



Sete Lagoas, MG
Dezembro, 2004

Frederico Ozanan M. Durães
Pesquisador da Embrapa Milho e
Sorgo, 35701-970 Sete Lagoas,
MG
fduraes@cnpmis.embrapa.br

Elto Eugenio Gomes e Gama
Pesquisador da Embrapa Milho e
Sorgo, 35701-970 Sete Lagoas,
MG gamaelto@cnpmis.embrapa.br

Fredolino Giacomini dos Santos
Pesquisador da Embrapa Milho e
Sorgo, 35701-970 Sete Lagoas,
MG, Fred@cnpmis.embrapa.br

Cleber Moraes Guimaraes
Pesquisador da Embrapa Arroz e
Feijão, 75375-000 Santo Antônio
de Goiás, GO

Walter Quadros Ribeiro Jr.
Pesquisador da Embrapa Trigo,
99001-970 Passo Fundo, RS

Maria da Glória Trindade
Pesquisador da Embrapa Trigo,
99001-970 Passo Fundo, RS

Reinaldo Lúcio Gomide
Pesquisador da Embrapa Milho e
Sorgo, 35701-970 Sete Lagoas,
MG gomide@cnpmis.embrapa.br

Paulo Emílio P. de Albuquerque
Pesquisador da Embrapa Milho e
Sorgo, 35701-970 Sete Lagoas,
MG emilio@cnpmis.embrapa.br

Fenotipagem para tolerância a seca: protocolos e características específicas visando o melhoramento genético de cereais.

Introdução

A variação biológica pode ser expressa pela variação fenotípica, que é o resultado da variação genotípica influenciada pela variação do meio ambiente. Assim, o fenótipo é a expressão genética de um ser vivo, modulado por fatores ambientais (bióticos e abióticos).

Para os estresses abióticos (água, radiação, temperatura, luz, CO₂, nutrientes, etc.), a fenotipagem adequada de germoplasma de espécies de cereais (e de legumes), constitui-se em fator de maior entendimento de processos ou mecanismos de tolerância e/ou eficiência a fatores abióticos “per se” e múltiplos estresses. Também, faz parte desta estratégia de pesquisa e desenvolvimento (P&D) e de utilização comercial, nos vários segmentos agrícolas, a melhoria de genótipos através da genética quantitativa (melhoramento convencional), os estudos de genômica funcional e de modelagem, que deverão sustentar os programas de genotipagem avançada e o desenvolvimento de novos cultivares comerciais, eficientes e competitivos.

Fenotipagem e genômica visando melhoramento de cereais de cultivos

Análise fenotípica é, atualmente, um fator limitante em genômica. Entretanto, o paralelo entre “fenotipagem” e “genotipagem” é apenas aparente, porque um fenótipo é uma representação simplificada de uma realidade complexa sob uma série de cenários pedoclimáticos. É assim um processo científico “per se”. Definir, ou redefinir conceitos, protocolos, estruturar adequadas instalações físicas, organizar e caracterizar genótipos com fins objetivos para o melhoramento e para usos comerciais, apropriar corretamente informações e gerenciar um banco de dados adequado, e estabelecer uma competente rede de fenotipagem para tolerância a seca em cereais em áreas tropicais, são objetivos estratégicos relevantes e de ações bem competitivas.

Seleção de plantas em cereais cultivados

Em melhoramento de plantas, o progresso através de seleção é proporcional à intensidade de seleção, correlação genética entre a seleção e o ambiente alvo, e herdabilidade no ambiente de seleção. Para se obter ganhos em ambientes difíceis, tipificados como de condições subótimas ou adversas à performance de plantas, os programas de melhoramento devem maximizar a intensidade de seleção para rendimento pela exposição de amplas populações em replicados testes, maximizar a herdabilidade no ambiente de seleção por extensiva replicação através de uma amostra representativa da população alvo; e, assegurar uma alta correlação genética entre a performance no ambiente

de seleção e em campos de produção, pelo manejo adequado de experimentos de melhoramento e condução extensiva de ensaios em áreas de produção. Geralmente, associações positivas entre performance em ambientes com e sem estresse, indicam que a combinação de tolerância a estresses com responsividade para condições favoráveis deve ser possível para alguns sistemas de cultivo. Seleção direta para rendimento de grão em altos níveis de precisão e intensidade de seleção, ao contrário da seleção indireta para características fisiológicas correlacionadas, tem demonstrado ser o mais efetivo arranjo para melhoramento sob ambientes estressantes (Atlin, 2001).

Seleção de cultivares sob condições ambientais subótimas ou adversas: estresse hídrico.

Seleção de cultivares de espécies de plantas com considerável tolerância ou resistência para estresse hídrico tem sido considerada um econômico e eficiente meio em áreas sujeitas a seca quando são utilizadas práticas de manejo apropriadas para reduzir as perdas de água (Turner 1991). Por esta razão, melhoria na tolerância é um dos maiores objetivos em programas de melhoramento de plantas para culturas vegetais em áreas secas (Matin et al., 1989), ou mesmo em regiões que apresentam déficits hídricos em fases críticas do ciclo da cultura (Durães et al, 1999).

É evidente que seca ocorre amplamente em regiões áridas e semi-áridas do mundo onde salinidade é também prevaiente por causa da rápida evapotranspiração da água do subsolo. A melhor opção para produção da cultura, melhoramento do rendimento e estabilidade do rendimento sob condições de déficit de umidade do solo é desenvolver cultivares tolerantes a seca. Um arranjo fisiológico poderia ser o mais atrativo modo de desenvolver novas cultivares rapidamente, mas melhoramento para

ambientes subótimos específicos envolve um profundo entendimento dos processos determinantes do rendimento (Blum, 1989).

Parâmetros fenotípicos de referência para seleção sob estresse ambiental, com ênfase em fator abiótico de seca.

Altos valores de tensão de água no solo ou estresse (baixo potencial de água no solo), causados por teores baixos de água no solo se opõem à passagem da água para a planta e através de suas superfícies transpirantes para a atmosfera; o resultado dessa oposição é o aumento do déficit de pressão de sucções dentro dos tecidos da planta e isto é ainda intensificado por condições de alta demanda evaporativa forte radiação solar, alta temperatura, baixa umidade e movimento rápido de ar. Essas condições são típicas em ambientes tropicais e subtropicais (e assim em casa de vegetação e em região temperada) e necessitam apenas que a demanda evaporativa seja satisfeita para transformá-las de condições quase que letais em plantas para condições de máximo crescimento. A restrição no suprimento de água diminui a entrada de dióxido de carbono e, assim, uma planta com suprimento limitado de água é menor do que uma com suprimento não limitado de água.

O potencial hídrico (w) é considerado um parâmetro confiável para medir a resposta da planta ao estresse hídrico. Isto varia grandemente, dependendo do tipo de planta e das condições ambientais. Hsiao et al. (1976) listaram um número de respostas de planta para estresse hídrico, que ocorre antes da dessecação se tornar letal. A maioria das respostas (p.ex., crescimento da célula, síntese de parede e proteína, atividade enzimática, etc.) é afetada por reduções de w de menos que -1,5 MPa. O controle passivo de dessecação de plantas ocorre quando o fechamento estomático resulta de reduzido w .

Respostas de plantas a condições de seca

O estresse hídrico em plantas ocorre quando baixos potenciais hídricos desenvolvem-se e a turgescência da célula começa a declinar (Kozlowski and Pallardy, 1997). As plantas devem ser capazes de enfrentar e sobreviver às condições de seca, sob duas grandes estratégias, a saber:

Escape a seca refere-se às ações ou adaptações que servem para ajudar a planta a escapar (evitar) a situação de estresse. Isto é primariamente limitado para curto ciclos de vida que terminam antes que a seca ocorra, e é importante apenas para secas efêmeras.

Tolerância a seca refere-se às ações ou adaptações que permitem a planta resistir opondo-se ao estresse, com ou sem a redução da performance. Isto inclui:

Escape a dessecação refere-se aos mecanismos através dos quais as plantas podem prevenir a iniciação de muito baixo conteúdo de água no tecido, apesar da presença de condições de seca. Tais adaptações podem incluir: profundidade de distribuição do sistema radicular, alta resistência interna do transporte de água, redução da transpiração através do reduzido tamanho de folha, abscisão foliar, espessura de cutícula e adequado controle estomático.

Tolerância a dessecação refere-se aos meios pelos quais as plantas podem sobreviver a muito baixo conteúdo de água no tecido. Os meios primários para isto são: ajustamento osmótico, possessão de firme parede celular (esses atributos são possuídos quase que exclusivamente por plantas de regiões áridas; poucas plantas lenhosas podem sobreviver a dessecação).

Algumas plantas usam uma combinação de ambos os mecanismos (Gaspar et al., 2002). O termo, tolerância a seca como é comumente usado, descreve os mecanismos que tendem a manter a sobrevivência ou produtividade durante a seca (Jones, 1992). Assim, uma espécie (ou genótipo) mais

tolerante a seca poderia sobreviver e produzir melhor do que outras sob condições de seca.

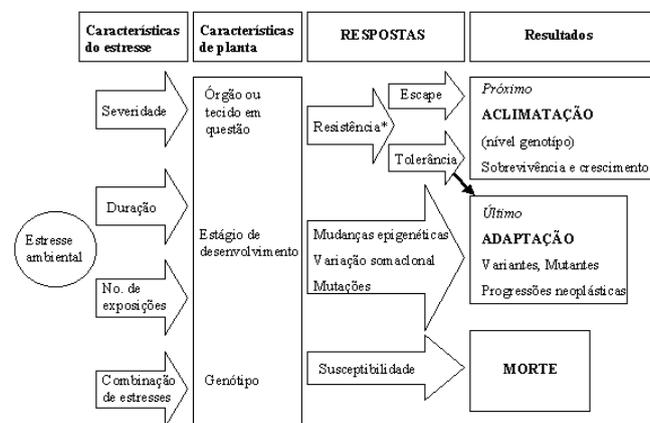
Respostas de plantas para estresses, tais como seca, envolvem uma variedade de escalas temporal, de processos em segundos para escalas de tempo evolucionárias. Lambers et al. (1998) oferece a seguinte definição:

Resposta ao estresse o efeito imediato detrimental de um estresse em um processo na planta. Isto normalmente ocorre acima de uma escala temporal de segundos ou dias em que o efeito líquido é um declínio na performance da planta.

Aclimação o ajustamento morfológico e fisiológico pelas plantas para compensar o declínio em performance seguindo da exposição ao estresse. Aclimação ocorre dentro do ciclo de vida da planta, normalmente dentro de dias ou semanas da exposição ao estresse.

Adaptação a resposta evolucionária, que resulta de mudanças genéticas em populações, conduz para compensações morfológicas e fisiológicas. Isto pode ser similar para aclimação, mas porque requer mudanças genéticas ela deve ocorrer após algumas gerações.

Atente-se para as respostas que são



* Resistência - mecanismos que permitem sobrevivência ao estresse

Figura 1. Respostas de plantas para estresse ambiental em correspondência com características de estresse e de plantas (Gaspar et al. 2002)

Tabela 1 Evidência do envolvimento do ácido abscísico (ABA) em resposta de plantas a estresse hídrico baseada na similaridade de respostas a estresse hídrico e a aplicação de ABA exógeno (de Jones 1992). Forte correlação é indicada por + .

| Resposta | Estresse Hídrico | ABA | Correlação |
|----------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------|
| Curto termo: | | | |
| Condutância estomática | Decresce | Decresce | +++ |
| Fotossíntese | Decresce | Decresce | +++ |
| Permeabilidade de membrana | Aumenta/Decresce | Aumenta/Decresce | + |
| Transporte de íon | Aumenta/Decresce | Aumenta/Decresce | + |
| | | | |
| Longo termo: bioquímico e fisiológico | | | |
| Específico mRNA e síntese protéica | Aumenta | Aumenta | ++ |
| Acumulação de prolina e betaina | Aumenta | Aumenta | ++ |
| Adaptação osmótica | Sim | Sim | + |
| Atividade de enzimas fotossintéticas | Decresce | Decresce | + |
| Tolerância a dessecação | Aumenta | Aumenta | + |
| Tolerância a salinidade e frio | Induz | Induz | ++ |
| Produção de cera | Aumenta | Aumenta | + |
| | | | |
| Longo termo: crescimento | | | |
| Inibição geral do crescimento | Sim | Sim | +++ |
| Divisão celular | Decresce | Decresce | +++ |
| Expansão celular | Decresce | Decresce | +++ |
| Germinação | Inibe | Inibe | ++ |
| Crescimento de raiz | Aumenta/Decresce | Aumenta/Decresce | ++ |
| Razão raiz/colmo | Aumenta | Aumenta | ++ |
| | | | |
| Longo termo: morfologia | | | |
| Produção de tricomas | Aumenta | Aumenta | ++ |
| Índice estomatal | Decresce | Decresce | ++ |
| Perfilhamento em gramíneas | Decresce | Decresce | ++ |
| Conversão de aquático para aéreo (tipo foliar) | Sim | Sim | ++ |
| Indução de dormência, gemas terminais ou perenização de órgãos | Sim | Sim | ++ |
| | | | |
| Longo termo: reprodutivo | | | |
| Florescimento em anuais | Frequente avanço | Frequente avanço | + |
| Indução floral em perenes | Inibe | Inibe | + |
| Abscisão de folhas | Aumenta | Aumenta | + |
| Viabilidade de pólen | Decresce | Decresce | + |
| Formação de semente | Decresce | Decresce | + |

primariamente consideradas respostas ao estresse, entretanto, aquelas podem ser difícil de separar de aclimatação e respostas a adaptação. Por exemplo, a resposta pode ser detrimental no curto prazo (tais como colapso de folha), mas pode ser crítico para a sobrevivência da planta no longo prazo (Gaspar et al. 2002). A **Figura 1** mostra um esquema das interações entre estresses, características de plantas e tempo.

Efeitos do déficit hídrico no crescimento e alocação em plantas

O crescimento resulta da interação de todos os processos dentro da planta: fotossíntese, respiração, transporte, relações hídricas e balanço de nutrientes. O crescimento pode incluir algum incremento em massa seca, volume, comprimento ou áreas de células (Lambers et al. 1998). O crescimento celular que tem dois componentes: divisão e expansão celular - aparenta ser um dos

processos de planta mais sensível ao déficit hídrico, e é normalmente reduzido mesmo antes da fotossíntese ou condutância estomática (Hsiao 1973).

Alocação de carbono nas plantas

Alocação de produtos fotossintatos é a distribuição do crescimento dentro da planta, em órgãos aéreos e subterrâneos (Lambers et al. 1998). Alocação pode ter efeitos significativos no crescimento da planta inteira, algumas vezes mais do que na taxa de fotossíntese (Nilsen and Orcutt 1996). O crescimento foliar permite à planta incrementar sua capacidade fotossintética, enquanto o crescimento da raiz permite às plantas adicionais explorações do solo por água e nutrientes. Assim, esses órgãos estão em competição entre si pela demanda de assimilados fotossintéticos. É desconhecido exatamente como um balanço é obtido entre os diferentes órgãos, particularmente em situações de estresses. Contudo, isto deve ser capaz de ser explicado pelas sensibilidades diferenciais de crescimento das raízes e colmos para estresse hídrico (Hsiao and Xu 2000).

Sensibilidade diferencial do crescimento de folha e raiz para déficit hídrico no solo.

É freqüentemente observado que seca aumenta a alocação de fotossintatos para raízes. É também conhecido que o crescimento de folhas é normalmente mais sensível ao estresse hídrico do que o crescimento de raiz. Aparentemente, isto não tem relação com o fato de terem as raízes uma maior proximidade com a fonte de água, mas mais propriamente que, ao mesmo potencial de água na célula, o crescimento foliar será reduzido mais do que o crescimento de raiz. Em parte, isto parece refletir uma maior habilidade das raízes em manter o turgor através do ajustamento osmótico. Pode ser também que o hormônio ácido abscísico (ABA) desempenhe um papel na inibição do crescimento do colmo, enquanto mantém o crescimento radicular (Hsiao and Xu 2000). Finalmente, a redução no crescimento foliar deixa mais assimilados livres para ir para as raízes (Lambers et al. 1998). Claramente há alguns outros processos de planta que são afetados pelo estresse de seca. Este trabalho não se

Tabela 2. Generalizada sensibilidade para estresse hídrico de processos ou parâmetros de plantas. O comprimento das marcas (linhas horizontais) representa o limite de níveis de estresse em que um processo primeiramente torna-se afetado. As marcas (linhas pontilhadas) significam deduções baseadas em dados menos conclusivos (de Hsiao 1973).

| Processo ou parâmetro afetado | Sensibilidade para estresse | | |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------|----------|
| | Muito sensível | Relativamente insensível | |
| | Potencial de água no tecido requerido para afetar o processo | | |
| | 0 MPa | -1,0 MPa | -2,0 MPa |
| Crescimento celular | XXXXXXXXXX--- | | |
| Síntese de parede | XXXXXXXXXXXX | | |
| Síntese de proteína | XXXXXXXXXXXX | | |
| Formação de protoclorofila | XXXXXXXXXXXX | | |
| Nível de reductase do nitrato | XXXXXXXXXXXX | | |
| Acumulação de ABA | ---XXXXXXXXXXXX | | |
| Nível de citocinina | XXXXXXXXXXXX | | |
| Abertura estomática | -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX----- | | |
| Assimilação de CO ₂ | -----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX----- | | |
| Respiração | ---XXXXXXXXXXXX | | |
| Acumulação de prolina | ---XXXXXXXXXXXX | | |
| Acumulação de açúcar | | XXXXXXXXXXXX | |

propõe a cobrir todos eles, mas apresenta uma discussão de alguns dos mais proeminentes efeitos. Para uma idéia de outros efeitos vide a Tabela 2, que mostra como ABA afeta vários processos de plantas, ou Tabela 3 que mostra a sensibilidade de processos de planta para déficit hídrico.

Marcadores moleculares para características fisiológicas

O desenvolvimento de marcadores moleculares para características fisiológicas tem feito significativos progressos em recentes anos com o avanço de novas tecnologias.

Consequentemente, o uso de marcadores moleculares em programas de melhoramento está aumentando rapidamente, assim como também eles tem mostrado estar melhorando a eficiência desses programas, no mínimo, pela melhor compreensão de processos e expressão de características úteis, incluindo o rendimento quali-quantitativo e melhoria das culturas.

Embora a aplicação de marcadores moleculares esteja relativamente em franca atividade, o desenvolvimento de marcadores robustos que sejam confiáveis para um amplo intervalo de background pode ser extremamente difícil, e é inteiramente dependente de uma adequada seleção de fenótipos. Entender a fisiologia do processo envolvido no estresse abiótico "per se", por exemplo, deficiência hídrica (Bolaños e Edmeades, 1993 a, b; Bolaños et al., 1993 c, d), absorção, uso e eficiência de nitrogênio (Durães et al. 2004a; Bänziger et al. 1997, Moll et al. 1982), absorção de fósforo (Hash et al., 2002), salinidade (Munns et al., 2002), tolerância a alumínio tóxico (Hash et al., 2002), etc., constitui-se em um fator crítico para o desenvolvimento de um confiável e adequado teste de fenotipagem e, assim, para a identificação de QTLs (Quantitative Trait Loci) e marcadores moleculares.

QTLs para tolerância a seca têm sido descritos em várias espécies de cereais, incluindo milho (Ribaut et al., 1996, 1997), sorgo (Magalhães et al., 2004; Menz et al., 2004), milheto (Yadav et al., 2004), arroz (Kamoshita et al., 2002; Tripathy et al., 2000, Lanceras et al.,

2004) e trigo (Tuberosa et al., 2002). QTLs para tolerância a sais têm sido descritos em várias espécies de cereais, incluindo arroz (Flowers et al., 2000; Koyama et al., 2001), aveia (Ellis et al., 1997; Mano and Takeda, 1997) e trigo (Semikhodskii et al., 1997). Para o caso de tolerância a seca em milho tropical, tem-se buscado definir estratégias para entender a resposta do milho para estresse hídrico durante o florescimento (Sawkins et al. 2003). Estes estudos têm buscado prover uma adequada estrutura biológica para a interpretação de mudanças na expressão gênica, realizando-se um conjunto de medidas fisiológicas, especialmente nos últimos três anos. A quantificação do ácido abscísico, sacarose, glicose, prolina, conteúdo relativo de água e ajustamento osmótico tem sido feita na espiga, estilo-estigma e tecidos da folha da espiga em diferentes períodos em uma população de linhagens recombinantes. Este trabalho está sendo complementado com tecnologias de genômica funcional para identificar diferenças significativas em expressão gênica de rotas alvo. Tecidos similares colhidos concomitantemente aos das medidas fisiológicas estão sendo usados em experimentos ordenados conduzidos em colaboração com o setor privado para estudos da expressão gênica usando semi-quantitativo RT-PCR. Um número de genes, que tem significância biológica, tem sido selecionado de rotas metabólicas alvo (ácido abscísico, amido e sacarose, e poliaminas). Estes genes estão agora sendo estudados em maior detalhamento através de RT-PCR em diferentes tecidos e em diferentes níveis de estresse e diferentes tempos. Alguns genes candidatos estão sendo também mapeados em cruzamentos para seca e alelos desses genes em diferentes linhagens de milho estão sendo caracterizados.

Embora, os estudos não tenham ainda rendido marcadores robustos que possam ser usados para uma série de germoplasma de diferentes espécies "per se", associações significativas entre a característica e o marcador têm sido limitadas para as populações das quais eles foram derivados.

foram derivados.

O sucesso desses estudos, por espécie, poderia ser limitado por uma pequena quantidade de diversidade genética presente dentro de cultivares modernos, e o uso de linhas parentais com pequenas diferenças nessas características. Uma estratégia razoável tem sido verificar uma diversidade genética mais ampla que existe em populações modernas. Em trigo, por exemplo, isto é possível com tetraplóide e hexaplóide, porquanto os progenitores de trigos modern durum e bread podem ter sido derivados de um germoplasma de base limitada, e a diversidade genética pode estar presente em populações originais de ancestrais diplóides que não foi ainda explorada (Semikhodskii et al., 1997).

Protocolos e características específicas visando o melhoramento genético de cereais, com ênfase em milho, sorgo, milheto, arroz e trigo:

Características de planta por espécie (cereais: milho, sorgo, milheto, arroz e trigo). Ampliado de contribuições anotadas do Workshop CPG "Phenotyping and Water Deficit", 5-9 July 2004 at Montpellier, France.

a) Questões básicas para a definição de características de interesse para fenotipagem de plantas por espécie de cereais:

- (i) utilidade de indicadores indiretos da habilidade de extração de água (T, transpiração, G, condutância estomática, ?, discriminação do carbono isotópico),
- (ii) caracteres diretamente envolvidos no rendimento ou manutenção da qualidade em ambientes limitados por seca,
- (iii) conexão para análises transcripto/proteínas (onde e quando coletar amostras?),
- (iv) qual o momento e controle do déficit hídrico para que/quais característica(s), e,
- (v) que material genético e para quais características?

b) Espécies:

b.1. milho, sorgo e milheto focar em adaptação de estratégias que a genética

quantitativa ou genômica funcional poderiam analisar. Prover critérios para qualificar material genético, características e arranjos para permitir comparações futuras.

b.2. arroz características encapsuladas em uma estrutura funcional provida pela Eq 1, que segundo Passioura (1977) a água usada pela cultura constitui-se um processo chave da formação do rendimento:

$$\text{Yield} = ET \times T / ET \times TE \times HI \text{ (Eq. 1)}$$

onde Y (kg m⁻²) é o rendimento (panícula, grão), ET (Kg m⁻²) é a evapotranspiração (normalmente uma fração de ETO, definida a seguir), T/ET (Kg Kg⁻¹) é a fração da evapotranspiração efetivamente transpirada pelas plantas e não evaporada do solo, TE (eficiência de transpiração, Kg Kg⁻¹) é a taxa de biomassa acumulada por água transpirada e HI (índice de colheita, Kg Kg⁻¹) é a taxa da biomassa colhida por biomassa total.

Para arroz, deve-se medir as características a um nível de resolução onde a interação GxE é eliminada e inserir as características dentro de uma estrutura funcional tipo:

$$GY = T \times TE \times HI, \text{ onde:}$$

Transpiração (T) - Características poderiam estar relacionadas para processos tais como acesso para água (reservatório da água total e disponibilidade ao tempo certo para manter a oferta de C/N) e controle das perdas de água. Elas poderiam incluir: i) vigor precoce estimado com o tamanho do embrião, largura da 1^a folha ou/e área específica foliar (SLA), ii) KdF (coeficiente de extinção), iii) exploração do volume de solo caracterizado pela profundidade e ramificação do sistema radicular; taxa de crescimento de raiz, e, iv) área de transpiração: área foliar, taxa de crescimento de folha.

Eficiência de Transpiração (TE) - TE tem sido definida como uma característica intrínseca e poderia ser estimada via SLA, SLN e controle estomatal.

Índice de colheita (HI) - A oferta de C/N para

estabelecer estruturas reprodutivas e enchê-las tem sido considerada de grande importância; tamanho do dreno poderia ser dimensionado via número de espiguetas ou biomassa e número de grãos.

Estas características alvo são relevantes para uso de água e componentes do rendimento, mas interdependentes e algumas vezes contraditórias. O uso de modelagem poderia auxiliar na combinação de níveis desejáveis de características de acordo com o tipo de seca.

b.3. trigo separadas as características constitutivas de características adaptativas, adaptar então as condições de seleção e considerar separadamente a caracterização de acessos da análise do material elite.

Características prioritárias, incluem o sistema radicular, ajustamento osmótico e características relacionadas com água, estabelecimento e vigor precoce, eficiência da transpiração, armazenamento e remobilização de carboidratos e fotossíntese de espiga.

c) Caracteres diretamente envolvidos no rendimento ou manutenção da qualidade em ambientes diversos:

c.1. Milho, Sorgo e Milheto:

Registro do tempo de florescimentos (masculino e feminino) de acordo com a fenologia, da emergência ou da 3-folha até a 10-folha, e florescimento (também, número de folhas ao florescimento) incluindo emergência da panícula e antese de cada entrada.

Hábito de perfilhamento (número de espiga?) de cada entrada.

Temperatura do meristema de no mínimo um acesso em cada ambiente (local x data de plantio x regime de estresse) em experimentos de campo em multi-locais.

· Outros dados dependendo da característica-alvo a dissecar, o tipo de experimento (experimento de campo em estação completa de crescimento em multi-locais vs mais controlado e limitado ambiente)

Rendimento de grão e de biomassa (em no mínimo alguns estudos) para cada entrada, providenciado de que medidas precoces são

não-destrutivas; é desejável fechar um experimento com a coleção de grãos e rendimento da biomassa (e seus componentes) para cada genótipo prover um ponto de referência para a característica. Altura de planta e altura de espiga e diâmetro do colmo em um ponto fixado do rendimento poderia ser usado como medida auxiliar para biomassa; número de espigas por planta e comprimento de espiga como para rendimento de grãos.

c.2. Recomendações complementares visando estratégias de fenotipagem para seca, por espécie vegetal.

c.2.1. Agrupamentos de genótipos por espécie e subgrupos por características:

Agrupar genótipos por grupos de maturidade, fenologia e arquitetura do rendimento baseado na avaliação inicial de um amplo conjunto de tempo de florescimento, altura de planta no florescimento, e então o hábito de perfilhamento (exceto milho) dentro de subgrupos por características secundárias e de rendimento de grãos.

c.2.2. Sítios-específicos para fenotipagem para estresse abiótico de seca:

A multiplicidade de causas e efeitos operando para criar variação espacial e temporal em campos de cultivo e experimentais coloca um grande desafio para especialistas de culturas ou mesmo para modelos de simulação. Novas e adicionais pesquisas e práticas de manejo devem incluir atenção quanto a variabilidade do solo, manejo e variabilidade temporal, e também construir novas ferramentas, incluindo medidas de propriedades físicas, determinando a influência do manejo, e modelos integrados de crescimento de cultivos e dinâmica de água e fluxos de nutrientes.

Para a caracterização fenotípica e genotípica de materiais vegetais, por espécie de cereais, especialmente para os parâmetros de tolerância e/ou susceptibilidade a estresse hídrico, a definição, implantação, manutenção e uso de sítios-específicos experimentais e de produção são de fundamental importância e integram objetivamente a "plataforma de fenotipagem para seca" de uma instituição

como a Embrapa, e aderem fortemente ao escopo de competitivos projetos em rede de P&DI.

c.2.2.1. Delineamento macro-agroecológico na definição e implantação de sítios ambientais visando a fenotipagem para tolerância a seca:

O delineamento macro-agroecológico do Brasil encerra uma visão global da distribuição geográfica das zonas macro-agroecológicas do país e de seu uso potencial. Começando com dados de vegetação, relevo, textura, drenagem, fertilidade e aptidão das terras, zonas macro-agroecológicas já foram definidas para preservação, extrativismo, pecuária e agricultura no país. Esse delineamento tem o mérito de servir como base para o planejamento agrícola e ambiental e para desenvolvimento de pesquisas, seguindo e ordenando por ecorregiões e ecossistemas. O avanço e detalhamento destes estudos e mapeamentos tem ampliado a caracterização regional e local quanto aos fatores ambientais, especialmente características morfogênicas e de capacidade e uso do solo; intensidade, capacidade e distribuição da precipitação pluviométrica; bem como das variações da radiação solar, ventos, sazonalidade de regimes térmicos durante cada período do ano, por região ou local.

Várias ações têm sido conduzidas com o objetivo de aumentar o entendimento dos ambientes naturais (bióticos e abióticos) em importantes ecossistemas, como os cerrados, os trópicos semi-áridos, etc. Também, esforços estão sendo carreados para a definição e caracterização de ambientes contrastantes nos Centros de Pesquisa da Embrapa, visando fortalecer em bases modernas, a plataforma Embrapa para fenotipagem para seca. Dados estão sendo levantados e tratados visando especificar as melhores áreas potenciais para estudos dessa natureza.

c.2.2.2. Delineamento micro-agroecológico e localizado na definição e implantação de sítios-específicos experimentais e de produção para fenotipagem para seca:

Em áreas agroecológicas distintas do Brasil, variando de clima tropical, sub-tropical e temperado, o cômputo de infra-estrutura mínima instalada para P&DI, aliada a protocolos, métodos e técnicas para imposição, controle, monitoramento de uso pleno e sob estresse hídrico em genótipos de cereais compõem elementos da estratégia de fenotipagem para seca, coordenada pela Embrapa. Assim, alguns sítios-específicos experimentais e de produção para tolerância a seca estão sendo delineados e preparados para abrigar experimentos visando a fenotipagem para seca. Esses tipos de ambientes e de solo estão sendo caracterizados, por amostragens, análises e mapeamentos tridimensionais, quanto a textura (tamanho e relação de partículas areia, silte, argila), estrutura (tipo de agregado), teor (potencial e atual) de nutrientes (tipo N, P, K), matéria orgânica, Al, pH, capacidade de retenção e disponibilidade de umidade, etc. Para indicadores quantitativos da qualidade de solos, uma limitada listagem de atributos do solo ou propriedades que podem ser estimadas de variáveis básicas usando funções ou modelos simples pode ser revista em Doran and Parkin (1996).

No período 2005-2007, para fins de fenotipagem para seca em cereais, estarão sendo caracterizados, mapeados e utilizados os sítios-específicos de Sete Lagoas e Janaúba, MG (Embrapa Milho e Sorgo); de Santo Antônio de Goiás e Porangatu, GO (Embrapa Arroz e Feijão); de Petrolina, PE (Embrapa Trópicos Semi-Árido); de Aracajú e Propriá, SE (Embrapa Tabuleiros Costeiros); de Teresina e Parnaíba, em PI (Embrapa Agropecuária Meio-Norte); e de Planaltina, DF (Embrapa Cerrados).

Atenção especial será conferida ao uso adequado dos sítios-específicos de fenotipagem para seca e o uso complementar de modelos de simulação para crescimento e desenvolvimento de plantas será priorizado. Resultados experimentais têm demonstrado que o estresse hídrico, inferido do uso de água, influencia variavelmente os

componentes do rendimento. Em milho, por exemplo, resultados experimentais em oito sítios demonstraram o uso final de água via diferentes caminhos (Sadler et al. 2000a, 2000b). Adicionalmente, foi significativa a variação de solos entre os sítios, indicando que as unidades de mapas de solo não são homogêneas com relação às relações hídricas. Estes resultados demonstram a necessidade de observações dentro da estação de crescimento quanto ao uso de água pela cultura e estresse para ampliar a interpretação dos mapas de rendimento de sítios-específicos.

c.2.3. Conexão para análise transcripto/proteína onde e quando coletar amostras:

- Caracterizar acessos em controle e sob estresse.
- Escolhendo genes candidatos para características relacionadas a seca:
 - Escolha de genes candidatos dependentes da expectativa de um significativo efeito fenotípico em um knockout mutante (gene inibido).
 - Regulação da rota e suas implicações requerem informação da família de genes, informação de mutantes dentro e entre espécies, co-localização de QTLs dentro e entre espécies (Posições de genes candidatos dentro de QTLs), modelar resultados experimentais dentro e entre espécies.
 - Rota de carboidratos poucos membros de famílias menores de genes
 - Regulação de canais para água (aquaporins)
 - Estresse oxidativo

c.2.4. Que material genético para quais características

Associação de mapeamento e estudos de QTL são complementares, mas deve-se preferir usar um ou outro dependendo da variação fenotípica que está sendo acessada. Em estudos de associação, é recomendado agrupar os acessos genéticos tendo nenhuma relação conhecida, materiais geneticamente fixados com população com nenhuma estrutura.

c.3. Trigo

O tipo de característica determina se o fenótipo deve ser avaliado sob estresse de seca (característica adaptativa) ou não (característica constitutiva). Diferindo do material elite, acessos devem incluir material não-adaptado com baixo rendimento e fenologia inapropriada e tipos de planta não-agronômicos (baixa altura de planta e severa limitação de dreno). Uma aproximação, de acordo com Reynolds et al. 1999, deve incluir: a) Desenvolvimento de um modelo conceitual de combinação de características que possa ressaltar a tolerância à seca; b) Identificação de fontes com máxima expressão destas características entre os materiais dos programas de melhoramento e acessos de bancos de germoplasma, incluindo raças locais (land races); c) Avaliação do ganho genético associado com as características específicas ou suas combinações quando introgrididas em diferentes backgrounds adaptados; d) Pré-screening entre genótipos diplóides e tetraplóides para uso no desenvolvimento de linhagens sintéticas de trigo visando aumentar a probabilidade de que características favoráveis possam ser expressas nas combinações tetraplóides e hexaplóides; e) Avaliação das características em populações mapeadas geneticamente para identificar marcadores moleculares para genes de tolerância à seca; e f) Estabelecimento de tratamentos de estresse para estudos de genômica funcional e identificação de características para o melhoramento genético baseado na dissecação genética. Assim, apenas características secundárias poderiam ser consideradas, como são listadas aqui:

d. Protocolos e características específicas visando o melhoramento genético para tolerância a seca: o caso do milho.

Em milho, a redução no rendimento de grãos causada por seca varia de 10% a 76% dependendo da severidade e do estágio de ocorrência (Bolaños et al., 1993). Estresse de seca coincidindo com o florescimento atrasa a emissão de estilo-estigmas (cabelo da espiga) e resulta em um aumento no intervalo entre

e resulta em um aumento no intervalo entre florescimentos masculino e feminino (ASI, anthesis-silking interval, Bolaños and Edmeades, 1993 a, b; 1996; Bolaños et al. 1993); isto normalmente está associado com reduções no número de grãos e rendimento (Edmeades et al., 1993). Resultados experimentais indicam que o estresse de seca altera significativamente o status interno de água na planta de milho pelo decréscimo no potencial osmótico, potencial de água e conteúdo relativo de água, que consequentemente inibe a taxa fotossintética e reduz o rendimento final. Imposição de seca especialmente no estágio de emergência do pendão tem um efeito depressivo na produtividade da planta. Genótipos de milho que demonstram ser mais econômicos em água quando sujeitos a estresse de seca evidenciam maior reserva de conteúdo hídrico em tecidos, mais alta condutância estomática e taxa fotossintética. Todas essas características associam-se com mais altas produtividades sob deficiência de oferta de água. Assim, é aconselhável cultivar esses

tipos de genótipos de milho em áreas de terreno que apresentam, até certos limites, limitada disponibilidade de água (de chuvas e/ou de irrigação).

Os efeitos do estresse de seca em milho ocorrem em nível celular, e envolvem algumas características fisiológicas-chaves, como acumulação de ácido abscísico e de prolina, ajustamento osmótico, foto-oxidação da clorofila, e redução da atividade de algumas enzimas. Por exemplo, a conversão da sacarose para amido no grão decresce porque a atividade da invertase ácida, uma enzima-chave que converte sacarose para hexose-açúcares, diminui (Westgate, 1997). Também ocorrem os efeitos da seca ao nível de planta inteira. Quando as mudanças ao nível celular são somadas àquelas ao nível da planta inteira, observam-se diferentes respostas para seca em milho. Em milho, seca conduz à reduzida expansão, em escala ordinal, folha > estilo-estigma > colmo > raiz > grão. Incompleta cobertura do solo resulta de reduzida expansão de área foliar. A senescência foliar é acelerada (da base da primeira planta, mas em condições

| Espécie: Trigo | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Background do germoplasma/espécie | Características secundárias | |
| | Constitutivas | Adaptativas |
| Accessos | <ul style="list-style-type: none"> - Longo coleótilo (para semeadura profunda, resíduos de cultura, etc.) - Semente grande (Emergência, cobertura do solo e biomassa inicial) - Sistema radicular - Vigor precoce (GC: largura de folha, perfilhamento; NDVI, normalized difference vegetation index) - Delta (folhas precoces) - Diâmetro de xilema - Folhas pálidas, pubescência, cerosidade, espessura e inclinação foliar (fotoproteção) | <p>Accessos: <i>melhor medido antes do enchimento de grãos para evitar limitação de dreno.</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - Biomassa no florescimento - Carboidratos no colmo (no florescimento) - Comprimento do pedúnculo - Colmos sólidos - Perfil de extração de água pelas raízes - CT (canopy temperature, durante o pico do período do estresse); CID-folha bandeira - Resistência ao arranquio de raiz (Root pulling strength) - OA (Ajustamento osmótico) - ABA (ácido abscísico), ácido fáséico - Cera (fotoproteção) - Anti-oxidantes - Fotossíntese de espiga |
| Linhagens Elite | <ul style="list-style-type: none"> - Rendimento potencial - Índice de Colheita - Padrão físico do desenvolvimento | <ul style="list-style-type: none"> . CT e CID (em algum estágio) . Rendimento . Biomassa . IC (índice de colheita, determinado por características de enchimento de grãos) |

Nota: Características em que há ambivalência: enrolamento foliar, anti-oxidantes (alguns), ABA, OA, CT (em ambientes com ventos e nublados) e resistência de arranquio de raízes (*root pulling*). Em alguns casos, recomendam-se usar seleção de ambientes em campos normais onde é exequível e que é preferível usar irrigação por gotejamento para maior precisão e tempo de rega. Certas características, p.ex., OA, podem requerer medidas a serem feitas em uma planta comum para *status* de água (Oleaf ou RLWC); assim, estudos em vasos podem ser capazes de permitir mais fácil controle do *status* de água.

primeira planta, mas em condições de alto potencial de evapotranspiração pode também ocorrer no topo da planta), e isto, adicionalmente, reduz a interceptação da radiação. O fechamento estomático ocorre e há o declínio da fotossíntese e respiração pela foto-oxidação e dano enzimático. O ajustamento osmótico, especialmente em meristemas em crescimento, representa o esforço da planta para manter a divisão celular mas não parece desempenhar um papel principal na manutenção do crescimento quanto o estresse é severo. Também, o fluxo de assimilados para o crescimento de órgãos é reduzido. Retardado crescimento de estilo-estigma é elevado pelo atraso do florescimento feminino e é aumentado o intervalo entre as anteses masculina e feminina. Abortos de espiga e de grãos aumentam e plantas podem tornar-se estéreis. Esterilidade pode conduzir a completa perda do rendimento de grãos. As estruturas reprodutivas femininas são mais susceptíveis do que os pendões, embora o murchamento do pendão possa ocorrer se a temperatura excede 38 °C. A relação raiz/colmo cresce levemente. Quando o estresse torna-se mais severo, o crescimento de raízes também decresce, e a absorção de nutrientes por fluxo de massa/difusão em solo seca é prontamente reduzida. A remobilização das reservas do colmo pode ocorrer, quando o estresse coincide com a fase de crescimento linear do grão. Em casos extremos isto pode resultar em prematuro carregamento no floema para os grãos.

Seca pode afetar a produção de milho pelo decréscimo do stand (população) de plantas durante o estágio de plântulas, pelo decréscimo do desenvolvimento da área foliar e taxa de fotossíntese durante o período pré-florescimento, pelo decréscimo de espiga e formação de grãos durante as duas semanas coincidentes com florescimento, e pelo decréscimo da fotossíntese e indução de precoce senescência foliar durante o período de enchimento de grãos. Reduções adicionais em produção podem ocorrer de um aumento do consumo de energia e nutrientes das respostas adaptativas a seca, tais como

aumento do crescimento de raízes sob seca. Dentre as características recomendadas para avaliação da tolerância à seca em milho, são listadas as seguintes em ordem decrescente de importância, segundo diversos autores citados por Durães et al. (2004b):

a) Produção/Rendimento de Grãos:

Herdabilidade: média sob estresse no enchimento de grão; média a baixa sob estresse no florescimento.

Relação com rendimento de grão: alta.

Seleção: para aumentado rendimento de grão.

Tipo de estresse: ser medido sob estresse de seca no florescimento ou no enchimento de grão.

Medida: debulhado, ajustado para umidade de grão.

Observação: A relação peso de grão/sabugo, ou seja, a porcentagem de debulha, varia consideravelmente sob seca. Peso de grão, não o peso de espiga, deve ser usado para calcular o rendimento de grão.

b) Número de espigas por planta (prolificidade):

Herdabilidade: alta e aumentando com a intensidade do estresse.

Relação com rendimento de grão: alta sob estresse no florescimento.

Seleção: para mais espigas por planta (i.e., menos abortamento).

Tipo de estresse: ser medido sob estresse de seca no florescimento; herdabilidade e variância genética são maiores quando o estresse no florescimento é intenso o suficiente assim que a média de espigas por planta é de 0,3 a 0,7 em todo o experimento.

Medida: contar o número de espigas com no mínimo um grão completamente desenvolvido e dividir pelo número de plantas colhidas.

c) Intervalo entre Florescimentos Masculino e Feminino (IFMF)

Herdabilidade: média, mantendo um razoavelmente alto nível sob estresse severo no florescimento.

Relação com rendimento de grão: alta sob estresse de florescimento.

estresse de florescimento.

Seleção é para um reduzido ou mesmo negativo IFMF.

Tipo de estresse: ser medido sob estresse de seca no florescimento; herdabilidade e variância genética são maiores quando o estresse no florescimento é intenso o suficiente assim que a média de IFMF é de 4 para 5 dias em todo o experimento.

Medida: determinar o número de dias da semeadura até 50% de plantas que tem extrusado as anteras (data da antese masculina, DA), e o número de dias da semeadura até 50% de plantas que mostram os estilo-estigmas (data da extrusão dos cabelos das brácteas da espiga do milho, DC); cálculo: IFMF = DC - DA.

d) Senescência foliar

Herdabilidade: média.

Relação com rendimento de grão: média sob estresse no enchimento de grão.

Seleção: para atrasada senescência foliar (stay-green).

Tipo de estresse: estresse no enchimento de grão.

Medida: nota na escala de 0 a 10, dividindo a porcentagem do total estimado da área foliar morta por 10.

| | |
|---------------------------|-----------------------------|
| 1 = 10% área foliar morta | 6 = 60% área foliar morta |
| 2 = 20% área foliar morta | 7 = 70% área foliar morta |
| 3 = 30% área foliar morta | 8 = 80% área foliar morta |
| 4 = 40% área foliar morta | 9 = 90% área foliar morta |
| 5 = 50% área foliar morta | 10 = 100% área foliar morta |

Observação: Senescência foliar poderia ser medida por 2-3 ocasiões 7-10 dias em separado durante o final do enchimento de grão.

e) Tamanho de pendão

Herdabilidade: média para alta.

Relação com rendimento de grão: média sob estresse no florescimento.

Seleção: para um menor pendão com poucas ramificações.

Tipo de estresse: esta característica pode ser medida sob condições bem-irrigadas, mas é indicativa de tolerância à seca no estágio de

florescimento.

Medida: nota na escala de 1 (poucas ramificações, pequeno pendão) a 5 (algumas ramificações, grande pendão).

Observação: indicado apenas com progênies que têm um grau de endogamia de no mínimo S1; mais difícil para determinar em material com completo vigor. Dois independentes escores são recomendados.

f) Enrolamento de folha

Herdabilidade: média a alta.

Relação com rendimento de grão: média a baixa.

Seleção: para folhas não enroladas.

Tipo de estresse: estresse no florescimento.

Medida: notas plotadas na escala de 1 a 5.

1 = não-enroladas, túrgidas

2 = borda da folha começa a enrolar

3 = folha tem o formato de um V

4 = borda da folha enrolada cobre parte da lâmina da folha

5 = folha está enrolada como uma cebola

Observação: ser medida antes do florescimento quando as folhas estão ainda mais eretas verticalmente; folhas são menos provável enrolar após o florescimento quando elas tornam-se mais moles e mais grossas. Dois ou três escores são recomendados.

Considerações finais

Os estudos de fenotipagem de espécies vegetais, visando produtividade e/ou adequada performance em ambientes adversos (áreas marginais ou de risco para os cultivos, condições ambientais subótimas, ou mesmo de estresses ambientais) buscam caracterizar genótipos de espécies cultivadas que possam responder bem a estresses "per se" e/ou múltiplos. Essa caracterização, baseada em protocolos, métodos e técnicas de fenotipagem (de preliminar a avançada) aplicados em fases críticas do ciclo de vida de cada espécie, objetiva identificar genótipos tolerantes e/ou eficientes a um dado fator ambiental (biótico ou abiótico) e contribuir para os ganhos de seleção no programa de melhoramento convencional, no preparo de background genético útil aos estudos genômicos, e mesmo promover estudos complementares de modelagem de plantas es

para fins objetivos. Esses estudos, visam sobretudo aumentar a competência técnica e ampliar as oportunidades futuras quanto a quais alelos (genes e sua expressão) de interesse estão sendo buscados, como por exemplo, para as melhorias na tolerância a seca e/ou eficiência de absorção e uso de nitrogênio. Neste sentido, iniciativas em P&DI tratam de um refinamento dentro da compreensão das relações genótipo x ambiente, e mesmo dos focos prioritários em estudo de vegetais sob condições de estresses ambientais (bióticos e abióticos). Ainda, esses projetos objetivam, com as dimensões e variações pertinentes, valorar germoplasma para favorecer o melhoramento, estudos genômicos e o desenvolvimento de novos cultivares. Esforços de P&D estão sendo desenvolvidos, criteriosamente, por espécie vegetal, agregando os conceitos de fenotipagem (preliminar, intermediária e avançada), dos sítios-específicos para estresse "per se" e múltiplos, definindo os protocolos (métodos e técnicas de imposição e monitoramento de estresse), os arranjos para definição de background genético útil a cada fase do melhoramento, e estudos genômicos, etc., o valor de cada característica, e apropriação utilitária de cada conhecimento novo nestes processos, por meio de um gerenciamento técnico de um banco de dados dinâmico. Trata-se do desenvolvimento de um modelo de "rede científica e de serviços", que está sendo desenhada e redimensionada quanto a tamanho, natureza e focos de uma rede de P&D para seca.

Técnicas moleculares modernas oferecem novos arranjos e estratégias para a melhoria de espécies cultivadas, visando tolerância a estresses abióticos, como o de seca. Possivelmente uma combinação de todos os arranjos, antigos (tradicionais) e novos (modernos), será o mais produtivo. A identificação de características fisiológicas e de genes (alelos) chaves, e o entendimento de mecanismos em níveis celular e da planta total, constituem pontos centrais para todos os arranjos.

Doravante, as técnicas de transformação disponíveis para a maioria das espécies podem tornar possível manipular a expressão de genes envolvidos no controle de mecanismos e processos de tolerância e/ou eficiência, tais como de ajustamento osmótico, transporte de íon-específico através de membrana, etc. Fenotipagem e genotipagem são estratégias

integradas para a obtenção de ganhos genéticos e melhoria de processos de obtenção do conhecimento e do melhoramento de plantas. Procedimentos dentro dessa estratégia visam obter aumento de produtividade, melhoria da adaptação e eficiência de respostas quanto a adequada performance de material elite, experimental e comercial, para condições de cultivo sob estresses ambientais.

Referências Bibliográficas

- ATLIN, G. N. Breeding for suboptimal environments. P. 245-251. In: *Increased Lowland Rice Production in the Mekong Region*, edited by Shu Fukai and Jaya Basnayake. ACIAR Proceedings 101. 2001.
- BÄNZIGER, M.; BETRÁN, F. J.; LAFITTE, H. R. Efficiency of high-nitrogen selection environments for improving maize for low-nitrogen target environments. **Crop Science**, Madison, v. 37, p. 1103-1109, 1997.
- BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. I. Responses in grain yield, biomass, and radiation utilization. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 31, p. 233-252. 1993a.
- BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.31, p.253-268, 1993b.
- BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O.; MARTINEZ, L. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. III. Responses in drought adaptive physiological and morphological traits. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 31, p. 269-286, 1993.
- BOLAÑOS, J.; EDMEADES, G. O. The importance of the anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 48, p. 65-80, 1996.
- BLUM, A. Breeding methods for drought resistance. In: JONES, H. G.; FLOWERS, T. J.; JONES, M. G. (Ed.) **Plants under stress**. Cambridge: University Press, 1989, p.197-216.
- DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Quantitative Indicators of Soil Quality: a minimum data Set. Chapter 2, pp. 25-37. In: DORAN, D. J.; JONES, A. J. (Ed.). **Methods for assessing soil quality**. Madison: Soil Science Society of America, 1996. Cap. 2, p. 25-37. (SSSA. Special Publication, 49).
- DURÃES, F. O. M.; MAGALHÃES, P. C.; MARRIEL, I. E.; GAMA, E. E. G.; CASELA, C. R.; OLIVEIRA, A. C.; CANTÃO, F. R. O. Maize genotypes

- characterization for nitrogen use and efficiency and nitrogen fertilization influence on the incidence and severity of the disease *Phaeosphaeria maydis*. In: REUNION LATINOAMERICANA DE MAÍZ, 20. 2004. Lima. **Anais ...** Lima: CIMMYT:INEA, 2004a.
- DURÃES, F. O. M.; MAGALHÃES, P. C.; SANTOS, M. X. dos; LOPES, M. A.; PAIVA, E. Seleção de genótipos de milho visando tolerância a seca: Estratégia de fenotipagem e utilização de marcadores moleculares. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, p. 718, 1999. Suplemento. Edição de Resumos do XLV Congresso Nacional de Genética, Gramado-RS, 1999.
- DURÃES, F. O. M.; SANTOS, M. X. dos; GAMA, E. E. G.; MAGALHÃES, P. C.; ALBUQUERQUE, P. E. P.; GUIMARÃES, C. T. **Fenotipagem associada a tolerância a seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2004b. 17 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 39).
- EDMEADES, G. O.; BOLAÑOS, J.; HERNANDEZ, M.; BELLO, S. Causes for silk delay in a lowland tropical maize population. **Crop Science**, Madison, v. 33, p. 1029-1035, 1993.
- ELLIS, R. P.; FORSTER, B. P.; WAUGH, R.; BONAR, N.; HANDLEY, L.; ROBINSON, D.; GORDON, D. C.; POWELL, W. Mapping physiological traits in barley. **New Phytologist**, Oxford, v. 37, p. 149-157, 1997.
- FLOWERS T. J.; KOYAMA, M. L.; FLOWERS, S. A.; SUDHAKAR, C.; SINGH, K. P.; YEO, A. R. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 51, p. 99-106, 2000.
- GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HAUSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**. The Hague, v. 37, p. 263-265, 2002.
- HASH, C.T.; SCHAFFERT, R. E.; PEACOCK, J. M. Prospects for using conventional techniques and molecular biological tools to enhance performance of "orphan" crop plants on soils low in available phosphorus. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, p. 135-146, 2002. 245:135-146, 2002.
- HSIAO, T. C. 1973. Plant responses to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 24, p. 519-570, 1973.
- HSIAO, T. C., ACEVEDO, E. FERERES, D.; HENDERSON, W. Stress metabolism, water stress, growth and osmotic adjustment. **Philoso. Trans. Royal Society**. London, v. 273, p. 479-500, 1976.
- Hsiao, T. C.; Xu, L. K. Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 51, p. 1595-1616. 2000.
- LANCERAS, J. C.; PANTUWAN, G.; JONGDEE, B.; TOOJINDA, T.. Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 135, p. 384-399, 2004.
- JONES, H. G. **Plants and microclimate**. 2. ed. Cambridge: University Press, 1992. Cambridge University Press, Cambridge.
- KAMOSHITA, A.; ZHANG, J.; SIOPONGCO, J.; SARKARUNG, S.; NGUYEN, H. T.; WADE, L. J.. Effects of phenotyping environment on identification of quantitative trait loci for rice root morphology under anaerobic conditions. **Crop Science**, Madison, v. 42, p. 255-265, 2002.
- KOYAMA, M. L.; LEVESLEY, A.; KOEBNER, R. M. D.; FLOWERS, T. J.; YEO, A. R. Quantitative trait loci for component physiological traits determining salt tolerance in rice. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 25, p. 406-422, 2001.
- KOZLOWSKI, T. T.; PALLARDY, S. G. **Physiology of woody plants**, 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- LAMBERS, H.; CHAPIN, F. S.; PONS, T. **Plant physiological ecology**. New York: Springer-Verlag, 1998.
- MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI LI; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the Poaceae. **Genetics**, Maryland, v. 167, n. 4, p. 1905-1914, 2004.
- MANO, Y.; TAKEDA, K. Mapping quantitative trait loci for salt tolerance at germination and the seedling stage in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Euphytica**, Wageningen, v. 94, p. 263-272, 1997
- MATIN, M. A.; BROWN, J. H; FERGUSON, H., Leaf water potential, relative water content and diffusive resistance as screening techniques for drought resistance in barley. **Agronomy Journal**, Madison, v. 81, p. 100-105, 1989.
- 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.
- MOLL, R .H.; KRAMPRATH, E. T.; JACKSON, W. A. Analysis and interpretation of factors wich contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agronomy Journal**, Madison, v. 74, n. 3, p. 562-564, 1982.

MUNNS, R.; HUSAIN, S.; RIVELLI, A. R.; JAMES, R. A.; CONDON, A. G.; LINDSAY, M. P.; LAGUDAH, E. S.; SCHACHTMAN, D. P.; HARE, R. A. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, The Hague, v. 247, p. 93-105, 2002.

NILSEN, E. T.; ORCUTT, D. M. **The physiology of plants under stress**. New York: J. Wiley, 1996

PASSIOURA, J. B. Grain yield, harvest index, and water use of wheat. **Journal of the Australian Institute Agricultural Science**. Sydney, v. 43, p.117-121, 1977

REYNOLDS, M.; SKOVMAND, B.; TRETOWAN, R.; PFEIFFER, W. Evaluating a conceptual model for drought tolerance. In: RIBAUT, J. M.; POLAND, D. (Ed.). **Molecular approaches for the genetic improvement of cereals for stable production in water-limited environments**. Mexico: CIMMYT, 1999.

RIBAUT, J. M.; HOISINGTON, D. A.; DEUTSCH, J. A.; JIANG, C.; GONZALEZ-DE-LEON, D. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 92, p. 905-914, 1996

RIBAUT, J. M.; JIANG, C.; GONZALEZ-DE-LEON, D.; EDMEADES, G. O.; HOISINGTON, D. A.. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 887-896. 1997

SADLER, E. J.; BAUER, P. J. BUSSCHER, W. J. Site-Specific Analysis of a Droughted Corn Crop: I. Growth and Grain Yield. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 3, p.395-402, 2000a.

SADLER, E. J.; BAUER, P. J. BUSSCHER, W. J.; MILLEN, J. A. Site-Specific Analysis of a Droughted Corn Crop: II. Water Use and Stress. **Agronomy Journal**, Madison, v. 92, n. 3, p. 403-410. 2000b.

SAWKINS, M. C.; NAVA GUTIÉRREZ, M. L.; BÄNZINGER, M.; RIBAUT, J. M. Drought tolerance

in tropical maize: strategies for understanding the response of maize to water stress during flowering. pp.71. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PLANT BREEDING., Mexico, 2003. **Book of abstracts...** Mexico: CIMMYT, 2003. P. 71. Editado por HALLAUER, A. R.

SEMIKHODSKII, A. G.; QUARRIE, S. A.; SNAPE, J. W. Mapping quantitative trait loci for salinity responses in wheat. In: JEVETIC, S.; PEKIC, S. (Ed.). **Drought and Plant Production: proceedings**. Belgrade: Agricultural Research Institute Serbia, 1997. International Symposium Drought and Plant Production, held in Lepenski Vir in September, 1996. p 83-92.

JTRIPATHY, J. N.; JINGXIAN ZHANG, S.; ROBIN, S.; NGUYEN, T. T.; NGUYEN, H. T. QTLs for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.100, n.8, 1197-1202, 2000.

TUBEROSA, R.; SALVI, S.; SANGUINETI, M. C.; LANDI, P.; MACCAFERRI, M; CONTI, S. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: Case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. **Annals of Botany**, London, v. 89, p.941-963, 2002.

TURNER, L. B. The effect of water stress on the vegetative growth of white clover (*Trifolium repens* L.), comparative of long-term water deficit and short-term developing water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 311-316, 1991

WESTGATE, M. E. Physiology of flowering in maize: identifying avenues to improve kernel set during drought. In SYMPOSIUM OF DEVELOPPING DROUGHT AND LOW N-TOLERANCE MAIZE, 1996, El Batán. **Proceedings...** El Batán: CIMMYT, 1997. P. 136-141. Editado por G. O. Edmeades; M. Bänziger; H. R. Mickelson; C. B. Peña-Valdivia.

YADAV, R. S.; HASH, C. T.; BIDINGER, F. R.; DEVOS, K. M.; HOWARTH, C. J. Genomic regions associated with grain yield and aspects of post-flowering drought tolerance in pearl millet across stress environments and tester background. **Euphytica**, Wageningen, v. 136, n. 3, p. 265-277. 2004

Circular Técnica, 54

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Milho e Sorgo
Endereço: Caixa Postal 151
 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3779-1000
Fax: (31) 3779-1088
E-mail: sac@cnpmis.embrapa.br

Ministério da Agricultura
 Pecuária e Abastecimento

1ª edição
 1ª impressão (2004): 200 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Jamilton Pereira dos Santos
Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães
Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade, Cláudia Teixeira Guimarães, Carlos Roberto Casela, José Carlos Cruz e Márcio Antônio Rezende Monteiro

Expediente **Editoração:** Communique ME