

## **Identificação de Marcadores Moleculares Microssatélites Associados à Restauração da Fertilidade em Sorgo**

Marcos de Oliveira Pinto<sup>1</sup>, Sílvia Neto Jardim Belicuas<sup>2</sup>, Jurandir V. Magalhães<sup>3</sup>, Rafael A. C. Parrella<sup>4</sup>, Robert E. Schaffert<sup>5</sup> e Cícero Beserra de Menezes<sup>6</sup>

1, 2, 3, 4, 5 e 6Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas –MG.1marcosoliveira@cnpms.embrapa.br, 2silvia@cnpms.embrapa.br, 3jurandir@cnpms.embrapa.br, 4parrella@cnpms.embrapa.br, 5schaffer@cnpms.embrapa.br, 6cicero@cnpms.embrapa.br.

**RESUMO** - A fertilidade em sorgo no citoplasma A1 pode ser restaurada pelos locos: *Rf1*, *Rf2* e *Rf5*. No Programa de Melhoramento de Sorgo Sacarino da Embrapa foram encontrados altos teores de açúcares somente nas linhagens R (restauradoras). A utilização de marcadores moleculares associados aos genes *Rf* pode acelerar o processo de obtenção de novas linhagens B (mantenedoras) e A (macho estéreis). O objetivo desse trabalho foi iniciar as atividades de identificação de marcadores microssatélites associados com a restauração da fertilidade em sorgo, utilizando genótipos do programa de melhoramento de sorgo sacarino da Embrapa. Foram avaliados três microssatélites ligados ao *Rf1*, três microssatélites ligados ao *Rf2* e três microssatélites na região do QTL de *Rf5*. A associação dos microssatélites com a restauração de fertilidade foi realizada em 110 indivíduos da população F<sub>2:5</sub> derivada de CMSXS157(B) x BR505(R). Dentre os genótipos B e R foram observados seis microssatélites polimórficos entre CMSXS156(B) x BR505(R); sete entre CMSXS157(B) x BR505(R) e BR008(B) x BR505(R). Foi verificada associação entre os microssatélites txp321 (9% de recombinação) e txp50 (46% de recombinação) com a restauração de fertilidade na população F<sub>2:5</sub> derivada de CMSXS157(B) x BR505(R).

**Palavras chave:** *Sorghum bicolor*; seleção assistida, macho esterilidade, *Rf1* e *Rf2*.

### **Introdução**

A macho esterilidade citoplasmática (CMS) é uma característica atribuída à interação entre genes mitocondriais e nucleares. Em geral, a CMS é causada por rearranjos no DNA mitocondrial, levando à formação de novas ORFs contendo fragmentos derivados de outros genes e/ou regiões não codificadoras. (LINKE e BORNER, 2005). Essas alterações podem provocar modificações no perfil de expressão de genes homeóticos que estão relacionados com o desenvolvimento dos órgãos masculinos nas flores, levando-se assim à macho esterilidade (CHASE, 2006).

A fertilidade masculina pode ser restaurada por uma série de genes nucleares denominados restauradores de fertilidade, ou *Rf*. O primeiro sistema restaurador do citoplasma macho estéril descoberto em sorgo envolve o citoplasma milo (ou A1) e um fator nuclear kafir. Outras fontes adicionais de citoplasma macho estéril já foram descritas em sorgo. Apesar dessas descobertas, A1 continua a ser o principal citoplasma utilizado para a produção de

sementes de híbridos no mundo (REDDY e STENHOUSE, 1994), inclusive no Brasil.

No citoplasma A1 de sorgo são descritos pelo menos dois genes de efeito maior controlando a característica de restauração da fertilidade. O primeiro gene, denominado *Rf1*, foi inicialmente mapeado no cromossomo 8 (KLEIN et al., 2001) e posteriormente clonado (KLEIN et al., 2005). Os marcadores ligados ao loco *Rf1* são capazes de prever a restauração da fertilidade na progênie gerada pelo cruzamento com a linhagem R Tx432, entretanto, não são capazes de classificar corretamente todas as linhagens restauradoras (R) disponíveis (JORDAN et al., 2010).

Jordan et al. (2010) realizaram o mapeamento fino do *Rf2* no cromossomo 2 e identificaram marcadores moleculares que, em conjunto com os marcadores *Rf1*, podem ser empregados na seleção assistida para a geração de linhagens comerciais do tipo B. Jordan et al. (2011) descreveram a existência de um terceiro loco de efeito maior, denominado *Rf5*, que possui a capacidade de restaurar citoplasmas do tipo A1 e A2. Além disso, foi caracterizada a presença de um loco de efeito menor, no cromossomo 4, capaz de restaurar parcialmente a fertilidade em citoplasmas A1.

No Programa de Melhoramento de Sorgo Sacarino da Embrapa foram encontrados altos teores de açúcares somente nas linhagens R, o que dificulta o processo de obtenção de híbridos sacarinos. Por ser um caráter quantitativo, é ideal que ambos os parentais do híbrido tenham elevados teores de açúcares. Assim, para obtenção de linhagens B com elevados teores de açúcares será necessário o cruzamento de linhagens B de sorgo granífero com linhagens R de sorgo sacarino. O processo de obtenção dessas linhagens poderá ser otimizado com a utilização de marcadores moleculares associados aos genes de restauração de fertilidade, durante a introgressão e seleção da característica, evitando a necessidade de fenotipagem dos indivíduos das populações segregantes B - R pelo *testcross* com linhagens A. Dessa forma, faz-se necessária a busca por marcadores moleculares associados com a restauração de fertilidade nos genótipos elites de sorgo do Programa de Melhoramento de Sorgo Sacarino da Embrapa.

### **Objetivo**

O objetivo desse trabalho foi iniciar as atividades de identificação de marcadores moleculares microssatélites associados à restauração da fertilidade em genótipos de sorgo do Programa de Melhoramento de Sorgo Sacarino da Embrapa.

### **Material e Métodos**

## **Material genético**

Foram utilizados os genótipos de sorgo CMSXS156(B); CMSXS157(B); BR008(B) e BR505(R) para um *screening* inicial de polimorfismos em marcadores SSR nas regiões onde foram mapeados genes e QTLs associados à restauração de fertilidade. O teste de associação foi realizado na população de 110 indivíduos  $F_{2:5}$  derivada do cruzamento entre CMSXS157(B) x BR505(R).

## **Fenotipagem**

A fenotipagem da restauração de fertilidade foi realizada nos híbridos correspondentes de cada  $F_{2:4}$  com o genótipo macho estéril CMSXS157(A). As sementes foram germinadas em placa de Petri com papel germiteste e posteriormente transferidas para vasos de 20 litros de solo e cultivadas em casa de vegetação. Para cada indivíduo da população  $F_{2:5}$  foram avaliados cinco híbridos.

## **Extração de DNA, amplificação dos SSR e eletroforese**

A extração do DNA genômico foi realizada em discos foliares de oito plantas representando cada família  $F_{2:4}$ . A extração foi realizada em placas de 96 orifícios utilizando o aparelho GenoGrinder 2000, segundo Lana et al. (2010).

Foram utilizados nove iniciadores SSR fluorescentes ligados aos locos *Rf*, sendo três ligados ao loco *Rf1* (NED-txp105, NED-txp321 e FAM-gpsb123), três ligados ao loco *Rf2* (HEX-txp50, HEX-txp304 e FAM-msbcir223) e três flanqueando o loco *Rf5* (FAM-txp94, FAM-txp065 e FAM-msbcir248) (MACE e JORDAN, 2011). As reações de amplificação foram realizadas utilizando 30 ng de DNA, 0,125  $\mu$ M de cada iniciador e kit Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich®), seguindo recomendações do fabricante. Os ciclos de amplificação consistiram de uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com uma etapa de extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos de amplificação gerados a partir de iniciadores marcados com fluorescência foram analisados no sequenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems®). Foram realizadas reações com iniciadores individuais e em multiplex [i) NED-txp321, HEX-txp50 e FAM-txp65; ii) HEX-txp304, FAM-txp94 e FAM-msbcir223].

## **Análises de dados moleculares**

O teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para a análise da segregação e a análise de segregação conjunta de cada marcador com o loco de restauração de fertilidade foram realizados pelo programa Genes (CRUZ, 2006). As frequências de recombinação e a estimativa das distâncias,

entre os marcadores microssatélites e o loco de restauração de fertilidade, foram efetuadas pelo programa GQMOL (CRUZ e SCHUSTER, 2012).

### **Resultados e Discussão**

A amplificação dos nove SSR flanqueando os genes *Rf* permitiu verificar a existência de variabilidade genética entre os diferentes genótipos utilizados no Programa de Melhoramento de Sorgo Sacarino da Embrapa (Figura 1 e Tabela 1). A partir desse *screening* inicial pôde-se observar que nos três possíveis cruzamentos entre os genótipos do tipo B e R havia polimorfismo entre seis marcadores SSR na população CMSXS156(B) x BR505(R); sete marcadores SSR segregando nas populações CMSXS157(B) x BR505(R) e BR008(B) x BR505(R).

A associação entre os marcadores microssatélites e a restauração de fertilidade foi realizada na população F<sub>2:5</sub> derivada do cruzamento entre CMSXS157(B) x BR505(R). A Análise de qui-quadrado para a segregação conjunta entre os microssatélites e a restauração da fertilidade para essa população é apresentada na Tabela 2. Dentre os sete microssatélites testados, apenas dois apresentaram associação com a restauração da fertilidade: txp321 e txp50.

Os cálculos de distância genética confirmam a associação entre esses marcadores microssatélites e a restauração de fertilidade (Tabela 3). O marcador txp321 apresentou taxa de recombinação de 9% com a restauração de fertilidade, enquanto o marcador txp50 apresentou taxa de 46%. Assim, o marcador txp321 é o que pode melhor explicar a restauração de fertilidade na população derivada do cruzamento entre CMSXS157(B) x BR505(R).

Apesar de o marcador txp321 apresentar uma taxa de recombinação relativamente baixa, em uma nova etapa outros marcadores microssatélites serão avaliados visando à identificação de marcadores que possam melhor explicar as alterações na restauração de fertilidade nessa população. Além do mais, o poder de discriminação de restauração de fertilidade a partir desses marcadores microssatélites será avaliado em outras populações do Programa de Melhoramento de Sorgo Sacarino da Embrapa.

Espera-se que com a identificação dos marcadores microssatélite associados à restauração de fertilidade possamos acelerar o desenvolvimento de linhagens B, utilizando a Seleção Assistida por Marcadores Moleculares, com intuito de aumentar o número de híbridos desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento de Sorgo Sacarino da Embrapa e, assim,

consolidar sua competência na oferta de produtos superiores.

### **Agradecimentos**

À FAPEMIG - Fundação de Apoio à Pesquisa de MG - e ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - pelo suporte financeiro.

### **Literatura citada**

CHASE, D. C. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends in Genetics*, Amsterdam, v. 23, p. 81-90, 2006.

CRUZ, C. D. Programa genes: estatística experimental e matrizes. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 285 p.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. GQMOL: aplicativo computacional para análise de dados moleculares e de suas associações com caracteres quantitativos: versão 2012. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2012.

JORDAN, D. R.; MACE, E. S.; HENZELL, R. G.; KLEIN, P. E.; KLEIN, R. R. Molecular mapping and candidate gene identification of the Rf2 gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 120, p. 279-287, 2010.

JORDAN, D. R.; KLEIN, R. R.; SAKREWSKI, K. G.; HENZELL, R. G.; KLEIN, P. E.; MACE, E. S. Mapping and characterization of Rf5: a new gene conditioning pollen fertility restoration in A1 and A2 cytoplasm in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 123, p. 383-396, 2011.

KLEIN, R. R.; KLEIN, P. E.; CHHABRA, A. K.; DONG, J.; PAMMI, S.; CHILDS, K. L.; MULLET, J. E.; ROONEY, W. L.; SCHERTZ, K. F. Molecular mapping of the rf1 gene for pollen fertility restoration in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 102, p. 1206-1212, 2001.

KLEIN, R. R.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E.; MINX, P.; ROONEY, W. L.; SCHERTZ, K. F. Fertility restorer locus Rf1 of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 111, p. 994-1012, 2005.

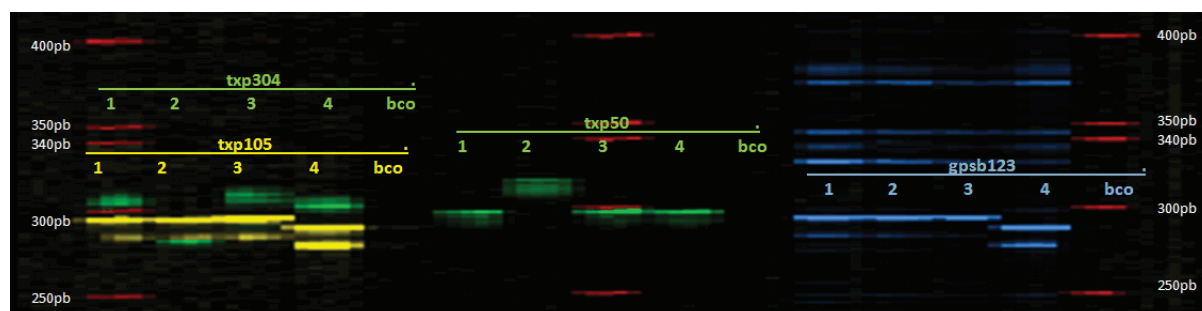
LANA, U. G. P.; GOMES, P. C.; TINOCO, C. F. S.; SILVA, B. C. F.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010 (Embrapa Milho e Sorgo. Documento, 104).

LINKE, B.; BORNER, T. Mitochondrial effects on flower and pollen development *Mitochondrion*, v. 5, p. 389-402, 2005.

MACE, E. S.; JORDAN, D. R. Integrating sorghum whole genome sequence information with

a compendium of sorghum QTL studies reveals uneven distribution of QTL and of gene-rich regions with significant implications for crop improvement Theoretical and Applied Genetics, New York, v. 123, p. 169-191, 2011.

REDDY, B. V. S.; STENHOUSE, J. W. Sorghum improvement for the semi-arid tropic region: past, current and future research thrusts in Asia. Punjabrao Krishi Vidyapeeth Research Journal, v. 18, p. 155-170, 1994.



**Figura 1:** Padrão de amplificação do marcador tpx304 e tpx50 marcados com a fluorescência HEX; tpx105 marcado com fluorescência NED e gpsb123 marcado com a fluorescência FAM, avaliados no sequenciador automático ABI Prism 377. Genótipos: 1) CMSXS156(B); 2) BR505(R); 3) CMS157XS(B); 4) BR008(B) e Bco) Branco da reação. Bandas em vermelho correspondem ao padrão de peso molecular ROX.

**Tabela 1:** Marcadores microssatélites polimórfico nos três cruzamentos possíveis entre as linhagens B e R

Cruzamento	<i>Rf1</i>	<i>Rf2</i>	<i>Rf5</i>
CMSXS156(B) x BR505(R)	txp321	msbcir223 txp50 txp304	txp065 msbcir248
CMSXS157(B) x BR505(R)	txp321	msbcir223 txp50 txp304	txp065 txp94 msbcir248
BR008(B) x BR505(R)	txp321 txp105 gsb123	msbcir223 txp50 txp304	msbcir248

**Tabela 2:** Segregação conjunta dos marcadores microssatélites com a restauração de fertilidade na população  $F_{2.4}$  derivada de CMSXS157B x BR505R

FV	GL	Qui-quadrado						
		txp321	msbcir223	txp50	txp304	txp065	txp94	msbcir248
Segregação Total	5	52,98*	8,35	10,82	5,26	3,54	6,57	3,79
Segregação A/a	1	0,08	0,02	0,02	0,12	1,75	0,07	0,71
Segregação B/b	1	1,75	1,75	1,85	1,34	1,75	1,16	1,54
Segregação conjunta	3	51,15*	6,58	8,95*	3,79	0,04	5,35	1,55

\*significativo a 5% de probabilidade

**Tabela 3:** Distâncias genéticas dos marcadores microssatélites com os locos de restauração de fertilidade na população  $F_{2.4}$  derivada de CMSXS157B x BR505R

Microssatélite	locus	Recombinação	Haldane	Kosambi	LOD
----------------	-------	--------------	---------	---------	-----

---

txp321	<i>Rf1</i>	9,0%	9,92	9,09	5,0
txp50	<i>Rf2</i>	46,0%	126,28	79,45	5,0

---