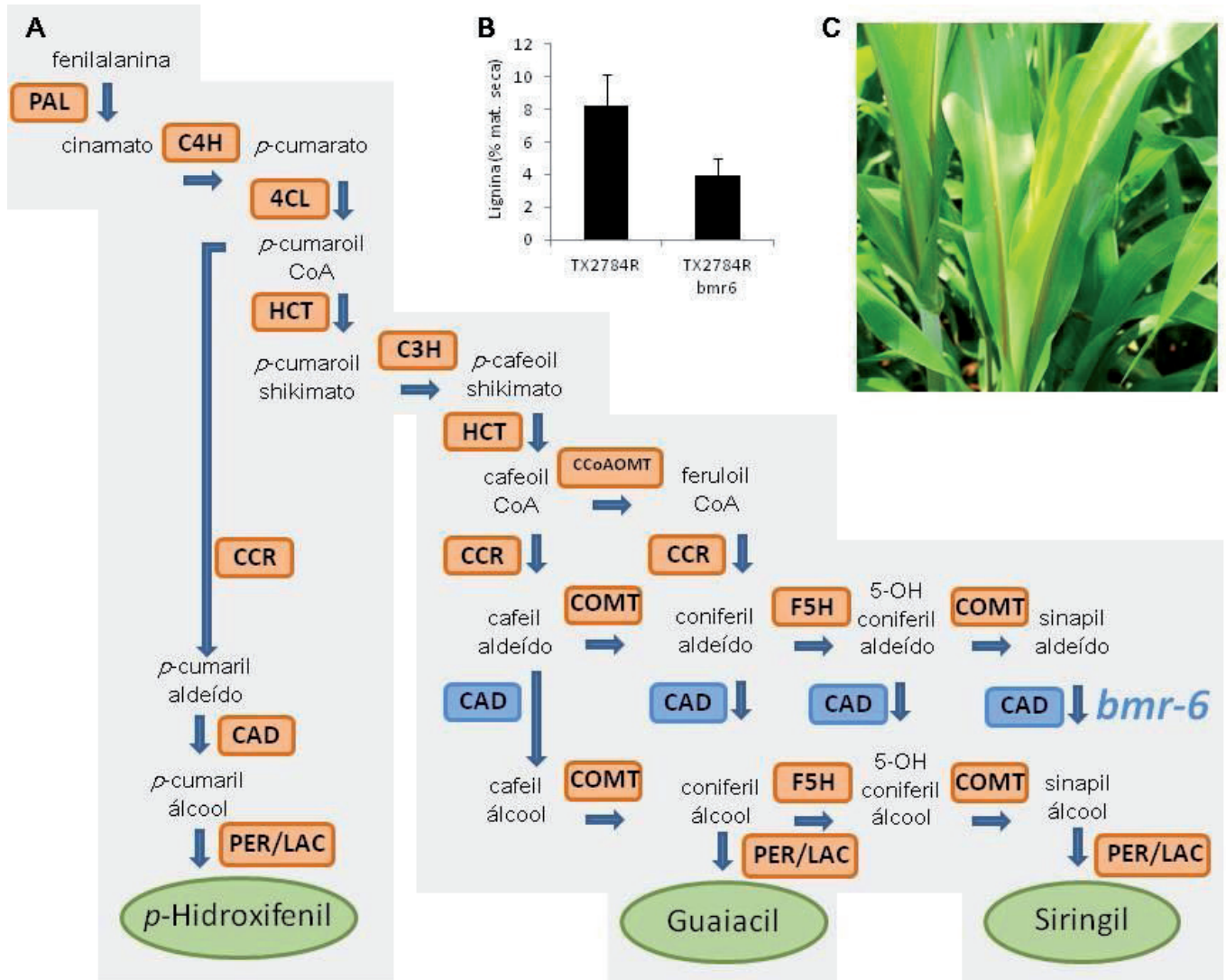
As progênies RC1F1 foram geradas a partir de 3 cruzamentos, tendo como parental doador do gene *bmr6* o genótipo Tx2784 *bmr6*. Os parentais recorrentes foram linhagens R elite do Programa

de Melhoramento de Sorgo da Embrapa, apresentando alta biomassa: CMSXS651, CMSXS650, CMSXS652.

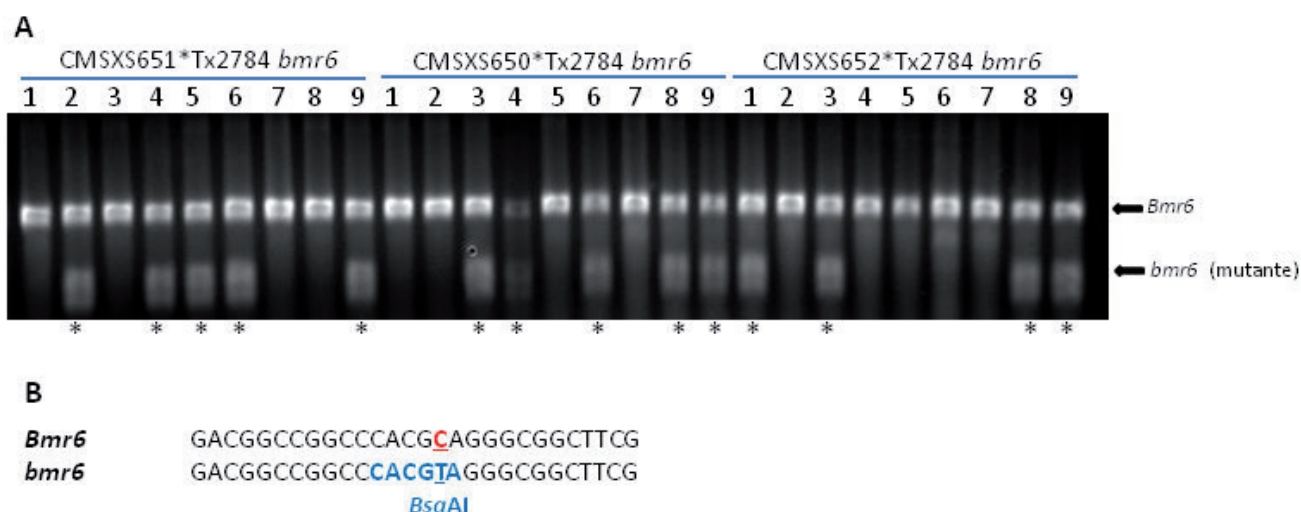
As plantas RC1F1 foram semeadas em dois vasos, cada vaso contendo 10 plantas. O DNA genômico foi extraído de amostras de folhas, duas semanas após o plantio. A extração de DNA foi feita utilizando-se o equipamento GenoGrinder 2000, segundo o protocolo descrito por Lana et al. (2010). A amplificação por PCR e a clivagem com a enzima de restrição *Bsa*I dos fragmentos amplificados foram feitas segundo descrito por Sattler et al. (2009).

Os resultados da triagem para o gene mutante *bmr6* estão ilustrados na Figura 2, onde 9 das 20 plantas de cada cruzamento RC1F1 podem ser visualizadas após análise eletroforética em gel de agarose. Cada um dos três retrocruzamentos apresentou segregação muito próxima do esperado, proporção de 1:1 de plantas dominantes homozigotas (*Bmr6/Bmr6*) para plantas heterozigotas (*Bmr6/bmr6*), sendo identificados de 4 a 5 plantas heterozigotas por vaso. As plantas heterozigotas identificadas foram então selecionadas para dar prosseguimento ao ciclo 2 de retrocruzamento (RC2).

Plantas RC2F1, a serem desenvolvidas em etapas futuras do trabalho, também serão analisadas com o marcador CAPS para o gene *bmr6* a fim de acelerar a introgessão da característica nervura marrom em genótipos elite de sorgo de alta biomassa.



**Figura 1.** A) Via sintética da lignina indicando a enzima CAD, cujo gene mutante confere a característica nervura marrom (*bmr6*). B) Teores de lignina na cultivar TX2784R e a mesma cultivar com o alelo *bmr6* introgridido, conferindo redução do conteúdo de lignina em cerca de 50%. C) Mutante de sorgo *bmr6* mostrando nervura marrom característica.



**Figure 2.** A) Genotipagem de plantas RC1F1, oriundas de três cruzamentos, com o marcador CAPS para o alelo *bmr6*. Os fragmentos amplificados por PCR foram clivados com a enzima *Bsa*I e analisados por eletroforese em gel de agarose (1,2%, TAE 1X). Os primers CAPS *bmr6* amplificaram um fragmento de 613 pb do gene *bmr6*. Após clivagem com *Bsa*I, apenas o fragmento do alelo mutante *bmr6* resultou em dois fragmentos de 333 e 280 pb, permanecendo o alelo não mutante intacto. Plantas heterozigotas estão identificadas por um asterisco. B) Sequência mostrando a transição C-T que resultou na mutação do alelo *bmr6* e o sítio de clivagem da enzima *Bsa*I.

## Conclusão

O uso de marcador molecular CAPS específico para o alelo mutante *bmr6* pode auxiliar na obtenção mais rápida e eficiente de materiais de sorgo biomassa destinados à produção de etanol de segunda geração. A partir dessa análise será possível selecionar novas progênies R de sorgo biomassa contendo o alelo *bmr6*, que serão utilizadas para produção de híbridos ou novas cultivares.

Como os genes mutantes *bmr12* e *bmr18* possuem marcadores moleculares disponíveis, estes serão, em breve, também introgredidos em materiais elite de sorgo do Programa de Melhoramento da Embrapa, aumentando a disponibilidade de materiais com potencial para ocuparem o novo nicho de mercado de etanol de segunda geração.

A tecnologia de produção de etanol de segunda geração poderá ser importante no futuro para incrementar a produção doméstica de biocombustíveis sem a necessidade de expansão

de fronteiras agrícolas nacionais. Sendo assim, é muito importante desenvolver culturas destinadas a esse fim, como o sorgo biomassa.

## Referências

- CHEN, F.; DIXON, R. A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, p. 759-761, 2007.
- DAUWE, R.; MORREEL, K.; GOEMINNE, G.; GIELEN, B.; ROHDE, A.; VAN BEEUEMEN, J.; RALPH, J.; BOUDET, A. M.; KOPKA, J.; ROCHANGE, S. F.; HALPIN, C.; MESSENS, E.; BOERJAN, W. Molecular phenotyping of lignin-modified tobacco reveals associated changes in cell-wall metabolism, primary metabolism, stress metabolism and photorespiration. **Plant Journal**, Oxford, v. 52, p. 263-285, 2007.
- DIEN, B. S.; SARATH, G.; PEDERSEN, J. F.; SATLER, S. E.; CHEN, H.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; NICHOLS, N. N.; COTTA, M. A. Improved sugar conversion and ethanol yield for forage

sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) lines with reduced lignin contents. **BioEnergy Research**, Lincoln, v. 2, p. 153-164, 2009.

FERREIRA, P. D. S.; GONÇALVES, L. C.; JAYME, D. G.; PIRES NETO, O. S.; TOMICH, T. R.; FARIA JÚNIOR, W. G. As ligninas e a mutação *bmr* em plantas de milho e sorgo: revisão de literatura. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 4, p. 27-34, 2012.

JORDAN D. B.; BOWMAN, M. J.; BRAKER, J. D.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E.; LEE, C. C.; MERTENS, J. A.; WAGSCHAL, K. Plant cell walls to ethanol. **Biochemical Journal**, New Delhi, v. 442, n. 2, p. 241-252, 2012.

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).

NAIK, S. N.; GOUD, V. V.; ROUT, P. K.; DALAI, A. K. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578-597, 2010.

PORTER, K. S.; AXTELL, J. D.; LECHTENBER, V. L.; COLENBRANDER, V. F. Phenotype, fiber composition, and in vitro dry matter disappearance of chemically induced brown midrib (*bmr*) mutants of sorghum. **Crop Science**, Madison, v. 18, p. 205-208, 1978.

RIBAS, M. N. **Avaliação agronômica e nutricional de híbridos de sorgo com capim-sudão, normais e mutantes bmr, portadores de nervura marrom**. 2010. 138 p. Tese (Doutorado) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SABALLOS, A.; VERMERRIS, W.; RIVERA, L.; EJETA, G. Allelic association, chemical characterization and saccharification properties of brown midrib mutants of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **BioEnergy Research**, Lincoln, v. 1, p. 193-204, 2008.

SABALLOS, A.; EJETA, G.; SANCHEZ, E.; KANG, C.; VERMERRIS, W. A genomewide analysis of the cinnamyl alcohol dehydrogenase family in Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] identifies *SbCAD2* as the *Brown midrib 6* gene. **Genetics**, Austin, v. 181, p. 783-795, 2009.

SATTLER S. E.; FUNNELL-HARRIS D. L.; PEDERSEN J. F. Efficacy of singular and stacked *brown midrib 6* and *12* in the modification of lignocellulose and grain chemistry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 3611-3616, 2010.

SATTLER, S. E.; SAATHOFF, A. J.; HAAS, E. J.; PALMER, N. A.; FUNNELL-HARRIS, D. L.; SARATH, G.; PEDERSEN, J. A nonsense mutation in a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene is responsible for the sorghum brown midrib 6 phenotype. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 150, n. 2, p. 584-595, 2009.

SIMMONS, B. A.; LOQUÉ, D.; RALPH, J. Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 312-319, 2010.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 1570-1580, 2010.

ÚNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Brasil é 'bola da vez' na rota do etanol celulósico. **Agrolink**, 8 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/noticias/ClippingDetalhe.aspx?CodNoticia=174255>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

VERMERRIS, W.; SABALLOS, A.; EJETA, G.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R.; CARPITA, N. C. Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. S3, p. S142-S153, 2007.

**Circular  
Técnica, 184**

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@cnpmis.embrapa.br  
**1ª edição**  
1ª impressão (2012): on line

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento



**Comitê de  
publicações**

**Presidente:** Presidente: Sidney Netto Parentoni.  
**Secretário-Executivo:** *Elena Charlotte Landau.*  
**Membros:** Flávia Cristina dos Santos Flávio  
Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes,  
Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana  
e Rosângela Lacerda de Castro.

**Expediente**

**Revisão de texto:** *Antonio Claudio da Silva Barros.*  
**Normalização bibliográfica:** *Rosângela Lacerda de Castro.*  
**Tratamento das ilustrações:** *Tânia Mara A. Barbosa.*  
**Editoração eletrônica:** *Tânia Mara A. Barbosa.*