

**Fernanda Fátima Caniato**

**Diversidade Genética para Tolerância ao Alumínio em Sorgo**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C223d  
2005

Caniato, Fernanda Fátima, 1975-

Diversidade genética para tolerância ao alumínio em  
sorgo / Fernanda Fátima Caniato. – Viçosa : UFV, 2005.  
xii, 73f. : il. ; 29cm.

Orientador: Aluizio Borém.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 66-73.

1. Sorgo - Melhoramento genético. 2. Sorgo - Efeito  
do alumínio. 3. Marcadores genéticos. 4. Genética vegetal.  
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 633.1742

**Fernanda Fátima Caniato**

**Diversidade Genética para Tolerância ao Alumínio em Sorgo**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

Aprovada: 18 de fevereiro de 2005

---

Dr. Jurandir Vieira de Magalhães

---

Prof. Cosme Damião Cruz  
(Conselheiro)

---

Dra. Claudia Teixeira Guimarães  
(Co-orientadora)

---

Dr. Luiz Antônio dos Santos Dias

---

Prof. Aluizio Borém de Oliveira  
(Orientador)

Aos meus pais José Augusto de Souza Caniato (*sempre presente*) e Maria Aparecida Barbosa Caniato.

**Dedico**

Aos meus queridos Lucas, Matheus e Giovanna.

**Ofereço**

*“Minha religião consiste numa admiração humilde ao Espírito Superior e Iluminado que se revela a si mesmo nos mínimos pormenores, que estamos aptos a captar com nossas fracas e irrelevantes mentes. A profunda certeza de um Poder Superior que se revela no Universo, difícil de ser compreendido, forma a minha idéia de Deus”*

Albert Einstein

## **Agradecimentos**

À Deus por cada dia de vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

À EMBRAPA Milho e Sorgo, pela oportunidade de conduzir os experimentos nesta instituição.

Ao Professor Aluizio Borém pela orientação.

Aos Pesquisadores Jurandir Vieira de Magalhães e Cláudia Teixeira Guimarães, pela co-orientação, ensinamentos, amizade e compreensão.

Aos Professores Cosme e Luiz Antônio pelas sugestões realizadas para finalização deste trabalho.

Ao Dr. Robert Eugene Schafertt, pelo fornecimento do material genético e pelas sugestões realizadas.

Aos Drs. José Avelino Rodrigues e Fredolino Giacomini dos Santos por terem disponibilizado os materiais genéticos dos respectivos programas de melhoramento.

Ao Dr. Antônio Carlos de Oliveira pelo constante socorro estatístico.

Aos funcionários da EMBRAPA Milho e Sorgo, especialmente Gislene, Sr. Geraldo e Ubiraci, pela disponibilidade na condução deste trabalho.

Aos estagiários Francine, Júlio, Wanderson e Jaciara pela ajuda na condução deste trabalho.

Aos novos amigos Cíntia, Denise, Nate, Célio, Miguel, Sílvia, Pedro, Martineli, Marcos pelos momentos agradáveis compartilhados, pelo ombro amigo sempre oferecido e pela paciência nos momentos de dificuldade.

Aos colegas do Curso de Genética e Melhoramento.

Ao meu querido Denilson por compartilhar comigo a sua vida.

À minha família pelo constante apoio e amor incondicional.

A todos aqueles que de alguma maneira tornaram possível a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Fernanda Fátima Caniato, filha de José Augusto de Souza Caniato e de Maria Aparecida Barbosa Caniato, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais, em 31 de janeiro de 1975.

Em março de 1998, iniciou o curso de graduação em Agronomia, na Universidade Federal Viçosa, onde em março de 2003 graduou-se como Engenheira Agrônoma.

Em março de 2003 iniciou curso de Mestrado em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese no dia 18 de fevereiro de 2005.

## Conteúdo

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. Introdução Geral.....	12
CAPÍTULO 1	
Controle Genético da Tolerância ao Alumínio em Sorgo [ <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench.]	
1. Introdução .....	15
2. Material e Métodos.....	19
2.1. Material Genético.....	19
2.2. Análise da Tolerância ao Al em Solução Nutritiva .....	20
2.3. Isolamento do DNA.....	23
2.4. Marcadores STS ( <i>Sequenced-Tagged Sites</i> ) .....	24
2.5. Análises Estatísticas.....	25
3. Resultados e Discussão.....	26
3.1. Variabilidade Fenotípica para Tolerância ao Al em Sorgo .....	26
3.2. Variabilidade Genética para a Tolerância ao Al em Sorgo .....	28
3.3. Efeito das Doses do Al na Avaliação Genética da Tolerância .....	38
3.4. Variabilidade Gênica e Alélica para a Tolerância ao Al em Sorgo .....	40
4. Conclusões .....	42
CAPÍTULO 2	
Avaliação da Diversidade Genética para Tolerância ao Alumínio em Sorgo	
1. Introdução .....	43
2. Material e Métodos.....	46
2.1 Material Genético.....	46

2.2. Avaliação da Tolerância ao Alumínio em Solução Nutritiva.....	46
2.4. Marcadores SSR .....	51
2.5. Protocolo de Amplificação e Eletroforese .....	52
2.6. Análise dos dados moleculares .....	52
3. Resultados e Discussão.....	54
3.1. Variabilidade Fenotípica para Tolerância ao Al .....	54
3.2. Diversidade Genética em Sorgo .....	59
3.3. Análises de Agrupamento.....	60
3.4. Diversidade Genética e Tolerância ao Al.....	61
4. Conclusões .....	64
Referências Bibliográficas.....	65

## RESUMO

CANIATO, Fernanda Fátima, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro 2005. **Diversidade Genética para Tolerância ao Alumínio em Sorgo.** Orientador: Aluízio Borém de Oliveira. Co-orientadora: Claudia Teixeira Guimarães. Conselheiro: Cosme Damião Cruz .

A toxidez causada pelo alumínio (Al) é um dos fatores que mais restringem o crescimento e o desenvolvimento das culturas em solos ácidos. Assim sendo, o entendimento acerca do controle genético que governa essa característica, bem como do nível de diversidade presente no germoplasma utilizado, são informações valiosas para programas de melhoramento que visam ao desenvolvimento de cultivares tolerantes a esse estresse abiótico. Marcadores moleculares fortemente ligados a *Alt<sub>SB</sub>* - um gene de efeito maior de tolerância ao Al previamente identificado em sorgo - em combinação com uma análise filogenética baseada em marcadores microssatélites, foram utilizados para abordar essa importante questão em um conjunto amplo de acessos de sorgo. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivos estudar o controle genético da tolerância ao Al em 12 acessos de sorgo de origem diversa, identificar novas fontes de tolerância ao Al em sorgo que contenham genes distintos do gene de efeito maior *Alt<sub>SB</sub>* previamente identificado na linhagem padrão de tolerância SC283, e estudar as relações filogenéticas em um grupo expandido de acessos. O padrão de segregação para tolerância ao Al nas progênies derivadas dos cruzamentos entre a linhagem sensível BR012R e as demais linhagens tolerantes sugeriu um modelo de herança complexa ou herança influenciada por gene(s) de efeito(s) maior(es) para a característica. Variação alélica no loco *Alt<sub>SB</sub>* pode ter sido responsável por ao menos parte da tolerância na maioria das linhagens

avaliadas. Notáveis exceções a esse padrão foram as linhagens 5DX-61-6-2 e SC112-14, que assim representam novas fontes de tolerância ao Al em relação àquelas que dependem do gene *Alt<sub>SB</sub>* para suportar níveis tóxicos do metal. Variação alélica no loco *Alt<sub>SB</sub>* responde também pela tolerância residual de BR012R, ainda que outros genes de efeito menor tenham contribuído para a herança complexa observada em alguns cruzamentos com essa linhagem. No estudo filogenético conduzido em um painel de 44 linhagens de sorgo, foi observada variabilidade fenotípica extensa para tolerância a {25} µM Al em solução nutritiva. Quando linhagens altamente tolerantes a {25} µM Al foram avaliadas a {37} µM Al, foram observados os mais altos níveis de tolerância nas linhagens SC283, CMSXS226R, SC566-14 e CMSXS227R, sendo que as linhagens SC566-14 e CMSXS227R mostraram níveis razoáveis de tolerância mesmo a {58} µM Al. Os dados de tolerância a {58} µM Al sugeriram a possível presença de um alelo no loco *Alt<sub>SB</sub>* que confere níveis de tolerância superiores ao de SC566-14 em comparação com o alelo presente em SC283. Os 15 locos SSR utilizados foram eficientes em detectar ampla diversidade genética entre os genótipos de sorgo, bem como as relações conhecidas de pedigree entre as linhagens. A análise de agrupamento evidenciou seis grupos coerentes com as informações disponíveis de pedigree e de origem geográfica. Linhagens cuja tolerância ao Al são ao menos em parte devida ao gene *Alt<sub>SB</sub>* mostraram-se bastante diversas, abrangendo três grupos observados na análise filogenética. Esses resultados demonstram a impossibilidade de se prever a presença de alelos desse gene com base somente em medidas globais de diversidade genética.

## ABSTRACT

CANIATO, Fernanda Fátima, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2005. **Genetic Diversity for Al Tolerance in Sorghum**. Adviser: Aluizio Borém de Oliveira. Co-adviser: Claudia Teixeira Guimarães. Committee member: Cosme Damião Cruz.

Aluminum (Al) toxicity is one of the major factors impairing crop development and yield in acidic soils. Thus, understanding the genetic basis of this trait as well as the range of diversity for Al tolerance control in extant germplasm are invaluable to breeding programs aimed at developing sorghum cultivars with enhanced Al tolerance. Molecular markers tightly linked to *Alt<sub>SB</sub>* - a known major Al tolerance gene in sorghum - in combination with an SSR-based phylogenetic analysis, were used here to approach this important issue in a wide sorghum panel. Thus, the goals of this study were to investigate the Al tolerance genetic control in 12 sorghum accessions of diverse origins, identify new sources of Al tolerance in sorghum that harbor Al tolerance genes distinct to the major gene *Alt<sub>SB</sub>*, previously identified in the standard SC283, and establish the phylogenetic relationships of an expanded sorghum set to study patterns underlying the origin of highly Al tolerant sorghums. When progeny of individual crosses involving different Al tolerant lines and the common sensitive parent BR012R were subject to Al in nutrient solution, Al tolerance segregated either as a quantitative trait or the inheritance was influenced by major tolerance gene(s). However, allelic variation at the *Alt<sub>SB</sub>* locus may have been responsible for at least part of the variation in the majority of the sorghum lines but on 5DX-61-6-2 and SC112-14, which, by this reason, represent new sources of Al tolerance genes in sorghum. Allelic variation at *Alt<sub>SB</sub>* contributed also to some of the

residual tolerance expressed by the sensitive line BR012R, but other Al tolerance genes with apparently minor effects in BR012R should be involved in the complex inheritance for Al tolerance observed in some BR012R crosses. In the phylogenetic study performed on an expanded panel of 44 sorghum lines, extensive phenotypic variation for Al tolerance was observed at {25}  $\mu\text{M}$  Al. When a subset comprising the most Al tolerant lines at {25}  $\mu\text{M}$  Al was assessed at {37}  $\mu\text{M}$  Al, the most Al tolerant lines were SC283, CMSXS226R, SC566-14 e CMSXS227R, and the lines SC566-14 and CMSXS227R remained tolerant even at {58}  $\mu\text{M}$  Al. In addition, results at {58}  $\mu\text{M}$  Al suggested the presence of a stronger *Alt<sub>SB</sub>* allele in SC566 when compared to that present in SC283. The 15-SSR set was efficient in detecting broad genetic diversity as well as the known pedigree relationships among sorghum lines. UPGMA analysis uncovered six groupings and nested minor sub-groupings that were consistent with both pedigree information and geographic origins. Some lines relying on *Alt<sub>SB</sub>* for their tolerance turned out to be highly diverse, comprising all 3 major groupings that were proposed based on phylogeny. These results explain the difficulties to predict the presence of *Alt<sub>SB</sub>* alleles based solely on global estimates of genetic diversity.

## 1. Introdução Geral

O sorgo é atualmente o quinto cereal mais produzido no mundo depois do milho, do trigo, do arroz e da cevada (FAO, 2005). A produção mundial em 2004, estimada em 60,2 milhões de toneladas, foi obtida em uma área de 44,4 milhões de hectares (FAO, 2005). No Brasil, o sorgo é cultivado principalmente para produção de grãos, embora existam também variedades para produção de massa verde para pastoreio, feno, silagem e para produção de álcool ou açúcar (Sawazaki, 1998).

O sorgo apresenta vantagem adaptativa distinta quando comparado a outros cereais, pois a sua notável resistência à seca e a outros fatores de estresse abióticos viabiliza a sua produção em ambientes problemáticos para outras culturas. Essa característica permite que a cultura se expanda em regiões com distribuição irregular de chuvas, particularmente na safrinha, em sucessão a culturas de verão. Entretanto, vários genótipos de sorgo são sensíveis à toxidez de Al em solos ácidos ( $\text{pH} < 5,0$ ). Para contornar este problema, a neutralização da acidez do solo por meio da calagem tem sido freqüentemente recomendada, mas a adoção dessa estratégia pode ser economicamente restritiva, principalmente em condições de toxidez de Al em camadas subsuperficiais do solo. Por essa razão, o emprego da calagem por parte de muitos agricultores torna-se inviável. Uma alternativa é o desenvolvimento de cultivares com maior tolerância ao alumínio, resultando em menores custos na aquisição de insumos e melhor rendimento para agricultores com baixa capacidade de investimento.

Estudos sobre herança e tipo de ação gênica envolvida em características de interesse agrônomo são estrategicamente importantes na

seleção de genitores dentro de um programa de melhoramento (Ferh, 1987). Muitos estudos têm mostrado que a tolerância ao AI em sorgo segue padrão simples de herança (Furlani e Bastos, 1990; Magalhães et al., 2004), enquanto outros têm sugerido que a tolerância ao AI pode ser devida a expressão de um gene de efeito maior e de vários outros genes de efeitos menores (Borgonovi et al., 1987a; Gourley et al., 1990). Diante disso, o controle genético da tolerância ao AI necessita ser melhor investigado, uma vez que o entendimento do padrão genético da tolerância ao AI pode orientar a escolha dos métodos de seleção.

Por outro lado, a exploração do germoplasma de uma espécie é fundamental para a escolha de genótipos superiores a serem usados em programa de desenvolvimento de cultivares. Esta avaliação envolve a caracterização fenotípica, estudos da diversidade genética e estabelecimento do grau de relacionamento entre genótipos.

Neste sentido, o programa de melhoramento de sorgo para tolerância a solos ácidos da Embrapa Milho e Sorgo concentrou-se inicialmente na avaliação de germoplasma existente, pois somente uma pequena parte da coleção mundial havia sido caracterizada para tolerância ao AI (Borgonovi et al., 1987a). Esses esforços possibilitaram a identificação de linhagens com níveis superiores de tolerância, que passaram a ser usadas no programa de melhoramento de sorgo para solos ácidos. Entre essas se destaca a linhagem SC283, hoje considerada como padrão de tolerância ao AI na cultura (Furlani et al., 1987; Foy et al., 1993).

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados no estudo da diversidade genética em plantas. Atualmente, os marcadores microssatélites têm se constituído em uma ferramenta poderosa para se estudar a diversidade genética em muitas espécies incluindo o sorgo. Todavia, a diversidade genética de genótipos de sorgo do programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo ainda não foi estabelecida.

Os objetivos do presente estudo são:

1. Estudar o controle genético da tolerância ao Al em sorgo usando progênies derivadas do cruzamento entre dez linhagens tolerantes e uma sensível ao Al tóxico;
2. Identificar, novas fontes de tolerância ao Al em sorgo que contenham genes distintos daquele identificado na linhagem SC283;
3. Estudar as relações filogenéticas em um grupo de 47 genótipos de sorgo utilizados no programa de melhoramento para solos ácidos da Embrapa Milho e Sorgo

## **CAPÍTULO 1**

### **Controle Genético da Tolerância ao Alumínio em Sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.]**

#### **1. Introdução**

No Brasil, aproximadamente 1,8 milhão de ha de solos sob cerrado estão quase sempre associados com elevada acidez. Esses solos são caracterizados por apresentarem baixos valores de pH ( $\text{pH} < 5,0$ ), baixa saturação de bases, baixa disponibilidade de fósforo e níveis tóxicos de manganês, ferro e alumínio (Lopes e Fox, 1977). Entre os vários fatores que limitam a produção agrícola em solos ácidos, a toxidez causada pelo alumínio tem sido considerada uma das mais importantes. Isso porque, quando o pH do solo encontra-se abaixo de 5,0, formas iônicas de alumínio encontram-se solubilizadas na solução do solo, inibindo de forma drástica o crescimento radicular e causando outras alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas prejudiciais às plantas (Kochian et al., 2004).

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 (Borgonovi et al., 1987a). Diante disso, os melhoristas de plantas têm direcionado esforços para mitigar os problemas advindos da fitotoxidez de Al, pela identificação de fontes de genes de tolerância e pela geração de cultivares tolerantes a esse metal.

A condição básica para o sucesso de qualquer programa de melhoramento é a existência de variabilidade genética. Em sorgo, variabilidade genética para tolerância ao alumínio tóxico tem sido descrita (Furlani et al.,

1983; Boye-Goni e Marcarian, 1985; Borgonovi et al., 1987b; Furlani et al., 1987). Além disso, o conhecimento acerca do controle genético envolvido com a tolerância ao alumínio é uma importante informação a ser explorada pelos melhoristas visando ao desenvolvimento de genótipos tolerantes a esse estresse abiótico.

Muitos estudos têm indicado que a tolerância ao alumínio em sorgo segue um padrão simples de herança. Borgonovi et al. (1987a) sugerem que, em geral, a tolerância ao Al em sorgo é controlada por poucos genes dominantes de efeitos maiores ou provavelmente um gene de efeito maior com dominância parcial e vários genes de efeitos menores. Furlani e Bastos (1990) cruzaram genótipos tolerantes (SC283 e IS12666) com genótipos sensíveis ao Al (Tx415 e IS1143), e analisaram as progênies F<sub>2</sub> quanto ao crescimento radicular em solução nutritiva contendo 167 µM de Al. Esses autores observaram segregação na razão de 3:1 (tolerância:suscetibilidade), como esperado para a condição de um gene dominante de efeito maior controlando a característica.

Entretanto, a herança da tolerância ao Al em sorgo não pode ser explicada tão somente por um modelo genético simples. Borgonovi et al. (1987b) cruzaram 11 linhagens de sorgo em um dialelo parcial e avaliaram os 24 híbridos F<sub>1</sub> quanto ao crescimento da raiz seminal em solução nutritiva contendo 180 µM de Al. As variâncias referentes à capacidade geral de combinação foram responsáveis pela maior parte (52%) da variação genética da característica. Contudo, a capacidade específica de combinação também foi importante. Observações similares foram feitas por Flores et al. (1991) e Boye-Goni e Marcarian (1985). A alta contribuição da capacidade geral de combinação enfatiza a importância dos efeitos genéticos aditivos sobre os efeitos genéticos não-aditivos para a tolerância ao Al. A predominância dos efeitos genéticos aditivos associados com altos valores de herdabilidade para a característica (Boye-Goni e Marcarian, 1985; Furlani e Bastos, 1990) sugerem que programas de seleção recorrente podem ter sucesso no desenvolvimento

de cultivares melhorados para cultivo em solos com problemas de acidez elevada.

Gourley et al. (1990) avaliaram um conjunto de híbridos  $F_1$  obtidos de cruzamentos dialélicos entre fêmeas (linhagens A, macho-estéreis) e machos (linhagens R, restauradoras da fertilidade) em solo ácido e em solução nutritiva contendo Al. Os resultados foram conflitantes para alguns híbridos avaliados em ambas as condições. Em solo, foram observados altos valores para variância genética devida aos efeitos de dominância, com baixos valores de herdabilidade. Em solução nutritiva, a variância aditiva foi muito maior que a variância devido à dominância, juntamente com altos valores de herdabilidade. Esses resultados demonstram que a partição da variância genética para tolerância ao Al entre efeitos aditivos ou de dominância depende fortemente da técnica empregada para avaliar o fenótipo. O melhor controle ambiental proporcionado pelos experimentos em solução nutritiva em relação aos experimentos de solo pode ter contribuído para os valores relativamente altos de herdabilidade em solução nutritiva. Além disso, no tocante aos estudos genéticos da tolerância ao Al *per se*, os resultados obtidos em solução nutritiva são mais aceitáveis que aqueles obtidos em solo, visto que, nesses, deve-se considerar que vários fatores estão interagindo, sendo o estresse do Al somente um deles.

Recentemente, Magalhães et al. (2004), realizando estudos de herança e mapeamento molecular em populações  $F_2$  e  $F_{2:3}$  derivadas do cruzamento entre linhagens tolerantes (SC283 e SC566-14) e sensível (BR007B) ao Al, obtiveram distribuições de frequência claramente bimodais para crescimento radicular, em que a segregação de um único loco com dominância parcial foi responsável pela tolerância em SC283 e SC566-14. Além disso, marcadores moleculares ligados ao gene de tolerância ao Al ( $Al/t_{SB}$ ) mapeado na região terminal do cromossomo 3, explicaram 80% da variação fenotípica observada para o crescimento radicular sob níveis tóxicos de Al em solução nutritiva. Em trabalhos complementares de mapeamento de alta resolução do gene  $Al/t_{SB}$ , um consórcio entre a Embrapa Milho e Sorgo, a Universidade de Cornell e a

Universidade do Texas A&M vêm desenvolvendo uma série de marcadores STS (*Sequenced - Tagged Sites*, Plieske e Struss, 2001) fortemente ligados ao gene *Alt<sub>SB</sub>*. Esses marcadores podem ser utilizados para se estudar o controle da tolerância ao AI em diferentes acessos de sorgo. Novas fontes de tolerância ao AI 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 AI. A seleção recorrente em sorgo tem sido possível com o uso de macho esterilidade (Borgonovi et al., 1987a).

O presente trabalho visa: (1) estudar o controle genético da tolerância ao AI em um espectro amplo de acessos de sorgo; (2) identificar, por meio de marcadores moleculares STS ligados ao gene de tolerância *Alt<sub>SB</sub>*, novas fontes de tolerância ao AI em sorgo que contenham genes distintos de tolerância daquele identificado na linhagem SC283.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Material Genético**

As doze linhagens de sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) avaliadas quanto à tolerância ao Al tóxico neste estudo suas raças morfológicas e sítios de coleta estão apresentados na Tabela 1. Com exceção de SC566-14, as demais linhagens foram cruzadas com BR012R, uma linhagem elite do Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo, porém sensível ao Al. Plantas  $F_1$  derivadas de cada cruzamento foram autofecundadas em casa de vegetação, tendo sido geradas 10 populações  $F_2$  segregantes para tolerância ao Al. O tamanho das populações foi de 100 indivíduos  $F_2$  para os cruzamentos SC283 x BR012R e BR012R x BR007B, e de 210 para os demais cruzamentos, sendo que para a população derivada do cruzamento entre CMSX225R x BR012R, os indivíduos  $F_2$  foram transplantados para vasos em casa de vegetação e autofecundados para obtenção de famílias  $F_{2:3}$ .

Tabela 1. Classificação das 12 linhagens de sorgo quanto à tolerância ao alumínio, raças morfológicas [“working groups” segundo Murty et al. (1967)] e sítios de coleta.

Genótipo	Classe de tolerância ao Al <sup>a</sup>	Grupo	Sítios de Coleta
9DX9/11	T	-	Uganda
5DX-61-6-2	T	-	Uganda
3DX57/1/1/910	T	-	Uganda
SC283 (IS7173C)	T	Conspicuum	Tanzânia
SC549 (IS3625C)	T	Conspicuum	Nigéria
SC175-14 (IS12666C)	T	Zera-Zera	Etiópia
SC112-14 (IS11612)	T	Zera-Zera	Etiópia
IS8577	T	-	Kênia
SC566-14	T	Caudatum	Nigéria
CMSXS225R	T	-	-
BR012R	S	-	-
BR007B	S	-	-

<sup>a</sup> Furlani et al. (1987); Gourley et al. (1990) e comunicação pessoal (Robert Eugene Schaffert).

## 2.2. Análise da Tolerância ao Al em Solução Nutritiva

As doze linhagens de sorgo (Tabela 1) foram avaliadas quanto ao crescimento da raiz seminal em solução nutritiva em quatro níveis de Al tóxico com as seguintes atividades {entre chaves} e concentrações [entre colchetes]: {11} [60], {20} [110], {27} [148] e {39} [222]  $\mu\text{M}$  Al. As atividades do Al iônico livre foram estimadas utilizando-se o software de especiação GEOCHEM-PC (Parker et al., 1995). Os dados de inibição de crescimento radicular foram calculados relativos ao tratamento controle com dose {0} [0]  $\mu\text{M}$  de Al. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três repetições, sendo cada parcela experimental constituída de sete plântulas de cada linhagem.

Os estudos genéticos da tolerância ao Al foram realizados com as populações  $F_2$  e suas respectivas linhagens parentais, sendo a linhagem tolerante representada por 20 plântulas e a linhagem sensível por 15 plântulas. Os níveis de alumínio tóxico utilizados foram aqueles que produziram diferenciação clara entre os parentais de cada cruzamento, definidos no

experimento supracitado. Assim, populações  $F_2$  derivadas dos cruzamentos entre a linhagem BR012R e as tolerantes SC112-14 e IS8577 foram avaliadas a  $\{20\} \mu\text{M Al}$ , os cruzamentos com as linhagens SC175-14, SC549, 5DX-61-6-2, 9DX9/11 e 3DX57/1/1/910 foram avaliados a  $\{27\} \mu\text{M Al}$ , e o cruzamento com a linhagem CMSX225R foi avaliado na atividade de  $\{39\} \mu\text{M Al}$ . Procedeu-se ainda ao teste de progênie na população  $F_2$ :BR012R x CMSXS225R utilizando-se as médias fenotípicas de 14 plântulas de 45 famílias  $F_{2:3}$  tomadas ao acaso e submetidas a  $\{39\} \mu\text{M Al}$ .

Para complementar o estudo das bases genéticas da tolerância ao Al, 100 indivíduos  $F_2$  derivados do cruzamento entre as linhagens sensíveis BR012R e BR007B, e seus respectivos parentais representados por 21 plântulas cada um foram avaliados a  $\{11\} \mu\text{M Al}$ . Da mesma forma, uma população de 100 indivíduos  $F_2$  derivados do cruzamento entre BR012R e SC283 (tolerante) juntamente com as linhagens parentais foram avaliadas a  $\{27\} \mu\text{M Al}$ .

Sementes das linhagens parentais e das progênies foram escarificadas com areia esterilizada por cinco minutos para quebra de dormência, sendo posteriormente esterilizadas com hipoclorito de sódio (0,525%) por 10 minutos sob agitação constante, e enxaguadas oito vezes com água destilada. As sementes foram germinadas em rolos de papel de germinação umedecidos em água deionizada por um período de quatro dias em câmara de crescimento com temperatura diurna média de  $27 \pm 3^\circ\text{C}$ , noturna de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas. As plântulas foram então 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 sem Al (Magnavaca et al., 1987), com a seguinte composição: Ca ( $3527\mu\text{M}$ ), K ( $2354\mu\text{M}$ ), Mg ( $855\mu\text{M}$ ), N- $\text{NO}_3$  ( $10857\mu\text{M}$ ), N- $\text{NH}_4$  ( $1300\mu\text{M}$ ), P ( $45\mu\text{M}$ ), S ( $587\mu\text{M}$ ), B ( $25\mu\text{M}$ ), Fe ( $77\mu\text{M}$ ), Mn ( $9,1\mu\text{M}$ ), Cu ( $0,63\mu\text{M}$ ), Mo ( $0,83\mu\text{M}$ ), Zn ( $2,29\mu\text{M}$ ), Na ( $1,74\mu\text{M}$ ), Fe-HEDTA ( $75\mu\text{M}$ ), Cl ( $596\mu\text{M}$ ), sendo o pH ajustado para pH 4,0 com HCl 1M. Após esse período, foi adicionada solução nutritiva com a mesma constituição anterior, porém com a

adição de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  nos tratamentos contendo Al. A solução foi continuamente aerada durante todo o período experimental. Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento, utilizando-se as mesmas condições ambientais utilizadas para germinação.

O Comprimento da raiz seminal de cada plântula das linhagens e das progênes foi medido após 24 ( $C_{24h}$ ) e 48 h ( $C_{48h}$ ) de crescimento em solução nutritiva completa, sem alumínio, para obter-se o Comprimento controle ( $C_c = C_{48h} - C_{24h}$ ), e após cinco dias de crescimento em solução nutritiva contendo {11}, {20}, {27} ou {39}  $\mu\text{M}$  Al ( $C_{120h+Al}$ ). Foi determinado o seguinte índice de tolerância nas progênes  $F_2$ : CRR (% Crescimento Radicular Relativo) =  $[(C_{120h+Al} - C_{48h}) / C_c \times 5] \times 100$ . Nas progênes  $F_2$ , a adoção de um controle independente não é possível, uma vez que cada indivíduo da população representa um genótipo distinto. Dessa maneira, os valores de Comprimento controle foram multiplicados por cinco, assumindo-se que as taxa de crescimento na ausência de Al são uniformes entre genótipos durante o período de exposição de cinco dias, ou que as variações nas taxas são uniformes entre genótipos. Para as linhagens, caso em que foi possível a adoção de um controle independente sem adição de Al durante todo o período experimental, foi obtido o Crescimento radicular Líquido num período de cinco dias em cada uma das quatro concentrações de Al:  $CL = C_{120h+Al} - C_{48h}$ . Valores percentuais de Crescimento Líquido Relativo (CLR) foram obtidos pela divisão do crescimento líquido medido após cinco dias de exposição ao Al pelo crescimento líquido obtido de plântulas cultivadas nas mesmas condições experimentais, porém na ausência de Al (controle). Para cada tratamento com Al, foram obtidas as médias de CL de cada uma das três parcelas experimentais compostas de sete plântulas cada. Essas médias foram divididas pela média global do tratamento controle sem Al, sendo assim gerados três valores de CLR para cada genótipo de sorgo.

### 2.3. Isolamento do DNA

Após o término das avaliações fenotípicas, sete plântulas de cada linhagem parental e 100 plântulas de cada progênie  $F_2$  tomadas ao acaso, foram transferidas para vasos com solo mantidos em casa de vegetação para fins de coleta de tecido foliar para isolamento de DNA, que se deu em *bulk* para as linhagens e individualmente para as progênies, entre 21 e 26 dias após o transplante. O isolamento do DNA das progênies foi feito em pequena escala, segundo uma modificação do método descrito por Saghai-Marooft et al. (1984), em que um volume de 600  $\mu\text{L}$  de tampão CTAB [CTAB 2% (m/v); 0,2 M; Tris-HCl (pH 8,0); 1,4 M NaCl; 0,02M EDTA; 2%  $\beta$ -Mercaptoetanol (v/v)] foram adicionados à aproximadamente 500 mg de material vegetal moído em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A mistura foi mantida em banho-maria a 65°C durante uma hora, com homogeneização a cada 15 minutos. Em seguida, foi feita lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1), com homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, onde foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de isopropanol mantido a -20°C. Os microtubos foram mantidos nessa temperatura por 45 a 60 minutos, seguindo-se nova centrifugação a 16.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos foram novamente centrifugados por 3 minutos a 16.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o isopropanol residual retirado em centrífuga a vácuo por cinco minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 80  $\mu\text{L}$  de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0). O DNA das linhagens foi isolado em macroescala, utilizando-se para tanto *bulks* de sete plantas de cada linhagens (aproximadamente 70 g de tecido fresco), seguindo o protocolo modificado de Saghai-Marooft et al. (1984).

Amostras de sete indivíduos de cada população tiveram os DNAs quantificados em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM, pH 8,0), utilizando um padrão de DNA de concentração

conhecida. Após a eletroforese realizada a 100V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). O DNA estoque foi diluído em água ultrapura autoclavada para a concentração de 10 ng/µL e armazenado a -20 °C.

#### **2.4. Marcadores STS (*Sequenced-Tagged Sites*)**

Dois marcadores STS flanqueando o gene *Alt<sub>SB</sub>* foram avaliados entre as linhagens parentais descritas no item 2.1. Os locos STS *m181* e *ctg29*, que foram desenvolvidos como parte de um projeto conjunto entre a Embrapa Milho e Sorgo, a Universidade de Cornell e a Universidade do Texas A&M, estão ligados ao gene *Alt<sub>SB</sub>* a 0,1 cM e 0,5 cM, respectivamente, segundo estimativa obtida em uma população de 2085 indivíduos F<sub>2</sub> derivados de BR007B x SC283 (Jurandir Magalhães, comunicação pessoal). Os marcadores polimórficos entre os parentais foram avaliados nas populações F<sub>2</sub> descritas no item 2.1.

As reações de amplificação por PCR foram preparadas para um volume final de 20 µL, consistindo de 30 ng de DNA; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1U Taq DNA polimerase; 0,5 mM dNTPs e 87,5 nM de cada um dos pares de *primers m181* e *ctg29*, sendo um dos *primers* de cada par marcado com as fluorescências 6-FAM (azul) e HEX (verde), respectivamente. Quando possível, as reações de PCR foram montadas em formato multiplex. Os ciclos de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C/1min., 30 ciclos de 94°C/30s, 55°C/1min. e 72°C/1min., alongação final a 72°C/5min, mantendo a reação à 4°C ao final.

As reações foram diluídas 10 vezes em água destilada, sendo retirados 2 µL de cada reação e adicionados 1 µL de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0,5 µL de tampão de carregamento (*blue dextran* 50 mg/mL; EDTA 25 mM). As amostras foram desnaturadas durante 5 minutos a 95°C e mantidas em gelo até o carregamento de 2 µL em gel de poliacrilamida 5% (p/v) (Long Ranger Gel Solution, Cambrex); uréia 6 M; Tris 100 mM; ácido bórico 100

mM e EDTA 2 mM. A eletroforese foi realizada no seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), por 1,5 h à 3000V em tampão TBE (Tris-HCl 0,89M; Ácido bórico 0,02M; EDTA 0,02M, pH 8,0).

## 2.5. Análises Estatísticas

A análise de variância dos valores de CLR e a comparação entre grupos de médias pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade foram realizadas para as linhagens descritas na Tabela 1 submetidas às atividades de {11}, {20}, {27} e {39}  $\mu$ M Al em solução nutritiva, com o auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2000).

Os testes de  $\chi^2$ , curtose e simetria foram utilizados para avaliar a hipótese de normalidade dos valores de CRR nas progênies  $F_2$ , sendo o teste de  $\chi^2$  também utilizado para verificar o ajuste da segregação individual dos marcadores *m181* e *ctg29* e do gene *Alt<sub>SB</sub>* na população  $F_{2:3}$  (BR0012R x CMSXS225R) a um modelo monogênico dominante. Para cada população  $F_2$ , a detecção da associação entre os marcadores *m181* e *ctg29*, e o fenótipo da tolerância ao Al foi feita pela análise de variância das médias de CRR em cada uma das classes genóticas para os marcadores, sendo o código 2 atribuído aos indivíduos homocigotos para o alelo da linhagem tolerante, 1 aos heterocigotos e 0 aos homocigotos para o alelo herdado de BR012R. A proporção da variância fenotípica explicada pelos marcadores foi determinada por análise de regressão simples. Os testes de normalidade, segregação, e as análises de variância e regressão foram realizadas com o auxílio do software GQMOL (Cruz e Schuster, 2001).

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Variabilidade Fenotípica para Tolerância ao Al em Sorgo**

Os resultados da Tabela 2 demonstram a existência de variabilidade acentuada quanto aos níveis de tolerância ao Al entre as linhagens de sorgo. Pôde-se observar estímulo do crescimento radicular em grande parte das linhagens tolerantes a  $11 \mu\text{M}$  Al. Resposta similar foi obtida por Baligar et al. (1995), avaliando genótipos de sorgo nas concentrações de 0 a  $150 \mu\text{M}$  Al. O estímulo do crescimento radicular causado por baixas concentrações de Al não necessariamente resulta de um efeito direto do Al sobre a nutrição das plantas de sorgo, e as possíveis explicações incluem o bloqueio de cargas negativas em sítios da parede celular favorecendo a absorção de P, e a prevenção da toxicidade causada por outros metais tóxicos (Foy et al., 1978). Contudo, à exceção da linhagem BR007B, que apresentou inibição acentuada de crescimento radicular (CLR) a  $11 \mu\text{M}$  Al, não houve uma aparente resposta diferencial entre as demais linhagens nessa atividade, resultando na detecção de dois grupos pelo teste estatístico. A linhagem BR007B não foi agrupada juntamente às outras linhagens nas demais atividades exceto a  $39 \mu\text{M}$ , provavelmente devido a quebra acentuada da tolerância nas linhagens BR012R, IS8577 e SC112-14 nessa atividade. Esses resultados não só confirmaram a conhecida sensibilidade ao Al da linhagem BR007B, quanto sugeriram a ocorrência de níveis de tolerância superiores de BR012R em relação à BR007B. Com o aumento da atividade de Al houve quebra diferencial na tolerância das linhagens, assim considerado quando as médias de CLR tornaram-se menores do que 70%. Entretanto, o grupo formado por CMSXS225R, SC566-14 e SC283 não apresentou inibição do crescimento

radicular a {27}  $\mu\text{M}$  Al, sendo que o grupo formado pelas linhagens SC283 e SC566-14 apresentou altos níveis de tolerância mesmo na mais alta atividade de Al ({39}  $\mu\text{M}$ ). A performance da linhagem SC283, considerada como padrão de tolerância na cultura, está de acordo com os resultados obtidos por Furlani et al. (1987) e Foy et al. (1993).

A identificação de grupos de linhagens com altos níveis de crescimento radicular a {39}  $\mu\text{M}$  Al, como em CMSXS225R, SC175-14 indicam a possibilidade de, em cruzamentos com SC283 ou SC566-14, obter-se genótipos com níveis de tolerância superiores àqueles atualmente presentes nas cultivares comerciais de sorgo. A viabilidade dessa estratégia depende da existência nessas linhagens de genes de tolerância que sejam distintos de *Alt<sub>SB</sub>* em SC283 e SC566-14, e, ainda, que tenham efeito aditivo em combinação com *Alt<sub>SB</sub>*. 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 2. Porcentagem de crescimento líquido relativo (CLR) de 12 linhagens de sorgo expostas às atividades de {11}, {20}, {27} e {39}  $\mu\text{M}$  de Al em solução nutritiva. Valores representam médias de três repetições. As células não sombreadas indicam as atividades de Al nas quais a tolerância foi quebrada (i.e.  $\text{CLR} \leq 70$ ).

Linhagens de Sorgo	CLR (+Al/-Al)			
	{11} $\mu\text{M}$ Al	{20} $\mu\text{M}$ Al	{27} $\mu\text{M}$ Al	{39} $\mu\text{M}$ Al
BR007B	45 a	21 a	16 a	9 a
BR0012R	87 b	53 b	35 b	20 a
IS8577	113 b	79 c	54 b	29 a
SC112-14	106 b	82 c	45 b	18 a
SC549	100 b	91 c	74 c	50 b
3DX57/1/1/910	116 b	95 c	70 c	52 b
5DX-61-6-2	125 b	113 d	96 d	56 b
9DX9/11	99 b	82 c	70 c	63 c
SC175-14	105 b	100 d	85 c	78 c
CMSXS225R	94 b	109 d	109 d	82 c
SC566-14	123 b	104 d	105 d	98 d
SC283	103 b	114 d	112 d	108 d
CV(%)	14,30	8,64	15,19	20,04

Médias dentro de colunas com a mesma letra constituem grupos homogêneos pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.2. Variabilidade Genética para a Tolerância ao Al em Sorgo

Para os cruzamentos de BR012R com SC549, SC112-14, SC175-14 (Figura 1), os resultados dos testes de  $\chi^2$ , Curtose (C) e Simetria (S) apresentaram ajuste dos dados de distribuição de freqüência dos valores de CRR nas progênies  $F_2$  a um modelo normal (Tabela 3), fornecendo indício de herança quantitativa. Essa possível complexidade poderia ser atribuída, dentre outros fatores, pela presença de mais de um gene de tolerância doado pelos parentais tolerantes ou pela presença de gene(s) de tolerância em BR012R. Essa hipótese torna-se plausível diante da superioridade da tolerância de BR012R em relação à BR007B (Tabela 2).

Por outro lado, nas progênies  $F_2$  derivadas de cada um dos cruzamentos entre BR012R com IS8577 (Figura 2A), BR007B (Figura 2B), CMSXS225R (Figura 3), 3DX57/1/1/910, 5DX-61-6-2, 9DX9/11 (Figura 4) e SC283 (Figura

5B), a hipótese de normalidade de distribuição de frequência dos valores de CRR foi rejeitada pelo teste  $\chi^2$  ( $P < 5\%$ ) (Tabela 3), indicando possível existência de genes de efeitos maiores afetando a característica. Entretanto, distribuições de frequência tipicamente descontínuas e bimodais não foram observadas. De fato, com exceção dos dados de distribuição de frequência de CRR da progênie derivada de CMSXS225R, as sete demais apresentaram curtose igual a três ( $P > 5\%$ ), e para as progênies derivadas do cruzamento de BR012R com IS8577, BR007B, 5DX-61-6-2 e SC283 os dados de distribuição de frequência apresentaram simetria ( $P > 5\%$ ) (Tabela 3), mostrando que apesar do teste de  $\chi^2$  ter rejeitado a hipótese de normalidade, estas populações guardam características de distribuição normal. A segregação da progênie  $F_2$  derivada do cruzamento entre BR007B e SC283 foi adotada como controle experimental, por ter sido a população utilizada por Magalhães et al. (2004) para mapear o gene *Alt<sub>SB</sub>* (Figura 5A). Nesta progênie a hipótese de normalidade foi rejeitada pelo teste de  $\chi^2$  sendo também observada ausência de simetria ( $P < 5\%$ ). Na progênie  $F_2$  derivada do cruzamento entre BR012R e SC283 (Figura 5B), a hipótese de normalidade foi também rejeitada pelo teste de  $\chi^2$ , ainda que os dados de distribuição de frequência tenham apresentado características de distribuição normal, como curtose estatisticamente igual a três e simetria ( $P > 5\%$ ).

Tabela 3. Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), Curtose (C) e Simetria (S) sobre a hipótese de normalidade da distribuição de frequência dos valores de CRR, nas progênies F<sub>2</sub> avaliadas em solução nutritiva.

Progênies F <sub>2</sub>	n <sup>(3)</sup>	Média	Variância	Teste de $\chi^2$ <sup>(1)</sup>		Curtose		Simetria	
				$\chi^2$	$\alpha$ (%) <sub>(2)</sub>	C	P(%)	S	P(%)
BR012R x SC549	198	77,03	649,10	27,14	24,99	2,42	8,73	-0,40	79,62
BR012R x SC112-14	174	83,33	391,78	22,79	24,69	3,05	88,59	-0,19	29,61
BR012R x SC175-14	192	63,87	473,41	26,29	19,55	2,65	67,74	0,17	67,44
IS8577 x BR012R	189	87,31	621,67	38,47	3,11	2,56	21,63	-0,07	70,74
BR012R x BR007B	102	97,49	493,32	32,34	3,98	3,29	54,58	0,42	7,53
BR012R x CMSXS225R	162	45,14	879,30	97,05	0,00	2,14	2,16	0,58	0,25
BR012R x 3DX57/1/1/910	172	72,31	963,42	54,41	0,29	2,62	30,95	0,49	0,77
BR012R x 5DX-61-6-2	175	84,67	1401,94	63,33	0,17	2,85	69,02	0,31	8,62
BR012R x 9DX9/11	203	67,27	337,83	38,53	0,51	3,40	23,95	-0,56	0,12
BR012R x SC283	81	68,84	553,66	30,95	1,36	2,03	6,37	-0,26	67,58
BR007B x SC283	102	52,41	950,38	86,59	0,00	2,89	81,29	0,73	0,24

<sup>(1)</sup> Hipótese testada: dados fenotípicos seguem distribuição normal.

<sup>(2)</sup>  $\alpha$ (%) = probabilidade máxima de erro ao rejeitar uma hipótese verdadeira.

<sup>(3)</sup> Número de plantas

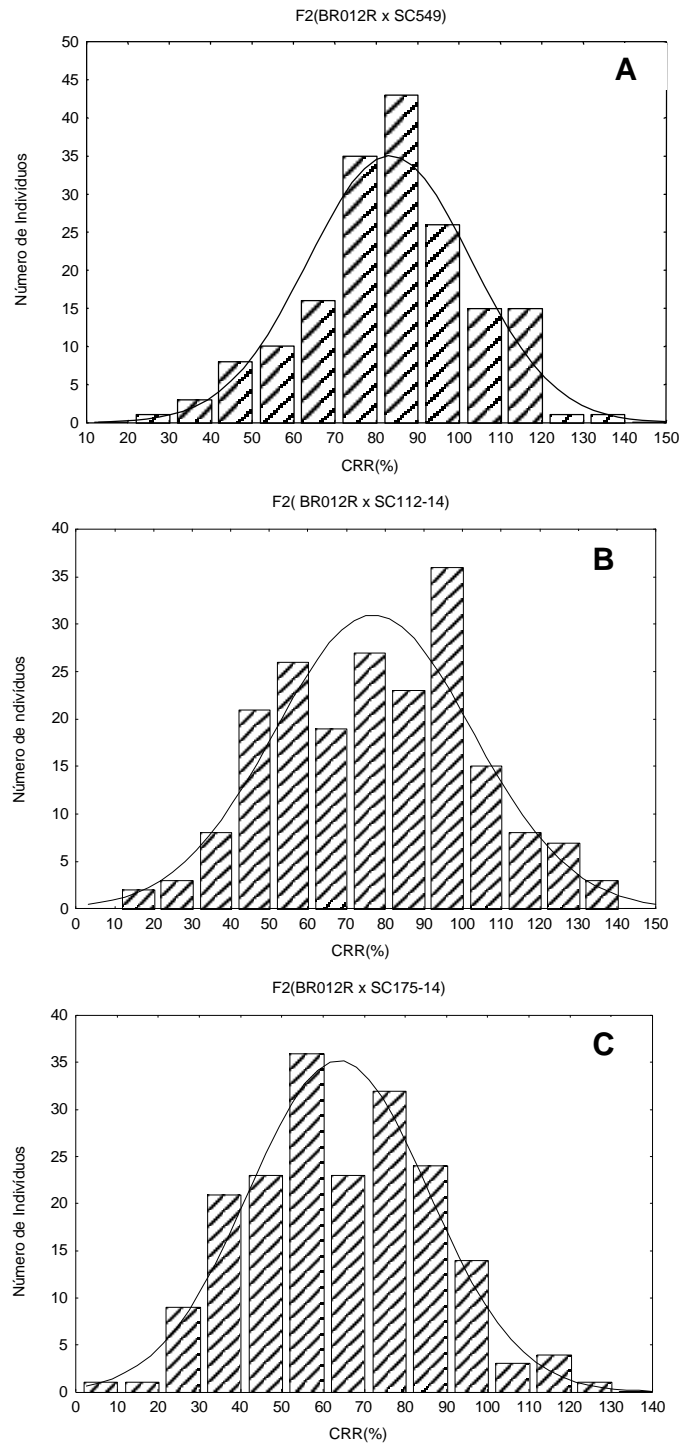


Figura 1. Distribuição de freqüência para valores de CRR nas progênies: **A.** F<sub>2</sub> (BR012R x SC549); **B.** F<sub>2</sub> (BR012R x SC112-14) e **C.** F<sub>2</sub> (BR012R x SC175-14), cultivadas em solução nutritiva a {20} (**B**) e {27} μM Al (**A e C**) durante cinco dias. A linha indica a curva normal esperada.

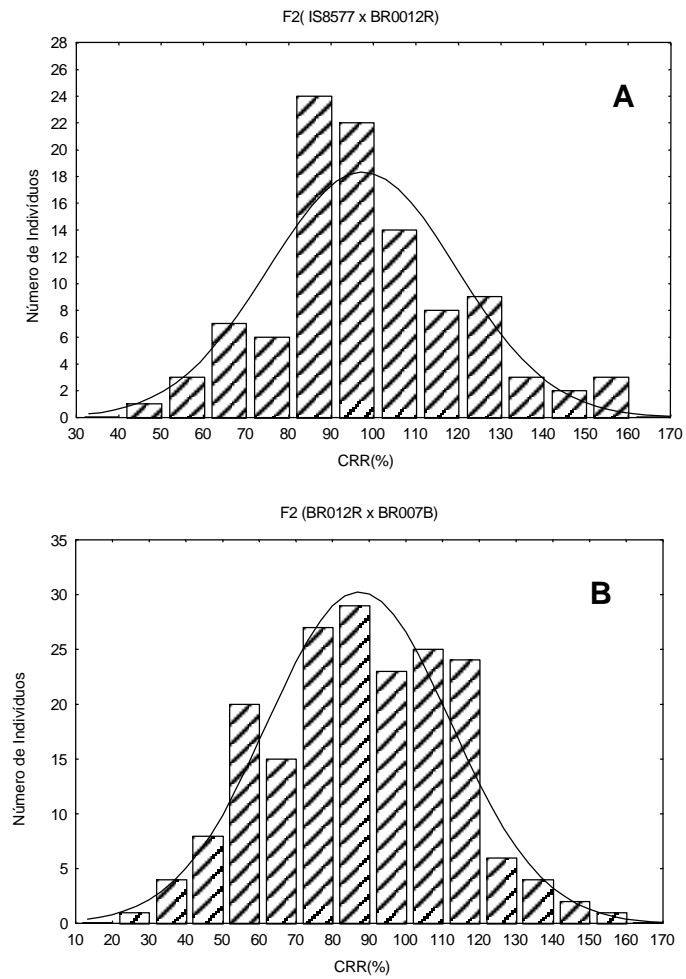


Figura 2. Distribuição de freqüência para valores de CRR nas progênies: **A.** F<sub>2</sub> (BR012R x IS8577); **B.** F<sub>2</sub> (BR012R x BR007B), cultivadas em solução nutritiva a {20} µM Al (**A**) e {11} µM Al (**B**) durante cinco dias. A linha indica a curva normal esperada.

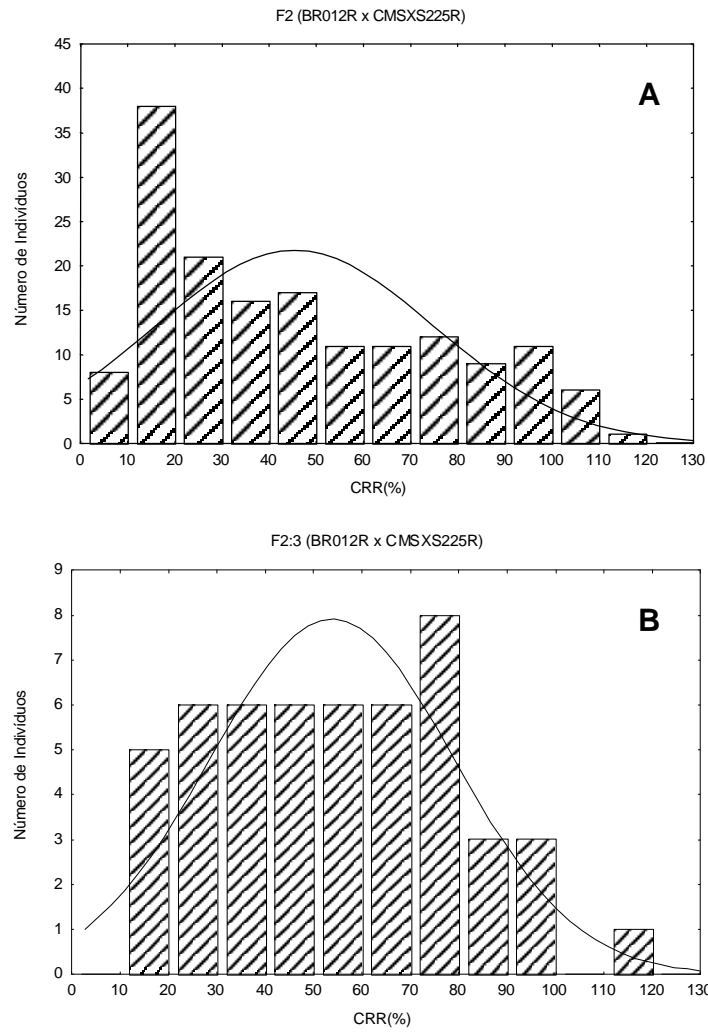


Figura 3. Distribuição de freqüência para valores de CRR nas progênies: **A.** F<sub>2</sub> e **B.** F<sub>2:3</sub> (BR012R x CMSXS225R), cultivadas em solução nutritiva a {39} µM Al durante cinco dias. A linha indica a curva normal esperada.

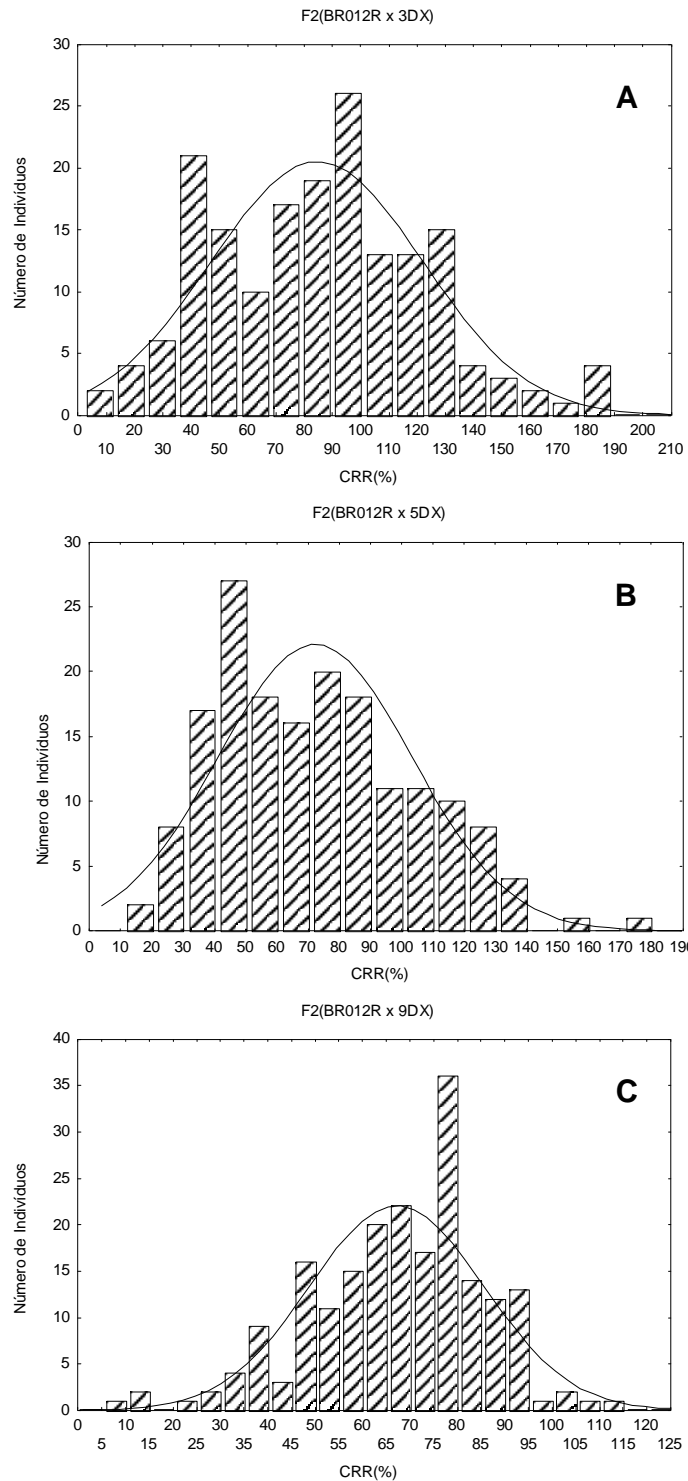


Figura 4. Distribuição de freqüência para valores de CRR nas progênies: **A.** F<sub>2</sub> (BR012R x 3DX57/1/1/910); **B.** F<sub>2</sub> (BR012R x 5DX61/612) e **C.** F<sub>2</sub> (BR012R x 9DX9/11), cultivadas em solução nutritiva a {27} µM Al durante cinco dias. A linha indica a curva normal esperada.

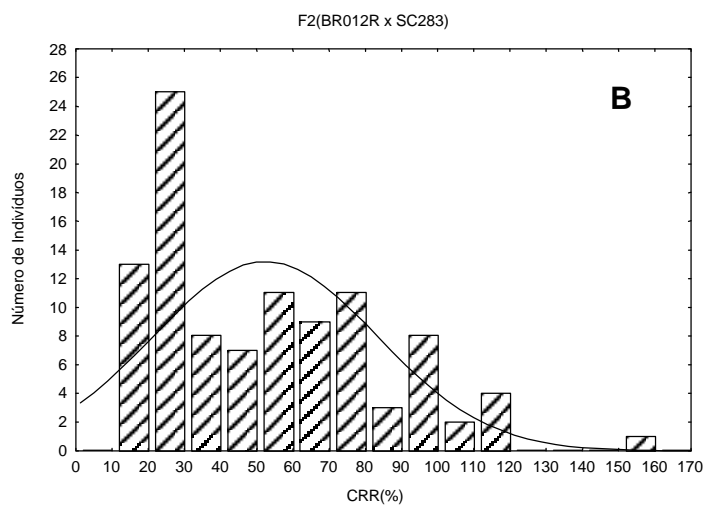
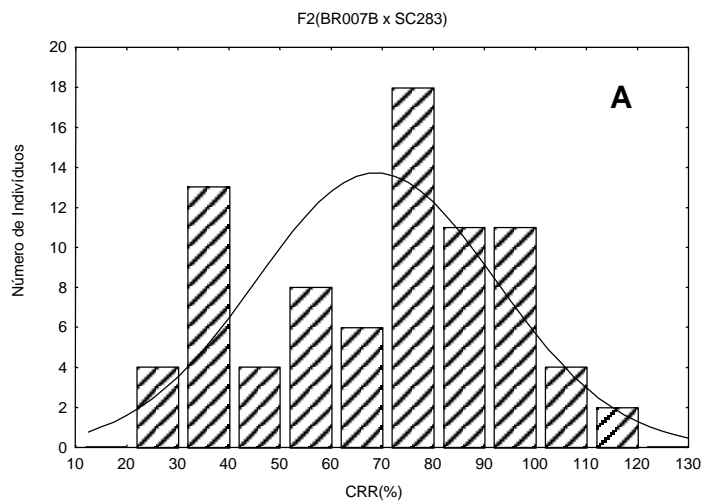


Figura 5. Distribuição de frequência para valores de CRR nas progênies: **A.** F<sub>2</sub> (BR007B x SC283) e **B.** F<sub>2</sub> (BR012R x SC283), cultivadas em solução nutritiva {27}  $\mu$ M Al durante 5 dias. A linha indica a curva normal esperada

Tratando-se a tolerância ao AI como uma característica métrica, procedeu-se à análise de associação com marcas simples visando verificar a contribuição do gene *Alt<sub>SB</sub>* na tolerância das linhagens CMSXS225R, 3DX57/1/1/910, 5DX-61-6-2, 9DX9/11, IS8577, SC175-14, SC549, SC112-14 e também na linhagem BR012R.

Os resultados do teste de  $\chi^2$  sobre a hipótese de segregação 1:2:1 dos marcadores *ctg29* e *m181* nas 10 populações F<sub>2</sub> (Tabela 4) mostraram que em duas delas, F<sub>2</sub> (BR012R x 3DX57/1/1/910) e F<sub>2</sub> (BR012R x SC283), houve desvio da segregação esperada (P<5%). A ligação entre os dois marcadores nas várias populações variou entre 0 cM nas F<sub>2</sub> derivadas de 9DX9/11, 5DX-61-6-2 e 3DX57/1/1/910 (LOD=35,82, 40,94 e 42,14, respectivamente), 1,0 (LOD=36,19) a 1,8 cM (LOD=30,53) nas populações F<sub>2</sub> derivadas de IS8577 e SC112-14 respectivamente, a 3 cM (LOD=31,51) na F<sub>2</sub> derivada de SC175-14, indicando que esses marcadores estão de fato ligados ao gene *Alt<sub>SB</sub>*, como observado previamente no cruzamento BR007B x SC283. Assim, esses marcadores deverão indicar com precisão a segregação desse gene nas condições experimentais adotadas.

Tabela 4. Análise da segregação dos marcadores *ctg29* e *m181* nas 10 progênies F<sub>2</sub> avaliadas.

Progênies	Nº de Indivíduos	Marcador	$\chi^2$ <sup>(1)</sup>	P(%)
F <sub>2</sub> (BR012R x 3DX57/1/1/910)	100	<i>m181</i>	7,92 *	1,91
	100	<i>ctg29</i>	7,92 *	1,91
F <sub>2</sub> (BR012R x 5DX-61-6-2)	87	<i>m181</i>	1,414 ns	49,32
	87	<i>ctg29</i>	1,414 ns	49,32
F <sub>2</sub> (BR012R x 9DX9/11)	88	<i>m181</i>	4,364 ns	11,28
	84	<i>ctg29</i>	4,262 ns	11,87
F <sub>2</sub> (IS8577 x BR012R)	90	<i>m181</i>	0,489 ns	78,31
	88	<i>ctg29</i>	0,432 ns	80,58
F <sub>2</sub> (BR012R x SC175-14)	96	<i>m181</i>	3,167 ns	20,53
	96	<i>ctg29</i>	4,26 ns	32,47
F <sub>2</sub> (BR012R x SC112-14)	84	<i>m181</i>	2,929 ns	23,12
	82	<i>ctg29</i>	3,561 ns	16,86
F <sub>2</sub> (BR012R x SC549)	91	<i>m181</i>	2,121 ns	34,63
F <sub>2</sub> (BR012R x CMSXS225R)	87	<i>ctg29</i>	1,115 ns	57,27
F <sub>2</sub> (BR012R x BR007B)	98	<i>m181</i>	1,163 ns	55,90
F <sub>2</sub> (BR012R x SC283)	75	<i>ctg29</i>	13,373*	0,12

<sup>(1)</sup> Hipótese testada: marcadores segregam na proporção 1:2:1

A análise de associação dos marcadores *ctg29* e *m181* com o índice de tolerância CRR (Tabela 5) apresentou valores de F significativos nas progênes  $F_2$  derivadas do cruzamento de cada um dos parentais tolerantes CMSXS225R, 3DX57/1/1/910, 9DX9/11, IS8577, SC175-14, SC549 e SC283 com o parental sensível BR012R, confirmando a ligação com o gene *Alt<sub>SB</sub>*. Exceções foram observadas nas progênes  $F_2$  derivadas dos cruzamentos entre 5DX-61-6-2 e SC112-14 com BR012R, para as quais os valores de F não foram significativos mesmo a 10% de probabilidade. Tais resultados sugerem que os níveis consideráveis de tolerância observados nessas duas linhagens devem-se a genes distintos do *Alt<sub>SB</sub>*. A contribuição do loco *Alt<sub>SB</sub>* nos baixos níveis de tolerância de BR012R foi confirmada pela ligação do marcador *m181* com o índice CRR na população  $F_2$  derivada do cruzamento entre as linhagens sensíveis BR012R e BR007B (F significativo a 1% de probabilidade). Assim, a variação alélica no loco *Alt<sub>SB</sub>* está envolvida pelo menos em parte da tolerância residual de BR012R (Tabela 5).

A regressão linear dos valores de CRR com os marcadores *m181* e *ctg29* mostrou que o loco *Alt<sub>SB</sub>* explica entre 10% e 50% da variação fenotípica de CRR nas populações  $F_2$  (Tabela 5). O restante da variação pode ser atribuído à presença de outros genes de tolerância, à variação experimental causada pela avaliação de plantas individuais nas progênes  $F_2$ , e à eficiência da atividade de AI utilizada em separar claramente o fenótipo tolerante do sensível. No tocante à avaliação de plantas individuais na geração  $F_2$ , os dados indicam pouca precisão das estimativas. No entanto, quando a fenotipagem foi realizada em famílias  $F_{2:3}$ (BR012R x CMSXS225R), foi possível a adoção de repetição. Neste caso, as médias foram utilizadas para estimar o valor fenotípico das plantas  $F_2$  que originaram essas famílias, o que tornou possível melhorar a estimativa do  $R^2$  de 50% para 79%(Tabela 5).

Tabela 5. Análise de ligação e de regressão dos marcadores *m181* e *ctg29* com o índice de tolerância CRR nas populações avaliadas sob níveis tóxicos de Al em solução nutritiva.

Progênes	Nº de Indivíduos	Marcador	F	P(<)	CV(%)	R <sup>2</sup> (%)
F <sub>2</sub> (BR012R x 3DX57/1/1/910)	100	<i>m181</i>	5,4201**	0,0059	45,02	10,05
	100	<i>ctg29</i>	5,4201**	0,0059	45,02	10,05
F <sub>2</sub> (BR012R x 5DX-61-6-2)	87	<i>m181</i>	1,5486ns	0,2186	42,99	-
	87	<i>ctg29</i>	1,5486ns	0,2186	42,99	-
F <sub>2</sub> (BR012R x 9DX9/11)	88	<i>m181</i>	4,4125*	0,0150	24,94	9,41
	84	<i>ctg29</i>	5,5739**	0,0054	23,02	12,10
F <sub>2</sub> (IS8577 x BR012R)	90	<i>m181</i>	6,9807**	0,0015	25,45	13,82
	88	<i>ctg29</i>	7,1132**	0,0014	25,62	14,34
F <sub>2</sub> (BR012R x SC175-14)	96	<i>m181</i>	12,3818**	0,0000	26,31	21,03
	96	<i>ctg29</i>	12,7359**	0,0000	26,23	21,50
F <sub>2</sub> (BR012R x SC112-14)	84	<i>m181</i>	0,6617ns	1,0	24,32	-
	82	<i>ctg29</i>	0,9667ns	1,0	24,41	-
F <sub>2</sub> (BR012R x SC549)	91	<i>m181</i>	11,9901**	0,0000	30,42	21,42
F <sub>2</sub> (BR012R x BR007B)	98	<i>m181</i>	18,7894**	0,0000	19,69	28,13
F <sub>2</sub> (BR012R x SC283)	75	<i>ctg29</i>	7,0827**	0,0016	31,54	16,44
F <sub>2</sub> (BR012R x CMSXS225R)	87	<i>ctg29</i>	41,7749**	0,0000	48,97	49,87
F <sub>2:3</sub> (BR012R x CMSXS225R)	45	<i>ctg29</i>	79,3236**	0,0000	22,77	79,07

\*\*, \* significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente.

### 3.3. Efeito das Doses do Al na Avaliação Genética da Tolerância

O nível de toxidez de Al adotado nas análises fenotípicas parece influenciar a distribuição das freqüências dos valores de CRR nas progênes. Quando as progênes F<sub>2</sub> foram avaliadas utilizando atividades de Al de {11} e {27} µM, as freqüências dos valores de CRR apresentaram distribuição normal, ou não apresentaram uma descontinuidade evidente como seria o caso da segregação de um único gene dominante de efeito maior. Tais resultados sugerem que essas doses de alumínio não tenham sido suficientes para neutralizar genes de efeitos menores segregando em segundo plano. No entanto, quando uma linhagem altamente tolerante como CMSXS225R foi utilizada no cruzamento, foi possível avaliar suas progênes na atividade de Al mais elevada, de {39} µM. Nesse caso, as progênes F<sub>2:3</sub> derivadas desse cruzamento apresentaram uma razão de segregação de 1:2:1 ( $\chi^2=0,377$ ,

P=82,79%) (Tabela 6), tendo sido a segregação do gene *Alt<sub>SB</sub>* responsável pela maior parte ( $R^2 = 79\%$ , Tabela 5) da variação fenotípica para tolerância ao Al.

Tabela 6. Distribuição de classes genotípicas de *Alt<sub>SB</sub>* em classes de CRR, na progênie F<sub>2:3</sub> (BR0012R x CMSXS225R)<sup>a</sup> a {39} μM de Al.

Classes de CRR	Nº Indivíduos/ Classe CRR	Número de Indivíduos por classe genotípica		
		<i>TT</i>	<i>Tt</i>	<i>tt</i>
10-20	5	0	0	<b>5</b>
20-30	6	0	0	<b>6</b>
30-40	5	0	<b>5</b>	0
40-50	5	0	<b>5</b>	0
50-60	6	0	<b>6</b>	0
60-70	5	<b>1</b>	<b>4</b>	0
70-80	6	<b>6</b>	0	0
80-90	3	<b>2</b>	1	0
90-100	3	<b>3</b>	0	0
100-120	1	<b>1</b>	0	0
Total	45	13	21	11

<sup>a</sup> médias de CRR nas linhagens parentais, CMSXS225R = 74,6 ± 2,23 e BR012R = 19,3 ± 0,79.

No tratamento com {39} μM Al, a linhagem BR012R formou um grupo homogêneo com BR007B (Tabela 2). Esse fato reforça a hipótese de que genes de efeitos menores presentes em BR012R, que condicionaram tolerância a {11}, {20} e {27} μM Al, não estão mais sendo efetivos na manutenção das taxas de crescimento radicular a {39} μM Al. Esse fator provavelmente resultou na maior proporção da variação fenotípica para CRR explicada pelo marcador *ctg29* (50%, Tabela 5), na população F<sub>2</sub> (BR012R x CMSXS225R). Tais resultados indicam a influência de diferenças alélicas na porção da variância explicada pelos marcadores, ao permitir a adoção de concentrações mais altas de Al na avaliação de progênies derivadas de parentais altamente tolerantes, reduzindo assim os efeitos de genes de efeitos menores segregando em um dado “background” genético.

A regressão linear dos valores médios de CRR em famílias F<sub>2:3</sub> (BR012R x CMSXS225R) em função das três classes genotípicas para o marcador *ctg29*

mostrou que o loco  $Alt_{SB}$  explicou 79% da variação fenotípica para a tolerância ao Al nessa população. A variação residual pode ser devida a genes controlando o crescimento radicular independentemente do Al e/ou a segregação de genes de efeito menor na tolerância, que ainda se mantém marginalmente ativos a  $\{39\}$   $\mu\text{M}$  Al.

A estimativa da ação gênica do  $Alt_{SB}$  nas progênies  $F_2$  e  $F_{2:3}$  do cruzamento com a linhagem tolerante CMSXS225R sugere ausência de dominância ( $d/a_{(F_2)} = 0,170$  e  $d/a_{(F_{2:3})} = -0,006$ ) nas condições experimentais adotadas, e que a adição de um alelo de tolerância de CMSXS225R (efeito aditivo, a) aumenta o CRR em aproximadamente 30% (Tabela 7).

Tabela 7. Estimativa da ação gênica do  $Alt_{SB}$  nas progênies  $F_2$  e  $F_{2:3}$  (BR012R x CMSXS225R).

Classe Genotípica	Média de CRR(%)	DP	$a^a$	$d^b$	$d/a$
CMSXS225R	74,6	2,23			
BR012R	19,3	0,79			
(CMSXS225R + BR012R) / 2	46,9	-			
$F_2 - TT$	68,1	6,1			
$F_2 - Tt$	45,7	3,5			
$F_2 - tt$	14,1	0,78			
$F_2 - (TT + tt) / 2$	41,1	-			
$F_2$			27	4,6	0,170
$F_{2:3} - TT$	83,11	3,54			
$F_{2:3} - Tt$	51,71	3,11			
$F_{2:3} - tt$	20,63	1,24			
$F_{2:3} - (TT + tt) / 2$	51,9	-			
$F_3$			31,24	-0,19	-0,006

<sup>a</sup>  $a = [(TT - tt) / 2]$ .

<sup>b</sup>  $d = Tt - [(TT + tt) / 2]$ .

### 3.4. Variabilidade Gênica e Alélica para a Tolerância ao Al em Sorgo

As análises moleculares revelaram a participação do loco  $Alt_{SB}$  nos níveis de tolerância apresentados pelas linhagens avaliadas, excetuando-se 5DX-61-6-2 e SC112-14. Contudo, níveis diferenciais de tolerância foram obtidos em solução nutritiva (Tabela 2), sugerindo que possa existir variação alélica no loco

*Alt<sub>SB</sub>* nas demais linhagens. Contudo, a hipótese de existência de alelos múltiplos no loco *Alt<sub>SB</sub>* necessita ser melhor investigada, uma vez que há evidências para a presença de outros genes de tolerância nas linhagens de sorgo. Todavia, a existência de materiais com controle genético distinto terá influência significativa na seleção de genótipos parentais para um programa de seleção recorrente, visando à obtenção de linhagens com características agrônomicas desejáveis e que incorporem altos níveis de tolerância ao alumínio tóxico no solo.

As análises da tolerância ao Al em sorgo sugerem que o modelo genético simples não explica totalmente a tolerância ao Al nas progênies avaliadas. A avaliação molecular revelou que a tolerância ao Al nas linhagens CMSXS225R, 3DX57/1/1/910, 9DX9/11, IS8577, SC175-14, SC549, SC283 e BR012R pode ser devida a alelos múltiplos no loco *Alt<sub>SB</sub>*. No entanto, genes distintos de tolerância ocorrem nas linhagens 5DX-61-6-2 e SC112-14. Assim, a piramidação do gene *Alt<sub>SB</sub>* aos genes presentes em SC112-14 e, particularmente em 5DX-61-6-2 (CRL = 94 a {27}  $\mu$ M Al, Tabela 2), pode ser uma estratégia eficiente visando aumentar os níveis de tolerância na cultura, desde que, como mencionado anteriormente, os efeitos desses genes sejam aditivos.

#### 4. Conclusões

Foi detectada variabilidade para a tolerância ao alumínio entre as 12 linhagens de sorgo avaliadas em quatro diferentes atividades de Al em solução nutritiva, sendo que os maiores níveis de tolerância foram observados nas linhagens CMSXS225R, SC566-14 e SC283. A linhagem testadora BR012R não formou grupo homogêneo com a linhagem padrão de sensibilidade BR007B, em baixas atividades de Al.

O padrão de segregação para o índice de tolerância nas progênies derivadas dos cruzamentos entre a linhagem sensível BR012R e as demais tolerantes sugeriu herança complexa e herança influenciada por gene(s) de efeito(s) maior(es) para a característica, sendo o loco  $Alt_{SB}$ , responsável pela tolerância na maioria da linhagens avaliadas, excetuando-se 5DX-61-6-2 e SC112-14. Variação alélica no loco  $Alt_{SB}$  responde também por ao menos parte da tolerância residual manifestada por BR012R.

Além da possível ocorrência de diferentes alelos no loco  $Alt_{SB}$  nas linhagens avaliadas, foi sugerida a existência de genes distintos de tolerância ao Al. Assim sendo, um programa de seleção recorrente pode ser uma estratégia eficiente para a geração de cultivares com níveis de tolerância superiores aos atuais. As linhagens SC283 ou SC566-14, 5DX-61-6-2 e SC112-14 são indicadas como possíveis parentais para esse tipo de estratégia.

## CAPÍTULO 2

### Avaliação da Diversidade Genética para Tolerância ao Alumínio em Sorgo

#### 1.Introdução

*Sorghum* é um gênero muito diverso, que compreende espécies cultivadas e espontâneas (Schertz e Dalton, 1980). O sorgo cultivado, *Sorghum bicolor* ( $2n = 20$ ), consiste de cinco raças básicas (bicolor, caudatum, durra, guinea e kafir) e de outras dez intermediárias envolvendo todos os possíveis pares de combinações entre as raças básicas (Harlan e De Wet, 1972). Estudos de avaliação da diversidade genética em sorgo foram inicialmente conduzidos com base em informações morfológicas (Teshome et al., 1997; Ayana e Bekele, 1998; Grenier et al., 2000). Contudo, o número de características morfológicas de herança simples, que são as mais comumente avaliadas nesses estudos, é reduzido. Pelo seu maior poder de detecção de variações no genoma dentre outras vantagens, metodologias baseadas em polimorfismos de DNA têm sido freqüentemente empregadas em estudos de diversidade genética em sorgo.

Vários tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados para avaliar a diversidade genética em sorgo, como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, Ahnert et al., 1996; Jordan et al., 1998), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*, Ayana et al., 2000) e microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeats*, Dean et al., 1999; Djè et al., 2000; Smith et al., 2000; Gebru et al., 2002). No entanto, os mais usados atualmente são os marcadores microssatélites, que se constituem em seqüências de dois a cinco

pares de base que se repetem em tandem e em número variável no genoma (Rafalski et al., 1996).

Além de serem altamente variáveis, os marcadores SSR, possuem outras características que os tornam atrativos para estudos genéticos, como codominância, padrão de herança mendeliana (Pejic et al., 1998) e alta reprodutibilidade (Yang et al., 1996). A maioria dos SSR em plantas é baseada em repetições dos dinucleotídeos  $(AC)_n$ ,  $(AG)_n$  e  $(AT)_n$ , que podem ser amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), usando *primers* complementares às seqüências que flanqueiam as repetições. Variações no comprimento do produto da reação de PCR ocorrem em função de variações no número de repetições, e são provenientes do escorregamento (“*slippage*”) da DNA polimerase durante a replicação do DNA ou do crossing-over desigual entre cromátides-irmãs (Valdes et al., 1993).

Vários marcadores SSR estão disponíveis para estudos moleculares em sorgo. Taramino et al. (1997) caracterizaram 13 locos SSR, sendo 10 isolados de bibliotecas genômicas de sorgo e 3 obtidos pela busca por seqüências repetitivas em bancos de dados. Os 13 locos revelaram níveis moderados a elevados de diversidade em um grupo de 9 linhagens de diferentes classificações raciais e origens geográficas. Por sua vez, Brown et al. (1996), visando identificar SSR polimórficos em sorgo, desenvolveram um conjunto de 15 pares de *primers* específicos para a espécie, com valor médio de diversidade (ou PIC) igual a 0,56. Posteriormente, Dean et al. (1999) otimizaram a análise dos *primers* SSR desenvolvidos por Brown et al. (1996), marcando-os com moléculas fluorescentes de acordo com o tamanho dos alelos, o que possibilitou a sua utilização em formato multiplex, minimizando assim os custos com a reação de PCR e eletroforese. Vários desses marcadores têm sido mapeados geneticamente, sendo disponíveis mapas genéticos com a localização de locos SSR em sorgo (Hart et al., 2000). O conhecimento da posição no genoma é importante, pois assegura a escolha uniforme de marcadores, aumentando a precisão das estimativas de similaridades entre indivíduos (Menz et al., 2004).

Comparados com outros marcadores, os SSRs têm mostrado alta eficiência na detecção de polimorfismos em sorgo. Agrama e Tuinstra (2003) utilizaram marcadores SSR e RAPD para avaliar a diversidade genética no germoplasma de sorgo de diferentes raças e origens geográficas. Seus resultados indicaram que os SSRs foram altamente polimórficos em comparação aos RAPDs, que apresentaram aproximadamente 40% de fragmentos monomórficos. Resultados similares foram obtidos por Uptmoor et al. (2003), ao avaliarem o relacionamento genético de acessos derivados da África do Sul. Os valores de diversidade genética obtidos com marcadores SSRs foram três vezes superiores aos obtidos com RAPD e AFLP, sugerindo a maior eficiência dos microssátelites em análises de diversidade genética em sorgo. Além disso, os marcadores SSR têm se mostrado adequados para avaliar a diversidade genética mesmo entre cultivares fortemente relacionados (Ghebru et al., 2002). Devido ao grande poder de discriminação desses marcadores, o seu uso é justificável quando se pretende obter uma boa representação da diversidade genética em sorgo.

Os objetivos desse estudo foram: (1) avaliar a diversidade genética do germoplasma rotineiramente utilizado no programa de melhoramento para tolerância a solos ácidos da Embrapa Milho e Sorgo, (2) observar possíveis padrões de relacionamento filogenético entre genótipos de sorgo altamente tolerantes aos Al.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Material Genético**

Às 12 linhagens de sorgo avaliadas no estudo do controle genético da tolerância ao Al realizado no capítulo 1 foram incorporados outros 35 genótipos representativos do germoplasma do programa de melhoramento para tolerância a solos ácidos da Embrapa Milho e Sorgo (Tabela 1).

### **2.2. Avaliação da Tolerância ao Alumínio em Solução Nutritiva**

Os 47 genótipos de sorgo foram avaliados quanto ao crescimento da raiz seminal em solução nutritiva nas atividades, entre chaves, estimadas com o software de especiação GEOCHEM-PC (Parker et al., 1995) e concentrações, entre colchetes, de {0}[0] e {25}[148]  $\mu\text{M}$  Al, respectivamente. As avaliações foram efetuadas em dois experimentos, cada um contendo metade dos genótipos em estudo e as linhagens BR007B (padrão de sensibilidade ao Al tóxico) e SC283 (padrão de tolerância ao Al tóxico). Os experimentos foram conduzidos segundo o delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições e 7 plântulas por repetição.

Posteriormente, os genótipos tolerantes que não puderam ser diferenciados quanto ao grau relativo de tolerância a {25}  $\mu\text{M}$  Al foram avaliados em solução nutritiva nas doses de {0}[0], {37}[222] e {58}[360]  $\mu\text{M}$  Al. Esse experimento, para discriminação de genótipos altamente tolerantes, foi conduzido segundo o delineamento inteiramente casualizado com 2 repetições, sendo avaliadas 7 plântulas por repetição.

As sementes de cada genótipo foram escarificadas com areia esterilizada por 5 minutos visando à quebra de dormência, sendo posteriormente tratadas

com hipoclorito de sódio (0,525%) por 5 minutos sob agitação constante, e enxaguadas oito vezes com água destilada. As sementes foram germinadas em rolos de papel de germinação umedecidos em água deionizada por um período de quatro dias. Plântulas uniformes de cada genótipo 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 sem Al (Magnavaca et al., 1987) com a seguinte composição: Ca (3527 $\mu$ M), K (2354 $\mu$ M), Mg (855 $\mu$ M), N-NO<sub>3</sub> (10857 $\mu$ M), N-NH<sub>4</sub> (1300 $\mu$ M), P (45 $\mu$ M), S (587 $\mu$ M), B (25 $\mu$ M), Fe (77 $\mu$ M), Mn (9,1 $\mu$ M), Cu (0,63 $\mu$ M), Mo (0,83 $\mu$ M), Zn (2,29 $\mu$ M), Na (1,74 $\mu$ M), Fe-HEDTA (75 $\mu$ M) e Cl (596 $\mu$ M), com pH ajustado para pH 4,2 com HCl 1M. Após esse período, foi adicionada solução nutritiva com a mesma constituição anterior, porém com a adição de AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.12H<sub>2</sub>O nos tratamentos contendo Al. A solução foi continuamente aerada durante todo o período experimental. Os experimentos foram conduzidos em câmara de crescimento com temperatura média diurna de 27  $\pm$  3°C, noturna de 20  $\pm$  3°C e fotoperíodo de 12 horas.

O Comprimento inicial da raiz seminal de cada plântula dos genótipos foi medido após 48 h (C<sub>48h</sub>) de crescimento em solução nutritiva completa sem alumínio. A solução nutritiva foi então substituída por solução de composição idêntica à original, porém contendo {0} e {25}  $\mu$ M Al na avaliação inicial ou {0}, {37} e {58}  $\mu$ M Al no experimento de discriminação de genótipos altamente tolerantes. O comprimento radicular foi novamente obtido cinco dias (C<sub>120h</sub>) após a aplicação dos tratamentos, sendo então determinado o Comprimento radicular líquido (CL = C<sub>120h</sub> – C<sub>48h</sub>) para cada dose de Al. Valores percentuais de Crescimento Líquido Relativo (CLR) foram obtidos pela divisão do crescimento radicular líquido medido após 5 dias na presença de Al por aquele obtido de plântulas cultivadas nas mesmas condições, porém na ausência de Al. Para cada tratamento com Al, foram obtidas as médias de CL de cada parcela experimental composta de 7 plântulas cada. Essas médias foram divididas pela média global do tratamento controle sem Al.

A análise de variância e a comparação entre grupos de médias pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade foram feitas para se estabelecer as diferenças entre as linhagens com base no índice de tolerância CLR avaliado a {25}, {37} e {58}  $\mu\text{M}$  Al. As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2000).

Tabela 1. Características dos 47 genótipos de sorgo utilizados no estudo de diversidade genética. “Grupos” correspondem às raças morfológicas [“working groups” segundo Murty et al., (1967)].

Genótipo	Outro Nome	Identificador IS <sup>a</sup>	Pedigree <sup>b</sup>	Grupos	Origem
BR007B	CMSXS101B		PU932242		USA
Tx2785	Capim Sudão		Derivada de TAM BK-49		USA
ARG1			Derivada de (MB807 x BTx624)		USA/ Argentina
Tx2784	Capim Sudão		Derivada de TAM BK-49		USA
IS10662	CMSXS237B	IS10662			-
CMSXS912	PU64294				USA
SC748-5	CMSXS173R	IS3552C	IS3552 RC4- dwarf Martin B <sup>c</sup>	Caudatum-guineense	Sudão
BTx644	B807		(BTx623*(BTx625*B35))-37B-2		USA
IS10317	CMSXS238B	IS10317			-
IS10562	CMSXS230B	IS10562			-
CMSXS156B	BTx1391				USA
QL-3		IS18757			Austrália
BTx642	B35, SC35	IS12555C	IS12555 RC4- dwarf Martin B	Durra	Etiópia
SC414-12-E		IS2508C	IS2508 RC4- dwarf Martin B	Caudatum-Kafir	Sudão
BTx643	B 1		(BTx625*B35)-HL19-HL9		USA
Tx430	CMSXS110R		Derivada de (Tx2536 x SC170)		USA
CMSXS180R			Derivada de (BRP3R x SC326-6) <sup>d</sup>		Brasil
BR001 B	Wheatland	IS8361	BTx399		USA
CMSXS205B	Tx631B		Tx615Bx(Tx378BxSC110-9)	Zera-zera	USA
<i>S. verticilliflorum</i>					-
IS3620C	SC303	IS3620C	IS3620 RC4- dwarf Martin B	Guinea	Nigéria
BTx623	BR009		Derivada de (Tx3197Bx SC170-6-4)	Zera-zera	Sudão
9929020			BRP5BR143-12-5-1-2-C <sup>e</sup>		Brasil
9910032			Desconhecido		Brasil
CMSXS235	9929036		BRP5BR143-7-6-4-2-3-C		Brasil
CMSXS182R			Derivada de (BRP3R x SC326-6)		Brasil
BR012R	CMSXS178R		Derivada de (SC748-5xSC326-6)		Brasil
CMSXS116R	Seleção de SC326-6, BR005R	IS3758C	IS375 RC4- dwarf Martin B		Etiópia / Brasil
9DX9/11					Uganda
SC112-14		IS12612C	IS12612 RC4- dwarf Martin B	Zera-zera	Etiópia
CMSXS226R			Derivada de (SC283 x SC326-6)		Brasil
SC283	CMSXS136	IS7173C	IS7173 RC4- dwarf Martin B	Conspicuuum	Tanzânia
SC175-14	CMSXS190	IS12666C	IS12666 RC4- dwarf Martin B	Zera-zera	Etiópia
BR501	Brandes		Derivada de (Collier 706-C e MN1500)		USA
ATF14			Derivada de (CMSXS101B x SC283)		Brasil
V20-1-1-1					Uganda
5DX-61-6-2					Uganda
SC549		IS3625C	IS3625 RC4-dwarf Martin B	Conspicuuum	Nigéria
IS8577		IS8577			Kênia
CMSXS153			156P-5-2-1		Uganda
CMSXS225R			Derivada de (CMSXS110xCMSXS153)		Brasil
SC566-14		IS7254C	IS7254 RC4-dwarf Martin B	Caudatum	Nigéria
3DX57/1/1/910					Uganda
CMSXS227R			Derivada de (SC283 x SC326-6)		Brasil
9929034			BRP5BR91-2-2-3-5-2-6		Brasil
9929030			BRP5BR317-2-3-1-2-2-C		Brasil
<i>S. halepense</i>					Brasil

<sup>a</sup> IS corresponde à denominação do ICRISAT

<sup>b</sup> compilado de informação pessoal, Dr. R. E. Schaffert, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas e www.ars-grin.gov . <sup>c</sup> RC – retrocruzamento.

<sup>d</sup> BRP3R refere-se à População Brasileira de Cruzamento Aberto R três.

<sup>e</sup> BRP5BR (População Brasileira de Cruzamento Aberto B e R cinco) tem como parentais as seguintes linhagens: SC048, SC112-14, SC175-14, SC283, SC322, SC418, 156-P-5-Serere-1, SC326-6 e TX2536.

### 2.3. Isolamento do DNA

Sementes de cada genótipo foram germinadas em células de isopor contendo substrato e cultivadas em casa de vegetação. A coleta de tecido foliar para isolamento de DNA se deu em *bulk* de cinco plântulas de cada genótipo, aproximadamente duas semanas após a germinação.

O isolamento do DNA de cada genótipo foi feito em pequena escala, segundo uma modificação do método descrito por Saghai-Marroof et al. (1984), em que um volume de 600µL de tampão CTAB (CTAB 2% [m/v]; 0,2 M Tris-HCl [pH 8,0]; 1,4 M NaCl; 0,02 M EDTA; 2% β-mercaptoetanol [v/v]) foram adicionados à aproximadamente 500 mg de material vegetal moído em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A mistura foi mantida em banho-maria à 65°C durante uma hora, com homogeneização a cada 15 minutos. Em seguida, foi realizada lavagem com igual volume de solução de clorofórmio-octanol (24:1), com homogeneização constante por 20 minutos. O material foi centrifugado a 16.000 x g por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para outro microtubo onde foram adicionados 1000 µL de isopropanol a -20°C. Os microtubos foram mantidos nessa temperatura por 45 a 60 minutos. Posteriormente, os microtubos foram novamente centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e o precipitado lavado com 300 µL de etanol 70% (v/v) gelado. Os tubos foram novamente centrifugados por 3 minutos a 16.000 x g, o sobrenadante foi descartado e o isopropanol residual retirado em centrífuga a vácuo por cinco minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 80 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0).

Amostras de DNA de sete genótipos foram quantificadas em gel de agarose 0,8% (m/v) em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0), utilizando um padrão de DNA de concentração conhecida. Após a eletroforese realizada a 100 V durante uma hora, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/mL) por 15 minutos, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no equipamento Eagle Eye II (Stratagene, La Jolla, CA). O DNA estoque foi

diluído em água ultra-pura autoclavada para a concentração de 10 ng/μL e armazenado a -20 °C.

## 2.4. Marcadores SSR

Quinze pares de *primers* SSR (Tabela 2), que previamente apresentaram alto nível de polimorfismo em sorgo (Brown et al., 1996), foram utilizados no estudo de diversidade genética. Esses marcadores foram analisados em três reações multiplex de cinco pares de *primers* segundo Dean et al. (1999). Os locos SSR utilizados amostraram 9 dos 10 cromossomos de sorgo, fornecendo uma ampla cobertura genômica.

Tabela 2. Composição e características dos painéis multiplex utilizados para a análise de diversidade genética em sorgo (Dean et al., 1999).

Locos SSR	Seqüência dos primers SSR	Natureza das repetições	Faixa alélica (pb)	Grupo de Ligação
Multiplex 1				
Sb4-15	F: <i>FAM</i> -GCTGCTAAGCCGTGCTGA R:TTATTTGGGTGAAGTAGAGGTGAACA	(AG) <sub>16</sub>	122-134	E
Sb4-121	F: <i>FAM</i> -GAAAAATCTCCGTCAATCCCAAAATAA R:CGCTGAACAACGAAAGGAATAAGTG	(AC) <sub>18</sub>	215-229	D
Sb4-32	F: <i>TET</i> -CTCGGCGGTTAGCACAGTCAC R:GCCCATAGACAGACAGCAAAGCCC	(AG) <sub>15</sub>	173-229	E
Sb5-236	F: <i>HEX</i> -TGC TTG TGA GAG TGC CTC CCT R:GTG AAC CTG CTG CTT TAG TCG ATG	(AG) <sub>20</sub>	160-208	G
Sb6-342	F: <i>HEX</i> -TGC TTG TGA GAG TGC CTC CCT R:GTG AAC CTG CTG CTT TAG TCG ATG	(AG) <sub>25</sub>	270-294	A
Multiplex 2				
Sb6-36	F: <i>FAM</i> -GCATAATGACGGCGTGCTC R:CTTCCAAGTGAAAGAAACCATCA	(AG) <sub>19</sub>	162-198	C
Sb1-1	F: <i>FAM</i> -TCCTGTTTGACAAGCGCTTATA R:AAACATCATACGAGCTCATCAATG	(AG) <sub>16</sub>	240-278	H
Sb1-10	F: <i>TET</i> -GTGCCGCTTTGCTCGCA R:TGCTATGTTGTTTGCTTCTCCCTTCTC	(AG) <sub>27</sub>	252-488	D
Sb5-256	F: <i>TET</i> -AATTTGCTTTTTGGTCCGTTT R:TAGGAAAGACAGTACTAGAGGTCA	(AG) <sub>8</sub>	168-182	C
Sb6-84	F: <i>HEX</i> -CGCTCTCGGGATGAATGA R:TAACGGACCACTAACAAATGATT	(AG) <sub>14</sub>	184-218	F
Multiplex 3				
Sb6-42	F: <i>FAM</i> -TTTTCTCTTTTTCAGATAACCGTA R:CCCACCAAGGGCATC	(AG) <sub>26</sub>	166-214	
Sb6-57	F: <i>FAM</i> -ACAGGGCTTTAGGGAAATCG R:CCATCACCGTCGGCATCT	(AG) <sub>18</sub>	284-310	C
Sb6-34	F: <i>TET</i> -AACAGCAGTAATGCCACAC R: TGACTTGGTAGAGAACTTGTCTTC	(AC)/(CG)	188-208	I
Sb5-206	F: <i>TET</i> -ATTATCATCCTCATCCTCGTAGAA R: AAAAACCAACCCGACCCACTC	(AC)/(AG)	106-156	E
Sb4-72	F: <i>HEX</i> -TGCCACCACTCTGGAAAAGGCTA R:CTGAGGACTGCCCAATGTAGG	(AG) <sub>16</sub>	184-220	B

## 2.5. Protocolo de Amplificação e Eletroforese

Cada uma das reações de amplificação em multiplex foram preparadas para um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , consistindo de 30 ng de DNA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,5U Taq DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,25 mM dNTPs e 2,5 pM de cada um dos 5 pares de *primers* componentes da reação multiplex. As amplificações seguiram-se mediante as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C/4 min, 25 ciclos de 95°C/1min., 55°C/2min. e 72°C/2min., e alongação final a 72°C/10 min. (Dean et al., 1999).

Um volume de 2  $\mu\text{L}$  do produto da reação de PCR diluído três vezes em água destilada foi misturado a 0,2  $\mu\text{L}$  do padrão GS-500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1  $\mu\text{L}$  de formamida HI-DI (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 0,5  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento (*blue dextran* 50mg/ml; EDTA 25 mM). As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C e mantidas em gelo até o carregamento de 2  $\mu\text{L}$  em gel de poliacrilamida 5% (p/v) (Long Ranger Gel Solution, Cambrex); uréia 6 M; Tris 100 mM; ácido bórico 100 mM e EDTA 2 mM. A eletroforese foi realizada no seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), por 2,5 h a 3000V em tampão TBE (Tris-HCl 0,89M; ácido bórico 0,02M e EDTA 0,02M pH 8,0).

## 2.6. Análise dos dados moleculares

As bandas polimórficas resultantes foram analisadas com o auxílio do software GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, CA), e os tamanhos dos alelos foram determinados usando o programa computacional Genotyper (Applied Biosystems, Foster City, CA). A variação genética de cada loco foi medida em termos do número de alelos por locos e conteúdo de informação polimórfica,  $PIC = 1 - \sum P_i^2$ , onde  $P_i$  é a freqüência do *i-ésimo* alelo.

Foi construída uma matriz, onde o valor 2 (dois) indicou a presença de duas cópias do alelo, 1 (um) uma cópia do alelo e o valor 0 (zero) ausência do

alelo. As estimativas de similaridades genéticas ( $S_{ij}$ ) entre cada par de genótipos ( $ij$ ) foram feitas utilizando um índice de coincidência simples com o software GQMOL <http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm> (Cruz e Schuster, 2001), segundo a fórmula:

$$S_{ij} = \frac{(2A + B + C + D)}{2 \times \text{Número de primers}}, \text{ onde :}$$

A = 2 e 2 (dois alelos em comum);

B = 2 e 1 (um alelo em comum);

C = 1 e 2 (um alelo em comum); e

D = 1 e 1 (um alelo em comum).

Os valores de similaridade derivados desse coeficiente foram transformados em medidas de dissimilaridade pela seguinte equação:  $d_{ij} = 1 - S_{ij}$ . O agrupamento dos genótipos foi realizado a partir da matriz de dissimilaridade pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Mean Arithmetics*, Mumm e Dudley, 1994), utilizando o software Statistica versão 4.5 (Stat Soft. Inc., 1993).

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Variabilidade Fenotípica para Tolerância ao Al**

Foi observada ampla variação dos valores percentuais de CLR nos genótipos avaliados em solução nutritiva a {25}  $\mu\text{M}$  Al (Tabela 3), indicando a existência de extensa variabilidade fenotípica para tolerância ao Al tóxico entre os genótipos avaliados. Dentre esses, 17 genótipos apresentaram alta tolerância ao Al, com CLR igual ou superior a 75%. Contudo, a atividade de {25}  $\mu\text{M}$  Al não se mostrou suficiente para diferenciar genótipos altamente tolerantes, tornando-se necessária a avaliação em doses superiores dos 12 genótipos que apresentaram CLR  $\geq 100$  nessa atividade.

Foram considerados sensíveis ao Al tóxico os grupos homogêneos formados com as letras a, b e c, respectivamente, como moderadamente tolerantes o grupo homogêneo formado com a letra d, e como tolerantes os grupos homogêneos formados com as letras e, f, g e h (Tabela 3). O grupo dos genótipos sensíveis é formado, em sua maioria, por materiais melhorados nos Estados Unidos, com algumas exceções como SC748 e SC414-12-E, coletados no Sudão, e Tx642B na Etiópia. Por sua vez, houve predominância de materiais coletados em Uganda, Nigéria e Tanzânia entre os genótipos tolerantes, que foram agrupados juntamente com a linhagem SC283, considerada como padrão de tolerância (Furlani et al., 1990; Foy et al., 1993). A predominância de genótipos sensíveis advindos do programa de melhoramento dos Estados Unidos pode ser explicada pelo fato de que os solos de regiões temperadas não são comumente ácidos, não sendo a seleção para tolerância ao Al prioridade naquelas condições. Em contraste, em países de clima tropical, onde os solos são naturalmente ácidos, o processo seletivo

foi certamente direcionado à identificação de genótipos tolerantes a esse estresse. Dada a baixa frequência de genótipos com altos níveis de tolerância ao Al em trigo, essa característica tem sido proposta como sendo um estado derivado, e não uma característica inerente à espécie (Garvin e Carver, 2002). Esse parece também ser o caso em sorgo, onde somente 5% dos acessos de sorgo avaliados até 1993 apresentaram tolerância satisfatória ao Al (Foy et al., 1993). Portanto, na ausência de seleção específica para tolerância ao Al, como foi provavelmente o caso dos genótipos originados do programa de melhoramento Norte Americano, não é surpreendente a predominância de genótipos sensíveis ao metal.

Tabela 3. Origem dos 44 genótipos de sorgo avaliados em solução nutritiva. Valores de crescimento líquido relativo (CLR) foram obtidos mediante exposição à {25}  $\mu$ M Al em solução nutritiva e representam médias de três repetições.

Genótipo	Origem	CLR
<sup>a</sup> BR007B	USA	22 a
Tx2785	USA	24 a
ARG1	USA/ Argentina	24 a
Tx2784	USA	24 a
IS10662	-	28 a
CMSXS912	USA	28 a
<sup>a</sup> BR007B	USA	29 a
SC748-5	Sudão	31 b
BTx644	USA	31 b
IS10317	-	31 b
IS10562	-	32 b
CMSXS156B	USA	33 b
QL-3	Austrália	34 b
BTx642	Etiópia	34 b
SC414-12-E	Sudão	36 b
BTx643	USA	36 b
TX430	USA	36 b
CMSXS180R	Brasil	39 b
BR001B	USA	41 b
CMSXS205B	USA	45 c
<i>S. verticilliflorum</i>	-	47 c
IS3620C	Nigéria	53 c
BTx623	Sudão	54 c
9929020	Brasil	54 c
9910032	Brasil	59 d
CMSXS235	Brasil	61 d
CMSXS182R	Brasil	64 d
BR012R	Brasil	65 d
CMSXS116R	Etiópia / Brasil	75 e
9DX9/11	Uganda	75 e
SC112-14	Etiópia	77 e
CMSXS226R	Brasil	83 e
<sup>a</sup> SC283	Tanzânia	84 e
SC175-14	Etiópia	92 f
BR501	USA	100 f
ATF14	Brasil	100 f
V20-1-1-1	Uganda	100 f
5DX-61-6-2	Uganda	104 f
SC549	Nigéria	107 f
IS8577	Kênia	107 f
CMSXS153	Uganda	107 f
<sup>a</sup> SC283	Tanzania	119 g
CMSXS225R	Brasil	120 g
SC566-14	Nigéria	124 g
3DX57/1/1/910	Uganda	126 g
CMSXS227R	Brasil	163 h
CV(%)		10,38

Médias dentro de colunas com a mesma letra constituem grupos homogêneos pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

<sup>a</sup> As linhagens BR007B (CLR =  $22 \pm 0,55$  e CLR =  $29 \pm 0,81$ ) e SC283 (CLR =  $119 \pm 4,93$  e CLR =  $84 \pm 2,59$ ) são apresentadas duas vezes por terem sido utilizadas como controle experimental em cada um dos dois experimentos de fenotipagem para tolerância ao Al.

Os genótipos classificados como tolerantes a {25}  $\mu\text{M}$  Al foram submetidos às doses de {37} e {58}  $\mu\text{M}$  Al, a fim de se discriminar graus de tolerância a altas atividades de Al nesses materiais. Os dois grupos homogêneos formados pelos genótipos SC175-14, SC549, BR501 ATF14, 5DX-61-6-2, 9DX9/11, CMSXS225R; SC283, CMSXS226R, SC566-14 e CMSXS227R mantiveram-se tolerantes a {37}  $\mu\text{M}$  Al (valores de CLR de ~60 a 148%), sendo que os quatro últimos não apresentaram inibição do crescimento radicular nessa atividade (Tabela 4). O parental imediato de ATF14, CMSXS226R e CMSXS227R é a linhagem SC283, indicando que a tolerância manifestada por essas linhagens deve ter sido herdada diretamente de SC283, a partir do loco *Alt<sub>SB</sub>*. A análise genética apresentada no Capítulo 1 indicou que o loco *Alt<sub>SB</sub>* é também responsável pelos altos níveis de tolerância em 9DX9/11, CMSXS225R e SC566-14, ainda que para essas linhagens não haja relações conhecidas de pedigree com SC283. A observação de que 5DX-61-6-2 mantém níveis de crescimento radicular ainda altos a {37}  $\mu\text{M}$  Al, e de que a tolerância ao Al não é devida à variação alélica no loco *Alt<sub>SB</sub>* nessa linhagem (Capítulo 1), indica que altos níveis de tolerância não estão de fato sob controle exclusivo de um único gene em sorgo.

Tabela 4. Porcentagem de crescimento líquido relativo (CLR) a {37} e {58}  $\mu\text{M}$ , dos genótipos de sorgo tolerantes a {25}  $\mu\text{M}$  Al em solução nutritiva. Valores representam médias de duas repetições.

Genótipos	% (CLR)	
	{37} $\mu\text{M}$ Al	{58} $\mu\text{M}$ Al
SC112-14	19,68 a	8,35 a
CMSXS116R	24,17 a	12,33 a
IS8577	33,99 b	12,38 a
3DX57/1/1/910	38,74 b	13,85 a
CMSXS153	43,06 b	12,85 a
SC175-14	60,37 c	29,32 a
SC549	63,50 c	28,71 a
BR501	67,48 c	22,17 a
ATF14	71,14 c	31,66 a
5DX-61-6-2	71,75 c	24,50 a
9DX9/11	71,88 c	22,35 a
CMSXS225R	87,98 c	31,97 a
SC283	104,11 d	46,18 b
CMSXS226R	134,14 d	45,57 b
SC566-14	134,23 d	64,99 c
CMSXS227R	148,22 d	61,74 c
CV(%)	11,26	29,10

Médias dentro de colunas com a mesma letra constituem grupos homogêneos pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Com o aumento da atividade para {58}  $\mu\text{M}$  Al houve redução nos níveis de tolerância de todos os genótipos, embora as linhagens CMSXS227R e SC566-14 tenham mantido níveis ainda razoáveis de crescimento radicular nessa atividade (CLR entre 60 e 65% Tabela 4). Os parentais imediatos de CMSXS227R são SC283 e CMSXS116R, sendo esse último derivado de BR012R. Assim sendo, a superioridade na tolerância de CMSXS227R pode dever-se à combinação do alelo do loco *Alt<sub>SB</sub>* originado de SC283 e provavelmente de outro(s) gene(s) de efeitos menores vindos de BR012R. A manutenção de níveis significativos de crescimento radicular em altas atividades de Al em CMSXS227R, que foram ainda comparativamente superiores àqueles de SC283, indica que a combinação de genes de tolerância de SC283 e BR012R pode de fato ser uma estratégia viável para o

desenvolvimento de genótipos de sorgo com patamares mais elevados de tolerância ao Al.

Considerando que SC566-14 não formou um grupo homogêneo com SC283 a {58}  $\mu\text{M}$  (Tabela 4), e que a tolerância de SC566-14 é devida à variação alélica no loco *Alt<sub>SB</sub>* (Magalhães et al., 2004), torna-se possível a existência de um alelo superior em SC566-14 em relação à SC283. Assim, SC566-14 parece ser uma fonte preferencial de tolerância em programas de seleção visando à obtenção de genótipos com níveis de tolerância superiores aos atuais.

### **3.2. Diversidade Genética em Sorgo**

Todos os 15 locos SSR foram polimórficos, sendo amplificado um total de 130 alelos entre os 47 genótipos de sorgo analisados. O número de alelos por loco variou de 2 (Sb5-256) a 12 (Sb5-206, Sb4-32 e Sb6-36), com média de 8,67 alelos por loco (Tabela 5), indicando ampla diversidade genética entre os genótipos de sorgo. Valores de PIC fornecem uma estimativa da força discriminatória do loco, pois não somente o número de alelos é levado em consideração, mas também a frequência relativa dos alelos. Os valores de PIC para os locos SSR variaram de 0,04 (Sb5-256) a 0,81 (Sb6-57) com valor médio de 0,62. As faixas de variações alélicas de cada loco foram similares às observadas em estudos anteriores (Brown et al., 1996; Dean et al., 1999; Smith et al., 2000). No entanto, o número médio de alelos por locos e os valores de PIC obtidos no presente estudo foram superiores aos resultados gerados com os mesmos marcadores SSR por Dean et al. (1999) e Smith et al. (2000), que obtiveram 6 alelos por loco e PIC médio de 0,5 e 0,58, respectivamente.

O alto grau de diversidade alélica observado neste estudo provavelmente reflete a extensa diversidade genética representada pelos genótipos de sorgo utilizados. Os genótipos incluem linhagens coletadas ou desenvolvidas em diferentes países como Brasil, Estados Unidos, Sudão, Austrália, Etiópia, Nigéria, Uganda e Tanzânia, e de diversas raças morfológicas como Caudatum-Kafir, Caudatum-guineense, Durra, Zera-zera,

Conspicuum e Caudatum. Estão ainda presentes no painel *landraces* como IS3620C, subespécies selvagens como *S. verticilliflorum* e outras espécies de sorgo como o tetraplóide *Sorghum halepense*, uma espécie rizomatosa que representa uma das ervas-daninhas de maior poder invasivo nos EUA (“*Johnson grass*”).

Tabela 5. Características dos 15 locos SSR analisados

Primers	Alelo (pb) <sup>a</sup>	A <sub>T</sub> <sup>b</sup>	A <sub>U</sub> <sup>c</sup>	PIC
Sb4-15	117-133	8	3	0,68
Sb4-121	214-226	5	-	0,70
Sb4-32	173-201	12	5	0,78
Sb5-236	169-193	9	3	0,76
Sb6-342	268-290	8	2	0,62
Sb6-36	158-196	12	5	0,79
Sb1-1	242-305	11	8	0,46
Sb1-10	251-297	8	4	0,54
Sb5-256	167-170	2	1	0,04
Sb6-84	183-211	11	5	0,67
Sb6-42	173-197	9	5	0,76
Sb6-57	285-311	8	1	0,81
Sb6-34	187-221	9	3	0,67
Sb5-206	100-151	12	6	0,67
Sb4-72	170-205	6	1	0,39

<sup>a</sup> tamanho dos alelos em pb; <sup>b</sup> A<sub>T</sub>, número total de alelos; <sup>c</sup> A<sub>U</sub>, número de alelos únicos.

### 3.3. Análises de Agrupamento

Pôde-se observar a separação dos 47 genótipos de sorgo em seis grupos (Grupos I, II, III, IV, V e VI, na Figura 1). O grupo I é um “*outgroup*” formado por *S. verticilliflorum*. O grupo II é formado por IS3620C e BTX642, ambos sem nenhum conhecido relacionamento de pedigree. O genótipo IS3620C pertence à subespécie *bicolor*, raça guinea, e possui fenótipo típico de subespécies selvagens (Cui et al., 1995). O cruzamento entre IS3620C (grupo II) e BTx623 (grupo V) tem sido rotineiramente utilizado na geração de populações de mapeamento em sorgo, devido à alta frequência de polimorfismos entre essas linhagens (Cui et al., 1995). O grupo III é muito diverso compreendendo as espécies *S. halepense* e *S. bicolor*. Nele ficaram

próximas linhagens de conhecido relacionamento de pedigree, como Tx2784 e Tx2785, ambas do Texas, que são derivados de TAM-Bk49. O grupo IV é formado por vários genótipos que apresentam relacionamento de parentesco e origem geográfica. Os genótipos 9929020 e CMSXS235 foram ambos selecionados a partir da população BRP5BR; e a proximidade com SC175-14 é justificada por ser essa uma das linhagens usadas para sintetizar essa população. A proximidade de 9DX9/11, CMSXS153, V20-1-1-1, 5DX-61-6-2 e 3DX57/1/1/910 parece refletir uma origem comum, de Uganda.

A maioria dos genótipos do grupo V (17 dos 25 representantes) foram desenvolvidos pelo programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo. As proximidades entre os genótipos presentes nesse grupo também refletem relações de pedigree. Como já descrito, ATF14, CMSXS226R e CMSXS227R foram agrupados juntamente com SC283, que é o parental direto destas linhagens. Da mesma forma, BR012R, CMSXS182 e CMSXS180 foram agrupados com CMSXS116R, que está presente no pedigree das mesmas. O grupo VI é formado por apenas três genótipos, sendo que para dois deles faltam informações detalhadas acerca do pedigree e origem.

### **3.4. Diversidade Genética e Tolerância ao AI**

As linhagens SC112-14 e 5DX-61-6-2, cuja tolerância ao AI foi atribuída a genes diferentes de *Alt<sub>SB</sub>* no Capítulo 1, ficaram próximas uma da outra no grupo IV (Figura 1), sugerindo que elas possam ter relacionamento ao nível do pedigree. Embora isso não possa ser afirmado devido à ausência de informações de pedigree para 5DX-61-6-2, torna-se possível o compartilhamento de genes de tolerância comuns por herança direta entre essas linhagens, como observado para as linhagens derivadas de SC283 no grupo V. Essa hipótese deve ser melhor investigada, dada a sua relevância para a definição de fontes de tolerância ao AI em um programa de melhoramento para a característica em sorgo.

As linhagens SC175 (grupo IV), SC283 e CMSXS225R (grupo V) e SC566-14 (grupo VI) mostraram tolerância a {37} µM de AI (Tabela 4) média à

alta, sendo grande parte dessa tolerância controlada pelo gene *Alt<sub>SB</sub>* em todas elas (Capítulo 1). No entanto, essas linhagens, que não têm pedigrees relacionados, apresentaram uma ampla diversidade genética, compreendendo diferentes raças morfológicas, locais de coleta e três diferentes grupos formados com base nos dados moleculares (Figura 1). Finalmente, foram observadas linhagens extremamente semelhantes entre si como 5DX-61-6-2 e 3DX57/1/1/910, que diferiram tanto no fenótipo (Tabela 4) quanto no controle genético para tolerância ao AI (Capítulo 1). Esses resultados demonstram a impossibilidade de se prever o fenótipo da tolerância com base em medidas globais de divergência genética.

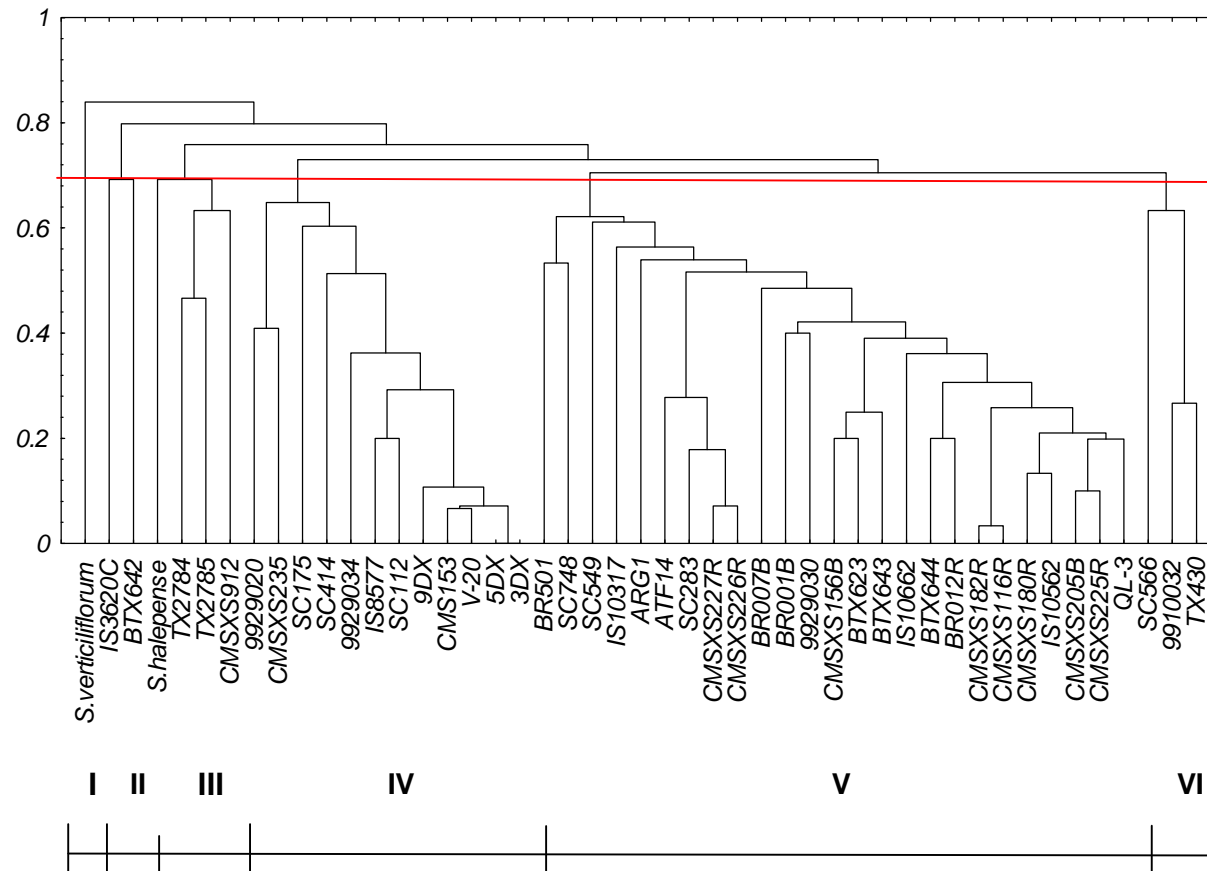


Figura 1. Dendrograma com 47 genótipos de sorgo revelado pela análise de agrupamento UPGMA

#### 4. Conclusões

Foi observada variabilidade fenotípica extensa para tolerância ao Al em um painel amplo de 44 linhagens de sorgo expostas a {25}  $\mu\text{M}$  Al em solução nutritiva. Quando avaliadas a {37}  $\mu\text{M}$  Al, foram observados níveis maiores de tolerância nas linhagens SC283, CMSXS226R, SC566-14 e CMSXS227R, sendo que os genes de tolerância em SC566-14 e CMSXS227R mostraram-se ativos mesmo a {58}  $\mu\text{M}$  Al. Os dados de CLR a {58}  $\mu\text{M}$  sugeriram a possível presença de um alelo no loco *Alt<sub>SB</sub>* que confere níveis de tolerância superiores à SC566-14 em relação ao alelo presente em SC283.

Os 15 locos SSR utilizados foram eficientes em detectar ampla diversidade genética entre os genótipos de sorgo, bem como relações conhecidas de pedigree entre as linhagens. A análise de agrupamento evidenciou seis grupos, muitos deles coerentes com as informações de pedigree e origem geográfica.

Linhagens cuja tolerância ao Al é ao menos em parte devida ao gene *Alt<sub>SB</sub>* mostraram-se bastante diversas, abrangendo os três grupos observados na análise filogenética. Esses resultados demonstram a impossibilidade de se prever a presença de alelos desse gene com base em medidas globais de diversidade genética.

## Referências Bibliográficas

AGRAMA, H. A.; TUINSTRA, M. R. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 10, p. 334-340, 2003.

AYANA, A.; BEKELE, E. Geographical patterns of morphological variation in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) germplasm from Ethiopia and Eritrea: qualitative characters. **Hereditas**, Lund, v. 129, p. 195-205, 1998.

AYANA, A.; BRYNGELSSON, T.; BEKELE, E. Genetic variation of Ethiopian and Eritrean sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) germplasm assessed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 47, p. 471-482, 2000.

AHNERT, D.; LEE, M.; AUSTIN, D. F.; LIVINI, C.; WOODMAN, W. L.; OPENSHAW, S. J.; SMITH, J. S. C.; PORTER, K.; DALTON, G. Genetic Diversity among elite sorghum inbred lines assessed with DNA markers and pedigree information. **Crop Science**, Madison, v. 36, p. 1385-1392, 1996.

BALIGAR, V. C.; ANGHINONI, I.; PITTA, G. V. E.; SANTOS, H. L. dos; CUNHA FILHO, E.; SCHAFFERT, R. E. Aluminum effects on plant and nutrient uptake parameters of soil and solution grown sorghum genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 18, n. 11, p. 2325-2338, 1995.

BHATTRAMAKKI, D.; DONG, J.; CHHABRA, A. K.; HART, G. E. An integrated SSR and RFLP linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Genome**, Ottawa, v. 43, p. 988-1002, 2000.

BOYE-GONI, S. R.; MARCARIAN, V. Diallel analysis of aluminum tolerance in selected lines of grain sorghum. **Crop Science**, Madison, v. 25, p. 749-752, 1985.

BORGONOVI, R. A.; SCHAFFERT, R. E.; PITTA, G. V. E. Breeding aluminum-tolerant sorghums. In: WORKSHOP ON EVALUATING SORGHUM FOR TOLERANCE TO AL-TOXIC TROPIC SOILS IN LATIN AMERICA, 1984, Cali. **Sorghum for acid soils**: proceedings. Cali: INTSORMIL; ICRISAT; CIAT, 1987a p. 271-292.

BORGONOVI, R. A.; SCHAFFERT, R. E.; PITTA, G. V. E.; MAGNAVACA, R.; ALVES, V. M. C. Aluminum tolerance in sorghum. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.) **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987b. p. 213-221.

BROWN, S. M.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; SENIOR, M. L.; WANG, T. Y.; DUNCAN, R. R. GONZALEZ-CANDELAS, F.; KRESOVICH, S. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, p. 190-198, 1996.

CRUZ, C. D.; SCHUSTER, I. **GQMOL**: Programa para análise de genética quantitativa molecular. Viçosa: UFV, 2001. Disponível em :.<  
<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>> Acesso em: 18 out 2004.

CUI, Y. X.; XU, G. W.; MAGILL, C. W.; SCHERTZ, K. F. RFLP-based assay of *Sorghum bicolor* (L.) Moench genetic diversity **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, p. 787-796, 1995.

DEAN, R. E.; DAHLBERG, M. S.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; KRESOVICH, S. Genetic redundancy and diversity among orange accessions in U.S. national sorghum collection as assessed with simple sequence repeat (SSRs) markers. **Crop Science**, Madison, v. 39, p. 1215-1221, 1999.

DJÈ, Y.; FORCIOLI, D.; ATER, M. LEFÈBVRE, C; VEKEMANS, X. Assessing population genetic structure of sorghum landraces from North-western Morocco using allozyme and microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 99, p. 157-163, 1999.

DJÈ, Y.; HEUERTZ, M.; LEFÈBVRE, C.; VEKEMANS, X. Assessment of genetic diversity within and among germplasm accessions in cultivated sorghum using microsatellite markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, p. 918-925, 2000.

FAO Statistical Database. Rome: FAO, 2002. Disponível em <<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>> Acesso em: 10 dez 2004.

FEHR, W. R. **Principles of cultivar development**: theory and technique. New York: Macmillan, 1987. 536 p.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e resumos...** [S. l.]: RBSIB: UFScar, 2000. p. 255-258.

FLORES, C. I.; GOURLEY, L. M.; PEDERSEN, J. F.; CLARK, R. B. Inheritance of acid soil tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor*) grow on an ultisol. In: WRIGHT R. J. et al. (Ed.) **Plant-Soil Interactions at Low pH**. Dordrecht: Kluwer, 1991. p. 1081-1093.

FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**. Bethesda, v. 29, p. 511-566, 1978.

FOY, C. D.; DUNCAN, R. R.; WASKON, R. M.; MILLER, D. R. Tolerance of sorghum genotypes to an acid, aluminum toxic tatum subsoil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 10, n. 1, p. 97-127, 1993.

FURLANI, P. R.; CLARK, R. B.; ROSS, W. M.; MARANVILLE, J. W. Variability and genetic control of aluminum tolerance in sorghum genotypes. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.) **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1983. p. 454-461.

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**, Brasília, v. 22, p. 323-330, 1987.

FURLANI, P. R.; BASTOS, C. R. Genetic control of aluminium tolerance in sorghum. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.) **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1990. p. 215-219.

GARVIN, D. F.; CARVER, B. F. The role of the genotype in tolerance to acidity and aluminum toxicity. In: RENGEL, Z. (Ed.) **Handbook of soil acidity**. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 387-406.

GAUT, B. S. Evolutionary dynamics of grass genomes. **New Phytologist**, Oxford, v. 154, p. 15-28, 2002.

GHEBRU, B.; SCHMIDT, R. J.; BENNETZEN, J. L. Genetic diversity of Eritrean sorghum landrace assessed with simple sequence repeat (SSR) markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 105, p. 229-236, 2002.

GOURLEY, L. M.; ROGERS, S. A.; RUIZ-GOMES, C.; CLARK, R. B. Genetic aspects of aluminum tolerance in sorghum. **Plant and Soil**, The Hague, v. 123, p. 211-216. 1990.

GRENIER, C.; BRAMEL-COX, P. J.; NOIROT, M.; PRASADA RAO, K. E.; HAMON, P. Assessment of genetic diversity in three subsets constituted from the ICRISAT sorghum collection using random vs non-random sampling procedures. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 101, p. 190-196, 2000.

HARLAN, J. R.; De WET, J. M. J. A simplified classification of cultivated sorghum. **Crop Science**, Madison, v. 12, p. 172-176, 1972.

JORDAN, D. R.; TAO, Y. Z.; GODWIN, I. D.; HENZELL, R. G.; COOPER, M.; MCINTYRE, C. L. Loss of genetic diversity associated with selection for resistance to sorghum midge in Australian sorghum. **Euphytica**, Wageningen, v. 102, p. 1-7, 1998.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? - Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

LOPES, A. S.; COX, F. R. A survey of fertility status of surface soils under "Cerrado" vegetation in Brazil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 41, p. 742-747, 1977.

MAGALHÃES, 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**, Maryland, v. 167, p. 1905-1914, 2004.

MAGNAVACA, R.; GARDNER, C. O. E.; CLARK, R. B. Inheritance of aluminum tolerance in maize. In: GABELMAN, H. W.; LOUGHMAN, B. C. (Ed.) **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p. 201-212.

MENZ, M. A.; KLEIN, R. R.; UNRUH, N. C.; ROONEY, W. L.; KLEIN, P. E.; MULLET, J. E. Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 1236-1244, 2004.

MUMM, R. H.; DUDLEY, J. W. A PC SAS computer program to generate a dissimilarity matrix for cluster analysis. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 3, p. 925-927, 1995.

MURTY, B. R.; ARUNACHALEN, V.; SAXENA, R. L. Classification and catalogue of a word collection of sorghum. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, New Delhi, v. 27, p. 1-74, 1967.

NATIONAL Germoplasm Resources Information Network. Washington: USDA, 2004. Disponível em: < [http://www.ars-grin.gov/npgs/acc/acc\\_queries.html](http://www.ars-grin.gov/npgs/acc/acc_queries.html).> Acesso em: 10 dez 2004.

NGUYEN, V. T.; BURROW, M. D; NGUYEN, H. T; LE, B. T.; LE, T. D.,  
PATERSON, A. H. Molecular mapping of genes conferring aluminum tolerance  
in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.102, p.  
1002-1010, 2001.

PARKER, D. R.; NORVELL, W. A.; CHANEY, R. L. GEOCHEM-PC: a chemical  
speciation program for IBM and compatible computers. In: LOEPPERT, R. H., et  
al. (Ed.) **Chemical equilibrium and reaction models**. Madison: Soil Science  
Society of America, 1995. p. 253-269.

PEJIC, I.; AJMONE-MARSAN, P.; MORGANTE, M.; KOZUMPLICK,  
V.;CASTIGLIONI, P.; TARAMINO, G.; MOTTO, M. Comparative analysis of  
genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs. SSRs  
and AFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 97, p. 1248-1255,  
1998.

PLIESKE, J.; STRUSS, D. STS markers linked to *Phoma* resistance genes of  
the *Brassica* B-genome revealed sequence homology between *Brassica nigra*  
and *Brassica napus*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 102, p. 483-  
488, 2001.

RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWEL, W.; ANDRE, C.;  
TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.;  
LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York, 1996.  
p. 75-134.

SCHERTZ, K. F.; DALTON, L. G. Sorghum. In: FEHR, W. R.; HADLEY, H. H.  
**Hybridization of crop plants**. Madison: American Society of Agronomy; Crop  
Science Society of America, 1988. p. 577-588.

SMITH, J. S. C.; KRESOVICH, S.; HOPKINS, M. S.; MITCHELL, S. E.; DEAN, R. E.; WOODMAN, W. L.; LEE, M.; PORTER, K. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with simple sequence repeats. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 226-232, 2000.

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. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Washington, v. 81, p. 8014-8018, 1984.

SAWAZAKI, E. Sorgo forrageiro ou misto, sorgo granífero, sorgo vassoura – *Sorghum bicolor* L. Moench. In: FALH, J. L., et al. (Ed.) **Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas**. Campinas: IAC, 1998. p. 44-49. (IAC. Boletim, 200).

TARAMINO, G.; TARCHINI, S.; FERRARIO, S.; LEE, M.; PE, M. E. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in *Sorghum bicolor*. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 66-72, 1997.

TESHOME, A.; BAUM, B. R.; FAHRING, L.; TORRANCE, J. K.; ARNASON, T. J.; LAMBERT, J. D. Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] Landrace variation and classification in North Shewa and South Welo, Ethiopia. **Euphytica**, Wageningen, v. 97, p. 255-263, 1997.

UPTMOOR, R.; WENZEL, W.; FRIEDT, W.; DONALDSON, G.; AYISI, K.; ORDON, F. Comparative analysis on the genetic relatedness of *Sorghum bicolor* accessions from Southern Africa by RAPDs, AFLPs and SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 106, p. 1316-1325, 2003.

VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Allelic frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. **Genetics**, Maryland, v. 133, p. 737-749, 1993.

YANG, W.; OLIVEIRA, A. C.; GODWIN, I.; SCHERTZ, K.; BENNETZEN, J. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in chinese sorghums. **Crop Science**, Madison, v.36, p.1669-1676, 1996.