

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Arroz e Feijão  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **Documentos 265**

### ***Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas: Adaptando as Cul- turas ao Clima do Futuro Trabalhos Apresentados***

Goiânia, 19 a 21 de outubro de 2010

Um evento apoiado pelo Fundo de Pes-  
quisa Embrapa - Monsanto

#### **Local**

Auditório da Federação da Agricultura do Estado de  
Goiás  
Goiânia, GO

#### **Realização**

Embrapa Arroz e Feijão

Embrapa Arroz e Feijão  
Santo Antônio de Goiás, GO  
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Arroz e Feijão**

Rod. GO 462, Km 12

Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (0xx62) 3533 2110

Fax: (0xx62) 3533 2123

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Flávia Aparecida de Alcântara*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*

Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

Capa: *Fábio Nolêto*

**1ª edição**

1ª impressão (2011): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Arroz e Feijão**

---

Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas : Adaptando as Culturas ao Clima do Futuro (2010 : *Goiânia, GO*).

Trabalhos Apresentados / Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas : Adaptando as Culturas ao Clima do Futuro, Goiânia, GO, de 19 a 21 de outubro de 2010. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2011.

148 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 265)

1. Deficiência hídrica. 2. Resistência a seca. 3. Clima. I. Título. II. Embrapa Arroz e Feijão. III. Série.

CDD 581.42 (21. ed.)

---

© Embrapa 2011

# Comissão Organizadora

## **Flávio Breseghello**

Engenheiro agrônomo, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas,  
pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO,  
flavio@cnpaf.embrapa.br

## **Soraya Cristina de M. Leal-Bertioli**

Bióloga, Ph.D. em Biologia Molecular de Microorganismos, pesquisadora  
da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF,  
soraya@cenargen.embrapa.br

## **Jurandir Vieira de Magalhães**

Engenheiro agrônomo, Doutor em Genética Molecular, pesquisador da  
Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG,  
jurandir@cnpms.embrapa.br

## **Newton Portilho Carneiro**

Biólogo, Doutor em Ciência das Plantas, pesquisador da Embrapa Milho  
e Sorgo, Sete Lagoas, MG,  
newtonc@cnpms.embrapa.br

## **Alexandre Lima Nepomuceno**

Engenheiro agrônomo, Ph.D. em Biologia Molecular e Fisiologia Vegetal,  
pesquisador da Embrapa Soja, Londrina, PR,  
nepo@cnpso.embrapa.br

## **Eugênio César Ulian**

Engenheiro agrônomo, Ph.D. em Fisiologia Vegetal, Gerente de  
Relações Científicas da Monsanto do Brasil Ltda, São Paulo, SP,  
eugenio.c.ulian@monsanto.com



# Prefácio

O tema tolerância à seca tem despertado grande interesse da comunidade científica em face de uma perspectiva de mudanças climáticas que poderiam tornar os episódios de estresse hídrico mais frequentes. Neste sentido, o Fundo de Pesquisa Embrapa - Monsanto<sup>1</sup> promoveu o Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas: Adaptando as Culturas ao Clima do Futuro, em Goiânia, de 19 a 21 de outubro de 2010. Este simpósio reuniu a grande maioria dos pesquisadores que desenvolvem trabalhos em tolerância à seca no Brasil e contou com a presença de nomes de destaque no cenário científico mundial. O público, composto de profissionais da Embrapa, de organizações estaduais de pesquisa e do setor privado, professores e estudantes de pós-graduação, teve a oportunidade de conhecer o estado da arte neste tema e, com isto, aprimorar seus projetos de pesquisa. O simpósio foi organizado em cinco sessões, as quais são comentadas a seguir.

## **Sessão I - Introdução ao Tema Tolerância à Seca**

A palestra de abertura foi apresentada por Abraham Blum (Plantstress. com), que alertou que a falta de comunicação e interação eficiente entre cientistas de diferentes disciplinas tem resultado em ideias dis-

---

<sup>1</sup> Fundo instalado por contrato de cooperação técnica entre Embrapa e Monsanto do Brasil, em 2007, com o objetivo de estabelecer condições para o financiamento de projetos de pesquisa e desenvolvimento, e transferência de tecnologia e comunicação, de interesse do Brasil, nas áreas de biotecnologia, segurança alimentar e ambiental, e uso sustentável de recursos naturais.

torcidas, que podem fazer com que grupos de pesquisa invistam em direções pouco promissoras. Como exemplo, ele citou que a seleção assistida por marcadores para tolerância à seca somente terá sucesso se houver um entendimento profundo da fisiologia da planta e métodos acurados de fenotipagem.

Andy Pereira (Virginia Tech) reforçou o conceito de que a manifestação de tolerância à seca em plantas é resultante da expressão de complexas redes genéticas. Lidar com as interações de expressão de múltiplos genes ao mesmo tempo, tarefa que até recentemente era impraticável, é agora o campo de estudo de um novo ramo da genética, a biologia de sistemas. Esta disciplina promete consolidar uma gama enorme de respostas de genes individuais em um número interpretável de módulos funcionais, criando modelos preditivos multigênicos mais acurados. Esta abordagem é promissora para um caráter complexo como a tolerância à seca.

## **Sessão II - Avaliação Fenotípica da Tolerância à Seca**

A Sessão II abordou o problema da avaliação fenotípica da tolerância à seca, reconhecido por todos os participantes como um dos principais fatores limitantes para o progresso genético no melhoramento de plantas para ambientes propensos à deficiência hídrica. No entanto, a avaliação fenotípica da tolerância à seca no Brasil parece estar sendo feita de um modo empírico, em que cada equipe faz a avaliação de acordo com as facilidades disponíveis, sem uma maior discussão quanto aos métodos mais adequados para cada cultura e cada região. Tanto nos casos em que o objetivo é a descoberta de genes, quanto na seleção de famílias tolerantes para o melhoramento genético de cultivos, o resultado final será inteiramente dependente do protocolo de avaliação fenotípica. A fenotipagem da tolerância à seca é reconhecida mundialmente como um desafio científico e prático, portanto, deve ser abordada por equipes multidisciplinares. Uma opção interessante seria a formação de uma “rede nacional de avaliação da tolerância à seca em plantas”, envolvendo competências nas áreas de modelagem, climatologia, fitotecnia, fisiologia vegetal, bioquímica, estatística, genética e melhoramento. Esta rede poderia trocar informações e experiências, além de colaborar na avaliação de materiais de interesse comum.

A avaliação da tolerância à seca requer o conhecimento do ambiente-alvo, especialmente quanto aos fatores de estresse normalmente observados. A estratificação ambiental é uma das boas aplicações da modelagem de culturas, conforme demonstrado por Michael Dingkuhn (CIRAD) em sua apresentação. Modelos apropriados e devidamente parametrizados são ferramentas muito úteis para a caracterização detalhada dos ambientes-alvos em termos probabilísticos, bem como para a identificação de características de plantas que possam resultar em ganhos de produção sob tais condições ambientais.

Embora alguns autores tenham levantado dúvidas quanto à possibilidade de que genes individuais possam causar impactos significativos na produtividade sob condições de estresse de seca, a empresa Crop Design tem investido nesta abordagem, conforme apresentação de Marnix Peferoen. Esta empresa faz um screening detalhado de milhares de plantas modificadas quanto a um ou poucos genes, buscando alterações fenotípicas detectáveis por análise de imagens digitais de plantas sob condições controladas. As alterações mais interessantes são posteriormente testadas a campo. Esta equipe aposta em um jogo de grandes números para encontrar raros casos em que pequenas modificações genotípicas possam causar um impacto significativo na produção sob condições de estresse. Segundo o palestrante, os resultados obtidos até o momento são bastante promissores.

A técnica de termometria de infravermelho foi apresentada por Reinaldo Gomide (Embrapa Milho e Sorgo) como uma ferramenta poderosa para a medição rápida das diferenças de tolerância à seca entre variedades de plantas. Um ponto interessante é que, sob condições de seca, o pesquisador normalmente selecionará em favor de uma menor temperatura de dossel, por ser uma indicação de melhor estado hídrico, enquanto que sob condições favoráveis, uma temperatura de dossel moderadamente mais alta pode indicar um uso mais parcimonioso da água do solo, poupando-a para uma possível fase de estresse. Este caso mostra como o pesquisador tem que estar preparado para interpretar os dados fenotípicos de acordo com a situação experimental e o ambiente-alvo.

Jagadish Rane apresentou um aparato desenvolvido no CIAT para a tomada automatizada de imagens em infravermelho a campo, o qual

permite que até 500 parcelas sejam fotografadas em apenas 40 minutos. Este sistema, montado sob um abrigo contra chuva para indução de estresse, pode avaliar o estado hídrico de germoplasma, mutantes e transgênicos de arroz, representando uma importante ferramenta complementar para estudos interdisciplinares.

Mauro Teixeira (Embrapa Trigo) enfatizou que o sucesso do trigo de sequeiro no cerrado brasileiro dependerá do desenvolvimento de cultivares com maior tolerância à seca. Considerando que a maior oportunidade de plantio para esta cultura é em sucessão à soja, no final da estação chuvosa, um sistema radicular profundo será essencial para enfrentar um provável estresse hídrico de final do ciclo.

Raízes profundas são também o foco dos estudos apresentados por Cleber Guimarães (Embrapa Arroz e Feijão). Estes estudos incluem fenotipagem detalhada de plantas de arroz e de feijoeiro comum quanto a um conjunto de caracteres morfológicos e fisiológicos sob regimes hídricos contrastantes. Os experimentos de estresse são conduzidos a campo, na estação seca e também em casa-de-vegetação, em colunas de solo. Importantes contrastes entre variedades têm sido observados nestes experimentos.

### **Sessão III - Genômica Aplicada à Tolerância à Seca**

A genômica tem sido aplicada na busca da tolerância à seca em várias culturas e, frequentemente, esta abordagem tem tido estreita relação com o aproveitamento de recursos genéticos exóticos ou não adaptados. Percebe-se que esta vertente tem gerado um grande volume de informações potencialmente úteis, ainda que resultados práticos ainda sejam raros. A relativa falta de resultados finalísticos na genômica da tolerância à seca pode ser justificada pela complexidade dos dois componentes que interagem para produzir as respostas das plantas ao estresse. De um lado têm-se genomas complexos com sofisticados mecanismos de regulação gênica e, de outro, um estresse abiótico multifacetado, com QTLs de tolerância mostrando fortes interações com o meio ambiente. Entretanto, esses dois aspectos têm sido em geral abordados de maneira estanque, desconsiderando-se as inter-relações existentes. O desenvolvimento de métodos estatísticos adequados para



modelar a interação de QTLs com o meio ambiente, a disponibilidade de metodologias para o estudo de características fisiológicas relacionadas à resposta ao estresse de seca e as novas estratégias de genotipagem em larga escala são grandes avanços com potencial impacto na genômica da tolerância à seca em plantas.

Jean Christophe Glazsmann (CIRAD) considera de suma importância a exploração da diversidade genética disponível, como uma estratégia para a incorporação de características de interesse agrônomo às espécies cultivadas. No caso de tolerância à seca no âmbito do Generation Challenge Programme, essa estratégia envolve a organização de um grande número de genótipos em coleções geneticamente representativas, que podem então ser fenotipadas de maneira mais eficiente. Uma das estratégias para se relacionar a variação alélica em locos candidatos ao fenótipo é a genética associativa, que depende de todo o histórico demográfico e de recombinações ao qual cada espécie foi sujeita ao longo do processo de domesticação. Outras possibilidades são a exploração de populações multiparentais ou de linhagens de substituição cromossômica (CSSL) para estudos de tolerância à seca. Finalmente, o autor chama a atenção para os avanços nas tecnologias genômicas, que agora viabilizam estratégias de genotipagem de alta resolução, e os sistemas de informações geográficas, que permitem uma documentação detalhada do germoplasma no seu ambiente de origem.

A importância da cultura da cana-de-açúcar foi discutida por Marcelo Menossi (Unicamp), que mostrou uma série de projetos científicos que foram ou vêm sendo financiados com foco principal no melhoramento genético dessa espécie e na identificação de alelos favoráveis. Análises genômicas recentes por esse grupo têm se concentrado em genes envolvidos no metabolismo de sacarose, resposta a hormônios e estresses bióticos e abióticos. Para estresse de seca, experimentos de campo e casa de vegetação têm sido realizados em Alagoas, Pernambuco e duas localidades de São Paulo, com três variedades menos tolerantes e três variedades mais tolerantes à seca. Resultados têm sido obtidos por meio de análises por géis 2D, microarraios, miRNA e RNA-seq. Testes de função gênica para alguns dos genes candidatos têm sido feitos em plantas de tabaco utilizando-se manitol e NaCl como alternativas aos estresses de seca e salino. No final da apresentação, o autor levantou

a importância de produção científica e patenteamento de resultados relevantes no Brasil.

Márcio Elias Ferreira (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) enfatizou o grande potencial para avanços de produtividade do arroz cultivado sob condições de risco de restrição hídrica, uma vez que o ideótipo utilizado em sistemas irrigados não proporcionou o mesmo aumento de produtividade em condições de sequeiro. Seguindo esse raciocínio, afirmou que muitas variáveis afetam a resposta de uma planta ao estresse de seca, refletindo a natureza quantitativa desse fenótipo. A estratégia descrita por Ferreira para o melhoramento molecular visando à tolerância ao estresse de seca envolve a genética associativa em coleções nucleares e o mapeamento genético em diferentes tipos de populações segregantes. A seleção genômica está também sendo aplicada em direção ao ideótipo de arroz de sequeiro. Também fazem parte dessa estratégia o resequenciamento de parentais de populações segregantes, a genotipagem com SNPs e SSRs e a fenotipagem em condições de campo e em condições controladas.

Newton Carneiro (Embrapa Milho e Sorgo) mostrou que a Embrapa tem investido cada vez mais em pesquisas relacionadas com tolerância a seca para várias culturas. Mais especificamente, foi descrito na sua apresentação um projeto em gramíneas (milho, sorgo, trigo e arroz) cuja ênfase está na caracterização de sítios de fenotipagem, aprimoramento de métodos e modelos, melhoramento genético para a tolerância ao estresse de seca, desenvolvimento de populações segregantes e caracterização de painéis de associação para dar suporte à identificação de QTLs favoráveis. O apresentador enfatizou a complexidade da análise de dados provenientes desse estresse em campo e em casa de vegetação e a necessidade da Embrapa investir em fenotipagem em grande escala, e unir esforços de especialistas em várias áreas para identificar materiais mais tolerantes à seca.

Soraya Leal-Bertioli (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) descreveu em sua apresentação estudos na tetraploidização de espécies silvestres de amendoim e sua relação com a tolerância ao estresse hídrico. A pesquisadora realizou análises de características relacionadas à resposta ao estresse hídrico com dois acessos silvestres diplóides,

o anfidiplóide originado do cruzamento e tetraploidização desses, e as duas cultivares de amendoim mais plantadas no território brasileiro. A apresentadora faz uma predição da baixa herdabilidade diante do processo de tetraploidização e menciona que esse processo depende da característica estudada. Ela também recomenda que a fenotipagem de características relacionadas ao estresse hídrico, no caso do amendoim, seja realizada após o processo de cruzamento e tetraploidização. A partir desses resultados, essa equipe vem engendrando esforços na área de genômica funcional para o estudo da resposta ao estresse hídrico em espécies silvestres do gênero *Arachis*.

Ana Maria Benko-Iseppon apresentou uma linha de trabalho em condução na Universidade Federal de Pernambuco que visa a identificar os principais grupos de genes relacionados às vias de resposta a estresse abiótico, principalmente salinidade e seca, em feijão-caupi, avaliando sequências geradas no projeto “Genômica Funcional, Estrutural e Comparativa de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*)”, incluindo bibliotecas de EST e de SuperSAGE. Estudos de bioinformática sobre esses dados têm mostrado que as sequências expressas são de diversas categorias metabólicas e, aparentemente, muitos genes podem estar diretamente ligados às respostas ao estresse de seca e salinidade em caupi, como já descrito na literatura para outras espécies.

#### **Sessão IV - Engenharia Genética Aplicada à Tolerância à Seca**

Nesta sessão ficou claro que vários grupos têm investido na estratégia de transformação genética utilizando fatores de transcrição para o aumento da tolerância à seca de diversas espécies de culturas agrícolas. Atenção especial foi dada para o gene *AtDREB2A*, isolado de *Arabidopsis thaliana*, que foi recentemente objeto de negociação entre Embrapa e JIRCAS para pesquisa e validação em cinco espécies de interesse agrícola.

Taishi Umezawa (Riken PSC) apresentou uma revisão das rotas metabólicas dependentes de ácido abscísico (ABA) e rotas ABA-independentes envolvidas nas respostas das plantas ao estresse hídrico. Várias centenas de genes que respondem ao estresse hídrico ao nível transcricional têm sido identificados por técnicas como microarranjos de DNA ou

RNA-seq. Várias moléculas-chave envolvidas na transdução de sinal têm sido identificadas e analisadas. Entre estas moléculas, destacam-se fatores de transcrição como AREB1, ABF2, DREB1A e DREB2, além de proteína-quinases, como a RPK1, SRK2C e CDPKs, estas expressas em células-guarda. Umezawa apresentou resultados em plantas-modelo, onde a superexpressão destes genes ou a manipulação de determinados domínios das regiões proteicas codificadas por estes podem alterar a tolerância das plantas a estresses abióticos, como seca e salinidade.

As estratégias para aumentar a tolerância ao estresse hídrico em soja através da introdução de fatores de transcrição por engenharia genética foram discutidas por Alexandre Nepomuceno (Embrapa Soja). Ênfase foi dada aos genes AtDREB2A e AtDREB2B, que são ativados especificamente em resposta à seca e à salinidade. Construções foram introduzidas em embriões de soja via biobalística, em uma cultivar sensível à seca. Os resultados indicaram que o promotor rd29A é ativado no tratamento de seca em soja, induzindo a expressão do fator de transcrição AtDREB1A e, conseqüentemente, ativando em níveis mais elevados os genes de defesa contra a dessecação, em relação aos observados nas plantas não transformadas. Os trabalhos encontram-se avançados, inclusive com alguns resultados a campo.

Fátima Grossi (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) apresentou o trabalho de transformação do gene AtDREB2A em linhagens de algodoeiro com baixa tolerância à seca. Foram apresentados resultados indicando que plantas transformadas apresentaram melhor crescimento, entre outras características, quando comparadas às plantas-controle em casa de vegetação. Em breve, testes a campo serão realizados, quando poderá ser avaliado o real valor desta estratégia para a cultura do algodão.

Francisco Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) apresentou o trabalho sendo desenvolvido com feijão, uma cultura relativamente vulnerável ao estresse hídrico em todas as áreas de plantio no Brasil, causando uma insegurança de produção para consumo interno. Os esforços para obter plantas mais tolerantes através de engenharia genética têm sido realizados com fatores de transcrição, tanto os já descritos, como também isolados de plantas nativas. Os promotores

utilizados são induzidos por estresse, como o rd29A. O trabalho descrito está fortemente ligado ao programa de melhoramento de feijoeiro da Embrapa.

Elizabeth Fontes (UFV) descreveu o trabalho realizado com o fator de transcrição BIP (sensor-binding protein) isolado de soja. Linhas transgênicas de tabaco e soja expressando esse fator de transcrição apresentam lesões necróticas atenuadas, aumentando a capacidade de sobrevivência em desidratação, sob condições controladas. Este trabalho representa um caso de lateralidade de pensamento: observações de um projeto de pesquisa básica e acadêmica possibilitaram direcionar os trabalhos para finalidades aplicadas na agricultura.

## **Sessão V - Melhoramento Genético para Tolerância à Seca**

Os programas de melhoramento genético de grandes culturas não parecem estar priorizando a tolerância à seca entre os fatores de seleção, ou seja, ainda não incorporaram a deficiência hídrica como uma característica fundamental dos seus ambientes-alvo. Ao invés disso, os melhoristas estão buscando testar seus materiais elites em ensaios específicos sob estresse, ou aproveitando oportunidades em que o estresse ocorre naturalmente em ensaios de valor de cultivo e uso, para detectar diferenças quanto a esta característica. Embora estas informações possam auxiliar no posicionamento de mercado das cultivares, tal estratégia dificilmente irá resultar em ganhos cumulativos para tolerância à seca. Por outro lado, os melhoristas parecem aguardar passivamente que alguma inovação significativa surja das pesquisas moleculares. Seria importante que os melhoristas buscassem uma maior aproximação com a biotecnologia, e vice-versa, para que as pesquisas em tolerância à seca obtivessem resultados finalísticos em um tempo mais curto.

Gary Atlin apresentou a estratégia para melhoramento da tolerância à seca em milho utilizada no CIMMYT. Aquele centro internacional utiliza ensaios específicos de estresse hídrico, mas Atlin destaca que é preciso ter cuidado ao utilizar os resultados destes ensaios para seleção de plantas no melhoramento, pois os mesmos normalmente apresentam grande erro experimental, podendo causar retrocessos no programa. Seria mais seguro utilizar os experimentos de seca apenas para descartar

os materiais notoriamente sensíveis a este estresse. Segundo ele, todos os fatores que podem resultar em aumento do erro experimental devem ser controlados e métodos estatísticos mais complexos devem ser utilizados, para uma maior efetividade dos experimentos de estresse.

David Butruille mostrou que a Monsanto tem uma estratégia clara para o desenvolvimento de híbridos para ambientes propensos à seca. Esta estratégia é baseada em métodos clássicos de melhoramento, com ajustes para as especificidades resultantes do estresse nos experimentos de campo. Ele destacou a importância da caracterização detalhada dos ambientes-alvo, incluindo o tipo e a frequência de estresses esperados em cada um deles. A Monsanto aplica todas as ferramentas disponíveis da ciência para atingir um progresso significativo para produção sob seca, incluindo novos métodos de mecanização, biotecnologia, estatística e meteorologia. Entretanto, foi ressaltado que a empresa não considera aceitável comprometer o potencial produtivo dos híbridos de milho para obter uma maior tolerância à seca, indicando que a sua estratégia comercial ainda dá preferência para os ambientes mais favoráveis.

Esse último ponto também foi mencionado por Carlos Arias, da Embrapa Soja. Embora haja um quase-consenso na comunidade científica de que tolerância à seca é relevante, para Arias a vantagem de mercado que teria uma cultivar de soja com algum nível de tolerância não é tão clara. Rotular uma cultivar como “tolerante à seca” poderia trazer excessiva responsabilidade sobre a empresa detentora em caso de perda de safra por causa de seca e, considerando a diversidade de tipos e intensidades de estresse que podem ocorrer a campo, além de problemas bióticos associados, nenhuma cultivar atual poderia ser dita tolerante à seca. Adicionalmente, posicionar uma cultivar para ambientes propensos à seca poderia trazer uma mensagem subliminar de que este material é indicado para manejo de baixa tecnologia. Arias acredita que algum nível de tolerância à seca que venha a ser atingido deveria ser dado ao produtor como um bônus, o qual seria percebido ao longo do tempo sob condições de estresse moderado, refletindo positivamente sobre a imagem da empresa detentora, sem trazer responsabilidade civil adicional.

O uso de marcadores moleculares como uma ferramenta para a seleção de plantas foi discutido por Claudio Lopes Jr. (Esalq/USP). Seus resul-

tados experimentais em milho indicam que a informação carregada por todos os marcadores moleculares, não só aqueles ligados a QTLs, deve ser utilizada para estimar valores genéticos para seleção de plantas. Esta abordagem, conhecida como seleção genômica, pode ser combinada com seleção fenotípica clássica para aumentar o ganho genético por ciclo de avaliação. Considerando que a fenotipagem para tolerância à seca é difícil e onerosa, esta estratégia poderia ser atraente. No entanto, deve-se reconhecer que a aplicação plena da seleção genômica em um programa de melhoramento requer uma logística muito eficiente para a genotipagem e análise estatística dos dados em curtos intervalos de tempo.

José Bressiani (Canavialis) explicou que tolerância à seca será uma característica necessária para a competitividade da cultura da cana-de-açúcar nas regiões tropicais do Brasil. Sendo uma cultura perene, é certo que as plantas terão que enfrentar longos períodos de escassez de água, durante a estação seca. Avaliações agronômicas, somadas à mensuração de caracteres fisiológicos associados à tolerância à seca, revelaram variabilidade genética útil ao melhoramento de cana-de-açúcar para a região tropical, onde a maior parte da expansão desta cultura tem ocorrido no Brasil. Nesta região, é comum o uso da irrigação de salvamento durante a primeira estação seca atravessada pela cultura. No entanto, considerando que o etanol é apresentado à sociedade como uma opção ambientalmente mais sustentável que os combustíveis fósseis, é importante que a sua produção não utilize grandes quantidades de água e energia.

## **Conclusões da Comissão Organizadora**

O Simpósio sobre Tolerância à Deficiência Hídrica em Plantas, Adaptando as Culturas ao Clima do Futuro, foi um evento de sucesso, considerando a qualidade e representatividade do público e das palestras apresentadas. Muitos dos presentes manifestaram o interesse em participar de novas edições deste evento que venham a ser realizadas no futuro. Ficaram de fora do escopo desse simpósio muitas culturas para as quais há interesse na pesquisa e melhoramento para tolerância à seca. Por esses motivos, a Comissão Organizadora recomenda a continuidade do evento, com periodicidade de três anos, em locais diferentes e sob coordenação de

diferentes grupos, de forma a maximizar a diversidade de abordagens e a representatividade regional. A Embrapa poderia também realizar eventos semelhantes sobre outros temas de alta relevância e grande transversalidade. O formato de simpósio foi considerado adequado, permitindo que uma grande quantidade de informação fosse apresentada em um tempo relativamente curto. Workshops sobre temas mais específicos, dentro do grande tema “tolerância à seca”, poderiam ser realizados em complemento ao simpósio, em locais e datas diferentes e com maior oportunidade de discussão.

Quanto aos trabalhos apresentados no simpósio, a impressão geral da comissão organizadora é que muitas pessoas estão interessadas no tema e que o país começa a dedicar um esforço significativo ao objetivo de obter cultivares mais tolerantes à deficiência hídrica. Entretanto, não há um plano estratégico sobre como atacar um tema tão complexo. Tal plano estratégico poderia ser elaborado sob coordenação da Embrapa, contemplando, entre outros, os seguintes aspectos:

- i) Análise ex-ante do potencial de impacto da tolerância à seca em diferentes regiões e espécies, no cenário presente e sob projeções de mudanças climáticas, levando em consideração também as alternativas de manejo cultural e irrigação;
- ii) Projeção da capacidade de pesquisa presente e futura que poderá ser dedicada a este tema, incluindo pessoas, infraestrutura e recursos financeiros, considerando, inclusive, o custo de oportunidade destes recursos;
- iii) Padronização de um conjunto mínimo de variáveis fisiológicas e agrônomicas para cada cultura, bem como as metodologias de fenotipagem para tolerância à seca, inclusive plataformas de fenotipagem em larga escala que possam ser de uso comum entre os membros da rede de pesquisa;
- iv) Busca na biodiversidade brasileira de novos genes e/ou metabólitos que possam ser utilizados em estratégias de engenharia genética para tolerância à seca;
- v) Estabelecimento de redes formais de colaboração científica, em âmbito nacional e internacional, que possam formar equipes multidisciplinares com alto potencial de obtenção de resultados;
- vi) Definição das estratégias de transferência de tecnologia quanto à



inserção das cultivares com diferentes níveis de tolerância à seca, quando estas finalmente estiverem disponíveis.

A comissão organizadora agradece a confiança depositada pela Embrapa e pelo Fundo de Pesquisa Embrapa - Monsanto para a organização deste simpósio e espera que o evento e esta publicação possam ter um impacto positivo na pesquisa e desenvolvimento do tema tolerância à seca no Brasil.

*A Comissão Organizadora*



# Programação

**19 de outubro de 2010**

**09:00 – 09:30 ABERTURA**

Kepler Euclides Filho (Diretor-Executivo da Embrapa)

Eugênio César Ulian (Monsanto, Gestor do Fundo Embrapa - Monsanto)

José Mário Schreiner (Presidente da Federação da Agricultura do Estado de Goiás)

## **SESSÃO I - INTRODUÇÃO AO TEMA TOLERÂNCIA À SECA**

**09:30 – 10:30 - Conferência "PLANT BREEDING FOR DROUGHT-PRONE ENVIRONMENTS: MYTH AND REALITY"**

Abraham Blum (Plantstress.com, Israel)

**11:00 – 12:00 - Conferência "SYSTEMS BIOLOGY OF DROUGHT STRESS RESPONSE AND RESISTANCE PATHWAYS"**

Andy Pereira (Virginia Tech, EUA)

## **SESSÃO II - AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA TOLERÂNCIA À SECA**

**14:00 – 15:00 - Conferência "HIGH-THROUGHPUT DROUGHT PHENOTYPING USING RICE AS A MODEL"**

Marnix Peferoen (Crop Design, Bélgica)

**15:00 – 16:00 - Conferência "HOW CAN CROP MODELS ASSIST IN IMPROVING CROP ADAPTATION TO ENVIRONMENTAL CHANGE, NAMELY DROUGHT?"**

Michael Dingkuhn (Cirad, França)

**16:30 – 18:00 Painel "ESTRATÉGIAS DE FENOTIPAGEM DA TOLERÂNCIA À SECA EM CULTURAS".** Walter Quadros (Embrapa Cerrados), moderador.

“USO DA TERMOMETRIA A INFRAVERMELHO NA FENOTIPAGEM PARA TOLERÂNCIA À SECA DE CEREAIS E LEGUMES”. Reinaldo Gomide (Embrapa Milho e Sorgo).

“O CULTIVO DE TRIGO NO CERRADO COMO EXEMPLO PARA DISCUSSÃO DE MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO”. Mauro Cesar Celaro Teixeira (Embrapa Trigo).

“CIAT’S PLANT PHENOTYPING PLATFORM”. Jagadish Rane (CIAT, Colômbia).

“PESQUISA EM TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO”. Cleber Moraes Guimarães (Embrapa Arroz e Feijão).

**20 de outubro de 2010**

### **SESSÃO III - GENÔMICA APLICADA À TOLERÂNCIA À SECA**

08:30 – 09:30 - Conferência “SUGARCANE GENOMICS AND BIOTECHNOLOGY”

Marcelo Menossi (Unicamp)

09:30 – 10:30 - Conferência “EXPLORING GENETIC DIVERSITY FOR DROUGHT TOLERANCE”

Jean Christophe Glazsmann (Cirad, França)

11:00 – 12:30 - Painei “ABORDAGENS GENÔMICAS PARA TOLERÂNCIA À SECA”. Rosana Vianello (Embrapa Arroz e Feijão), moderadora.

“PERFIL GERAL DE EXPRESSÃO ASSOCIADO À SALINIDADE E SECA EM FEIJÃO-CAUPI (*VIGNA UNGUICULATA*)”. Ana Maria Benko-Iseppon (Universidade Federal de Pernambuco).

“GENÔMICA DE POPULAÇÃO 8-WAY-RIL NO ESTUDO DE TOLERÂNCIA À SECA EM ARROZ”. Márcio Elias Ferreira (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

“INTROGRESSION OF USEFUL GENES FROM WILD SPECIES INTO PEANUT WITH THE AID OF GENETIC AND GENOMIC TOOLS: DROUGHT TRAITS”. Soraya Leal-Bertioli (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia).

“ASPECTOS GENÔMICOS PARA TOLERÂNCIA A SECA EM CEREAIS”. Newton Carneiro (Embrapa Milho e Sorgo).

### **SESSÃO IV - ENGENHARIA GENÉTICA APLICADA À TOLERÂNCIA À SECA**

14:00 – 15:00 - Conferência “A LARGE-SCALE ANALYSIS OF FULL-LENGTH CDNA COLLECTION AND DROUGHT-RESPONSIVE GENES IN SOYBEAN”.

Taishi Umezawa (RIKEN Plant Science Center, Japão)

15:00 – 16:00 - Conferência "ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA À SECA ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO"

Alexandre Nepomuceno (Embrapa Soja)

16:30 – 18:00 - Painei "TOLERÂNCIA À SECA VIA ENGENHARIA GENÉTICA". Soraya Leal-Bertioli (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), moderadora.

"THE MECHANISM OF BIP-MEDIATED INCREASES IN DROUGHT TOLERANCE". Elisabeth Fontes (Universidade Federal de Viçosa - UFV)

"TOLERÂNCIA À SECA VIA ENGENHARIA GENÉTICA". Francisco Aragão (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

"BRAZILIAN COTTON CULTIVARS: TOLERANCE TO DROUGHT STRESS". Fátima Grossi (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)

## **21 de outubro de 2010**

### **SESSÃO V - MELHORAMENTO GENÉTICO PARA TOLERÂNCIA À SECA**

08:30 – 09:30 - Conferência "MAIZE BREEDING FOR DROUGHT PRONE ENVIRONMENTS AT CIMMYT"

Gary Atlin (Cimmyt, México)

09:30 – 10:30 - Conferência "AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE MILHO PARA TOLERÂNCIA À SECA NA MONSANTO"

David Butruille (Monsanto, USA)

11:00 – 12:30 - Painei "ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO PARA AMBIENTES SUJEITOS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA". Sidney Parentoni (Embrapa Milho e Sorgo), moderador.

"COMPARAÇÕES DAS SELEÇÕES FENOTÍPICA, BASEADA EM QTL E GENÔMICA EM MILHO". Claudio Lopes Souza Jr. (Esalq/USP)

"DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES DE SOJA COM TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA". Carlos Arrabal (Embrapa Soja)

"ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO PARA AMBIENTES SUJEITOS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA: O EXEMPLO DA CANA-DE-AÇÚCAR". José Bressiani (Canavialis)



# Sumário

## SESSÃO I

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO AO TEMA TOLERÂNCIA À SECA .....</b>                                     | <b>25</b> |
| PLANT BREEDING FOR WATER-LIMITED ENVIRONMENTS – MYTH<br>AND REALITY .....             | 27        |
| SYSTEMS BIOLOGY OF DROUGHT STRESS RESPONSE AND<br>RESISTANCE PATHWAYS IN PLANTS ..... | 29        |

## SESSÃO II

|                                                                                                                    |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>AValiação Fenotípica da Tolerância à Secca.....</b>                                                             | <b>31</b> |
| IDENTIFICATION OF GENES FOR YIELD ENHANCEMENT AND<br>ABIOTIC STRESS TOLERANCE BY HIGH THROUGHPUT PHENOTYPING ..    | 33        |
| USO DA TERMOMETRIA A INFRATERMELHO NA FENOTIPAGEM PARA<br>TOLERÂNCIA À SECA DE CEREAIS E LEGUMES .....             | 35        |
| O CULTIVO DE TRIGO NO CERRADO COMO EXEMPLO PARA<br>DISCUSSÃO DE MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO...     | 51        |
| CIAT-PLANT PHENOTYPING PLATFORM TO ACCELERATE<br>CONVENTIONAL AND MOLECULAR APPROACH FOR CROP<br>IMPROVEMENT ..... | 53        |
| AValiação da Tolerância à Deficiência Hídrica na EMBRAPA<br>ARROZ E FEIJÃO .....                                   | 55        |

### **SESSÃO III**

#### **GENÔMICA APLICADA À TOLERÂNCIA À SECA..... 63**

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| PERFIL GERAL DE EXPRESSÃO ASSOCIADO À TOLERÂNCIA À                   |    |
| SALINIDADE E SECA EM FEIJÃO-CAUPI ( <i>Vigna unguiculata</i> ) ..... | 65 |
| GENOMIC ANALYSIS IN THE STUDY OF DROUGHT TOLERANCE                   |    |
| USING RECOMBINANT INBRED LINES AND RECURRENT SELECTION .....         | 76 |
| EFEITO DA TETRAPLOIDIZAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE                 |    |
| ARACHIS EM CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À TOLERÂNCIA                 |    |
| AO ESTRESSE HÍDRICO E ESTUDOS DE GENÔMICA FUNCIONAL .....            | 83 |
| ABORDAGENS GENÔMICAS PARA TOLERÂNCIA A SECA EM CEREAIS ..            | 89 |

### **SESSÃO IV**

#### **ENGENHARIA GENÉTICA APLICADA À TOLERÂNCIA À SECA 101**

|                                                         |     |
|---------------------------------------------------------|-----|
| ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA À    |     |
| SECA EM PLANTAS ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE FATORES DE      |     |
| TRANSCRIÇÃO .....                                       | 103 |
| THE MECHANISM OF BiP-MEDIATED INCREASES IN WATER STRESS |     |
| TOLERANCE IN SOYBEAN .....                              | 110 |
| MELHORAMENTO DO FEIJÃO PARA TOLERÂNCIA À SECA VIA       |     |
| ENGENHARIA GENÉTICA .....                               | 112 |

### **SESSÃO V**

#### **MELHORAMENTO GENÉTICO PARA TOLERÂNCIA À SECA.. 115**

|                                                        |     |
|--------------------------------------------------------|-----|
| BREEDING FOR IMPROVED DROUGHT TOLERANCE IN MAIZE:      |     |
| CIMMYT'S EXPERIENCE.....                               | 117 |
| EVALUATION AND SELECTION OF DROUGHT TOLERANCE IN MAIZE |     |
| AT MONSANTO .....                                      | 123 |
| COMPARAÇÕES DAS SELEÇÕES FENOTÍPICA, BASEADA EM QTL    |     |
| E GENÔMICA EM MILHO TROPICAL .....                     | 126 |
| DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES DE SOJA COM TOLERÂNCIA   |     |
| À DEFICIÊNCIA HÍDRICA .....                            | 130 |
| ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO PARA AMBIENTES SUJEITOS À  |     |
| DEFICIÊNCIA HÍDRICA: O EXEMPLO DA CANA-DE-AÇÚCAR ..... | 135 |



# **SESSÃO I - INTRODUÇÃO AO TEMA TOLERÂNCIA À SECA**



## PLANT BREEDING FOR WATER-LIMITED ENVIRONMENTS – MYTH AND REALITY

*Abraham Blum<sup>1</sup>*

During the last decade plant breeders, geneticists, plant physiologists and molecular biologists developed their own niche understanding of what constitutes drought resistance and how to genetically tailor plants to sustain production under drought stress. Crosstalk between these disciplines regarding practical solutions has not always been effective or even in existence. Subsequently, several myths and misconceptions developed in each of these disciplines, which might in certain cases divert a breeding program from its track or send a young scientist to follow a mirage. This opinionated presentation discusses briefly the most problematical issues in this respect in the light of real applications to breeding.

The first myth is that plant breeding was not successful in breeding drought resistant crop cultivars, partly because our crops are devoid of genetic variation for drought resistance. Evidence is presented to indicate a historical average genetic gain of about 0.5-0.7% per year in crop yield under water-limited conditions. This gain has been partly driven by the available genetic variation for the trait in our crops.

The second myth is that a “super variety for all season” is a reasonable target in breeding programs. The reality is that there is often a crossover interaction for cultivar yield across water regimes, which dictates a negative relationship between yield potential and yielding capacity under severe water shortage – with few noted exceptions.

The third myth are the written and voiced views that osmotic adjustment is ineffective towards plant production under drought stress because it concerns only survival or it sets a cost in terms of plant carbon available for yield production. Both views do not survive in view of evidence available to date.

The fourth myth is a widely conceived notion that abscisic acid (ABA) is a stress hormone which enhances drought resistance. While ABA induces stomatal closure, reduces transpiration and delays wilting it is now established that plant production requires continued water use and sustained transpiration also under drought stress. ABA might have a role in desiccation tolerance but its general impact towards crop productivity is negative in view of its effect towards retarded growth and reproductive failure. ABA might perhaps have a limited positive role in crop drought resistance under very strict conditions of regulated activity and specific drought stress scenarios.

---

<sup>1</sup> Plantstress.com, Tel Aviv, Israel. E-mail: [ablum@plantstress.com](mailto:ablum@plantstress.com)

The fifth myth is the notion that water-use efficiency is synonymous with drought resistance or that it is a major selection criterion for yield performance under drought stress. It is argued (Blum, 2009) that effective use of water (EUW) and not WUE is the important target in the genetic improvement of yield under drought stress.

Finally, marker assisted selection for yield under drought stress and work with transgenic plants for drought resistance are discussed in terms of their immediate value towards breeding for water limited environments.

## References

Blum, A. 2009. Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crops Res.* 112:119–123

## SYSTEMS BIOLOGY OF DROUGHT STRESS RESPONSE AND RESISTANCE PATHWAYS IN PLANTS

*Arjun Krishnan, Amal Harb, Madana M.R. Ambavaram, Utlwang Batlang, Andy Pereira<sup>1</sup>*

Drought stress response and resistance are complex biological processes that can be best understood in an integrated systems biology view. Plants respond to drought stresses by the activation of cascades of molecular networks involved in stress perception, signal transduction, and the expression of specific stress related genes and metabolites. To dissect the complex pathways involved in drought stress response and resistance we use the model plants *Arabidopsis* and rice, and project the information to other crops like maize. Gene expression analysis of drought treated *Arabidopsis* and rice in vegetative and reproductive tissue, showed a high correspondence of differentially regulated orthologous genes, supporting that perception and resistance to dehydration/drought has evolved in plants through some common conserved mechanisms. To develop a systems view of plant biological processes, we created probabilistic gene interaction networks in *Arabidopsis* by integrating multiple functional genomics data, and in rice gene coexpression networks. From these global gene interaction networks we derived drought response networks. We use these networks to transfer comparative functional information between the plant systems. To probe the gene networks and validate the interactions we studied the effect of drought responsive regulatory genes as genetic perturbations in the networks. A set of 200 *Arabidopsis* drought stress regulatory genes (SRGs) differentially expressed under drought were tested to characterize their knockout mutants for altered drought response phenotypes under controlled moderate drought, and representative mutants were used in microarray experiments. The altered gene expression responses mapped onto the drought gene interaction networks revealed sets of drought-regulated genes that are involved in basic drought protective mechanisms. Simultaneously in rice, overexpression and knockout lines of candidate drought SRGs are being tested for their drought response phenotypes and the altered gene expression patterns. This genetic perturbation data of altered gene expression patterns of SRGs is iteratively used to create a validated drought gene interaction network. The objective is to develop a network-based model of gene pathways responsible for different parameters of drought response and resistance.

---

<sup>1</sup> Virginia Bioinformatics Institute, Virginia Tech, USA. E-mail: pereira@vbi.vt.edu



## **SESSÃO II - AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA TOLERÂNCIA À SECA**





## IDENTIFICATION OF GENES FOR YIELD ENHANCEMENT AND ABIOTIC STRESS TOLERANCE BY HIGH THROUGHPUT PHENOTYPING

*Frankard V., Vandenabeele S., Reuzeau C., Lejeune P., De Wolf J., Puzio P., Van Camp W and Peferoen Marnix<sup>1</sup>*

Population growth is expected to rise to above 9 billion by 2050, necessitating an increase in food production. Increasing social standards will cause an increase in meat consumption, triggering a higher feed production. Annually, the use of agricultural products for fuel is increasing by 20%. To meet these demands agricultural production needs to double within the next 20 years. This doubling of production has to occur while arable land is limited, farmer population is shrinking, water usage for agriculture is under pressure and environmental impact of agriculture must be decreased. Basically, we will have to find ways to produce more with less. The innovation potential of mechanization, breeding, fertilizers and crop protection products is limited. Biotechnology is the key for the quantum leap advancement in agricultural productivity.

CropDesign is a biotech company delivering agronomic biotech traits for the global seed markets. The company's trait discovery and development program focuses on enhancing grain yield of crops such as corn, soybean, wheat and rice, and increasing biomass of energy crops. It is powered by TraitMill™, a unique high-throughput platform for phenotypic analysis. This platform uses rice as a model crop and has a capacity for testing more than 1,000 different gene constructs per year in a controlled environment. The plants are grown in gutters and with the use of robots for automated transportation are moved from the greenhouse compartment to an imaging cabinet where digital images are taken from the roots and the above ground part of the rice plants. The TraitMill™ platform then uses digital imaging tools for plant phenotype evaluation, proprietary image analysis software for data production and statistical analysis for generating the results. Phenotypic parameters include growth rate, flowering time, vegetative and root biomass, and the most relevant grain yield components, such as number of panicles, seed number, seed filling, seed size and total seed yield. Because of the gutter system, plants can be supplied with variable amounts of water and nutrients so that the same parameters can be measured for plants grown under salt-, nutrient- or water-deficiency stress.

Drought stress in the field may occur throughout the plant's lifecycle. Two different TraitMill™ drought tolerance screens specifically target higher tolerance during the vegetative or reproductive growth phase of the plant. The susceptibility to water stress of many crops is more pronounced at the

reproductive stage and causes the greatest reduction in grain yield when stress coincides with the irreversible reproductive processes. In the TraitMill™ reproductive drought stress screen, plants are grown under normal conditions until they approach the heading stage. A stop in watering during grain filling until the soil water content goes down certain thresholds mimics nicely the mid summer hot and dry field conditions. In the more recently developed TraitMill™ vegetative drought screen, seedlings are subjected to several cycles of drought stress and allowed to recover at later stages. Humidity probes inserted in randomly chosen pots monitor constantly the soil water content during the drought screens.

Over the years, CropDesign has identified a large number of genes that improve one or more of the key phenotypic parameters and that cause a significant increase in yield, a better usage of nitrogen or improved tolerance to drought stress. Rice plants with improved productivity have been tested in field trials and are moved into product development. TraitMill™ leads for increased yield or improved tolerance to abiotic stress are also being validated in crops such as corn, soybean and sugarcane.

## USO DA TERMOMETRIA A INFRAVERMELHO NA FENOTIPAGEM PARA TOLERÂNCIA À SECA DE CEREAIS E LEGUMES

Reinaldo Lúcio Gomide<sup>1</sup>

**ABSTRACT: Infrared Thermometry Use for Drought Tolerance Phenotyping of Cereals and Legumes-** Remotely-sensed infrared crop canopy temperature ( $T_c$ ) measurements provide an efficient method for rapid, non-destructive monitoring of the whole-plant response to water stress. With the advent of portable infrared radiation thermometers (IRT's), the concept of using  $T_c$  measurements to infer water stress and transpirational rates of genotypes has been advanced and received some interest as a drought-tolerance screening technique for research purposes. A crop water stress index (CWSI) was developed by Jackson (1982) using the rational basis for relating plants water stress and  $T_c$  by means of the Monteith (1973) and the surface energy balance equations. The infrared technology has improved to the point that light weight (about 1kg) hand-held instruments, accurate to  $\pm 0.5^\circ\text{C}$ , are available on the market. Today, some IRT's sensors can be equipped with dedicated microprocessors that translate  $T_c$  measurements and ambient weather conditions directly into CWSI. However, it is important that these sensors be selected to operate under crop condition. This means that they should meet the following specifications: low temperature range readings (ideally up to  $80^\circ\text{C}$ ), 8–14 mm band wave length, and emissivity set to 0.98 (for most crops). There are at least two main situations in which  $T_c$  measurements might best be used in screening for drought tolerance. The first involves leaf temperature traits that are measured under low soil moisture (water stressed) conditions, where plants showing a cooler  $T_c$  are transpiring at higher rates and, hence, are capable of relatively high rates of photosynthesis and growth and higher yields. The second situation can occur in genotypes that exhibit a warmer  $T_c$  under well-watered conditions. This would indicate greater drought resistance, based on the reasoning that plants with a higher  $T_c$  transpire less, thus saving soil water for growth and reproductive effort later in the season.

**Keywords:** remote sensing, canopy temperature, crop water stress index, genotype screening.

**RESUMO:** Medidas remotas da temperatura do dossel de plantas ( $T_c$ ), tomadas na banda do infravermelho termal, fornecem um método eficiente para o monitoramento rápido e de uma forma não destrutiva da resposta da planta inteira ao estresse hídrico. Com o advento de termômetros de radiação a infravermelho portáteis (IRT's), o conceito de usar medições de  $T_c$  para inferir sobre o estresse hídrico e as taxas de transpiração de genótipos tem avançado e recebido importância como uma técnica de seleção para tolerância à seca, com fins de investigação. Um índice de estresse hídrico de cultura (IEHC) foi desenvolvido por Jackson (1982), utilizando a base racional para relacionar o estresse hídrico

<sup>1</sup> Embrapa Milho e Sorgo. Sete Lagoas, MG. E-mail: gomide@cnpmis.embrapa.br

de plantas e a  $T_c$ , por meio das equações de Monteith (1973) e do balanço de energia da superfície. A tecnologia a infravermelho evoluiu a tal ponto que instrumentos portáteis de peso leve (cerca de 1 kg) estão disponíveis no mercado, com precisão de  $\pm 0,5$  °C. Hoje, alguns sensores de IRT's podem ser equipados com microprocessadores dedicados, que traduzem medições de  $T_c$  e de condições climáticas do ambiente diretamente em IEHC. No entanto, é importante que estes sensores sejam selecionados para operar nas condições das culturas. Isso significa que eles devem possuir as seguintes especificações: leituras de baixa faixa de temperatura (ideal até 80 °C), comprimento de onda na banda de 8-14  $\mu\text{m}$  e emissividade ajustada para 0,98 (para a maioria das culturas). Há pelo menos duas principais situações em que as medições  $T_c$  poderiam ser bem utilizadas na seleção de genótipos para tolerância à seca. A primeira envolve as características da temperatura foliar que são medidas sob baixa condição de umidade do solo (com estresse hídrico), onde as plantas mostrando um  $T_c$  mais baixo (mais frio) estão transpirando a taxas mais elevadas e, portanto, são capazes de taxas relativamente elevadas de fotossíntese, crescimento e produção. A segunda situação pode ocorrer em genótipos que apresentam um maior valor de  $T_c$  (mais quente) sob condições bem irrigadas (sem estresse hídrico). Isto poderia indicar uma maior resistência à seca, com base no raciocínio de que as plantas com maior  $T_c$  transpiram menos, então poupando água no solo para ser usada no seu crescimento e mais tarde no ciclo na sua fase reprodutiva.

**Palavras chave:** sensoriamento remoto, temperatura do dossel, índice de estresse hídrico da cultura, seleção de genótipos.

## Caracterização e Manejo de Estresse Hídrico

Um dos problemas principais na fenotipagem de genótipos de plantas, cereais e legumes para a caracterização e manejo de estresse hídrico é a limitação e até mesmo a falta de conhecimento e experiência dos técnicos e engenheiros com os princípios básicos para operar e manejar adequadamente os sistemas de irrigação, de modo a garantir um ótimo controle da água de irrigação e uma caracterização precisa do regime da água de irrigação, que deve ser diferenciado nos sítios de fenotipagem para tolerância à seca. Devido a isso, é necessário um programa de treinamento em operação, avaliação e manejo de água de sistemas de irrigação em condições de campo, principalmente sob condições de limitação ou restrição hídrica.

A programação correta da irrigação no que diz respeito ao momento de aplicação da água nas quantidades adequadas é essencial quando o suprimento da água é limitado e a demanda evaporativa da atmosfera é alta. Portanto, decisões corretas devem ser tomadas com relação a essa programação, baseadas em informações e conhecimentos do sistema irrigado dos genótipos de plantas, do estágio de desenvolvimento desses genótipos e da previsão antecipada de redução de produção devido ao estresse hídrico induzido, bem como do registro em base contínua de dados de condições climáticas e de solo para se ter um registro de mudanças e variações ao longo do ciclo de crescimento das plantas (Jensen et al., 1990).

## Medições do Status de Água no Solo para Tolerância à Seca

A medição da água armazenada no perfil do solo, na profundidade efetiva do sistema radicular, e a determinação da capacidade de um determinado solo de armazenar água são importantes para a definição precisa do regime de irrigação de genótipos de plantas e consequentemente do controle da *disponibilidade de água no solo (DAS)* na região efetiva do sistema radicular.

Nos ensaios em campo de tolerância à seca, genótipos de plantas são submetidos a estresse hídrico, que pode ser imposto durante todo o ciclo das plantas ou apenas em determinados estádios de seu ciclo fenológico. O período de aplicação, a duração e a intensidade do estresse hídrico dependem da sensibilidade dos genótipos ao estresse e dos objetivos do estudo. No Brasil, para cultura do milho, cultivada no período de segundo cultivo ("safrinha"), o estresse é aplicado antes do início da floração. Já para a cultura do sorgo o estresse pode ser aplicado na floração. Geralmente, para as culturas que possam ser submetidas a períodos secos na fase inicial, o estresse pode ser aplicado antes da floração.

Simplesmente suspendendo o suprimento de água via irrigação não significa que os genótipos de plantas sofram estresse hídrico. A capacidade de retenção de água no solo varia de solo para solo e isso deve ser levado em consideração ao planejar um experimento de campo de tolerância à seca. Por outro lado, não é desejável que um determinado genótipo sofra de murcha permanente e morra. O nível de estresse que um determinado genótipo sofrerá depende da interação entre plantas nas fileiras de plantio, do tipo e profundidade de solo e também de condições climáticas. Portanto, é fundamental que algum tipo de monitoramento seja feito sobre esses três elementos. Monitoramento do conteúdo de água do solo e do estado hídrico da planta permite a quantificação e caracterização do nível de estresse hídrico e ajuda a tomar uma decisão sobre quando interromper a aplicação do estresse hídrico nos ensaios de campo.

## Medições da Necessidade e do Status de Água nas Plantas

A determinação da necessidade hídrica de genótipos de plantas, cereais e legumes, ou seja, evapotranspiração ( $ET_c$ ), é um processo combinado de transferência de água, na forma de vapor, a partir da superfície vegetativa para a atmosfera, incluindo a evaporação direta da superfície do solo e transpiração das plantas. Nesse processo de transferência de vapor d'água, elementos climáticos da atmosfera controlam a demanda de água, atuando como um dreno no contínuo solo-planta-atmosfera.

A programação da irrigação deverá seguir a variação das necessidades de água dos genótipos de plantas, em diferentes ambientes, durante o ciclo fenológico das plantas, a fim de assegurar alta eficiência de uso de água e alta produção dos genótipos (Doorenbos e Kassam, 1979). Na maioria dos casos, o momento de aplicação da água de irrigação e a quantidade de água a aplicar estão diretamente relacionados.

A fim de determinar a  $ET_c$  dos genótipos de plantas é necessário obter em primeiro lugar a evapotranspiração potencial ( $ET_p$ ) ou evapotranspiração de referência ( $ET_o$ ) por meio da equação modificada e combinada de Penman-Monteith (Allen et al., 1998; Doorenbos e Pruitt, 1977; Smith et al., 1991):

$$ET_o = \frac{\delta}{\delta + \gamma} (R_n - G) \frac{1}{\lambda} + \frac{\gamma}{\delta + \gamma} \frac{900}{T + 273} U_2 (e_a - e_d)$$

Onde,  $ET_o$  é a evapotranspiração de referência de um genótipo hipotético (em  $\text{mm d}^{-1}$ ),  $R_n$  é o saldo de radiação (em  $\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ),  $G$  é o fluxo de calor no solo (em  $\text{MJ m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ),  $T$  é a temperatura do ar (em  $^{\circ}\text{C}$ ),  $U_2$  é a velocidade do vento a 2 m de altura (em  $\text{m s}^{-1}$ ),  $(e_a - e_d)$  é o déficit de pressão de vapor do ar (DPV; em kPa),  $\delta$  é a inclinação da curva de saturação de pressão de vapor (em  $\text{kPa } ^{\circ}\text{C}^{-1}$ ),  $\lambda$  é o calor latente de evaporação da água (em  $\text{MJ kg}^{-1}$ ),  $\gamma^*$  é a constante psicrométrica modificada ( $\gamma = 1 + 0,33 U_2$ , em  $\text{kPa } ^{\circ}\text{C}^{-1}$ ), e 900 é o fator de conversão de unidade. As medições climáticas podem ser obtidas a partir de uma estação meteorológica automática (EMA) em tempo real.

O cálculo da  $ET_c$  dos genótipos de cereais e leguminosas é feito multiplicando o valor de  $ET_o$  pelo valor do coeficiente de cultura do respectivo genótipo ( $K_c$ ). Todo o processo pode ser realizado automaticamente, desde a aquisição de dados climáticos até o ponto de cálculo de  $ET_c$  de cada genótipo. Cuidados devem ser tomados para o uso adequado de valores de  $K_c$  de cada genótipo para diferentes sítios específicos de fenotipagem para a tolerância à seca.

## Princípios da Termometria a Infravermelho

A tecnologia de registro da temperatura do dossel ( $T_c$ ) de genótipos de cereais e legumes é um método eficiente para a avaliação e seleção rápida de genótipos ("screening") por meio de sensoriamento remoto (Wanjura e Upchurch, 2000; Kostrzewski et al., 2002) com o monitoramento e registro não-destrutivo da resposta da planta inteira ao estresse hídrico, utilizando transdutores de temperatura ou termômetros a infravermelho (IRTs). A porção do infravermelho termal do espectro tem sido usada para acessar e avaliar o estado hídrico de plantas, baseado na correlação direta existente entre as temperaturas do dossel das plantas ( $T_c$ ) e do ar ( $T_a$ ) e o estresse hídrico (Jackson, 1982). Além disso, outros fatores ambientais de clima (déficit de pressão de vapor do ar, saldo de radiação, resistência aerodinâmica e resistência do dossel da cultura) precisam ser considerados para uma boa medida e caracterização dos níveis de estresse hídrico das plantas (Jackson, 1982; Sadler et al., 2002).

Um índice de estresse hídrico de cultura (IEHC) foi posteriormente desenvolvido por Jackson (1982), a partir do balanço de energia da cultura, utilizando a base racional para relacionar o estresse hídrico das plantas e  $T_c$  por meio das equações propostas por Monteith e Szeicz (1962) e Monteith (1973), relacionando a diferença  $T_c - T_a$  com o DPV do ar, saldo de radiação, resistência do dossel da cultura e resistência aerodinâmica:

$$T_c - T_a = \frac{r_a(R_n - G)}{\rho c_p} \cdot \frac{\gamma(1 + r_c/r_a)}{\Delta + \gamma(1 + r_c/r_a)} - \frac{e_a^* - e_a}{\Delta + \gamma(1 + r_c/r_a)}$$

onde,  $T_c$  é a temperatura do dossel de genótipos (em °C),  $T_a$  é a temperatura do ar (em °C),  $R_n$  é o saldo de radiação (em  $W m^{-2}$ ),  $G$  é o fluxo de calor de ou para o solo abaixo do dossel (em  $W m^{-2}$ ),  $\Delta$  é a inclinação da curva de saturação de pressão de vapor (em  $kPa ^\circ C^{-1}$ ),  $e_a^*$  é a pressão de vapor saturado em  $T_c$  (em Pa),  $e_a$  é a pressão atual do vapor no ponto de medição de  $T_a$  (em Pa),  $\rho$  é a densidade do ar (em  $kg m^{-3}$ ),  $c_p$  é a capacidade térmica do ar à pressão constante (em  $J kg^{-1} ^\circ C$ ),  $\gamma$  é a constante psicrométrica (em  $Pa ^\circ C^{-1}$ ),  $r_a$  é a resistência aerodinâmica à transferência de calor e massa ( $s m^{-1}$ ), e  $r_c$  é a resistência do dossel à transferência de vapor d'água ( $s m^{-1}$ ). A transferência de calor sensível ( $H$ , em  $W m^{-2}$ ) do dossel das plantas (genótipos) para o ar é dada pelo lado esquerdo da equação e a transferência de calor latente para o ar ou a transferência de calor através da evapotranspiração das plantas é dada pelo terceiro termo do lado direito dessa equação.

Jackson (1982) discutiu os limites de  $T_c - T_a$  para condições extremas de regimes hídricos, um limite superior ( $dT_u$ ) para o máximo estresse hídrico, em que  $r_c$  aumenta indefinidamente, isto é,  $r_c$  tende ao infinito; e outro limite inferior ( $dT_l$ ) para uma condição de plantas sem limitação hídrica, em que se tem  $r_c$  tendendo a zero, sob uma condição de evapotranspiração potencial ou máxima ( $r_{cp}$  e  $ET_p$ ). Com base nesses dois limites, a equação acima se torna respectivamente:

$$T_c - T_a = dT_u = \frac{r_a(R_n - G)}{\rho c_p}$$

$$T_c - T_a = dT_l = \frac{r_a(R_n - G)}{\rho c_p} \cdot \frac{\gamma}{\Delta + \gamma} - \frac{e_a^* - e_a}{\Delta + \gamma}$$

O índice de estresse hídrico da cultura (IEHC) é calculado com base na seguinte equação:

$$IEHC = 1 - (ET_r / ET_p) = (dT - dT_l) / (dT_u - dT_l)$$

em que,  $ET_r$  e  $ET_p$  são a evapotranspiração real ou atual e potencial ou máxima da cultura, respectivamente,  $dT$  é a diferença  $T_c - T_a$  atual,  $dT_l$  e  $dT_u$  são os limites inferior e superior de  $T_c - T_a$ , respectivamente, que constituem as linhas básicas não estressada ( $dT_l$ ) e estressada ( $dT_u$ ), ajustadas por meio de equações de regressão, relacionando-se a diferença  $T_c - T_a$  com o DPV.

A necessidade hídrica da planta, ou  $ET_c$ , deve ser avaliada a partir de medição dos termos da última equação. Como antes,  $T_c - T_a$  devem ser monitorados com um IRT, um saldo radiômetro deve registrar  $R_n$ , e placas de fluxo de calor do solo devem ser usadas para medir  $G$ . Durante o intervalo relativamente estreito de medição de temperatura e pressão na maioria das condições de

ambiente, os parâmetros  $\lambda$ ,  $c_p$ ,  $\gamma$  e  $\rho_w$  geralmente podem ser considerados constante. No entanto, esses parâmetros também podem ser determinados como funções de temperatura e pressão, se necessário.

As medições de diferenças de  $T_c - T_a$  podem ser tomadas com um dos modelos portáteis de transdutores IRT disponíveis, que deve ser configurado para medir tanto  $T_a$  e  $T_c$ , ou a diferença  $T_c - T_a$ . No entanto, é importante que os modelos de transdutores selecionados para operar sob condições de avaliação e seleção de genótipos para tolerância à seca sigam as seguintes especificações: leituras de baixa faixa de temperaturas de dossel (idealmente até 80 °C); comprimento de onda na banda de 8-14  $\mu\text{m}$ , ou seja, a porção termal do espectro eletromagnético; e emissividade ajustada para 0,98 (para a maioria dos genótipos de cereais e legumes). Para utilização das equações apresentadas há necessidade de registrar em intervalos de pelo menos uma hora os parâmetros de velocidade média do vento a 2 m de altura, DPV do ar e  $R_n$  próximo às parcelas experimentais. Com isso é possível fazer uso das equações que relacionam a diferença real  $T_c - T_a$  (dT).

O uso de  $T_c$  para detectar estresse hídrico em plantas é baseado na relação estreita e inversa entre a  $T_c$  e o resfriamento pela taxa de transpiração das folhas (Jackson, 1982). A água transpirada evapora e resfria as folhas abaixo da temperatura do ar ao seu redor. Com o aumento de estresse hídrico da planta, a resistência ao transporte de vapor d'água devido à energia incidente será particionada cada vez mais em direção ao calor sensível (H) (Campbell e Norman, 1990). A fim de dissipar esse calor adicional,  $T_c$  deve então subir. Portanto, as medições de diferenças de temperaturas  $T_c$  e  $T_a$  (logo acima do dossel, 1,5 m) podem fornecer uma base para a detecção e quantificação de estresse hídrico de plantas.

## Fenotipagem de Tolerância à Seca com Medições de Temperatura do Dossel de Genótipos

Medição remota de temperatura do dossel de genótipos ( $T_c$ ) por meio de um transdutor de temperatura a infravermelho é uma tecnologia eficiente para avaliação e acompanhamento, de uma maneira rápida e não destrutiva, das respostas de plantas inteiras submetidas a pressão de seleção ao estresse hídrico. Com o advento de IRTs portáteis, o conceito de usar medições  $T_c$  para inferir estresse hídrico e consequentemente as taxas de transpiração de genótipos foi bastante aprimorado e recebeu bastantes adeptos para fins de investigação científica no seu uso como uma técnica de "screening" visando a tolerância à seca. A tecnologia dos transdutores a infravermelho melhorou a tal ponto que instrumentos portáteis de peso leve (cerca de 1 kg), com uma precisão de  $\pm 0,5$  °C, estão disponíveis no mercado (Jackson et al., 1981). Hoje, alguns sensores IRTs podem ser equipados com microprocessadores dedicados, que integram diretamente medições de  $T_c$  e de alguns parâmetros climáticos do ambiente para fornecer e registrar diretamente o IEHC.



O uso de respostas de  $T_c$  de genótipos de plantas de parcelas sob diferentes regimes hídricos (de bem irrigado à vários níveis de estresse de água) depende da estratégia de manejo da água de irrigação na área da parcela (incluindo a água de precipitação e irrigação), da espécie do genótipo da planta envolvida e da sensibilidade ao estresse hídrico desse genótipo em diferentes fases de seu ciclo de crescimento. No entanto, existem algumas limitações no uso de medidas de  $T_c$  de ambientes com bastante limitação hídrica- seca. Com o aumento do déficit hídrico do solo, a variabilidade de textura e da capacidade de retenção de água solo se torna uma fonte importante de variação que pode mascarar diferenças de respostas genotípicas. Outra limitação é que a medição remota de  $T_c$  requer uma copa densa cobrindo completamente a superfície do solo (Blum et al., 1982; Clarke e McCaig, 1982; Jackson, 1982), a fim de evitar erros decorrentes da visão da superfície do solo exposto. No entanto, sob condições de seca extrema, o fechamento do dossel completo pode nunca ser atingido. Essa ultima limitação pode ser atenuada com o uso de IRTs com baixo campo de visada de sua lente, permitindo a leitura de  $T_c$  de até uma só folha, quando a leitura é realizada bastante próxima a essa folha.

O índice de estresse de temperatura (IET), definido por Gardner et al (1986) como a diferença de  $T_c$  obtido ao meio-dia entre uma localização específica e a área de produção de rendimento máximo para cada híbrido de milho, foi usado para estabelecer uma forma de relação entre IET e produção relativa de grãos para a avaliação de tolerância à seca de híbridos de milho. Eles encontraram correlação positiva ( $r = 0,70$ ;  $P < 0,01$ ) entre as temperaturas de dossel sem estresse hídrico e rendimento de grãos de híbridos de milho e também relataram que os valores cumulativos de IET podiam ser usados para estimar a produtividade de grãos de  $\pm 4\%$  para os híbridos específicos. Eles consideraram que essa ferramenta é de potencial importância para a seleção de resposta à seca em milho.

Vários autores (Blum et al., 1982; Ehrler et al., 1978; Hatfield et al., 1987; Jackson, 1982) têm apontado que a temperatura das folhas das plantas tem sido reconhecida como um bom indicador da disponibilidade de água das plantas. Resultados de trabalhos relatados por Idso et al (1977), Jackson et al (1977) e Jackson et al (1981) estabeleceram um método para quantificar o estresse hídrico de plantas com base em medições de diferenças entre  $T_c$  e  $T_a$ .

Existem pelo menos duas principais situações em que as medições de  $T_c$  poderiam ser melhor utilizadas na seleção ("screening") para tolerância à seca. A primeira envolve as características da temperatura foliar que são medidas sob baixas condições de umidade do solo (estresse hídrico), onde as plantas mostrando valores de  $T_c$  mais baixos (um efeito de "cooler") estão transpirando a taxas mais elevadas e, portanto, são capazes de taxas relativamente elevadas de fotossíntese e crescimento e consequentemente maior produção. A segunda situação pode ocorrer em genótipos que

apresentam valores de  $T_c$  mais elevados (quentes) em condições bem irrigadas (sem estresse hídrico). Isto poderia indicar uma maior tolerância à seca, com base no raciocínio de que as plantas com maior  $T_c$  transpiram menos, poupando água no solo para o seu crescimento e o seu esforço reprodutivo mais tarde, no final de seu ciclo fenológico - a chamada "estratégia conservadora" daquelas plantas.

## Aplicação, Resultados e Discussão do Uso da Tecnologia

Gardner et al (1986) relataram que a redução da produtividade em milho sob condições de falta de água foi menor para o híbridos que mantiveram temperaturas ligeiramente mais frias sob pressão de seleção devido a limitação hídrica.

Alguns investigadores têm utilizado medidas de  $T_c$  de parcelas com estresse hídrico para avaliar a resposta dos genótipos à seca. Estabilidade de rendimento sob diferentes condições de umidade no solo tem sido caracterizada por Blum et al (1989), por meio da medição de  $T_c$  em genótipos de trigo submetidos à seca. O autor encontrou uma correlação positiva ( $r = 0,72$ ,  $p < 0,01$ ), entre o Índice de susceptibilidade à seca e às temperaturas do dossel entre genótipos, indicando que os genótipos suscetíveis à seca, que sofreram as maiores perdas de rendimento sob estresse, também tenderam a apresentar um valor de  $T_c$  maior (mais quente) ao meio-dia. Em sorgo sob condições de estresse hídrico,  $T_c$  foi geralmente de  $3,2 - 3,7$  °C mais quente do que em plantas sem estresse de água, bem irrigadas (Chaudhuri e Kanemasu, 1982). Esses autores encontraram que os rendimentos dos híbridos de sorgo foram negativamente correlacionados com a média sazonal  $T_c$  ( $r = -0,92$ ;  $P < 0,05$ ) e as diferenças de temperaturas  $T_c - T_a$  ( $r = -0,94$ ;  $P < 0,05$ ). Variação genotípica de temperatura foliar também foi observada em soja cultivada em ambientes estressados (Harris et al., 1984), e resultados semelhantes foram relatados para a cultura da batata (Stark e Pavek, 1987).

Sob condições irrigadas e sem estresse hídrico  $T_c$  fornece uma boa indicação do desempenho do rendimento potencial de um genótipo durante a seca e pode ser utilizada como uma técnica eficaz para avaliar a resposta genotípica à seca. Singh e Kanemasu (1983) encontraram uma correlação negativa significativa ( $r = -0,81$ ;  $P < 0,05$ ) entre produção de grãos e média do período da tarde de  $T_c$  em genótipos de milho, em condições irrigadas. A correlação entre a produtividade média e a média do período da tarde de  $T_c$  medido em condições não irrigadas também foi negativa, mas fraca ( $r = -0,27$ ;  $P < 0,05$ ). Eles classificaram genótipos de milho (*Pennisetum americanum* L), com valores de  $T_c$  medido, relativamente mais elevados (quentes) e mais baixos (frios), em condições irrigadas. Genótipos com  $T_c$  mais elevados (quentes) sob condições irrigadas, quando cultivados sob condições não irrigadas, tiveram um rendimento significativamente maior que os genótipos com valores de  $T_c$  mais baixos em condições não irrigadas (sequeiro).

Chaudhuri et al (1986) constataram que os genótipos de sorgo e milho apresentaram maiores valores de  $T_c$  (mais quentes) e foram os mais produtivos em geral, que os genótipos mais frios sob condições de estresse de seca. Em outro estudo, Stark et al (1991) relataram que genótipos de batata (*Solanum tuberosum* L) mais quentes sob condições bem irrigada também foram geralmente menos suscetíveis à seca do que os genótipos mais frios. Pinter et al (1990) compararam as temperaturas do meio-dia do dossel de genótipos de trigo bem irrigados com o rendimento relativo de grãos sob estresse de seca. As cultivares que foram mais quentes sob condições bem irrigada mantiveram o maior rendimento relativo quando expostas a regimes de déficit de irrigação ( $r = 0,78$ ;  $P < 0,05$ ).

A relação entre as diferenças de  $T_c$  e  $T_a$  ( $T_c - T_a = \Delta T$ ) e DPV do ar foi usada por alguns pesquisadores para avaliar a resposta à seca. Chaudhuri et al (1986) desenvolveram relações entre DPV e  $\Delta T$  medido de parcelas bem irrigadas e, em seguida, usaram essas relações para avaliar a resposta à seca de 219 genótipos de sorgo. Esses autores encontraram que os genótipos de sorgo que foram menos sensíveis a mudanças no DPV produziram mais grãos em condições de estresse hídrico.

Um termômetro a infravermelho (National, modelo ER 2008), posicionado num ângulo de cerca de  $45^\circ$  em relação à superfície do dossel das plantas, a uma distância de 2 m, resultando num diâmetro de visada de aproximadamente 7 cm, com o operador realizando quatro leituras voltadas para cada um dos pontos cardeais, foi usado por Albuquerque et al., (1998) para a obtenção de valores de IEHC de um feijoeiro irrigado, sob 4 regimes hídricos diferentes, no período da fase de crescimento entre os 29 e 80 dias após a semeadura (DAS). Todos os quatro tratamentos hídricos receberam um total de 118,8 mm de água aplicada da semeadura até aos 28 DAS, com intervalo médio entre as irrigações de quatro dias. Após esta fase de crescimento da cultura, iniciou-se a diferenciação dos tratamentos hídricos, com a aplicação de lâminas de irrigação diferenciadas, com base nas frequências de irrigação de 4, 8, 12 e 16 dias, que constituíram os tratamentos. Da semeadura à colheita da cultura, as quantidades totais de água aplicada foram de 439,6; 385,6; 326,5 e 290,4 mm para os tratamentos T4, T8, T12 e T16, respectivamente.

As Figuras 1 e 2 mostram a variação do IEHC com o período de crescimento (expressado como DAS) para as quatro frequências de irrigação (T4, T8, T12 e T16) e dois períodos de medições (manhã: 10:00 às 11:00 horas e tarde: 13:00 às 14:00 horas), respectivamente (Albuquerque et al., 1998). O tratamento T4 foi considerado como aquele em que houve um adequado suprimento de água para a cultura, sem restrição hídrica. Os resultados mostram que T4 apresentou as menores variações nos valores de IEHC, que foram mantidos próximo ao nível de zero, indicando não acarretar estresse hídrico à cultura. A análise dos dois períodos de medições, manhã e tarde, indicou uma tendência similar nas variações dos valores de IEHC.

No entanto, os valores mais elevados de IEHC foram obtidos durante as medições do período da tarde. Isso sugere que o melhor período para as medições de  $T_c$  é o da tarde. O tratamento que causou os maiores níveis de IEHC foi o T16, que atingiu valores de 0,26 e 0,40 para os períodos da manhã e tarde respectivamente. No geral, observou-se que os valores de IEHC de cerca de 0,20 podem ser usados como um limite nas estratégias de manejo de água de irrigação, para diferenciar as condições de regime hídrico de não-estressado para estressado, sem acarretar perdas significantes de produção.

A termometria a infravermelho foi usada com um sistema de posicionamento global diferencial (DGPS) para a espacialização de índice de estresse hídrico da cultura (IEHC) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em área irrigada por pivô central (Gomide et al., 2005), com o intuito de integrar os dados de IEHC, altimetria da área e produtividade de grãos a um sistema de informação geográfica (SIG). Para isso, usou-se um pivô central de 38 ha, na Embrapa Milho e Sorgo, instalado num Latossolo Vermelho-Escuro álico, em área de cerrado. Na ocasião da colheita, os dados de produtividade da área foram obtidos por meio de uma automotriz dotada de antena, receptor DGPS e monitor automático de produtividade de grãos. A temperatura do dossel da cultura ( $T_c$ ) foi registrada por meio de um IRT, da Everest Interscience, modelo 510B, com ângulo de visada de 1°, faixa de espectro de 8 a 14  $\mu$ m e emissividade de 0,98. As leituras de  $T_c$  foram realizadas aos 74 dias após a semeadura (12/09/2002), no estágio fenológico R6 ou floração, no horário de 9 às 16 h, sob condição de céu claro, com o IRT distanciado de 2 a 3 m dos alvos e o eixo de visada do instrumento formando um ângulo de cerca de 45° em relação à superfície do dossel da cultura.

As leituras de  $T_c$  foram realizadas próximo às direções de deslocamento das torres do pivô central, com visadas do IRT nos sentidos leste-oeste e norte-sul (Figura 3). O transdutor, mantido sempre a 1,5 m de altura acima do dossel da cultura, registrou também os valores de temperatura do ar ( $T_a$ ), déficit de pressão de vapor do ar (DPV) e radiação solar. Com o auxílio de um DGPS, via satélite, da Trimble (modelo AG114), de precisão submétrica, foram georreferenciados as áreas de amostragem de leituras do IRT e os dados de altimetria da área (Figura 3). A área irrigada apresentou superfície uniforme, suavemente ondulada, com declividade média de 7,9 % na direção ao eixo leste-oeste e desnível total de 55 m. A integração dos dados georreferenciados de elevação, IEHC e produtividade da cultura ao sistema de informação geográfica (SIG) foi realizada com o “software” SPRING, versão 4.0, para posterior acesso, processamento e análises de variabilidade desses dados na área do pivô (Gomide et al., 2005).

Os mapas de variação do índice de estresse hídrico de cultura (IEHC) e da produtividade de grãos de feijão na área do pivô central encontram-se na Figura 4. De um modo geral, os valores de IEHC variaram de 0,0 a 0,2 e 0,2 a 0,4 em 65,3% e 15,3% da área irrigada, respectivamente (Gomide et al.,

2005). Para a cultura irrigada, os níveis de produtividade foram baixos. Isto pode ser justificado pela baixa uniformidade de distribuição de água do pivô, principalmente nas áreas mais elevadas (aclive) onde avaliações de campo forneceram valores de coeficiente de uniformidade de Christiansen da ordem de 68 %. A produtividade de grãos variou de 200 a 3000 kg/ha. A região da parte mais elevada (oeste) do pivô apresentou as menores produtividades e os maiores IEHC (Figura 4). Nesta região, verificou-se a predominância de um rendimento de grãos de 200 a 750 kg/ha e uma variação de IEHC de 0,6 a 1,0, que corresponderam a 4,6 % e 9,8 % da área irrigada, respectivamente. Registrou-se produtividade da ordem de 750 a 1400 kg/ha e 1400 a 2000 kg/ha em 53,5 % e 35 % da área irrigada, respectivamente, onde prevaleceram valores de IEHC de 0,2 a 0,4. Apenas 7% da área irrigada forneceu os maiores rendimentos (2000 a 3000 kg/ha) com valores de IEHC de 0,0 a 0,2.

## Recomendações e Conclusões

A coleta de dados ambientais sobre a água de irrigação e chuva, as condições climáticas local, o conteúdo de umidade no perfil do solo, na região efetiva de desenvolvimento das raízes, a fenologia e alguns parâmetros fisiológicos das plantas e o sistema de manejo da cultura é essencial quando a água é limitada/escassa (estresse hídrico/ seca) e a demanda evaporativa da atmosfera é elevada, a fim de melhor compreender os efeitos das interações dos genótipos (G) com o ambiente (A).

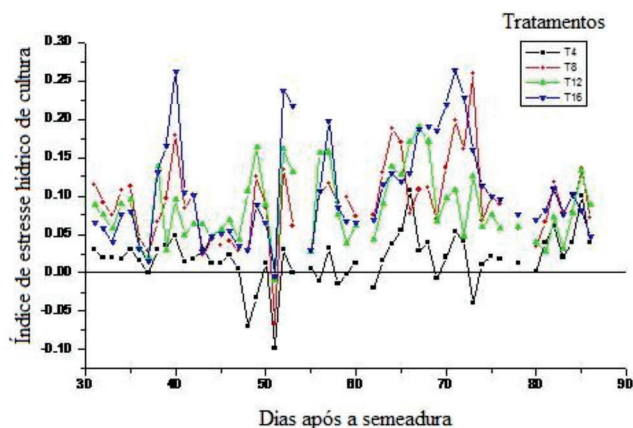
Medições de temperatura do dossel de plantas ( $T_c$ ) com transdutores de temperatura a infravermelho (IRT) têm sido usadas para triagem (screening) visando a tolerância à seca em muitas culturas. Segundo vários autores, duas abordagens básicas poderiam ser adotadas para a utilização de  $T_c$  visando a seleção para resistência à seca:

1. A identificação de genótipos com temperaturas  $T_c$  relativamente baixas (frias), em condições de baixa umidade do solo, ou
2. A identificação de genótipos com  $T_c$  relativamente mais altas (quentes) sob condições bem irrigadas, sem estresse hídrico.

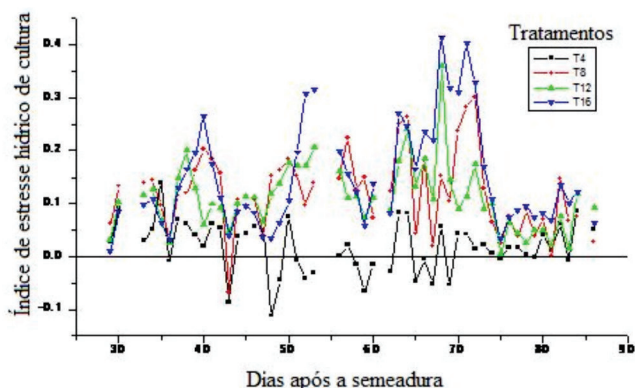
O uso de IRT's no registro de dados de diferenças de  $T_c - T_a$  e déficit de pressão de vapor (DPV) do ar mostrou-se eficaz na determinação de IEHC e possibilitou a fenotipagem de genótipos de plantas visando a tolerância à seca.

Índice de estresse hídrico de cultura (IEHC) da ordem de 0,20 tem sido usado como um valor-limite para diferenciar a cultura de uma condição hídrica de não estressada para estressada.

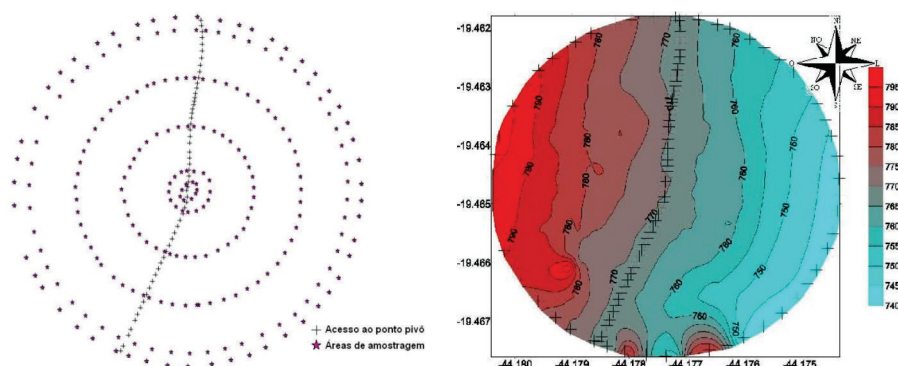
Para os ensaios de fenotipagem de cereais e legumes visando à tolerância à seca, os valores de IEHC na faixa de 0,6 a 0,7 tem sido utilizado, quando se pretende atingir reduções de mais de 50% da produção de grãos dos genótipos estudados.



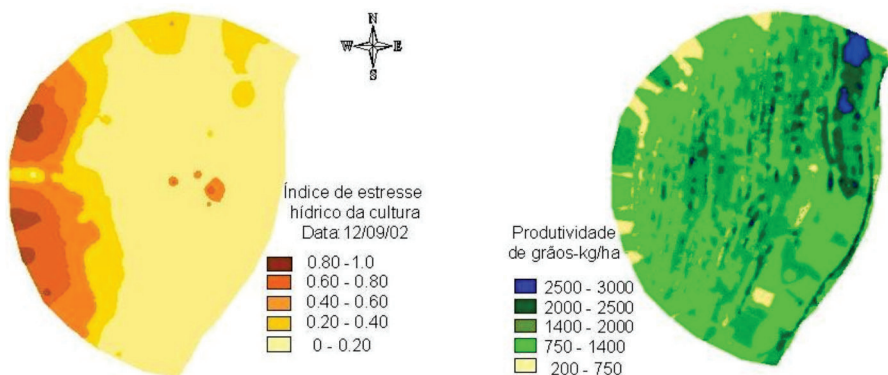
**Figura 1.** Variação do índice de estresse hídrico de cultura (IEHC) da cultura do feijoeiro em função de dias após a semeadura e frequências de irrigação (T4, T8, T12 e T16), para o período de medições de 10:00 às 11:00 horas da manhã (Albuquerque et al., 1998).



**Figura 2.** Variação do índice de estresse hídrico de cultura (IEHC) da cultura do feijoeiro em função de dias após a semeadura e frequências de irrigação (T4, T8, T12 e T16), para o período de medições de 13:00 às 14:00 horas da tarde (Albuquerque et al., 1998).



**Figura 3.** Localização das áreas de leituras do transdutor de temperatura a infravermelho (IRT) próximo às direções de deslocamento das torres do pivô (esquerda) e variação de elevação com curvas de nível a cada 5 m da área do pivô central (direita) (Gomide et al., 2005).



**Figura 4.** Variação espacial do índice de estresse hídrico de cultura (IEHC) durante a floração do feijão (esquerda) e da produtividade de grãos de feijão (direita) na área do pivô central (Gomide et al., 2005).

## Referências

Albuquerque, P.E.P.; Gomide, R.L.; Klar, A.E. Crop water stress index for beans obtained from temperature difference between canopy and air. In: *1<sup>st</sup> Inter-Reg. Conf. Environment-Water: innovative issues in irrigation and drainage*, Lisbon, Portugal, 1998. p. 189-196.

Allen RG, Pereira LS, Raes D and Smith M. Crop evapotranspiration: Guidelines for computing crop water requirements. Irrigation and Drainage Paper 56, Food and agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 1998, 300 pp.



Blum A, Mayer J and Gozlan G. Infrared thermal sensing of plant canopies as a screening technique for dehydration avoidance in wheat. *Field Crops Research*, 1982, 5:137-146.

Blum A, Shipiler L, Golan G and Mayer J. Yield stability and canopy temperature of wheat genotypes under drought stress. *Field Crops Research*, 1989, 22:289-296.

Blum A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*, 2008, 56:1159-1168.

Campbell GS and Norman JM. Estimation of plant water status from canopy temperature: An analysis of the inverse problem. In: *Applications of remote sensing in agriculture* (Steven MD and Clark JA, ed). Butterworths, London, UK, 1990, pp 225-271.

Chaudhuri UN and Kanemasu ET. Effect of water gradient on sorghum growth, water relations and yield. *Canadian Journal of Plant Science*, 1982, 62:599-607.

Chaudhuri UN, Deaton ML, Kanemasu ET, Wall GW, Marcarían V and Dobrenz AK. A procedure to select drought-tolerant sorghum and millet genotypes using canopy temperature and vapor pressure deficit. *Agronomy Journal*, 1986, 78:490-494.

Clarke JM and McCaig TN. Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Science*, 1982, 22:503-506.

Doorenbos J and Pruitt WO. Guidelines for predicting crop water requirements. Irrigation and Drainage Paper 24, FAO, Rome, Italy, 1977, 144 pp.

Doorenbos, J and Kassam, A.H. Yield response to water. Irrigation and Drainage Paper 33, FAO, Rome, Italy, 1979, 287 pp.

Ehrler WL, Idso SB, Jackson RD and Reginato RJ. Wheat canopy temperature: relation to plant water potential. *Agronomy Journal*, 1978, 70:251-256.

Gardner BR, Blad BL and Wilson GD. Characterizing corn hybrid moisture stress sensitivity using canopy temperature measurements. *Remote Sensing of Environment*, 1986, 19:207-211.

Gomide, R. L; Kobayashi, M. K.; Avellar, G. Aplicação da termometria a infravermelho e do sistema de posicionamento global diferencial na espacialização de índice de estresse hídrico da cultura do feijoeiro em área irrigada por pivô central. In: *XIV Congresso Brasileiro de Agrometeorologia*, Campinas, SP, 18 a 21 de julho de 2005, 2005. Anais em CD ROM 3 p.

Harris DS, Schapaugh Jr WT and Kanemasu ET. Genetic diversity in soybean for leaf canopy temperature and the association of leaf temperature and yield. *Crop Science*, 1984, 24:839-842.



Hatfield JL, Quisenberry JE and Dilbeck RE. Use of canopy temperature to identify water conservation in cotton germplasm. *Crop Science*, 1987, 27:269-273.

Idso SB, Jackson RD and Reginato RJ. Remote sensing of crop yields. *Science*, 1977, 196:19-25.

Idso, S.B. Non-water-stressed baselines: a key to measuring and interpreting plant water stress. *Agricultural Meteorology* 27:59-70, 1982.

Jackson RD, Idso SB, Reginato RJ and Pinter Jr PJ. Canopy temperatures as waterstress indicator. *Water Resources Research*, 1981, 17:1133-1138.

Jackson RD, Reginato RJ and Idso SB. Wheat canopy temperature: A practical tool for evaluating water requirements. *Water Resources Research*, 1977, 13:651-656.

Jackson RD. Canopy temperature and crop water stress. *Advanced Irrigation*, 1982, 1:43-85.

Jensen ME, Burman RD and Allen RG. *Evapotranspiration and irrigation water requirements*. ASCE Manual and reports on engineering practice 70, American Society of Civil Engineers, Reston, Virginia, USA, 1990, 332 pp.

Kostrzewski, M.; Waller, P.; Guertin, P.; Haberland, J.; Colaizzi, P.; Barnes, E.; Thompson, T.; Clarke, T.; Riley, E.; Choi, C. Ground-based remote sensing of water & nitrogen stress. *ASAE. Trans. of the ASAE* 46(1): 29-38. 2002.

Monteith JL and Szeicz G. Radioactive temperature in the heat balance of natural surfaces. *Journal of the Royal Meteorological Society*, 1962, 88:496-507.

Monteith JL. *Principles of environmental physics*. American Elsevier, New York, USA, 1973, 243 pp.

Moran, S.M., T.R. Clarke, Y. Inoue; A. Vidal. Estimating crop water deficit using the relationship between surface-air temperature and spectral vegetation index. *Remote Sens. Environ.* 49:246-263, 1994.

Pinter Jr PJ, Zipoli G, Reginato RJ, Jackson RD and Idso SB. Canopy temperature as an indicator of differential water use and yield performance among wheat cultivars. *Agricultural Water Management*, 1990, 18:35-48.

Sadler, E.J.; Camp, C.R.; Evans, D.E.; Millen, J.A.. Corn canopy temperature measured with a moving infrared thermometer array. *ASAE. Transaction of the ASAE* 45(3): 581-591. 2002.

Singh P and Kanemasu ET. Leaf and canopy temperatures of pearl millet genotypes under irrigated and nonirrigated conditions. *Agronomy Journal*, 1983, 75:497-501.

Smith M, Segeren A, Pereira LS, Perrier A and Allen R. *Report on the expert consultation on procedures for revision of FAO guidelines for prediction of crop water requirements*. Land and Water Development Division, FAO, Rome, Italy, 1991, 45 pp.

Stark JC and Pavek JJ. Selection of drought tolerant potato clones using foliage temperature measurements. In: *Proceedings, 10th Triennial Conference of the European Association for Potato Research* (Foldo NE, Hansen SE, Nielsen NK and Ramsussen R, eds). Aalborg, Denmark, 1987, pp: 26-27.

Stark JC, Pavek JJ and McCann IR. Using canopy temperature measurements to evaluate drought tolerance of potato genotypes. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 1991, 116:412-415.

Wanjura, D.F.; Upchurch, D.R. Canopy temperature characterization of corn and cotton water status. ASAE. *Transaction of the ASAE* 43(4): 867-875. 2000.

## O CULTIVO DE TRIGO NO CERRADO COMO EXEMPLO PARA DISCUSSÃO DE MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO DÉFICIT HÍDRICO

*Mauro Cesar Celaro Teixeira<sup>1</sup>*

A deficiência hídrica é um dos fatores mais limitantes ao desenvolvimento do trigo no Cerrado brasileiro, quando em regime de sequeiro e considerando o sistema de produção existente. Como o trigo é cultivado normalmente após a soja, a disponibilidade hídrica é decrescente durante o ciclo devido ao término do período chuvoso e início da estação seca. Em função disto, a capacidade de extração de água em maiores profundidades e, principalmente, a conservação da água na planta, bem como a manutenção do metabolismo vegetal em condição de déficit são fundamentais. Assim, os mecanismos que conferem certa tolerância ao déficit hídrico devem ter perfeito ajuste com o meio em que as plantas irão se desenvolver a fim de que seja maximizada a eficiência em termos de produção de matéria seca por unidade de água consumida.

A maneira mais simples e efetiva de minimizar o efeito de estresse é evitar que a deficiência hídrica coincida com o período crítico de demanda de água da planta, através da adequação da época de semeadura, utilização de cultivares de ciclo compatível com a disponibilidade de água no solo ou ainda o uso de suplementação hídrica durante o período crítico. Quando essas práticas de manejo não podem ser utilizadas, é necessário escolher o genótipo que disponha dos mecanismos fisiológicos de tolerância mais apropriados ao ambiente de cultivo.

Primeiramente, para que a extração de água seja suficiente para satisfazer as necessidades metabólicas, de transporte e de evapotranspiração, a fim de manter um alto potencial de água na planta, evitando ao máximo a desidratação dos tecidos quando em condição de redução gradativa da quantidade de água disponível no solo, é necessário que a planta desenvolva sistema radicular hidráulicamente eficiente, amplo e profundo. No entanto, no atual cenário, cabe considerar, que a melhoria da condição hídrica e de fertilidade nas camadas superficiais, por ocasião da presença de palha na superfície da cultura anterior e do não revolvimento do solo no sistema plantio direto, favorece o desenvolvimento de grande volume de raízes próximas da superfície. Assim, existe a necessidade de selecionar genótipos que tenham por característica a capacidade de produzir raízes com boa eficiência hidráulica também em camadas mais profundas já no início da estação de cultivo para que, na condição prevista de diminuição hídrica gradativa, as raízes possam disponibilizar mais água para a planta nos estádios subsequentes. Estudos no campo e em casa de vegetação devem propiciar a identificação de tais características para serem incorporadas em programas de melhoramento genético para ambientes com deficiência hídrica. Em algumas regiões onde

---

<sup>1</sup> Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS. E-mail: mauro@cnpt.embrapa.br

também existem problemas de estresse hídrico em trigo, o melhoramento para resistência a nematódios do solo, podridões de raízes e tolerância a altas concentrações de micronutrientes têm levado a bons resultados em termos de melhoria da condição hídrica das plantas, sinalizando que a sanidade das raízes pode, em certas situações, ser um bom indicador na escolha de genótipos. Marcadores moleculares para algumas dessas características já estão disponíveis para auxiliar melhoristas na seleção de materiais.

Para evitar a desidratação dos tecidos e a manutenção do potencial de água, agora considerando também a parte aérea, o foco deve ser em mecanismos que dificultem a perda de água para a atmosfera, principalmente os que diminuam a condutividade de tecidos foliares, enfatizando o processo do controle estomático, que está associado à produção de ABA pelas raízes e a presença nas paredes celulares e/ou superfície da folha de cutina, lignina, cera ou grande número de tricomas, já verificado em trigo cultivado em ambientes com escassez de água. Outro fator que deve ser apontado é a capacidade de diminuir a exposição e a absorção de radiação através de modificações na disposição das folhas e aumento da refletância da superfície foliar. As alterações que evitam a perda de água para a atmosfera também diminuem a fotossíntese líquida. Porém, como a resistência para o fluxo de entrada de  $\text{CO}_2$  é menor do que a do fluxo de saída de água, ocorre normalmente um aumento da eficiência de uso da água pela planta.

O grande desafio para a planta em ambiente de severa diminuição da disponibilidade hídrica é manter a integridade protoplasmática e o metabolismo fisiológico em potencial de água baixo. Assim, para regular a pressão de turgescência, as plantas podem aumentar a concentração de solutos no citoplasma e vacúolos, ajustando o potencial osmótico. No entanto, este é um componente que muitas vezes não recebe a devida atenção em estudos de seca focados na redução da evapotranspiração e, frequentemente, nessas situações, ocorre aumento de temperatura nos tecidos vegetais expostos à radiação, com consequente aceleração do processo de degradação do metabolismo.

## CIAT PLANT PHENOTYPING PLATFORM TO ACCELERATE CONVENTIONAL AND MOLECULAR APPROACHES FOR CROP IMPROVEMENT

*Jagadish Rane, Manabu Ishitani, Idupulapati Rao and Joe Tohme<sup>1</sup>*

Agroecosystems are under tremendous pressure to meet global food demand for ever increasing population. Favorable environments that were benefited from green revolution are witnessing environmental footprints of agricultural technologies and hence need input use efficiency, while potential of unfavorable environments needs to be exploited by developing more productive crop varieties. The new agricultural technologies that aim to benefit both farmers and the environment should focus on tolerance to abiotic stresses such as drought, less nitrogen, acid soils and high temperature, particularly when global warming is going to affect crop production adversely. This needs to be achieved through limited resources, while the present cost of inputs such as fertilizers are higher than ever.

Advanced technologies can facilitate conventional crop breeding for developing eco-efficient and climate resilient crops for different production environments. With the recent advances in molecular biology, it is now possible to understand the genes that decide response of organisms to environment with few dollars instead of millions that were spent earlier. However, thousands of plants need to be characterized, to know their function, and to develop robust molecular breeding approaches. The question is, can we do this with conventional technology?

Obviously, high throughput technologies are needed to characterize, or phenotype, large number of genotypes precisely and rapidly, without disturbing the plants. These technologies, which use automation and image, based on non-invasive method for phenotyping plants have been demonstrated for controlled environments. CIAT, International Center for Tropical Agriculture, located in Colombia, wishes to extend these technologies to natural field environments through its Plant Phenotyping Platform, that aims to facilitate discovery of useful plant traits, genes, molecular markers, their validation and environmental impact. The platform aims at eco-efficient and climate resilient crop varieties.

CIAT generates thousands of new lines of crop varieties to identify superior lines and also to develop and validate the molecular approaches. Promising ones are then phenotyped for water use efficiency under a rainout shelter that move on rails and is designed to protect drought experiments from rains. While phenotyping for water use efficiency, desired level of soil moisture stress, at specific stage of crop growth, is maintained by precise irrigation with boom system, and soil moisture measurement system that consists of a network of access tubes dug a meter inside the soil.

---

<sup>1</sup> International Centre for Tropical Agriculture. CIAT, Cali, Colombia. E-mail: j.rane@cgiar.org

Plant response to stress is measured mainly in terms of grain yield and growth parameters. In addition, plants are evaluated for physiological traits such as leaf canopy temperature. Plants with cooler leaf canopy have mechanisms to be physiologically efficient and more productive than those with hot leaf canopy under limited soil moisture. CIAT has developed high throughput techniques to differentiate cool and hot genotypes of plants by employing infrared camera with high precision, that was obtained along with a minicomputer. It was modified to host a multiport USB that can connect to barcode reader. Local materials were used for mounting the camera and barcode reader on a single rail boom irrigation system, to move camera along the length of the experimental field. The software customized at CIAT, enables the mini-computer to capture the IR images, and also the visible images, when the barcode reader scans barcode label of each plot. Images are stored instantly with barcode names in two separate folders. In about 40 minutes, more than 500 images, each from IR camera and web camera, can be captured with this technology, which, otherwise will take several days. These images are then automatically moved to external storage drives. Infrared images are then used to differentiate the cool and hot genotypes through image analysis software optimized for selection threshold. Thousands of images are processed in a couple of minutes.

With this automation, it is possible to monitor plant responses even under night for additional data for dissecting mechanisms of plant tolerance to drought or high ambient temperatures. CIAT is looking forward to scale up its phenotyping capacities with other hyperspectral technologies such as chlorophyll fluorescence and near infrared imaging that can reveal genetic variation, which cannot be measured efficiently with conventional methods.

In addition, CIAT has recently established an evaluation system for nitrogen use efficiency (NUE) in plants and at present is evaluating transgenic events and chromosome segment substitution lines for their responses to different levels of nitrogen.

With a generic permission from host country to evaluate transgenic events in confined field, CIAT has been uniquely placed to explore this technology for improvement of rice and cassava. CIAT follows standard operating procedures (SOP) to strictly comply with national biosafety regulations of Colombia and to avoid biosafety risks.

CIAT wishes to utilize its vast experience and facilities to stack stress tolerant traits in varieties of cassava, beans, forages and rice, with focus on tolerance to drought, low nutrient, acid soil, water logging and high temperature. Phenotyping technologies, infrastructure to evaluate gene technology and molecular approaches, all together can make CIAT an important research hub for global phenomics network to accelerate development of eco-efficient and climate resilient crop varieties, the mandate it has to accomplish and the technology that it has to extend to National Agricultural Research Systems through research collaboration.

## AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA NA EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO

*Cleber Moraes Guimarães & Luís Fernando Stone<sup>1</sup>*

### Introdução

A região do Cerrado começou a produzir em alta escala soja, milho, arroz e feijão a partir dos anos de 1970, tanto pelos incentivos governamentais como pelas suas características naturais. A topografia plana favoreceu a mecanização. Os solos, considerados improdutivos, tornaram-se produtivos com a aplicação de quantidades consideráveis de corretivos e fertilizantes. Assim, essa região assumiu importância estratégica para o desenvolvimento de uma agricultura comercial moderna de alta produtividade. Entretanto seu sucesso, avaliado pelos resultados econômicos obtidos, não depende apenas da racional e eficiente aplicação de fatores de produção, insumos, trabalho, uso correto de tecnologia e do mercado. Ele é influenciado também, e fortemente, pelas condições climáticas, principalmente pela distribuição irregular de chuvas, que ocasiona déficit de água nas plantas e constantes frustrações de safra. Como o período de ocorrência da deficiência hídrica não pode ser previsto, a antecipação ou o atraso da semeadura tentando evitar a coincidência com o florescimento, que é o período de desenvolvimento da planta mais sensível à deficiência hídrica, não é efetivo. Ademais, embora as implicações do aquecimento global sejam imprevisíveis, ele certamente poderá comprometer a disponibilidade de chuvas nas regiões tidas como favoráveis e agravar nas regiões tidas atualmente como de alto risco.

A fisiologia das plantas, a biologia molecular e o melhoramento genético desempenharão um papel chave nesse processo. Portanto, entender a tolerância das plantas à deficiência hídrica e como explorá-la, devem ser considerados não só como problemas de ordem agronômica, fisiológica ou ecológica, mas também como importante meta internacional de significância humanitária, econômica e política. A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à deficiência hídrica são fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares comerciais mais tolerantes à deficiência hídrica.

A cultura do feijoeiro e principalmente a do arroz de terras altas são muito sensíveis às condições climáticas. Elas são produtivas nos sistemas de produção tecnificados e quando as exigências climáticas são satisfeitas. Entretanto, quando isso não ocorre, a produtividade é totalmente comprometida, sendo inversamente proporcional à duração e à intensidade das condições climáticas adversas. De forma geral, a deficiência hídrica não causa prejuízos muito severos quando ocorre na fase vegetativa da planta de arroz; entretanto, quando ocorre na floração, o número de grãos e a sua formação são severamente comprometidos. Resultados similares são observados para o

<sup>1</sup> Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: cleber@cnpaf.embrapa.br

feijoeiro, pois há maior redução da produtividade quando ocorre na floração, pela abscisão de flores e de vagens. Ambas as culturas são cultivadas em todo território nacional, portanto sujeitas às mais variadas condições climáticas.

## **Objetivos da Avaliação da Tolerância à Deficiência Hídrica**

1. Caracterizar os principais fatores fisiológicos e morfológicos responsáveis pela tolerância à deficiência hídrica;
2. Conduzir populações segregantes e selecionar linhagens promissoras, em condições de deficiência hídrica;
3. Fenotipar populações de mapeamento; e
4. Avaliar a tolerância à deficiência hídrica de linhas elites dos programas de melhoramento.

## **Sítios de avaliação**

A fenotipagem para tolerância à deficiência hídrica demanda experimentações conduzidas à campo, protocolos de avaliações, instalação e monitoramento dos tratamentos hídricos aplicados; suas épocas de aplicação, assim como a duração e a intensidade de aplicação. Nesse contexto, um sítio de fenotipagem para tolerância à deficiência hídrica deve apresentar condições de solo representativas das regiões produtoras. O clima deve ser propício, principalmente temperaturas noturnas e diurnas, que conferem desenvolvimento normal à planta. Deve apresentar também precipitação pluvial mínima, que não comprometa o controle da água no solo, além de sistema de irrigação que garanta eficiência na distribuição de água e monitoramento da água aplicada.

Nesse sentido, selecionou-se a Estação Experimental da Emater-GO em Porangatu para a condução das avaliações de tolerância à deficiência hídrica. Adicionalmente, foram iniciadas as fenotipagens auxiliares em ambiente controlado na Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás-GO, em colunas de solo, que fornecem informações adicionais e específicas no mapeamento das características fenotípicas associadas à tolerância à deficiência hídrica, como a avaliação do crescimento radicular das plantas.

## **Protocolos de Avaliação**

Aplicam-se protocolos específicos para as diversas fases de fenotipagens. Faz-se desde seleção individual de plantas em gerações segregantes até levantamentos detalhados da resposta das plantas ao estresse de deficiência hídrica em fenotipagens avançadas. Os genótipos são conduzidos, geralmente, em dois ambientes contrastantes de água no solo. No primeiro, mantém-se condição adequada de água no solo durante todo o ciclo de desenvolvimento das plantas mediante irrigações de aproximadamente 25 mm, efetuadas quando o potencial matricial da água do solo a 15 cm de profundidade, avaliado por tensiômetros instalados na área experimental, atingir  $-0,025$  MPa (STONE et al., 1986) para o arroz e  $-0,035$  MPa (SILVEIRA; STONE, 1994) para o feijoeiro. No segundo ambiente, mantém-se essas irrigações até aos 20-25 dias e 25-30 dias após a emergência, respectivamente, para o feijoeiro



e para o arroz, quando é imposta a deficiência hídrica pela aplicação de aproximadamente metade da lâmina de irrigação aplicada no primeiro ambiente. As irrigações são efetuadas por barras irrigadoras com 36 m de envergadura e equipadas com aspersores autorreguladores de pressão. O sistema, para se adequar às culturas, permite um ajustamento de altura, que diminui o efeito do vento sobre a distribuição da água aplicada. O conjunto barra e aspersores é montado sobre um chassi com rodas, que se move ao longo dos experimentos a uma velocidade constante, graças a um sensor de velocidade que equipa o sistema de irrigação e que possibilita a aplicação da lâmina de água planejada. Adicionalmente, por meio de coletores de água distribuídos na área experimental, é possível monitorar a distribuição da água de irrigação.

As avaliações de raízes são conduzidas preferencialmente em telados. Utilizam-se colunas de solo acondicionadas em tubos de PVC de 25 cm de diâmetro e 100 cm de altura, formados de cinco anéis de 20 cm de altura, interligados por fita adesiva, e são consideradas nas avaliações cinco profundidades do solo, 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100 cm. Os genótipos são mantidos em condições adequadas de umidade no solo até à floração, quando é aplicada a deficiência hídrica, que é mantida até a colheita. Nessa fase é avaliado o perfilhamento, a biomassa da parte aérea e o sistema radicular. O perfilhamento é avaliado pela contagem de colmos. A biomassa da parte aérea é determinada após secagem em estufa a 80°C por cerca de 48 h, até massa constante. O sistema radicular é avaliado em amostras compostas de quatro subamostras simples, com trado tipo calha, com aproximadamente 7 cm de diâmetro e comprimento correspondente ao da camada de solo amostrada. A separação das raízes presentes nas amostras de solo é feita por meio do método de suspensão/decantação repetitivas (GUIMARÃES et al., 1996). Após a separação, as raízes são recuperadas do sobrenadante em peneiras de 0,25 mm, com o auxílio de pinças, e acondicionadas em freezer. Posteriormente são descongeladas, purificadas e submetidas à avaliação pelo método informatizado WinRhyzo. São determinados o comprimento, o número, a espessura média e o volume radicular.

Determina-se também a resistência difusiva estomática, o potencial da água nas folhas, a temperatura das folhas e componentes de crescimento da planta (GUIMARÃES et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2010). As leituras do potencial de água na planta e da temperatura das folhas são efetuadas do amanhecer ao pôr do sol, enquanto a da resistência difusiva é iniciada após o desaparecimento do orvalho, para não comprometer as leituras. Essas leituras são feitas na superfície superior das folhas apicais completamente expandidas e com boa exposição solar. O potencial da água na folha é determinado com câmaras de pressão. A temperatura das folhas é avaliada com um termômetro de infravermelho e a resistência difusiva com porômetro.

## **Avaliações Realizadas**

São efetuadas avaliações preliminares, em alto número de genótipos, em que se faz um levantamento não detalhado do comportamento das plantas

em dois ambientes, com e sem deficiência hídrica, e seleciona-se um menor número de genótipos com maior divergência fenotípica para tolerância a esse estresse abiótico. Os acessos são provenientes das mais variadas fontes e características fenotípicas. As fases seguintes da seleção são caracterizadas pelo aumento da pressão de seleção e detalhamento das informações. Cruzamentos simples e múltiplos são projetados e efetuados pelos programas de melhoramento entre os genótipos desse programa com os dos demais, que buscam outras características, como resistência a doenças, tipo de arquitetura de planta, alto teor de ferro e zinco, etc. As linhas segregantes e fixadas são avaliadas nos ambientes hídricos descritos anteriormente.

Neste trabalho são contemplados atualmente os seguintes projetos: (1) Fenotipagem, avaliação de mecanismos de tolerância e associação genômica aplicadas ao desenvolvimento de recursos genéticos de cereais tolerantes à seca, (2) Melhoramento genético para produtividade e qualidade dos grãos da cultura do arroz no Brasil, (3) Melhoramento genético para o fortalecimento da cadeia produtiva do feijoeiro comum, (4) Aplicação de tecnologias genômicas no melhoramento do feijoeiro comum visando a identificação de genes candidatos e mapeamento de locos associados ao estresse hídrico e à murcha de *curtobacterium*, (5) Plataforma genômica para o melhoramento genético e genômica comparativa de leguminosas tropicais visando resistência à seca, (6) *Biofortified crops with improved vitamin A, essential minerals and quality protein* e (7) Transformação genética de algodão, cana-de-açúcar, feijão, milho e soja com construções rd:AtDREB visando tolerância à seca.

## Resultados Preliminares com a Cultura do Arroz

Os estudos tiveram início em 2004 com a condução de atividades de projetos nacionais e internacionais. Foram conduzidas fenotipagens em condições de campo e em ambiente controlado, como atividades do Projeto Orygens – Inovações genômicas para o descobrimento de genes e melhoramento genético de gramíneas e do Projeto *Generation Challenge Programme*. Fenotiparam-se populações de mapeamento, coleção de cultivares tradicionais de arroz de terras altas, com ampla divergência fenotípica, e linhas interespecíficas do cruzamento *O. sativa* x *O. glaberrima*.

Após seguidas avaliações, foram identificados os genótipos CA780308 (Amarelão Ligeiro), CA780329 (Comum Creolo), CA780336 (Pratão Goiano), CA870092 (Branquinho), CA870139 (Noventinha), CA870177 (Arroz Roxo ou Caqui), CNA0000937 (Catalão), CNA0001420 (Carreon) e CNA0004623 (Pico Negro) como produtivos quando irrigados adequadamente e tolerantes à deficiência hídrica.

Com relação as avaliações das linhas interespecífica, constatou-se que apenas uma, a CT16308-CA-5-M, foi produtiva sob condições de deficiência hídrica e classificada no grupo mais produtivo juntamente com as linhas não interespecíficas, CNA 9045 (BRS Monarca) e BRA 1618. Neste trabalho foi observado que as linhas mais produtivas sob deficiência hídrica apresentaram

temperaturas das folhas mais baixas durante a fase reprodutiva. Verificou-se, também, que tanto as linhas interespecíficas como as não interespecíficas sofreram redução linear da produtividade com o aumento da temperatura das folhas, porém com diferentes intensidades.

Avaliaram-se também linhas de arroz de terras altas do grupo *indica*. Na ausência de deficiência hídrica, os genótipos foram classificados em quatro grupos segundo a sua produtividade, sendo o mais produtivo composto pelo genótipos (IRRI 2) B6144F-MR-6-0-0 e (IRRI 7) IR71525-19-1-1. Na presença de deficiência hídrica, eles foram classificados em três grupos, sendo o mais produtivo composto pelos genótipos (IRRI 2) B6144F-MR-6-0-0, (IRRI 9) IR72176-140-1-2-2-3, (IRRI 16) IR77080-B-34-3, (IRRI 33) IR80312-6-B-3-2-B e (IRRI 36) UPLRI 7. Verificou-se que o genótipo (IRRI 2) B6144F-MR-6-0-0 foi classificado no grupo mais produtivo, tanto na presença como na ausência de deficiência hídrica.

Em casa de vegetação, em colunas de solo de 25 x 100 cm contactou-se que, sob deficiência hídrica, o grupo de genótipos com maior densidade radicular na profundidade de 60-80 cm de profundidade foi composto pelas cultivares Muruim Branco (CA790241), Agulhinha Tardio (CA800143) e Vermelhão (CA800150). A Muruim Branco (CA790241) também apresentou sistema radicular mais desenvolvido nas camadas de 40-60 cm e de 0-20 cm de profundidade e manteve, sob condições hídricas adequadas, bom desenvolvimento radicular nas camadas mais profundas do solo. Os dados sugerem que essa é uma característica constitutiva da cultivar, pois manifestou-se mesmo no tratamento sem deficiência hídrica. Observou-se ainda que a densidade radicular média observada nas colunas de solo conduzidas em condições de casa de vegetação e o índice de susceptibilidade à deficiência hídrica determinado em condições de campo correlacionaram-se negativamente, sinalizando que as cultivares com maior tolerância à deficiência hídrica em condições de campo apresentaram maior densidade radicular nas colunas de solo conduzidas em condições de casa de vegetação. Desta maneira, a avaliação do sistema radicular nesse ambiente, por ser menos trabalhoso e oneroso, constitui-se numa ferramenta importante de fenotipagem para tolerância à deficiência hídrica.

Adicionalmente observou-se que os genótipos com melhor adaptação à deficiência hídrica, por apresentarem menor resistência difusiva estomática e maior potencial de água nas folhas, apresentaram menor temperatura das folhas ao longo do dia e essa variou linearmente com o potencial de água nas folhas. Assim, a termometria ao infravermelho, se conduzida adequadamente, constituiu-se num componente secundário importante na avaliação de linhagens para as regiões com distribuição irregular de chuvas, pois é rápida e não destrutiva.

## Resultados Preliminares com a Cultura do Feijoeiro

Foram avaliados inicialmente para tolerância à deficiência hídrica genótipos da coleção nuclear, viveiros internacionais, cultivares lançadas, linhas de seleção recorrente e também foi conduzida seleção individual de plantas em F2 e F1:3.

Depois de seguidas avaliações em ambientes hídricos contrastantes foram identificados os genótipos Bambuí, FT 84-292, G 4280, BAT 304 e G 6490 como os mais produtivos sob condições de deficiência hídrica. Entre as linhas elites do programa de melhoramento do feijão observou-se que o genótipo mais produtivo do tipo carioca foi o IPR Juriti. Esse genótipo foi classificado entre os mais precoces, com floração aos 41 dias após a semeadura. Destacaram-se também os genótipos CNFC11959, CNFC11953, CNFC11954, CNFC11966, CNFC11952, CNFC11962, CNFC11956 e BRS Estilo. Os genótipos mais produtivos do tipo preto foram CNFP 11983, CNFP 11979, CNFP 11985 e CNFP 11994. Todos esses genótipos foram classificados entre os mais tardios, exceto o CNFP 11994, que se classificou entre os mais precoces, com floração aos 42 dias após a semeadura. Destacaram-se ainda os genótipos BRS Campeiro, CNFP 11984, BRS Esplendor, IPR Uirapuru, CNFP 11995, CNFP 11978, CNFP 11976 e CNFP 11973.

Adicionalmente observou-se que cultivares com diferentes tolerâncias à deficiência hídrica, Pérola e BAT 477, diferem quanto ao potencial da água nas folhas e temperatura do dossel. Os potenciais observados na BAT 477 foram inferiores aos observados na Pérola, tanto na presença como na ausência de deficiência hídrica. Verificou-se ainda que a BAT 477 apresentou temperatura do dossel mais baixa que a Pérola durante as horas de maior demanda atmosférica, no tratamento com deficiência hídrica. Os dados sugerem que a BAT 477, ao desenvolver menor potencial de água na folha, apresenta maior gradiente de potencial de água no sistema folhas-raízes e maior fluxo de água, maior transpiração e menor temperatura das folhas, comparativamente à Pérola. Esse mecanismo pode ser favorecido por um sistema radicular mais desenvolvido e eficiente na absorção de água. Os dados sugerem também que o mecanismo encontra-se ativado tanto em ambiente com e sem deficiência hídrica.

Finalmente pode-se acrescentar que os trabalhos de fenotipagem serão aprimorados com o desenvolvimento e a implantação, com tecnologias de domínio da Embrapa (TORRE NETO et al., 2007), de um sistema de irrigação de precisão e monitoramento de umidade do solo. O sistema permitirá uma fenotipagem automatizada para tolerância à deficiência hídrica, tendo como base a quantidade de água absorvida pelas raízes, a profundidade da zona efetiva do sistema radicular na absorção de água e o planejamento de tratamentos hídricos.

## Referências Bibliográficas

GUIMARÃES, C.M.; BRUNINI, O.; STONE, L.F. Adaptação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. I. Densidade e eficiência radicular. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 31, n.6, p.393-399, 1996.

GUIMARÃES, C.M.; STONE, L.F.; BRUNINI, O. Adaptação do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) à seca. Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande, v.10, n.1, p.70-75, 2006.

GUIMARÃES, C.M.; STONE, L.F.; LORIEUX, M.; OLIVEIRA, J.P. de; ALENCAR, G.C. de O.; DIAS, R.A.A. Infrared thermometry for drought phenotyping of inter and intra specific upland rice lines. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v.14, n.2, p.148–154, 2010.

SILVEIRA P.M. da; STONE L.F. Manejo da irrigação do feijoeiro: uso do tensiômetro e avaliação do desempenho do pivô central Brasília: EMBRAPA-SPI 1994 46p. EMBRAPA-CNPAP Documentos 27.

STONE, L.F.; MOREIRA, J.A.A.; SILVA, S.C. da. Tensão da água do solo e produtividade do arroz. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1986. 6p. (EMBRAPA-CNPAP. Comunicado Técnico, 19).

TORRE NETO, A.; RODRIGUES, E.L.L.; FERRAREZI, R.A.; SPERANZA, E.A.; OLIVEIRA, A.C.N. Rede de sensores e atuadores sem fio para irrigação com taxa variável. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AUTOMAÇÃO INTELIGENTE, 8., 2007, Florianópolis. [Anais...] Florianópolis: [UFSC], 2007. 1 CD-ROM.



## **SESSÃO III - GENÔMICA APLICADA À TOLERÂNCIA À SECA**





## PERFIL GERAL DE EXPRESSÃO ASSOCIADO À TOLERÂNCIA À SALINIDADE E SECA EM FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*)

Nina da Mota Soares-Cavalcanti<sup>1</sup>; Valesca Pandolfi<sup>1</sup>; Ederson Akio Kido<sup>1</sup>; Luis Carlos Belarmino<sup>1</sup>; Laureen Michelle Houllou Kido<sup>2</sup>; Ana Maria Benko-Iseppon<sup>1,2</sup>

### Introdução

Dentre as plantas cultivadas e amplamente utilizadas pela população nordestina, nenhuma tem tantas características vantajosas como o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Conhecido também como feijão-caupi, inclui o popular feijão-de-corda, fradinho ou macassar e o feijão-verde. Também é chamado de “*southern pea*” ou ervilha do sul nos Estados Unidos, país no qual constitui produto para exportação e consumo interno, na forma de enlatados (do tipo seleta de legumes). Algumas variedades e espécies próximas são usadas na obtenção de *moyashi* (broto-de-feijão), uma cara iguaria da cozinha asiática, já difundida no mundo todo, que também é comercializada como alimento enlatado ou congelado. Além de produzir os grãos citados, trata-se de uma das plantas mais versáteis que existem, sendo muito valiosa como forrageira, com uma capacidade ímpar de fertilizar solos pobres, mesmo em condições de calor, seca e salinidade. A capacidade do feijão-caupi de crescer sob condições de solo e ambiente estressantes tem sido reconhecida por muitos cientistas. No Brasil, trata-se do único feijão capaz de sobreviver com sucesso na região Norte (alta umidade, muita chuva, solo argiloso) e no Nordeste (seca, solo arenoso, por vezes salino, muito sol), crescendo também em locais menos estressantes e com clima temperado, como no estado de Santa Catarina e o estado norte-americano da Califórnia (Benko-Iseppon, 2001).

O feijão-caupi também se apresenta muito promissor como fonte de importantes genes para o melhoramento de outras leguminosas, como a soja, o feijão comum, a ervilha, a lentilha, o amendoim, o grão-de-bico, etc. (Benko-Iseppon, 2001). Comparado a essas leguminosas o caupi apresenta características superiores para a recuperação de áreas degradadas, uma vez que em associação com rizóbio nativo torna-se eficiente fixador de nitrogênio sob as mais adversas condições, o que o torna um excelente candidato para uso em biorremediação (recuperação de ambientes degradados), transformando regiões em processo de desertificação em áreas novamente férteis e produtivas (Benko-Iseppon, 2001).

### Estresse abiótico em plantas

O crescimento e desenvolvimento vegetal podem ser severamente afetados por estresses abióticos, como seca, alta salinidade e temperaturas baixas

<sup>1</sup>UFPE - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE.

<sup>2</sup>CETENE – Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste. Recife, PE. E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

ou altas, causando grandes prejuízos à produção agrícola em todo mundo, seja pelas safras com qualidade abaixo do desejável, seja pela baixa produtividade. Quando tais estresses abióticos ocorrem, várias respostas bioquímicas e fisiológicas são induzidas nas plantas, de forma a propiciar a tolerância ou aumentar as chances de sobrevivência às condições adversas.

Embora os estresses abióticos possuam características específicas, todos apresentam como principal consequência a redução no potencial hídrico. Esse déficit hídrico é diretamente responsável por várias perturbações nas células vegetais, como a perda da integridade e seletividade da membrana plasmática, que sinalizam para a ativação de uma cascata de eventos moleculares que culminam na tolerância ao estresse, tanto através da repressão da expressão de alguns genes, quanto pelo aumento transcricional de genes responsivos. As reações moleculares ao estresse hídrico em plantas foram analisadas estudando-se vários genes de resposta à seca, alta salinidade e frio em nível transcricional. Os produtos identificados podem ser classificados em dois grupos. Aqueles que agem diretamente na proteção aos estresses ambientais e aqueles que regulam a expressão e a transdução de sinais direcionados à resposta ao estresse (Hasegawa et al., 2000).

Estudos de microarranjos visando monitorar a expressão de 7000 genes de *Arabidopsis thaliana* submetida à seca, alta salinidade e frio revelaram expressão aumentada (em mais de cinco vezes comparativamente aos controles não-estressados) de 277, 194 e 53 genes, respectivamente. Interessante foi observar que 22 genes tinham sua expressão aumentada em todas as três situações de estresse abiótico. Na definição da resistência e/ou susceptibilidade aos estresses citados, torna-se importante não apenas observar quais genes são ativados, mas a velocidade com que determinados fatores são transcritos, observando-se acentuadas diferenças entre indivíduos resistentes e suscetíveis, sob esse aspecto. Entre os três grupos de estresses, 11 genes imediatamente indutíveis na fase pós-estresse (entre poucos minutos até 2 horas após o tratamento) foram observados, revelando fatores ideais para inclusão em estudos visando identificar fontes gênicas de resistência à estresses abióticos (Seki et al., 2002).

## Objetivos

O presente estudo objetivou identificar os principais grupos de genes relacionados às vias de estresse abiótico (principalmente salinidade e seca) em plantas, avaliando sequências do feijão-caupi, com ênfase para sequências geradas no projeto “Genômica Funcional, Estrutural e Comparativa de Feijão-Caupi (*Vigna unguiculata*)”, incluindo bibliotecas de EST e de SuperSAGE.

## Material e Métodos

Transcritos do feijão-caupi foram gerados pela Rede NordEST, que inclui 12 Laboratórios dedicados à geração de dados importantes para o melhoramento e a biotecnologia do feijão-caupi. As sequências geradas incluíram 39.302

seqüências de EST (*Expressed Sequence Tags*), as quais foram depositadas em um banco de dados local, juntamente com 187.483 seqüências disponíveis em bancos de dados públicos, perfazendo, após clusterização, um total de 18.084 clusters e 24.596 singlets. Os esforços incluíram 10 bibliotecas de EST para estresses bióticos (CpSMV, Cowpea Severe Mosaic Virus) e abiótico (salinidade).

Com base nas pesquisas de Seki et al. (2002), um total de 103 seqüências protéicas de genes em diferentes categorias (Tabela 1) que tiveram sua expressão aumentada mais de 5x em resposta aos estresses abióticos foram buscadas no GenBank (NCBI, National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Além dessas, também as seqüências protéicas codificadas pelos 10 genes envolvidos na via SOS e seqüências de nove genes osmoprotetores foram identificados do GenBank (Tabela 1). Todas as seqüências foram compiladas, de forma a construir um banco local de seqüências-sonda (*seed-sequences*), com a finalidade de gerar análises comparativas contra o banco de dados de feijão-caupi. Na identificação das diferentes categorias genéticas, os candidatos de feijão-caupi, obtidos através do algoritmo tBLASTn, foram selecionados usando-se um *cut-off* de  $1e^{-05}$ . Tais seqüências foram avaliadas com auxílio do grupo de ferramentas BLAST, sendo por vezes traduzidas no ExPASy Translate Tool ([bo.expasy.org/tools/dna.html](http://bo.expasy.org/tools/dna.html)), onde também foram feitas predições de ORFs, as quais foram submetidas ao RPS-BLAST (Reverse Position Specific BLAST) contra o banco de dados de domínios conservados (Conserved Domain Database).

Dados obtidos e melhores alinhamentos (com o respectivo e-value) foram anotados em planilhas para análise e comparação com dados disponíveis em fontes de literatura, estando sumarizados na Tabela 1.

## Resultados e Conclusão

Os produtos dos genes estresse-induzidos são classificados em dois grupos principais: grupo I, aqueles que protegem diretamente contra os estresses ambientais e grupo II, aqueles que regulam a expressão gênica e transdução de sinais na resposta ao estresse (Seki et al., 2003). O primeiro grupo inclui proteínas que provavelmente funcionam protegendo a célula contra a desidratação, como as enzimas requeridas para a biossíntese de osmoprotetores, proteínas LEA, chaperonas e enzimas de desintoxicação. O segundo grupo inclui fatores de transcrição, proteínas quinase e enzimas envolvidas no metabolismo de fosfoinosítídeos (Seki et al., 2003). Considerando os dois grupos em conjunto, ao todo foram analisadas 33 categorias, resultando em 1.010 seqüências de caupi, sendo as categorias mais representativas: 'proteínas desconhecidas', 'estrutura, organização e biogênese celular', 'canais iônicos', 'defesa vegetal' e 'metabolismo de carboidrato' (234, 69, 65, 61 e 61 seqüências, respectivamente). A Figura 1 apresenta as principais categorias de genes que tiveram sua expressão aumentada após a exposição aos estresses seca/salinidade, indicando o número das prováveis

sequências ortólogas de feijão-caupi depositados no banco do consórcio NordEST.

A grande quantidade de sequências com função desconhecida envolvidas nas respostas às condições estressantes sempre despertou grande interesse de pesquisadores e cientistas, por tratar-se de uma provável fonte de novos genes, sendo importante analisar a função dos genes estresse-induzidos, não só para entender melhor os mecanismos moleculares das respostas e da tolerância ao estresse em plantas superiores, mas também para melhorar a tolerância ao estresse das culturas pela manipulação genética (Seki et al., 2002).

Ponderando que as altas concentrações de sais nos solos e o déficit hídrico são fatores que alteram sobremaneira tanto em nível micro, como a estrutura das membranas celulares, quanto macro, como a fisiologia de toda a planta, considera-se que os resultados refletiram essa variedade de respostas envolvidas na aquisição de tolerância. Em nível microcelular foi observada a ativação de genes das categorias 'estrutura, organização e biogênese celular' e 'canais iônicos', mostrando a importância da manutenção das estruturas celulares e do controle da troca de íons com o meio. Considerando a planta como um todo, observou-se a ativação de genes das categorias 'metabolismo de carboidrato' e 'defesa vegetal'. A primeira está diretamente relacionada com o crescimento e desenvolvimento da planta e a segunda parece indicar a importância de "*cross-talk*" entre vias, mecanismo comum nas plantas submetidas a condições estressantes; as plantas além de apresentarem respostas adaptativas estresse-específicas, também compartilham respostas que protegem as mesmas de mais de um tipo de estresse.

Vale ressaltar que o número de sequências-sonda usadas nas buscas não foi igual para todas as categorias; a categoria 'proteínas desconhecidas', por exemplo, estava composta por 37 representantes, enquanto 'fatores de transcrição bZIP' estava composta por apenas uma sequência. Desta forma, era esperado que as categorias mais abundantes no feijão-caupi fossem aquelas que encerravam maior quantidade de sequências-sonda.

De outra forma, corrigindo os resultados obtidos, proporcionalmente as categorias igualmente mais representativas (5,57%) foram: 'proteínas quinase', 'proteínas de degradação', 'relacionadas ao metabolismo secundário' e 'proteínas de canais de água' (Figura 2).

Indiscutivelmente, todas as categorias analisadas contribuem para a aquisição da tolerância ao estresse osmótico, embora algumas funções sejam mais relevantes do que outras. Os canais iônicos e os canais de água são exemplos de proteínas essenciais na resistência às condições de excesso de sais solúveis e escassez de água; os primeiros controlando a entrada e saída de íons tóxicos como o  $\text{Na}^{2+}$  e o segundo controlando a perda de água para o meio. Além dessas, destacam-se as proteínas quinase, envolvidas na fosforilação de outras

proteínas envolvidas nas respostas aos estresses, e os metabólitos secundários, componentes-chave nas cascatas de eventos moleculares que levam à tolerância.

Considerando os membros do Grupo II, que é composto por proteínas envolvidas numa maior regulação da transdução de sinais e expressão gênica nas respostas ao estresse, foi possível perceber que o mesmo representava 21,20% do total de sequências de *vigna* obtidas. Avaliando separadamente as proteínas deste grupo, os resultados mostram maior abundância de sequências nas categorias 'Proteínas Quinase' seguida da categoria 'Fatores de Transcrição DREB e ERF', representando 24% e 20%, respectivamente (Figura 3). As primeiras atuando na regulação de enzimas e proteínas responsivas aos estresses abióticos, enquanto as últimas atuam diretamente na ativação ou repressão de genes envolvidos nas respostas.

Ademais, a alta abundância de fatores de transcrição (77% dos membros do Grupo II) sugere a existência de vários mecanismos de regulação transcricional nas vias de transdução de sinais acionadas pelos estresses salino e hídrico.

Embora existam muitos grupos onde poucas sequências relacionadas ao metabolismo de sais e à homeostase celular de *caupi* sejam conhecidas, como fatores de transcrição bZIP, genes envolvidos na fotossíntese, proteínas LEA, entre outros, observa-se que outros grupos, como os osmoprotetores, apresentam um número significativo de sequências avaliadas. Considerando todos os osmoprotetores, tanto os identificados por Seki et al. (2002), quanto os adicionais (totalizando 12 sequências-sonda), os resultados revelaram 81 prováveis osmólitos compatíveis no genoma do feijão-*caupi*.

Essa alta incidência não foi surpreendente, visto que a síntese de 'osmólitos compatíveis' é uma das principais estratégias dos eucariotos para prevenir os efeitos adversos causados pelos estresses abióticos. Os 'solutos compatíveis', como também são conhecidos, caracterizam-se pelo fato de serem acumulados em altas concentrações pelas plantas sem, no entanto, perturbar ou interferir no metabolismo celular onde, pelo contrário, apresentam a função de proteção celular.

Ressalte-se que nenhum representante do gene *CMO* foi identificado em *vigna*, resultado similar ao obtido por nosso grupo em pesquisas no transcriptoma da cana-de-açúcar. Apesar de ser esperada a presença de pelo menos um representante desse gene, especula-se que o resultado obtido esteja relacionado com o fato do *CMO* ser expresso apenas quando há necessidade de oxidação de colina, para a síntese do osmoprotetor glicina-betaína, ou necessidade da própria glicina-betaína, que sinalizará para a expressão tanto do *CMO* quanto do *BADH* (que oxida betaína-aldeído).

Em plantas tolerantes ou sensíveis à salinidade, o estresse inicia um complexo de respostas, começando com a percepção do estresse, a qual

desencadeia uma cascata de eventos moleculares que é finalizada em vários níveis de respostas fisiológicas, metabólicas e de crescimento. Um exemplo simples desta reação em cadeia é a via SOS (*Salt Overly-Sensitive*), uma das mais bem detalhadas vias de resposta às altas concentrações de sais solúveis no solo. Os genes da via SOS estão envolvidos na manutenção da homeostase celular através da exclusão do excesso de sódio. O estresse sódico inicia um sinal de cálcio que estimula o complexo SOS3/SOS2, que ativa o gene *SOS1*, o qual codifica uma proteína de antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , permitindo a exclusão do íon  $\text{Na}^+$  sobressalente e minimizando os efeitos da salinidade sobre a planta (Zhu, 2002). Os componentes da via SOS são relativamente bem conhecidos em *A. thaliana*, sendo também encontrados no banco de dados do SUCEST (genoma expresso da cana de açúcar, *Saccharum officinarum*), com exceção do gene codificante da proteína NKH. Com relação ao genoma do caupi, foi identificada a maioria dos genes que integram a via SOS (Figura 4). Os genes mais representados foram o SOS2, ATPase e ABI2, cada um com 20 prováveis ortólogos. Especula-se que essa alta abundância está relacionada com o fato de se tratarem de proteínas amplamente empregadas em diferentes processos celulares; a primeira uma quinase, usada na regulação de várias outras proteínas e enzimas, estando a segunda envolvida na transformação de energia de praticamente todos os processos celulares, enquanto a terceira é uma proteína induzida por ABA, que tem sua expressão regulada não apenas pelos estresses salino e hídrico.

É interessante notar que assim como nas análises do genoma da cana-de-açúcar, também nos dados obtidos no feijão-caupi nenhum ortólogo ao *NKH* foi identificado.

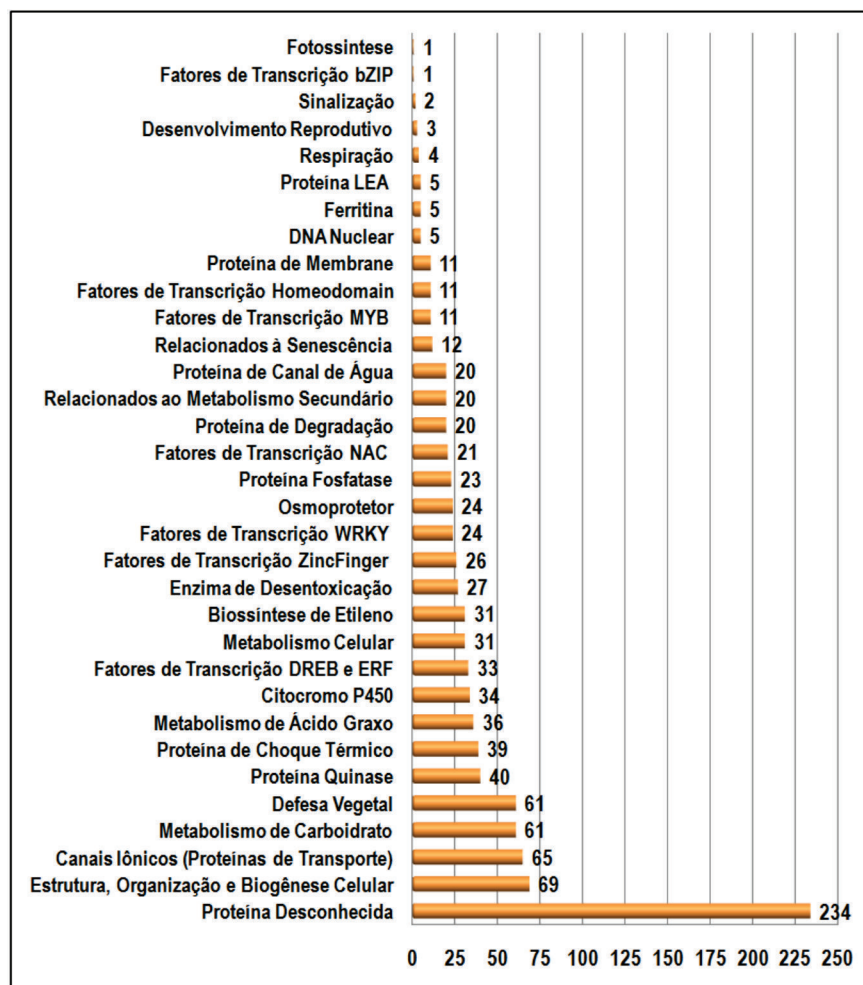
Os resultados apontam para a conservação da via SOS no genoma do feijão-caupi, como esperado, uma vez que o controle das trocas iônicas, principalmente a exclusão do sódio, é um dos primeiros e principais mecanismos ativados nas respostas aos estresses abióticos.

De forma geral, os dados disponíveis revelaram interessantes candidatos para o melhoramento do feijão-caupi e de outras leguminosas cultivadas, especialmente considerando a capacidade de adaptação a condições adversas dessa espécie, que pode ser considerada como uma fonte ímpar de genes (e características) de resistência a estresses ambientais.

Finalmente, especula-se que o desenvolvimento de estudos comparativos adicionais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, considerando as combinações [salinidade\_x\_controle], [seca\_x\_controle], [salinidade\_x\_seca] e [salinidade\_+\_seca\_x\_controle], possam dar um panorama mais completo dos genes envolvidos nas respostas ao estresse osmótico, que poderão futuramente ser usados na categorização de genomas/transcriptomas.

**Tabela 1.** Descrição das categorias funcionais e respectivo número de sequências-sonda.

| <i>Categoria Funcional</i>             | <i># Sequências-Sonda</i> | <i>Categoria Funcional</i>                 | <i># Sequências-Sonda</i> |
|----------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
| Fatores de Transcrição bZIP            | 1                         | Osmoprotetor                               | 3                         |
| Fotossíntese                           | 1                         | Fatores de Transcrição ZincFinger          | 3                         |
| Sinalização                            | 1                         | Enzima de Desintoxicação                   | 2                         |
| Desenvolvimento Reprodutivo            | 1                         | Metabolismo Celular                        | 3                         |
| Respiração                             | 1                         | Fatores de Transcrição DREB e ERF          | 2                         |
| DNA Nuclear                            | 1                         | Biossíntese de Etileno                     | 2                         |
| Ferritina                              | 1                         | Citocromo P450                             | 2                         |
| Proteína LEA                           | 1                         | Metabolismo de Ácido Graxo                 | 4                         |
| Fatores de Transcrição MYB             | 1                         | Proteína de Choque Térmico                 | 2                         |
| Fatores de Transcrição Homeodomain     | 1                         | Proteína Quinase                           | 2                         |
| Proteína de Membrane                   | 2                         | Metabolismo de Carboidrato                 | 6                         |
| Relacionados à Senescência             | 1                         | Defesa Vegetal                             | 4                         |
| Proteína de Degradação                 | 1                         | Canais Iônicos (Proteínas de Transporte)   | 4                         |
| Relacionados ao Metabolismo Secundário | 1                         | Estrutura, Organização e Biogênese Celular | 5                         |
| Proteína de Canal de Água              | 1                         | Proteína Desconhecida                      | 37                        |
| Fatores de Transcrição NAC             | 2                         | Via SOS                                    | 10                        |
| Proteína Fosfatase                     | 2                         | Outros Osmoprotetores                      | 9                         |
| Fatores de Transcrição WRKY            | 2                         |                                            |                           |
| Total                                  |                           |                                            | 122                       |



**Figura 1.** Principais categorias relacionadas ao metabolismo de sais e à manutenção da homeostase com as respectivas quantidades de sequências obtidas no genoma do feijão-caupi em valores absolutos.



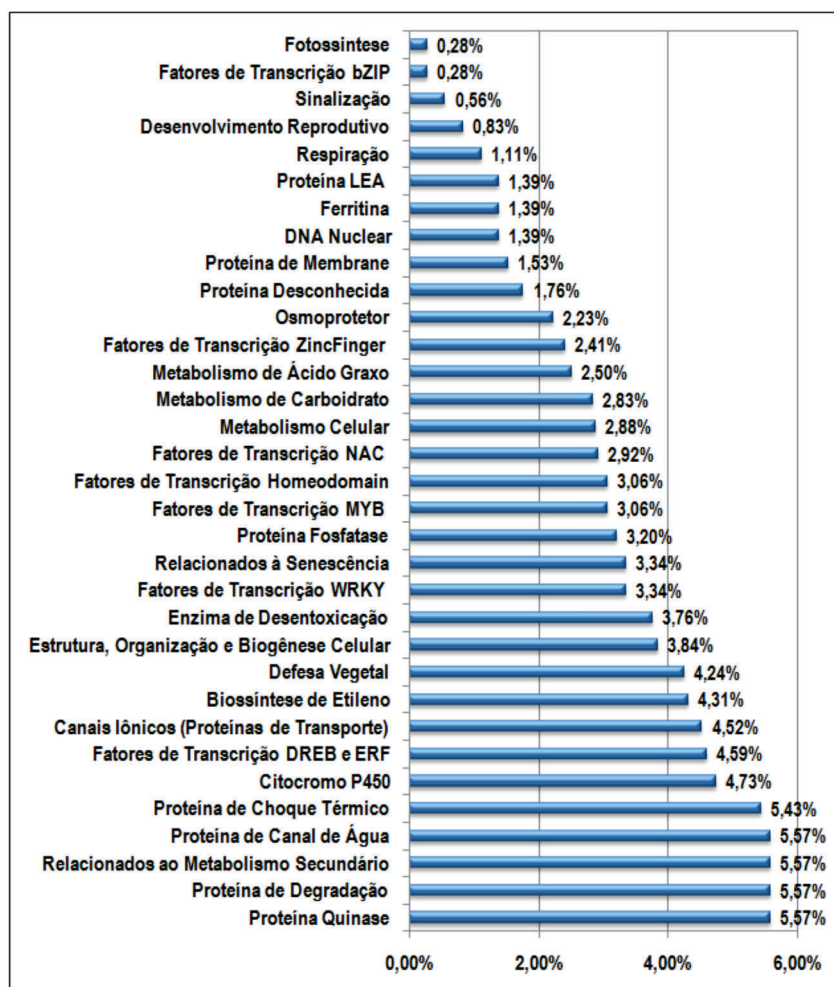


Figura 2. Proporção de sequências de feijão-caupi por categoria, a partir dos valores corrigidos.

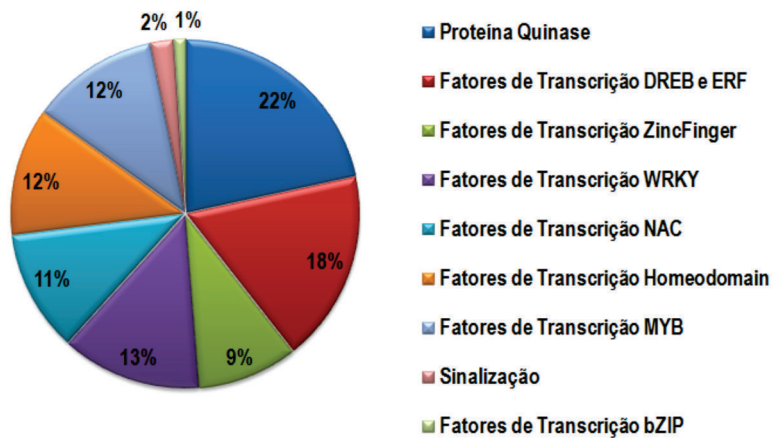


Figura 3. Gráfico mostrando a distribuição proporcional das categorias envolvidas na regulação da expressão gênica e transdução de sinais nas respostas aos estresses abióticos.

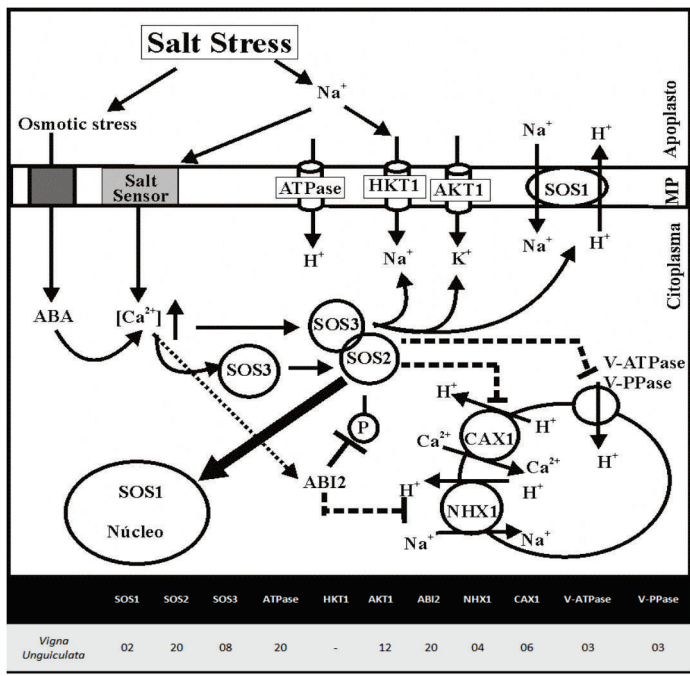


Figura 4. Representação esquemática da Via SOS (Salt Overly-Sensitive), indicando abaixo a quantidade de ortólogos identificados no genoma do feijão-caupi.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao programa Renorbio/MCT/BNB e à Facepe por apoio financeiro. Ao CNPq e à CAPES agradecemos pela concessão de bolsas de estudos.

## Referências

Benko-Iseppon AM. Estudos moleculares no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. Embrapa Documentos 2001;56: 327-332.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Plant Mol Biol. 2000;51: 463-499.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. Plant J. 2002;31:279-292.

Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, et al (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. Curr Opin Biotechnol. 2003;14:194-199.

Zhu J-K. Salt and drought stress signal transduction in plants. Annu Rev Plant Biol. 2002;53:247-273.

## GENOMIC ANALYSIS IN THE STUDY OF DROUGHT TOLERANCE USING RECOMBINANT INBRED LINES AND RECURRENT SELECTION

*<sup>1</sup>Márcio Elias Ferreira; <sup>1</sup>Georgios Pappas Jr.; <sup>2</sup>Alexandre A. Martins, <sup>2</sup>Pedro Ítalo Tanno, <sup>3</sup>Marco Pessoa-Filho, <sup>1</sup>Roberto C. Togawa; <sup>1</sup>Orzenil Silva Junior; <sup>4</sup>Paulo H. N. Rangel*

**Introduction** - Water use efficiency in agriculture is one of the major research challenges of this century. Crop yield losses caused by limitations on water use have been substantial in recent years (FAO, 2002). It is possible that these limitations will have even greater impacts as a consequence of global warming in a climate change scenario. It is estimated that 70% of the freshwater consumed by human populations are used for food production (WMO, 1997). This brings a perspective of a world where water will be increasingly scarce, and, therefore, more expensive, causing significant impact on crop production costs. Plant breeding for drought tolerance is one of the approaches that can be applied in order to improve water use efficiency in agriculture.

The genetic control of drought tolerance in cereals - such as rice - is quantitative, being determined by several genes with a strong interaction with the environment (Bennett, 2003). Because of their complexity, quantitative traits pose a great challenge for breeding programs. The number of genes involved in drought tolerance, in addition to genotype X environment interactions, makes the development of superior cultivars by breeding programs more difficult. In spite of the unquestionable advances in the development of improved crop varieties brought about by the use of conventional breeding strategies, the development of drought tolerant varieties by these methods has been recalcitrant and marginal (Tuberosa and Salvi, 2006). There are many factors contributing to this lack of efficiency, since there are several variables interfering on the water-plant system, from the capture of water by roots and their conduction to plant tissues, to its release in the atmosphere through transpiration. Throughout this journey, some environmental factors influence water use capacity by the plant: soil type, wind speed, air moisture, temperature, solar radiation, among others. In the plant itself, root system and stem architecture, cell and tissue resistance, transpiration, hormone regulation, photosynthesis, cell-wall composition and adjustment, plant developmental stage, among others, all affect water flow. Therefore, evaluating drought tolerance in plants is far from being a trivial task. Being such a complex trait to deal with, the definition of drought tolerance itself has had different interpretations by research groups. We use as a reference that drought tolerance is the capacity of a variety to present greater yields than other varieties of the same species under limiting water availability in the soil.

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF.

<sup>2</sup>Universidade de Brasília (UnB). Brasília, DF.

<sup>3</sup>Embrapa Cerrados. Planaltina, DF.

<sup>4</sup>Embrapa Arroz e Feijão. Santo Antônio de Goiás, GO. E-mail: phrangel@cnpaf.embrapa.br

**Drought tolerance in rice** – Rice (*Oryza sativa* L.) is a hydrophytic plant, adapted to water abundant environments. The Green Revolution promoted modifications in plant architecture in order to better adapt it to irrigated production systems, without drought stress. The definition of an ideotype for irrigated rice has culminated in a significant increase in yield, witnessed in several parts of the world in recent decades. This was a landmark in rice breeding. Most of the global rice production is done in bunded fields or flood prone areas, using varieties highly responsive to crop inputs. It is important to notice, however, that in some countries, a significant share of rice production is carried in rainfed environments. Brazil is the largest rice producer among western countries, having a great proportion of its production receiving irrigation only by natural precipitation. Upland rice has a very important role in rice production in Brazil, representing about 60% of the cultivated area, but with less than 30% of total grain production (CONAB, 2010). Therefore, in a singular manner when compared to Asian countries, upland rice is of utmost importance in Brazil, where rice is one of the staple foods for almost 200 million people. Mean yield values for upland rice in Brazil are still low, around 2.2 ton/ha, which is lower than the average 6.8 ton/ha for irrigated rice (CONAB, 2010). Increasing yield for upland rice, with more than 1.6 million ha planted every year, is, therefore, fundamental and strategic for the country. Increasing water use efficiency in upland rice is part of the equation for making it more productive. Therefore, it is a fact that the Green Revolution occurred for irrigated rice, bringing innovation for plant ideotype and increasing crop yields. A “Green Revolution”, however, has not succeeded for upland rice yet. In order to contribute to the increase of rice yield in upland production systems and for the stability of production for this crop, a research project has been conceived which integrates conventional methods of plant breeding with new genomic tools for the understanding and investigation of drought tolerance control mechanisms in rice. The strategy being applied to this end is illustrated in Figure 1 and discussed below.

*Thematic Core Collection for Drought Tolerance* - Initially, an assessment of rice landraces deposited in the Rice Germplasm Bank of Embrapa was performed. Among the 3,200 accessions of rice collected by Embrapa starting in the 1970's all around the Brazilian territory, a list of approximately 700 accessions of rice landraces showing a *tropical japonica* genetic background was delimited. These landraces are adapted to different environmental conditions in the country, almost always cropped for subsistence by small farmers. This germplasm stands as a true genetic treasure, given its diversity for root system and stem architecture, plant height, type and color of grains, plant cycle, etc. The accessions were genotyped with panels of microsatellite markers distributed throughout the rice genome (Pessoa-Filho et al., 2007). With the information gathered by this genotyping process, a thematic core collection for drought tolerance was obtained (Pessoa-Filho, 2010). It is composed of approximately 90 *tropical japonica* landraces. This core collection presents high levels of diversity for drought tolerance, conserving about 84% of the gene diversity of the source collection in a sample with ~18% of its original size.

*Phenotyping of the thematic core collection for the definition of an ideotype*

– Due to its high level of genetic diversity and variability in drought stress responses, the thematic core collection for drought tolerance is being submitted to evaluations of several traits, including: morphological descriptors for the species (IRRI/IPGRI), leaf anatomy by scanning microscopy, canopy temperature, date of flowering, plant height, weight of 100 grains, number of tillers, number of panicles, yield, root length, root diameter, root volume, among others. Special attention is being given to root development, under the rationale that drought tolerant plants explore water more efficiently from deeper soil layers. Phenotyping experiments are being performed in field conditions and in the greenhouse, with evaluation of plots in treatments with and without drought stress. The main goal is to detect morphological, structural, physiological and genetic variations associated with drought tolerance. The collected phenotypical data are being compiled in order to assist on the definition of a new ideotype for upland rice, focusing on a plant with an architecture that promotes greater yields in this production system. Data indicate, for instance, a significant negative genetic correlation between the drought susceptibility index (DSI) (Fischer and Maurer, 1978) and plant height, as well as a significant negative correlation between DSI and root length (20-40 cm and 40-60cm layers). This suggests that the definition of a possible upland rice ideotype should take into consideration greater plant heights than observed in semi-dwarf varieties and longer root lengths than current upland varieties. Apparently, the irrigated rice ideotype from the Green Revolution was directly transferred to current upland rice varieties when, realistically, a new upland rice ideotype still claims to be built.

*Development of segregating populations for the identification of genomic regions associated with drought tolerance*

– Four Brazilian landraces, belonging to the *tropical japonica* group (Chorinho, Puteca, Catetão and Ligeiro) were selected in the thematic core collection in order to develop populations for genetic studies concerning drought tolerance. Three other *tropical japonica* varieties well-known for showing drought tolerance (Azucena, Moroberekan and IAC 165) and a variety with desirable traits for grain quality (Primavera), have also been selected as parental varieties. Some of these varieties are sources of genes for blast resistance, such as Azucena, Moroberekan and Chorinho. Tolerance to abiotic (e.g. drought tolerance) and biotic stresses (e.g. blast resistance) is a limiting factor for the development of upland rice varieties with higher yields in Brazil. These new populations segregate not only for drought tolerance, but also for blast resistance.

The crosses were designed in order to develop three types of populations: (1) 8-Way RIL population - a population of ~ 1200 recombinant inbred lines derived from the cross between eight *tropical japonica* rice varieties (Chorinho, Puteca, Primavera, IAC 165, Catetão, Azucena, Moroberekan, and Ligeiro), presenting variations in mechanisms for tolerance or susceptibility to drought and for blast resistance. Dozens of individuals of each variety were genotyped with a panel of microsatellite markers distributed throughout the rice genome. One individual representing the standard fingerprinting of each variety was selected in order

to obtain paired crosses (Chorinho x Puteca; Primavera x IAC 165; Catetão x Azucena; Moroberekan x Ligeiro). This population is being used in genetic and genomic analyses, since it is expected to be composed of highly homozygous recombinant inbred lines with reduced extensions of linkage disequilibrium. From generation G4 on, up till at least generation F12, the population is being conducted by SSD. When finished, this population will be adequate for genetic association studies for the discovery and selection of drought tolerance and blast resistance genes in rice. It will also be useful for similar studies regarding other economically important traits segregating in the population.

(2) RIL (recombinant inbred lines) populations, derived from bi-parental crosses (Chorinho x Puteca; Primavera x IAC 165; Catetão x Azucena; Moroberekan x Ligeiro). The four RIL populations, each having ~200 recombinant lines, are being used for QTL mapping studies for the identification of genomic regions associated with the control of drought tolerance and blast resistance.

(3) Recurrent Selection Population, derived from the 8-way cross between varieties mentioned above, with selection cycles derived from generation G4. This population is segregating for drought tolerance, grain quality, yield, plant type, blast resistance, among other economically important traits. Drought tolerance is the main focus of the project, but this population allows the integration between programs of selection for drought tolerance and blast resistance. Because it is a recurrent selection population, it will be adequate for the use of genome wide selection principles (Meuwissen et al., 2001). In this case, the thematic core collection for drought tolerance and the bi-parental RIL populations, after thorough phenotyping for drought tolerance traits and genotyping with molecular markers (SSR's and SNP's) are being used as "training populations" in order to estimate the value of each molecular marker on the composition of the drought tolerant phenotype. These data will be used in the selection of superior plants in each selection cycle for recombination and obtainment of the next cycle progeny.

**Rice genome re-sequencing and SNP detection** – Genome wide selection requires discovering and genotyping of a large number of molecular markers scattered throughout the genome. In order to cope with this challenge, a second generation DNA sequencing technology (Illumina) has been used to re-sequence the genome of the eight parental varieties used to obtain the segregating populations (bi-parental RIL, 8-way RIL and recurrent selection populations). This approach allows for a broad search for SNP polymorphism throughout the rice genome. It also makes it possible to characterize all sources of genetic variation at the nucleotide level between the parental varieties. Genome re-sequencing has been accomplished with an Illumina GAIIx sequencer, based on DNA from the same plant used to obtain the segregating populations. A total of 66 million short reads (76 base long) have been obtained for the variety Chorinho, covering ~ 5 Gigabases of the variety genome (~ 13.5X average genome coverage). The following values have been observed for the other parental varieties: Puteca (80,443,550

reads; average coverage = 16.4X); Primavera (60,197,846 reads; average coverage = 12.3X); IAC 165 (50,470,079 reads; average coverage = 10.3X); Catetão (62,978,225 reads; average coverage = 12.9X); Azucena (57,482,501 reads; average coverage = 13.4X); Moroberekan (52,052,047 reads; average coverage = 10.6X); Ligeiro (52,804,710 reads; average coverage = 10.8X).

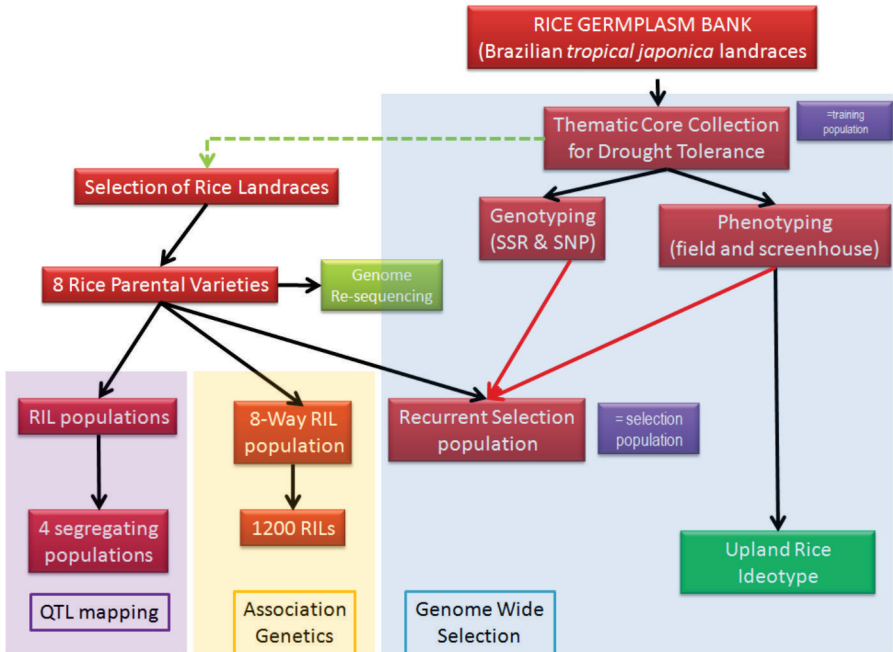
The analysis aiming at SNP discovery and marker genotype selection indicated that the number of SNP's identified between each parental genome and the reference genome (Nipponbare) is high, varying from 504,337 to 584,996 SNP's in the pairwise comparisons evaluated. The strategy used also included the comparison between the parental varieties (Chorinho x Puteca; Primavera x IAC 165; Catetão x Azucena; Moroberekan x Ligeiro) (Figure 2). For the recurrent selection population and the 8-way RIL population, SNP's have been selected based on confirmed polymorphism in at least 2 out of 8 varieties. Several filters have been tested to identify and select the SNP's employed in the genotyping experiments.

Besides genome re-sequencing of the eight varieties to promote SNP discovery and selection, SNP mining was also pursued through comparison of rice ESTs (Expressed Sequence Tags) deposited on international databases. By doing so, 158 SNPs have been extracted after screening 1,251,304 EST sequences of the rice genome deposited on the dbEST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>). Also, 1,797 SNPs have been selected after screening 100.1 Mb deposited at the OryzaSNP database (<http://www.oryzasnp.org/>). This last database has been recently developed by a consortium lead by IRRRI (International Rice Research Institute) focused on genome re-sequencing of 20 rice cultivars (McNally et al., 2009).

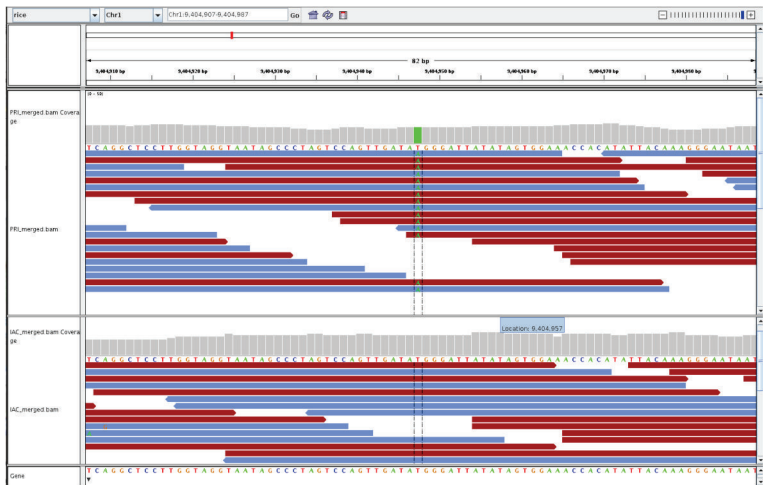
Structural variants with 4 bp or more have been detected in large amounts on each pairwise comparison with the reference genome, varying from 51.332 to 80.092 indels per comparison. New methods of detection and validation of indels have been tested. Indel based genetic mapping and the study of the role of structural variants on plant phenotype diversity is still an underexplored area, potentially promising for the understanding of the genetic diversity of the species, with eventual application in selection for traits of economic importance.

The SNP's selected in the three databases (genome re-sequencing of eight parental varieties, Oryza dbEST and OryzaSNP) are in the process of experimental validation with samples of the different segregating populations and accessions of the Rice Germplasm Bank. The objective is to obtain a minimal set of hundreds of SNP markers that will be used in large scale population genotyping and in genome wide selection of superior individuals in the recurrent selection population. The integration of classic breeding methods with new genomic tools opens the perspective of improving the efficiency of selecting superior genotypes based on DNA polymorphism analysis, aiming at the development of plants that are more tolerant to drought stress.





**Figure 1.** Strategy applied for the detection, isolation and investigation of regions of the rice genome associated with drought tolerance for the development of drought tolerant varieties.



**Figure 2.** Detection of a SNP (A/T) locus mapped on rice chromosome 1, based on genomic re-sequencing data of varieties Primavera and IAC 165.

## References

Bennett, J. 2003 Opportunities for increasing water productivity of CGIAR crops through plant breeding and molecular biology. In. Improving water productivity in agriculture. Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture Series. Jacob W. Kijne, Randolph Barker and David Molden (eds). Chapter 7:103-126

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento 2010 Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos – 4º Levantamento, janeiro 2010, CONAB, 39 pp

FAO. 2002. Crops and Drops: Making the Best Use of Land and Water. FAO, Rome.

Fischer, R. A.; Maurer, R. 1978 Drought resistance in spring wheat cultivars. I grain yield responses, Australian Journal of Agricultural Research. v. 29, p. 897-912.

McNally et al., 2009 Genomewide SNP variation reveals relationships among landraces and modern varieties of rice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 July 28; 106(30): 12273–12278.

Meuwissen, T.H.E.; Goddard, M.E. and Hayes, B.J. 2001 Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. Genetics 157:1819-1829

Pessoa-Filho, M. A. C. ; Belo, A. ; Alcochete, A. A. N. ; Rangel, P. H. N.; Ferreira, M. E. 2007 A set of multiplex panels of microsatellite markers for rapid molecular characterization of rice accessions. BMC Plant Biology, 7:23

Pessoa-Filho, M.A.C.P.; Rangel, P.H.N. and Ferreira, M.E. 2010 Extracting samples of high diversity from thematic collections of large gene banks using a genetic-distance based approach. BMC Plant Biology 10:127

Tuberosa, R. and Salvi. S. 2006 Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. Trends in Plant Science 11(8) 405-412

WMO 1997 Comprehensive assessment of the freshwater resources of the world. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 52 pp.

## EFEITO DA TETRAPLOIDIZAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES DE *ARACHIS* EM CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO E ESTUDOS DE GENÔMICA FUNCIONAL

Soraya Leal-Bertioli<sup>1\*</sup>, David Bertioli<sup>2</sup>, Patricia Guimarães<sup>1</sup>, Ana Cláudia Guerra<sup>1</sup>, Carolina Morgante<sup>1</sup>, Vincent Vadez<sup>3</sup>, Joseane Padilha<sup>1</sup> & Ana Cristina Brasileiro<sup>1</sup>

O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea* L., é uma leguminosa, da subfamília Papilionidae. É um alotetraplóide de origem recente. Assim como várias outras espécies poliplóides, passou por um gargalo genético imposto por sua origem, quando duas espécies silvestres diplóides hibridizaram (*A. duranensis* and *A. ipaensis*) e a planta resultante sofreu duplicação cromossômica espontânea (HALWARD et al., 1991; SEIJO et al., 2007; SEIJO et al., 2004; YOUNG et al., 1996). Devido à diferença de ploidia, esse híbrido esteve reprodutivamente isolado dos seus parentes silvestres diplóides, o que levou à baixa diversidade genética do amendoim. Por outro lado, espécies silvestres de *Arachis* são mais diversas geneticamente e passaram por seleção evolucionária incluindo vários ambientes e estresses, acumulando então, uma grande quantidade de variações de caracteres agrônômicos de interesse. Para ampliar a diversidade alélica do amendoim, esforços têm sido feitos para introgrediver genes, a partir de parentes silvestres diplóides (SIMPSON et al., 2003; STALKER et al., 2002; STALKER e LYNCH, 2002).

Espécies silvestres de *Arachis* podem ser encontradas em regiões extremamente adversas e muitas são resistentes a estresses bióticos (LEAL-BERTIOLI et al., 2010; NELSON et al., 1989; PROITE et al., 2008). São anatomicamente diversas do cultígeno, em termos de anatomia, área foliar, ciclo, tamanho e espessura de estolão, entre outras.

Resistência a doenças e pragas são uma limitação fundamental para a cultura do amendoim em várias regiões do mundo, especialmente onde recursos para controle fitossanitário são mais escassos. Nessas regiões a transferência de resistências a partir dos parentes silvestres são uma contribuição ainda mais significativa, pois contribuirão para a segurança alimentar desses povos. No entanto, essa introgressão tem sido limitada por diferença de ploidia entre os parentes silvestres e o cultígeno. Um caso de transferência de resistência no amendoim bem documentado originou duas cultivares resistentes ao nematóide das galhas, são elas COAN and NEMATAM (SIMPSON e STARR, 2001; SIMPSON et al., 2003).

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. E-mail: soraya@cenargen.embrapa.br

<sup>2</sup> Universidade de Brasília, Brasília, DF.

<sup>3</sup> ICRIAT, Pantacheru, Índia.

Uma das razões para o sucesso da introgressão da resistência ao nematóide em amendoim e para os esforços correntes de introgressão de resistências a fungos foliares é que essas características são codificadas por um ou poucos genes ou QTLs (GARCIA et al., 1996; GOWDA, 2008; LEAL-BERTIOLI et al., 2009). Entretanto, para tolerância a seca, o cenário é muito mais complexo: a capacidade de uma cultivar produzir sob estresse hídrico é devida a uma gama de características (anatômicas fisiológicas, bioquímicas), tornando a transferência dessa tolerância igualmente mais complexa.

Em programas de introgressão, o primeiro passo é eleger o parental com as características desejadas. Entretanto, aparece a questão: essa característica permanece uma vez que a ploidia é alterada? Essa questão leva a um segundo questionamento: considerando que o processo de cruzamento, tetraploidização e recuperação de anfidiplóides férteis, o que é mais eficiente: fenotipar os parentais diplóides e cruzar os mais interessantes ou cruzar acessos compatíveis e só depois avaliar as características relativas ao estresse hídrico?

Para tentar responder a essas questões, foram realizadas várias análises de características relacionadas à resposta ao estresse hídrico com dois acessos silvestres diplóides (*A. duranensis* V14167 e *A. ipaensis* KG30076), o anfidiplóide originado do cruzamento e tetraploidização desses, e as duas cultivares de amendoim mais plantadas no território brasileiro: *A. hypogaea* cv Tatu e *A. hypogaea* cv Runner. Foram analisados os seguintes parâmetros: eficiência de transpiração, curva de transpiração em função da FATS (fração de água transpirável no solo), índice SPAD, área foliar específica, variação de isótopo de carbono ( $\Delta C13$ ), e várias medidas de anatomia foliar.

Para espécies silvestres sob estresse hídrico gradual, a transpiração declina seguindo o mesmo padrão que o amendoim e outras espécies de leguminosas (SADRAS e MILROY, 1996; SINCLAIR e SERRAJ, 1995). Não houve diferenças significantes entre o ponto em que o declínio se inicia (threshold) entre silvestres e o cultivado Runner (variando entre 0,58 e 0,87. O anfidiplóide, por outro lado, teve um valor muito menor ( $0.30 \pm 0.05$ ).

A eficiência de transpiração (ET) foi avaliada em dois experimentos: as cultivares de amendoim apresentaram uma ET mais alta em relação aos demais genótipos (entre 3,22 e 4,08), sendo que o anfidiplóide apresentou a ET mais baixa (2,72 e 2,12). Os silvestres apresentaram valores intermediários. Esses dados sugerem que a biomassa dos indivíduos não determina os valores de ET, uma vez que as plantas silvestres são geralmente menores e com área foliar reduzida e a área foliar do anfidiplóide é semelhante àquela dos cultivados. Além disso pode-se observar-se que os valores de área foliar específica, SPAD, e dados de anatomia foliar seguem o mesmo padrão (ou falta de): alguns dados do anfidiplóide são mais similares ao parental *A. duranensis*, outros ao parental *A. ipaensis*, outros tornam-se totalmente semelhantes ao amendoim cultivado tetraplóide.

De todos os experimentos conduzidos ao longo de dois anos, algumas conclusões podem ser retiradas: existe um contraste definido entre espécies silvestres e cultivares de amendoim. Das vinte e uma características tessadas, dez modificam-se quando a planta é tetraploidizada, tornando-a mais próxima do amendoim cultivado (ex. área foliar, comprimento e espessura de estômatos, densidade de células epidérmicas); seis características assemelham-se às do parental *A. duranensis* (ex. índice estomático abaxial e adaxial, área foliar específica e variação de isótopo de carbono); quatro assemelham-se às do parental *A. ipaensis* (ex. densidade de tricomas na face abaxial, índice SPAD sob estresse e em plantas controle); e uma característica (razão entre a espessura da hipoderme e a espessura total da folha) apresentou-se diferente de qualquer outro genótipo testado. Considera-se que as características que permaneceram no anfidiplóide originadas dos parentais silvestres são passíveis de introgressão, enquanto que as outras são derivadas da tetraploidização ou de novas combinações alélicas.

Como esse estudo, conclui-se que a predição de como as características serão herdadas diante do processo de tetraploidização é baixa e parece depender da característica estudada. Apesar da necessidade de se validarem esses dados em um número maior de anfidiplóides, hoje já disponíveis (SANTOS et al., 2008), atualmente recomendamos que a fenotipagem de características relacionadas ao estresse hídrico seja realizada após o processo de cruzamento e tetraploidização.

A partir desses resultados, essa equipe vem engendrando esforços na área de genômica funcional para o estudo da resposta ao estresse hídrico em espécies silvestres de amendoim. Foi observado um comportamento fisiológico durante o estresse bastante diferente das cultivares de *A. hypogaea* testadas, como, por exemplo, uma rápida diminuição da taxa de transpiração em resposta à quantidade de água transpirável no solo. Três acessos silvestres foram então escolhidos como genótipos silvestres de referência do genoma tipo AA (*A. duranensis* acesso K7988) e do genoma tipo BB (*A. magna* acesso KG30097 e *A. ipaensis* acesso KG30076) para os estudos de genômica (BRASILEIRO et al., 2008; LEAL-BERTIOLI et al., 2007). O principal propósito da genômica funcional é o de alocar os genes contidos em um determinado genoma dentro de uma perspectiva funcional, visando identificar qual proteína é traduzida por cada gene, e qual o seu papel no funcionamento do organismo como um todo. Pesquisas aplicadas à prospecção de genes envolvidos com estresse hídrico estão sendo desenvolvidas para uma série de espécies vegetais (TUBEROSA; SALVI, 2006; VALLIYODAN; NGUYEN, 2006) visando identificar, isolar, caracterizar e validar a função biológica de genes associados à resposta à seca.

Nesse contexto, o transcrito de plantas de *A. magna* submetidas a estresse hídrico gradual, e seu respectivo controle não-estressado, foi analisado pela construção de duas bibliotecas subtrativas de cDNA (SSH) (BRASILEIRO et al., 2008; MORGANTE et al., 2009). A análise in silico revelou 759 leituras que foram agrupadas em 249 clusters (138 singlets e 111 contigs), com um índice

de novidade de 32,8%. Vários genes foram identificados como sendo regulados positiva ou negativamente nas condições de estresse ou de controle. O perfil de expressão de alguns desses genes diferencialmente regulados foi validado pela técnica de RT-PCR em tempo real, utilizando o cDNA de raízes e folhas. Genes que codificam, por exemplo, a *glycine descarboxilase*, *metallothionein-like protein*, *drought stress responsive protein* e duas proteínas desconhecidas são regulados positivamente durante o estresse hídrico enquanto que o gene que codifica para uma *disease responsive protein* é regulado negativamente durante o estresse hídrico. Assim, esses resultados revelaram que a expressão espacial e temporal desses genes estão fortemente correlacionados com os dados da análise in silico e com a resposta ao estresse. Os genes-candidatos de *A. magna* que se revelaram mais promissores serão, no futuro, isolados e introduzidos em plantas transgênicas modelo (como *Medicago truncatula*) ou alvo (amendoim) a fim de avaliar a regulação da sua expressão e o seu potencial papel nos mecanismos de resposta da planta ao estresse.

Dando continuidade às análises genômicas, mais recentemente, a equipe analisou o perfil global de expressão em dois tecidos (folha e raiz) de plantas de *A. duranensis* submetidas a estresse hídrico gradual, utilizando a tecnologia 454 de sequenciamento massal. Foram geradas 380.601 leituras com um tamanho médio de 293,24 nucleotídeos após limpeza. Depois do agrupamento e da montagem, um total de 12.840 sequências únicas foram geradas para *A. duranensis*. A interpretação funcional das sequências obtidas foi realizada por atribuições de Ontologia Gênica, mostrando uma cobertura para uma ampla gama de categorias. O índice de novidade foi de 29% e um número significativo de sequências foi identificado como sendo diferencialmente expresso entre as duas bibliotecas. Assim como realizado para *A. magna*, o perfil de expressão temporal e espacial dos genes-candidatos de *A. duranensis* serão posteriormente validados. Até o momento, esses são os únicos trabalhos de análise de transcrito de espécies silvestres de *Arachis* submetidas ao estresse hídrico.

O estudo do perfil de expressão pelo sequenciamento em larga escala de cDNA em espécies silvestres de *Arachis* submetidas a estresse hídrico gradual possibilitará a rápida e eficiente identificação de genes e de suas interações durante os processos de estresse abiótico. A análise in silico dessas sequências poderá revelar genes-candidatos, auxiliando na construção de um quadro comparativo em termos transcricionais do processo de resposta e adaptação das plantas ao estresse hídrico, podendo ser integrado ao conhecimento atual da tolerância das plantas ao estresse abiótico. Os conhecimentos gerados proporcionarão importantes alternativas com potencial aplicação na biotecnologia (seleção assistida por marcadores, introgressão/introdução de genes candidatos no amendoim cultivado), visando o desenvolvimento de cultivares de amendoim mais tolerantes à seca e mais adaptadas a condições ambientais adversas. Através de estudos de sintonia e genômica comparativa, será possível também estender esses conhecimentos para outras culturas de importância econômica para o País.

## Referências

- BRASILEIRO, A. C. M.; SANTOS, C. M. R.; MORGANTE, C. V.; MARTINS, A. C. Q.; SILVA, F. R.; ARAÚJO, A. C. G.; BERTIOLI, D. J.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M. GUIMARAES, P. M. Análise in silico da expressão diferencial de genes em *Arachis magna* sob estresse hídrico. Boletim de Pesquisa - série Embrapa. 218: 18 p. p. 2008.
- GARCIA, G. M.; STALKER, H. T.; SHROEDER, E. KOCHERT, G. Identification of RAPD, SCAR, and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. Genome, v.39, n.5, Oct, p.836-45, 1996.
- GOWDA, M. V. C. Genetic enhancement of resistance to foliar diseases - strategies and prospects. Advances in Arachis through Genomics and Biotechnology. Hyderabad, India. 4-8 November 2008, 2008. 66 p.
- HALWARD, T. M.; STALKER, H. T.; LARUE, E. A. KOCHERT, G. Genetic variation detectable with molecular markers among unadapted germplasm resources of cultivated peanut and related wild species. Genome, v.34, p.1013-1020, 1991.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; FARIAS, M. P.; SILVA, PEDRO Í. T.; GUIMARÃES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M.; BERTIOLI, D. J. ARAÚJO, A. C. G. Ultrastructure of the Initial Interaction of *Puccinia arachidis* and *Cercosporidium personatum* with Leaves of *Arachis hypogaea* and *Arachis stenosperma*. Journal of Phytopathology, v.158, n.11-12, p.792-796, 2010.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; JOSE, A. C. V. F.; ALVES-FREITAS, D. M. T.; MORETZSOHN, M. C.; GUIMARAES, P. M.; NIELEN, S.; VIDIGAL, B. S.; PEREIRA, R. W.; PIKE, J.; FAVERO, A. P.; PARNISKE, M.; VARSHNEY, R. K. BERTIOLI, D. J. Identification of candidate genome regions controlling disease resistance in *Arachis*. BMC Plant Biology, v.9, n.1, p.112, 2009.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; VADEZ, V.; GUIMARÃES, P. M.; SILVA, P. I. T.; MORAES, L. F. M. V.; BERTIOLI, D. J. ARAÚJO, A. C. G. Avaliação de espécies silvestres de *Arachis*, híbridos e cultivares de amendoim para características relacionadas à resposta ao estresse hídrico. Boletim de Pesquisa - série Embrapa. Brasília. 166: 16 p. p. 2007.
- MORGANTE, C. V.; MARTINS, A. C. Q.; ARAÚJO, A. C. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; GUIMARAES, P. M. BRASILEIRO, A. C. M. Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica no gênero *Arachis*. Boletim de Pesquisa - série Embrapa. in press 2009.
- NELSON, S. C.; SIMPSON, C. E. STARR, J. L. Resistance to *Meloidogyne arenaria* in *Arachis* spp. germplasm. Journal of Nematology, v.21, p.654 - 660, 1989.
- PROITE, K.; CARNEIRO, R.; FALCÃO, R.; GOMES, A.; LEAL-BERTIOLI, S.; GUIMARÃES, P. BERTIOLI, D. Post-infection development and hisopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. Plant Pathology, v.57, n.5, p.974-980, 2008.

SADRAS, V. O. MILROY, S. Soil-water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange. *Field Crops Research*, v.47, p.253–266, 1996.

SANTOS, S. P.;MORETZSOHN, M. C. BERTIOLI, D. J. Produção e caracterização de anfidiplóides sintéticos entre espécies silvestres de *Arachis*. 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador • BA 16 a 19 de setembro de 2008. p.

SEIJO, G.;LAVIA, G. I.;FERNANDEZ, A.;KRAPOVICKAS, A.;DUCASSE, D. A.;BERTIOLI, D. J. MOSCONE, E. A. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. *American Journal of Botany*, v.94, n.12, December 1, 2007, p.1963-1971, 2007.

SEIJO, J. G.;LAVIA, G. I.;FERNANDEZ, A.;KRAPOVICKAS, A.;DUCASSE, D. MOSCONE, E. A. Physical mapping of the 5S and 18S-25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (leguminosae). *American Journal of Botany*, v.91, p.1294 - 1303, 2004.

SIMPSON, C. E. STARR, J. L. Registration of 'COAN' peanut. *Crop Science*, v.41, p.918, 2001.

SIMPSON, C. E.;STARR, J. L.;CHURCH, G. T.;BUROW, M. D. PATERSON, A. H. Registration of 'NemaTAM' Peanut. *Crop Science*, v.43, p.1561 - 1561, 2003.

SIMPSON, C. E.;STARR, J. L.;CHURCH, G. T.;BURROW, M. D. PATERSON, A. H. Registration of NemaTAM peanut. *Crop Science*, v.43, p.1561, 2003.

SINCLAIR, T. R. SERRAJ, R. Legume nitrogen fixation and drought. *Nature*, v.378, p.344, 1995.

STALKER, H. T. LYNCH, R. E. Registration of Four Insect-Resistant Peanut Germplasm Lines. *Crop Science*, v.42, n.1, Jan, p.313-314, 2002.

STALKER, H. T.;BEUTE, M. K.;SHEW, B. B. ISLEIB, T. G. Registration of Five Leaf Spot-Resistant Peanut Germplasm Lines. *Crop Science*, v.42, n.1, Jan, p.314-316, 2002.

TUBEROSA, R. SALVI, S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends in plant science*, v.11, n.8, p.405-12, 2006.

VALLIYODAN, B. NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v.9, n.2, p.189-95, 2006.

YOUNG, N. D.;WEEDEN, N. F. KOCHERT, G. Genome mapping in legumes (Family Fabaceae) In: A. H. Paterson (Ed.). *Genome mapping in plants*. Austin, TX: RG Landes, 1996. *Genome mapping in legumes (Family Fabaceae)*.



## ABORDAGENS GENÔMICAS PARA TOLERÂNCIA A SECA EM CEREAIS

*Newton Portilho Carneiro<sup>1</sup>*

O mundo está passando por grandes incertezas econômicas que têm se intensificando com o decorrer do tempo. O aumento das relações comerciais entre os países e a interdependência entre eles faz com que problemas em alguns locais reflitam fortemente em outras regiões, gerando uma cascata de problemas econômicos. Além do crescimento populacional, milhões de pessoas no mundo passaram a comprar sua comida em vez de plantá-la e um grande número de países tem aumentado a renda média da população desviando as necessidades e anseios.

A estabilização entre a oferta e a demanda por alimentos no mundo passa necessariamente por um aumento na produtividade e/ou na área agricultável. A área agrícola mundial hoje é de cerca de 1,4 bilhões de hectares, sendo que, cada vez mais, se restringe o aumento da produção via incorporação de novas áreas agrícolas. Uma grande incerteza está se delineando para o futuro com os possíveis cenários relacionados às mudanças climáticas decorrentes do fenômeno chamado de aquecimento global. Nas próximas décadas, existem previsões de que as mudanças de clima podem ser tão intensas, a ponto de mudar a geografia da produção agrícola mundial. Isto deverá causar uma migração de plantas para regiões que hoje não são de sua ocorrência em busca de condições climáticas melhores. Áreas que atualmente são grandes produtoras de grãos podem não estar mais aptas ao plantio antes do final do século.

Além do deslocamento de commodities para áreas marginais, a disponibilidade de água no planeta já está entre as principais preocupações das diversas lideranças mundiais. Existe hoje uma grande competição (e a tendência é de aumentar exponencialmente) dos centros urbanos com os grandes sistemas de irrigação. Há previsões de que, no máximo em 25 anos, a água será um produto raro. A escassez, o uso inadequado, a poluição, a contaminação e o desperdício do recurso “água”, são temas chave nas agendas de debates de diversas instituições públicas ou privadas. Dessa forma, estudos que sirvam de base para um futuro desenvolvimento de variedades mais tolerantes ao estresse de seca não só tem importância para áreas com limitação agrícola devido à falta de água, mas também como fator de produção a ser economizado em sistemas irrigados.

Estudos relacionados à tolerância à seca serão então cada vez mais estratégicos, já que esse é o estresse abiótico mais complexo e de maior efeito sobre as culturas e o principal fator que deve limitar a produção mundial de alimentos nos próximos anos (Pennisi, 2008). Neste cenário, torna-

---

<sup>1</sup> Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. E-mail: newtonc@cnpmis.embrapa.br

se imperativo um maior conhecimento dos fatores biológicos e climáticos relacionados à tolerância ao déficit hídrico, de forma a garantir que no futuro, a agricultura possa contar com genótipos cada vez mais adaptados aos estresses hídricos.

O melhoramento de plantas tem tido grande êxito em aumentar o potencial produtivo das culturas no último século, e deve se preparar para enfrentar os novos desafios decorrentes das alterações climáticas globais previstas para as próximas décadas (Borlaug e Doswell, 2005). Em países tropicais como o Brasil, a seleção somente em ambientes de alta produtividade pode não ser a maneira mais eficaz de identificar genótipos capazes de obter melhores produtividades em condições de múltiplos estresses (seca, baixo uso de insumos, toxidez subsuperficial de Al, etc), como ocorre em várias áreas de produção. Essa variabilidade genética é mais facilmente identificada em ensaios envolvendo grande número de genótipos cultivados em sítios manejados de forma a propiciar níveis adequados de estresse nas fases fenológicas apropriadas de cada uma das diferentes culturas. Entretanto, cada estação de cultivo possui condições próprias de precipitação, incluindo períodos de restrição hídrica em alguma fase do desenvolvimento da cultura. Sob essa ótica, cultivares de alta estabilidade de produção quando avaliados em múltiplos locais e anos, podem conter genes favoráveis para tolerância a estresse hídrico, devendo também ser incluídos num programa de identificação e desenvolvimento de materiais tolerantes à seca (Byrne et al., 1995).

No Brasil, estima-se que cerca de 20% da área plantada com cereais (arroz, trigo, milho e sorgo), equivalendo a aproximadamente 8,5 milhões de hectares, é afetada pela seca, resultando em uma perda na produção desses cereais de mais de 23,7 milhões de toneladas (em anos e locais específicos, pode-se chegar à perda total da produção). Estudos de efeitos do estresse hídrico nas diferentes fases fenológicas desses cereais indicam que os estádios de pré-florescimento, florescimento e enchimento de grãos são os mais sensíveis ao estresse hídrico, e que reduções na produção de grãos e no número de grãos por planta pode ser superior a 50% quando a seca coincide com esses estádios (Durães et al., 2004).

A implantação de sítios específicos para imposição do estresse de seca é uma das principais limitações aos trabalhos de fenotipagem para tolerância ao déficit hídrico. Esses sítios devem passar por completa caracterização química, física e das propriedades hídricas do solo, de forma a permitir que as condições de estresse hídrico impostas possam ser reproduzidas ao longo dos ciclos de cultivo das diferentes espécies, e nas fases fenológicas desejadas. Para isto devem ser determinadas características como: a) necessidade hídrica ou evapotranspiração máxima ou potencial (Allen et al., 1998); b) coeficientes de cultura (Albuquerque & Guimarães, 2004); c) controle da água de irrigação e do estresse hídrico diário (Albuquerque & Andrade, 2001); d) monitoramento da umidade do solo por tensiômetros; e) caracterização do estresse hídrico a partir de medições de temperatura do dossel por

termometria infravermelha e da redução de produção entre ambientes com e sem estresse de seca.

Outro tema importante de ser abordado em qualquer projeto que vise estudar o estresse hídrico em uma dada cultura é a definição da fase fenológica e da intensidade com que a mesma será submetida ao estresse. Cada espécie vegetal possui um limite máximo de estresse hídrico, que deve ser experimentalmente estabelecido para que as plantas se recuperem e mantenham um potencial de produção economicamente viável. Isto significa que a submissão da cultura ao estresse acima desse limite ultrapassa as suas condições biológicas de sustentar uma produção econômica.

A biotecnologia é uma ferramenta tecnológica robusta, capaz de impactar o conhecimento e a geração de produtos e processos relacionados ao setor agrícola. O avanço contínuo das técnicas de biologia molecular, aliado à disponibilidade massiva de sequências genômicas estruturais e funcionais, têm viabilizado o surgimento de novas metodologias para geração e análise de dados em genotipagem e expressão gênica a uma velocidade, precisão e escala sem precedentes. Em função da complexidade e da quantidade de dados gerados, muitas vezes o processamento e a análise dos mesmos não é trivial, sendo importante a interação entre grupos e Unidades de pesquisa com diferentes experiências.

O principal propósito da genômica funcional é o de alocar os genes contidos em um determinado genoma dentro de uma perspectiva funcional. Isto significa localizar qual proteína é produzida por cada gene, e qual o seu papel no funcionamento do organismo como um todo (Livesey & Hunt, 2002). Outro aspecto importante da genômica funcional é identificar onde e sob quais condições os genes são expressos. Considerando que a expressão de um gene está condicionada a fatores transcricionais e pós-transcricionais que dependem do grau de desenvolvimento e diferenciação celular, bem como da resposta a estímulos externos (Alberts et al., 1994), tais processos são mediados por programas de expressão gênica diferencial. Nesse sentido, estudos de expressão gênica associados com estratégias de bioinformática, podem permitir a identificação de genes envolvidos nas respostas diferenciadas entre genótipos submetidos a diferentes tipos de estresses.

Na área de tolerância à seca, uma infinidade de estudos tem relatado a identificação de QTLs e de genes controlando diferentes respostas ao déficit hídrico em plantas (Tuberosa & Salvi, 2006; Collins et al., 2008; Bhatnagar-Mathur et al., 2008), indicando que plataformas genômicas, de sequenciamento e de bioinformática têm contribuído para o conhecimento das bases genéticas e fisiológicas desta característica. Por outro lado, os exemplos de sucesso na geração de cultivares tolerantes à seca por meio da seleção assistida ou de transgenia são ainda relativamente limitados, indicando a necessidade de esforços multidisciplinares nessa área. Para isto é fundamental uma abordagem que envolva aspectos tais como: caracterização detalhada de parâmetros

fenotípicos utilizando sítios de seleção apropriados; uma correta escolha dos genótipos a serem avaliados; uma compreensão ampla dos mecanismos genético-fisiológicos que controlam essa característica e ainda, o uso de modelos estatísticos e de simulação adequados para maximizar a utilização da informação gerada nas diferentes espécies.

De posse de uma estrutura consolidada de fenotipagem e de genótipos contrastantes para características efetivamente associadas com tolerância à seca, o uso de técnicas biotecnológicas que possibilitem uma ampla varredura genômica posicional e funcional deve então aumentar a chance de que os fatores genéticos identificados contribuam com o aumento da produção de grãos sob limitação hídrica. Para um problema complexo como os estudos relacionados à tolerância à seca em plantas, o uso de uma abordagem multidisciplinar tem sido então peça fundamental nos projetos mais modernos voltados para esse tema.

Em trabalhos recentes na Embrapa foi verificado correlação de QTLs de sorgo e milho para a característica stay green. Em sorgo foram identificados marcadores significativamente associados com stay green nos dois anos de avaliação, que estão localizados dentro do intervalo de confiança de dois QTLs da mesma característica, Stg2 e Stg3, mapeados nos cromossomos 3 e 2 de sorgo, respectivamente, por Harris et al. (2007). Como resultado das atividades de mapeamento em milho, o marcador bnlgl1904 foi associado com as características stay green e produção relativa (com/sem estresse) de forma consistente nos dois anos de avaliação fenotípica. Observação importante foi que esse marcador está localizado entre os bins 3.03 e 3.05 de milho, região sintênica à posição do QTL de stay green, Stg2, em sorgo. Tais resultados sugerem que o retardamento na senescência foliar pode também ser um mecanismo de tolerância à seca em milho e que o mapeamento comparativo é uma estratégia importante no estudo da tolerância à seca entre gramíneas. Ainda como parte dos resultados obtidos em milho, marcadores localizados nos bins 1.06 e 1.07 foram associados com a produção relativa em ambos os anos e com a produção sob déficit hídrico em 2006. Nessa região, em trabalhos conduzidos por outros grupos de pesquisa, foram detectados QTLs explicando proporções significativas da produção de grãos sob estresse hídrico (Tuberosa et al., 2002) e QTLs de tolerância à seca estáveis em vários ambientes (Vargas et al., 2006). Outros resultados obtidos nas atividades de mapeamento em milho permitiram identificar marcadores nos cromossomos 4 e 8 associados com características de tolerância à seca no ano de 2006. Essas regiões haviam sido previamente identificadas em outros estudos de mapeamento de QTLs para tolerância à seca em milho (Vargas et al., 2006).

Diversas técnicas para a análise da expressão diferencial de genes são disponíveis, tais como Northern blot (Alwine et al., 1977), differential display (Liang & Pardee, 1992) e dot blot (Lennon & Lebrach, 1991). Entretanto, essas estratégias não são adequadas quando um grande número de produtos de expressão deve ser analisado simultaneamente. Desta forma, a hibridização

subtrativa de cDNAs permite a identificação e o isolamento de seqüências de transcritos diferencialmente expressos em duas condições (Hara et al., 1991). Os métodos de subtração de cDNAs geralmente envolvem a hibridização de uma população (tester) com outra população de cDNA (driver) em excesso, sendo eliminadas as seqüências em comum entre as duas populações. Entretanto, esse método não se mostrou eficiente para a detecção de mRNAs de baixa expressão.

Os projetos de sequenciamento completo dos genomas e de seqüências expressas (ESTs) de diferentes organismos têm cada vez mais impulsionado o desenvolvimento de métodos para o estudo da expressão gênica envolvendo todo o genoma simultaneamente, como os microarranjos de DNA (Watson et al., 1998; Duggan et al., 1999; Graves, 1999). Essa tecnologia utiliza substratos sólidos (chips) para a imobilização de um grande número de seqüências gênicas, as quais têm sua expressão monitorada e quantificada por meio de experimentos de hibridização, possibilitando a varredura massal do genoma, a uma velocidade, precisão e escala sem precedentes (Lemieux et al., 1998). Assim, os microarranjos de DNA aumentaram substancialmente a sensibilidade e a quantidade de dados de expressão gerados entre diferentes genótipos, tecidos ou tratamentos. Embora a confecção dos chips seja uma limitação técnica, atualmente várias empresas comercializam chips de DNA para diferentes espécies, como a Affymetrix (<http://www.affymetrix.com>). No caso do milho, chips de DNA estão disponíveis no Maize Gene Discovery Project, e serão utilizados como estratégia de identificação de genes diferencialmente expressos sob estresse de seca.

Novas tecnologias de piro-sequenciamento de DNA têm sido utilizadas no sequenciamento de transcritos, revelando grandes quantidades de genes diferencialmente expressos e de polimorfismos do tipo SNP, o que viabiliza a ancoragem dos mesmos nos genomas e em mapas genéticos. Barbazuk et al. (2007) utilizaram o 454 no sequenciamento do transcriptoma de meristema apical entre as linhagens de milho B73 e Mo17. Dentre os mais de 280.000 ESTs sequenciados foram identificados em torno de 7.000 SNPs, dos quais mais de 4.900 foram validados dentro dos genes de milho, demonstrando uma elevada eficiência para identificar SNPs em genes. Recentemente, o sequenciamento com a plataforma SOLiD (Applied Biosystems) utilizando bibliotecas de cDNA curtos, quantitativos e aleatórios, ligados a adaptadores específicos tem se destacado como uma excelente estratégia para realizar uma varredura extensiva e quantitativa de genes expressos (Coolnan et al., 2008). Além de uma sensibilidade superior aos ensaios de microarranjos, é possível avaliar splicing alternativo e elementos repetitivos, mas, por outro lado, é necessária a existência de um genoma completamente sequenciado e de seqüências de cDNAs completos, que serão as estruturas para a alocação das etiquetas expressas sequenciadas.

Uma resposta específica ao déficit hídrico representa a combinação de eventos moleculares prévios que foram ativados pela percepção do sinal de

estresse. Por exemplo, mudanças no volume celular em plantas submetidas ao déficit hídrico podem ativar canais na membrana celular, causar alterações na conformação e justaposição de proteínas responsáveis pela percepção do estresse ou causar alterações na continuidade do sistema “parede celular – plasmalema”, consequentemente, acionando outras sinalizações moleculares que, então, ativam outros genes, em resposta ao déficit hídrico (Hare et al., 1996; Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1996, 1997; Yamaguchi-Shinozaki et al., 2002). Quando a água é perdida pela célula, processos regulatórios que ajustam o metabolismo celular para a nova condição são iniciados. Simultaneamente, o crescimento é inibido e alterações no desenvolvimento resultam em outras mudanças na expressão gênica. Genes que funcionam durante mudanças no metabolismo, regulação, sinalização e reconhecimento do estresse são também induzidos. Entretanto, poucos desses genes têm sido identificados e documentados. Genes induzidos pelo déficit hídrico promovem tolerância celular à desidratação, funções de proteção no citoplasma, alterações do potencial osmótico da célula para aumentar absorção de água, controle da acumulação de íons e regulação gênica (Bray, 1993, 1997, 2002).

Muitos dos genes induzidos pelo déficit hídrico são tidos como protetores das estruturas celulares dos efeitos da perda de água (Bray, 1997; Shen et al., 1997). Entretanto, a expressão de um gene não garante que o produto desse gene específico melhore a habilidade da planta de sobreviver ao estresse (Nepomuceno et al., 2001). A expressão de alguns genes pode ter resultado de injúria ou dano ocorrido durante o estresse. Outros genes podem ser induzidos, mas sua expressão não apresenta nenhum efeito na tolerância ao déficit hídrico. Entretanto, alguns genes são necessários para a tolerância ao déficit e a acumulação de seus produtos pode ser uma resposta de adaptação ao período de estresse (Bray, 1993, 1997, 2002). Diversos trabalhos tem sugerido o envolvimento de proteínas LEA (Late embryogenesis abundant) (Bohnert et al., 1995; Zhu et al., 1997), proteínas de choque térmico (HSP-Heat Shock Proteins), osmólitos como prolina, glicina-betaina, manitol e inositol (Shen et al., 1997; Hare and Cress, 1997), proteínas de transporte (aquaporin - channel proteins) (Maurel et al., 1993; Yamada et al., 1995), ácido abscísico (Bray, 1993; Ingram & Bartels, 1996) e açúcares, como trehalose e sacarose (Goddijn et al., 1997; Boyer, 1996; Muller et al, 1995; Crowe et al., 1993), nas respostas expressas por plantas ao déficit hídrico, e que podem estar relacionadas com uma maior ou menor tolerância ao estresse.

Um importante avanço no conhecimento de genes reguladores e regulados no estresse hídrico foi a identificação de um elemento cis-atuante denominado DRE (Dehydration Responsive Element) em *Arabidopsis thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1994; Liu et al., 1998). Esse elemento tem uma sequência de 5 pares de bases (CCGAC), denominada de C-repeat (Baker et al., 1994), e está presente em uma ou múltiplas cópias na região promotora de muitos genes de plantas, relacionados com resposta a desidratação

(Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). O fator de transcrição DREB1 (Dehydration Responsive element Binding Protein) especificamente interage com esse elemento DRE, e induz a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse em *Arabidopsis thaliana* (Kasuga et al., 2004). Um número considerável de genes tem sido descrito como induzidos em resposta à desidratação (Tomashow, 1994). Seki et al. (2001) identificaram doze genes estresse-induzidos como genes alvo de DREB1, enquanto Fowler & Tomashow (2002) descreveram 41 genes alvos de DREBs. A função de alguns produtos desses genes parece estar relacionada a mecanismos de manutenção das estruturas e funções celulares básicas durante déficit hídrico, baixas temperaturas e alta salinidade (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996).

A expressão diferencial de genes envolvidos nos mecanismos de defesa contra a desidratação celular tem papel chave na maior ou menor tolerância ao déficit hídrico. A compreensão de como a expressão individual de genes contribui na resposta final em termos celulares, fisiológicos e agrônômicos tem possibilitado o desenvolvimento de estratégias para o desenvolvimento de plantas mais tolerantes ao déficit hídrico (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Tomashow, 1994). Entretanto, não se sabe na prática o quanto cada uma dessas respostas está contribuindo para uma maior ou menor tolerância ao déficit hídrico em plantas. Essa contribuição pode ser pequena ou grande, individual ou como parte de um complexo maior de inter-relações. Na realidade, o que deve ocorrer é uma interação entre todas essas respostas (Hare & Cress, 1997; Nepomuceno et al., 2001) ou pelo menos uma parte delas, tendo como resultado final uma maior tolerância à seca.

Recentemente a Embrapa realizou experimentos de microarranjos com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos na raiz de uma linhagem de milho mais tolerante ao estresse de seca. Essa linhagem apresenta a característica de apresentar o intervalo de florescimento reduzido mesmo na presença do estresse trazendo produtividade relativa mais alta do que as outras linhagens. Foi utilizado uma lamina de oligos de 46,128 oligonucleotídeos de 70pb representando genes expressos de milho ([www.maizearray.org](http://www.maizearray.org)). Os dados gerados por esse experimento concentraram-se em genes relacionados principalmente com transporte e resposta a estímulos. Os dados de genes diferencialmente expressos confirmado por Realtime serão integrados com mapeamento e banco de dados para avaliar o efeito do gene na tolerância ao estresse.

## Considerações finais

Tolerância a seca é uma característica quantitativa controlada por muitos genes, com baixa herdabilidade e alta interação entre genótipo e ambiente. O melhoramento de espécies vegetais visando tolerância à seca é ainda mais complicado devido a outros fatores abióticos como temperatura, irradiação e toxicidade e/ou deficiência de nutrientes. As características de certos solos podem afetar o balanço de diferentes estresses abióticos. Para o uso de

seleção assistida por marcadores é necessário as regiões de tolerância estarem muito bem definidas para um possível sucesso desse processo e é difícil definir se essa estratégia tem tido sucesso. Deve-se considerar a interação de múltiplos estresses, a fenologia da planta e a integração com características de tolerância à seca, QTLs, microarranjos, e transgenia. Deve-se ser específico a um germoplasma apropriado adaptado a um ambiente escolhido e extensiva definição de mecanismos moleculares e morfo-fisiológicos.

Verificou-se na Embrapa a necessidade de desenvolver um projeto multidisciplinar sobre tolerância à seca em milho, sorgo, arroz e trigo, que envolvesse a caracterização de forma detalhada de sítios de seleção utilizados para fenotipagem (aspectos físico-hídricos e químicos) para garantir a imposição do estresse hídrico de forma adequada quanto à sua intensidade e tempo de exposição (fase fenológica desejada) nas culturas estudadas; a fenotipagem de recursos genéticos buscando identificar materiais mais tolerantes à seca e gerando dados para uso nos trabalhos de mapeamento das quatro espécies; a identificação de mecanismos morfo-fisiológicos relacionados com a tolerância à seca nas diferentes culturas; a identificação de regiões genômicas (QTLs) e genes ligados à tolerância à seca utilizando estratégias de genômica posicional e funcional; a organização de forma digitalizada dos dados gerados; e a criação de bases para estratégias futuras visando desenvolver cultivares mais adaptadas às condições de limitação hídrica.

Uma correta fenotipagem, associada ao uso de materiais genéticos contrastantes, dará subsídio para que modernas técnicas de biologia molecular sejam aplicadas para identificar genes e entender os mecanismos biológicos a eles relacionados. Para isso, os resultados advindos do mapeamento de QTLs, mapeamento associativo, microarranjos de DNA, bibliotecas subtrativas e sequenciamento massivo de cDNA serão integrados por meio de ferramentas de bioinformática. Esse vasto conjunto de informações genético-moleculares será uma valiosa fonte de genes, promotores e marcadores para serem validados e utilizados no futuro, em projetos visando o desenvolvimento de cultivares via melhoramento assistido ou transgenia.

## Referências

- Allen, R.G.; Pereira, L.S.; Raes, D.; Smith, M. (1998) Crop evapotranspiration: guidelines for computing crop water requirements. Rome: FAO, 1998. 300p. (FAO. Irrigation and drainage paper, 56).
- Baker SS, Wilhelm KS, Thomashow MF. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol*. 1994 Mar;24(5):701-13
- Bhatnagar-Mathur, P.; Vadez, V.; Sharma, K.K. (2008) Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep* 27: 411-424.
- Bohnert, H. J.; Nelson, D. E.; Jensen, R. G. (1995). Adaptations to



environmental stresses. *The Plant Cell*, 7:1099-1111.

Borlaug, N.E.; Doswell, C.R. (2005) Feeding a world of ten billion people: a 21st century challenge. In R. Tuberosa, RL Phillips, M Gale, eds, *Proceedings of the International Congress in the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution*, 27-31 May 2003, Bologna, Italy. Avenue Media, Bologna, Italy pp 3-23.

Bray, E. A. (2002). Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarrays and differential expression data. *Ann Bot*, 89:803-811.

Bray, E. A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol*. 103:1035-1040.

Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci*. 2: 48-54.

Byrne, P.F., J. Bolanos, G.O. Edmeades, and D.L. Eaton. 1995. Gains from selection under drought versus multilocation testing in related tropical maize populations. *Crop Science* 35:63-69.

Collins, N.C.; Tardieu, F.; Tuberosa R. (2008) Quantitative trait loci and crop performance under abiotic stress: where do we stand? *Plant Phys*. 147: 469-486.

Coolan, N.; Forrest, A.R.R.; Kolle, G.; Gardiner, B.B.A.; Faulkner, G.F.; Brown, M.K.; Taylor, D.F.; Steptoe, A.L.; Wani, S.; Bethel, G.; Robertson, A.J.; Perkins, A.C.; Bruce, S.J.; Lee, C.C.; Ranade, S.S.; Peckham, H.E.; Manning, J.M.; McKernan, K.J.; Grimmond, S.M. (2008). Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing. *Nature Methods*, 1223: 1-7.

Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Leslie, S.B.; Fisk, E. (1993). Mechanisms of stabilization of dry biomolecules in anhydrobiotic organisms. In: Close TJ, Bray EA (eds.), *Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress*, p. 11-20. Amer. Soc. Plant Physiology, Riverside, CA.

Durães, F.O.M.; Gama, E.E.G.; Gomide, R.L.; Andrade, C.L.T.; Guimarães, C.T., Magalhães, J.V. (2005) Phenotyping maize for drought response in Brazilian tropical lands: Approaches to breeding programs and genomics studies. Pp. 7-9 In: *INTERDROUGHT II – The 2nd International Conference on Integrated Approaches to Sustain and Improve Plant Production under Drought Stress*, 2., 2005, Rome, Italy. *Annals ... Rome: Interdrought-II Committee; University of Rome*, 2005. (Rome, Italy, from 24th to 28th September 2005 at University of Rome “La Sapienza”).

Goddijn, J.M.; Verwoerd, T.C.; Voogd, E.; Krutwagen, R.W.H.H.; Graaf, P.T.H.M.; Poels, J.; Dun, K.; Kees; Ponstein, A.S.; Damm, B.; Pen, J. (1997). Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiology* 113:181-190.

Hare, P.D.; Cress, w.a. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21:79-102.

Hare P; Plessis S.P.; Cress W.A.; Staden J.V. (1996) Stress-induced changes in plant gene expression. *South Africa Journal of Science* 92:431-439.

Harris, K.; Subudhi, P.K.; Borrell, A.; Jordan, D.; Rosenow, D.; Nguyen, H.; Klein, P.; Klein, R.; Mollet, J. (2007) Sorghum stay-green QTL individually reduce post-flowering drought-induced leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 58: 327-338.

Ingram J.; Bartels, D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biology* 47: 377-403.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 1998 Aug;10(8):1391-406.

Maurel, C.; Reizer, J.; Schroeder, J. I.; Chrispeels, M. J. 1993. The vacuolar membrane protein - TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. 12:2241-2247.

Muller, J.; Boller, T.; Wiemken, A. (1995) Trehalose and Trehalase in plants: Recent developments. *Plant Science* 112:1.

Nepomuceno, A.L.; Farias, J. R. B.; Neumaier, N.; Cattelan, A.J; Oya, T; Delattre, N. (2001) Estratégias para amenizar impactos decorrentes das adversidades climáticas. In: Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja.

Pennisi E (2008). The blue revolution, drop by drop, gene by gene. *Science* 320: 21-39.

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi- Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA Microarray. *Plant Cell* 13:61–72

Shen, B.; Jensen, R.G.; Bohnert, H.J. (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology* 115:527-532.

Shen, L.; Courtois, B.; McNally, K.L.; Robin, S. Li. Z. Evaluation of near-isogenic lines introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection. *Theor. Appl.Genet.* 103:75-83, 2001.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* 115:327-334.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold

Thomashow MF. Plant Cold Acclimation: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1999 Jun;50:571-599

Tuberosa, R.; Salvi, S.; Sanguineti, M.C.; Landi, P.; Maccaferri, M.; Conti, S. (2002) Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Annals of Botany* 89: 941-963.

Tuberosa, R.; Salvi, S. (2006) Genomics approaches to improve drought tolerance in crops. *Trends Plant Sci* 11: 405–412.

Vargas, M.; van Eeuwijk, F.; Crossa, J.; Ribaut, J-M. (2006) Mapping QTLs and QTL x environment interaction for CIMMYT maize drought stress program using factorial regression and partial least squares methods. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1009-1023.

Yamada, S.; Katsuhara, M.; Kelly, W.; Michalowski, C. B.; Bohnert, H. (1995). A family of transcripts encoding water channels proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7:1107-1112.

Yamaguchi-Shinozaki, K.; Kasuga, M.; Liu, Q.; Nakashima, K.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Shinwari, Z.K.; Seki, M.; Shinozaki, K. (2002). Biological mechanisms of drought stress response. In: Iwanaga, M., Genetic engineering of crop plants for abiotic stress. Jircas Working Report No 23, Japan.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell.* 1994 Feb;6(2):251-64.

Zhu, J.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A. (1997) Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Review in Plant Science* 16:253-27.



## **SESSÃO IV - ENGENHARIA GENÉTICA APLICADA À TOLERÂNCIA À SECA**



## ESTRATÉGIAS DE ENGENHARIA GENÉTICA PARA TOLERÂNCIA À SECA EM PLANTAS ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO

*Alexandre Lima Nepomuceno<sup>1</sup>, Renata Fuganti<sup>1</sup>, Norihito Kanamori<sup>2</sup>, Selma dos Santos Pereira<sup>3</sup>, Fabiana Aparecida Rodrigues<sup>1</sup>, Norman Neumaier<sup>1</sup>, José Renato Bouças Farias<sup>1</sup>, Francismar Correa Marcelino<sup>1</sup>*

Segundo a OECD (2010), a produção mundial de alimentos terá que dobrar a partir dos níveis atuais considerando-se que estejam certas as projeções de que a população mundial atingirá em 2050 mais de nove bilhões de pessoas. Para que isto aconteça deverá ocorrer uma intensificação no uso da terra através da agricultura e pecuária, que junto com o crescimento industrial das cidades levará ao aumento das emissões de gases de efeito estufa. Projeções para 2050 sugerem que o aumento das temperaturas médias provocará uma ampliação na variabilidade das características climáticas de todo planeta onde secas prolongadas e/ou chuvas intensas ocorrerão com maior frequência. Isto certamente afetará a produção de alimentos, principalmente nos países maiores produtores. Assim, é essencial que estratégias de mitigação comecem a ser desenvolvidas para que nas próximas décadas seja possível manter o equilíbrio na produção mundial de alimentos. Neste contexto a ocorrência de secas será o principal fator impactante em países produtores de grãos como o Brasil, a Argentina, os EUA e o Canadá. Por exemplo, a Região Sul do Brasil, responsável por 40% da produção nacional de soja é a que mais tem sofrido com perdas devido à ocorrência de secas. Nas safras 2003/04 e 2004/05, as perdas médias decorrentes da seca, estimadas com base em safras normais em anos imediatamente anteriores ou posteriores, e com base na mesma área plantada, ficaram em torno de 24% e 44%, respectivamente. Na safra 2004/05, somente o Rio Grande do Sul perdeu em média 70% de sua produtividade. Nas últimas dez safras as perdas diretas podem ser estimadas em mais de U\$18 bilhões devido à ocorrência de secas (Farias et al, 2006).

A busca por variedades comerciais mais tolerantes a períodos de deficiência hídrica através do melhoramento clássico é relativamente difícil devido à complexidade dos mecanismos de resposta desenvolvidos pelas plantas, e neste sentido, a biotecnologia vem se tornando uma importante aliada do melhoramento genético no desenvolvimento de variedades mais adaptadas a diferentes condições de déficit hídrico. Especificamente com a engenharia genética tem sido possível desenhar estratégias moleculares que permitem que as plantas tolerem por mais tempo a indisponibilidade de água no solo. O sequenciamento completo do genoma de várias espécies, mas principalmente a compreensão da função de um gene específico e da sua interação com

<sup>1</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR. E-mail: nepo@cnpso.embrapa.br

<sup>2</sup> Japan International Researcher Center for Agricultural Sciences (JIRCAS)

<sup>3</sup> Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal. *In memoriam*.

diversos outros, tem permitido aos pesquisadores entender a complexa malha de respostas que as plantas utilizam para se proteger de estresses ambientais. São estes conhecimentos que impulsionam o surgimento de novas ideias de engenharia genética para alterar ao nível molecular os mecanismos de defesa, visando afetar respostas fisiológicas e agrônômicas das culturas ao déficit hídrico.

Frequentemente, os genes selecionados nestes estudos visando tolerância as condições adversas do ambiente, são aqueles que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de vários osmoprotetores (proteínas LEA, *Late Embryogenesis Abundant*; prolina; glicina-betaina; rafinose; trehalose; etc), enzimas detoxificantes (superóxido dismutase, SOD; ascorbato peroxidase, APX; catalases, CAT; glutatona redutase, GR; etc), ou ainda genes que codificam Fatores de Transcrição (FT), que são proteínas envolvidas nas etapas iniciais de expressão e regulação gênica e na transdução de sinais, em resposta aos estresses.

Por participarem de etapas iniciais do processo de percepção e sinalização, os fatores de transcrição acabam regulando a expressão de vários grupos de genes. Isto torna interessante o uso de FT em trabalhos de engenharia genética onde se busca aprimorar características de tolerância à seca, salinidade, congelamento, etc, que são basicamente características poligênicas.

As respostas moleculares dos vegetais aos estresses ambientais podem basicamente ser divididas em rotas dependentes ou independentes da presença do ácido abscísico (ABA). Na via independente de ABA, foi identificada em *Arabidopsis thaliana* uma família de FT, conhecida como DREB (*Dehydration Responsive Element Binding protein* – Proteína de ligação ao elemento responsivo à desidratação; também conhecido como CBF, **C-repeat-binding factor** – fator de ligação a repetições C). As proteínas DREB atuam no topo da cascata de eventos moleculares, induzindo respostas de defesa contra a desidratação celular. Genes homólogos a essa família tem sido identificados em canola, cevada, trigo, arroz (*OsDREB1A*, *OsDREB1B*, *OsDREB1C*, *OsDREB1D* e *OsDREB2A*), soja (*GmDREBa*, *GmDREBb* e *GmDREBc*, *GmDREB2A*) e milho (*ZmDREB1A* e *ZmDREB2A*). A proteína DREB1A atua como um fator de transcrição e possui em sua estrutura o domínio ERF/AP2 (*ethylene responsive factor* – fator responsivo ao etileno/APETALA) que interage especificamente com uma região conservada denominada DRE (*Dehydration Responsive Element* - elemento responsivo à desidratação), um elemento *cis*-atuante presente na região promotora de vários genes ativados durante condições de seca (Maruyama et al., 2009).

Trabalhos científicos (Pellegrineschi, et al., 2002; Kasuga et al., 2004; Qin et al., 2007; Chen et al., 2007) têm demonstrado o potencial da manipulação genética dos genes *DREB* no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGM) tolerantes à seca, à alta salinidade e ao frio. A super expressão deste FT através do uso de promotores estresse induzidos (ex.:



rd29), ou constitutivos (ex.: 35S) estimula um aumento na indução de genes ativados por proteínas DREB e que estão envolvidos em mecanismos de defesa celular contra a desidratação.

Em tabaco, a construção gênica *rd29A:AtDREB1A* resultou em plantas GM mais tolerantes aos estresses de seca, alta salinidade e frio, quando comparadas às plantas controle. Plantas de tomate transformadas com a construção gênica *35S:AtDREB1B* sob condições de déficit hídrico mostraram maior tolerância à seca quando comparadas às selvagens. Já, plantas de trigo transformadas com a construção gênica *rd29A:AtDREB1A* tiveram folhas com turgor reduzido somente após 15 dias de déficit hídrico, enquanto plantas controle não foram tolerantes e morreram.

Em arroz GM expressando constitutivamente os genes *DREB1A* e *ABF3*, fatores de transcrição da via ABA-independente e ABA-dependente, respectivamente, as plantas não transformadas, após tratamento de seca, apresentaram murcha, enrolamento foliar e diminuição na clorofila mais intensamente do que as linhagens transgênicas. Após a reidratação, as PGMs apresentaram o crescimento praticamente igual ao tratamento controle e sobreviveram, enquanto as plantas não transformadas apresentaram uma redução severa no crescimento e morreram.

Ainda, em outras espécies vegetais, os genes da família DREB também aumentaram a tolerância a outros estresses ambientais, como em batata GM que apresentou maior tolerância à alta salinidade e ao frio quando transformada com a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*. Em amendoim GM com a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*, e submetido a 12 dias de déficit hídrico no solo, os efeitos de retardo no crescimento não foram observados e as plantas mantiveram taxas de eficiência de transpiração até 40% maiores quando comparadas com plantas controle.

Em soja, a construção gênica *rd29A:AtDREB1A*, foi introduzida com sucesso, via biobalística, em embriões de uma cultivar sensível à seca. Os resultados moleculares indicaram que o promotor *rd29A* foi ativado no tratamento de seca induzindo a expressão do FT *AtDREB1A* e, consequentemente, ativando em níveis mais elevados, em relação aos observados nas plantas não transformadas, genes de defesa contra a dessecação. Genes estes envolvidos na osmoproteção, e genes que, entre outras funções, codificam proteínas que atuam direta ou indiretamente na proteção de estruturas celulares garantindo o funcionamento dos processos metabólicos vitais das plantas (Polizel, 2007).

As análises de microarranjos de DNA utilizando plantas de soja GM com a construção gênica *rd29:AtDREB1A*, identificaram mais de 100 genes diferencialmente expressos nos eventos estudados, entre eles, fatores de transcrição como *bZIP*, *WRKY*, *MYB*, *NAC*; genes envolvidos com o metabolismo fotossintético, metabolismo de aminoácidos, de carboidratos, de citocromo, aquaporinas, prolina, entre outros, sendo que várias proteínas

desconhecidas também foram identificadas como reguladas pela proteína *AtDREB1A* em soja (Stolf, 2007; Stolf-Moreira, 2010).

Dados fisiológicos obtidos a partir de experimentos em casa de vegetação realizados com plantas *rd29A:AtDREB1A* positivas indicaram que as plantas transformadas apresentaram maior condutância estomática, maiores taxas fotossintética e transpiratória, além de maior eficiência fotossintética quando comparadas com plantas controle não GM, sugerindo a ativação de mecanismos que podem culminar em uma maior tolerância ao déficit hídrico (Beneventi, 2006; Polizel, 2007; Stolf, 2007).

Outro importante membro da família DREB, o gene *AtDREB2A* também vem sendo utilizado no desenvolvimento de PGMs visando tolerância a estresses ambientais. Este gene também possui o domínio conservado de ligação ao DNA, ERF/AP2 e reconhece a sequência DRE dos genes de resposta. Os genes *AtDREB2A* e *AtDREB2B* são ativados, especificamente, em resposta à seca e à salinidade, e estão localizados respectivamente, nos cromossomos cinco e três de *A. thaliana* (Nakashima et al., 2009). A partir de estudos funcionais do FT *AtDREB2A*, a deleção de domínios de regulação negativa da proteína foi realizada e uma forma constitutivamente ativa da proteína *AtDREB2A* (*AtDREB2A CA*) foi desenvolvida. A forma *AtDREB2A-CA* unida a diferentes promotores (constitutivos, *35S*; e estresse-induzidos, *rd29A*), estimulou a expressão de genes envolvidos nas defesas celulares contra a dessecação, sem promover redução no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da plantas GMs.

Análises de expressão gênica em plantas de *A. thaliana* super expressando a proteína *AtDREB2A-CA* identificaram 21 genes induzidos pela superexpressão e dentre eles, 14 genes foram induzidos exclusivamente sob déficit hídrico e seus promotores apresentavam a sequência *core* DRE (Sakuma et al., 2006). Outros trabalhos comprovaram que, em *A. thaliana*, DREB2A também induz genes de resposta ao calor (*Heatshock*), como fatores de choque térmico (ex.: Hsf - *Heat shock factors*; *AtHsfA3*) responsáveis pela regulação e indução de genes responsivos a altas temperaturas (ex.: HSP, *Heat Shock Proteins*, Schramm et al., 2008) e de outros genes que induzem respostas ao déficit hídrico como chaperonas moleculares, proteínas LEA, genes de síntese de açúcares osmoprotetores, dentre outros.

Outra família de fatores de transcrição que tem sido utilizada experimentalmente no desenvolvimento de PGMs mais tolerantes a estresses ambientais é a família AREB (*Abscisic acid-responsive element binding protein* – proteína de ligação ao elemento de resposta ao ácido abscísico) ou ABF (*ABRE-binding factors*). Este fator de transcrição é do tipo bZIP (*Basic domain/leucine zipper* – zíper básico de leucina) e participa da via de resposta dependente de ABA, um fitohormônio que, em condições de seca promove o fechamento estomático nas células guarda e regula a expressão de muitos genes ABA – induzidos. Esses genes possuem a sequência conservada ABRE

(*abscisic acid responsive element* – elemento de resposta ao ácido abscísico - PyACGTGGC) em suas regiões promotoras, nas quais o FT AREB se liga ativando a transcrição de genes (Furihata et al., 2006; Yoshida et al., 2010) cujos produtos funcionam na tolerância a desidratação em tecidos vegetativos e sementes. A importância da família AREB na tolerância celular ao déficit hídrico tem sido reforçada por resultados obtidos por outros pesquisadores que demonstraram que PGMs de *Arabidopsis* super expressando a forma ativa de *AREB1* apresentaram alta sensibilidade ao ABA e aumentada tolerância à seca.

Várias estratégias moleculares podem ser trabalhadas visando o aumento da capacidade das plantas em tolerar períodos de imposição de condições ambientais adversas. Entretanto, durante o desenvolvimento de variedades comerciais GM para tolerância à seca deve haver uma estreita parceria entre melhoristas, fisiologistas vegetais e biólogos moleculares, para que os ganhos observados em condições de laboratórios, realmente reflitam em redução de perdas em condições reais de lavoura. Cabe ressaltar ainda que PGMs tolerantes a estresses ambientais, como a seca, deverão ser sempre utilizadas em conjunto com outras práticas agronômicas, como por exemplo, o plantio direto que permite uma melhor conservação da água na lavoura, e consequentemente, uma maior eficiência do uso de água pelas plantas. Ao agricultor, maior beneficiário das tecnologias desenvolvidas com o uso das técnicas de manipulação genética, recomenda-se o uso de variedades mais tolerantes aos estresses ambientais, aliado ao correto manejo das lavouras através de práticas agrícolas sustentáveis. Só assim, pequenos, médios e grandes produtores serão capazes de tirar o máximo proveito das novas tecnologias, aumentando a produção de grãos, mas principalmente reduzindo significativamente as perdas econômico-financeiras resultantes de períodos ambientais hostis.

Neste contexto, também deve ficar esclarecido que, todas as linhas de pesquisa hoje desenvolvidas nas várias instituições nacionais e internacionais de pesquisa agrícola objetivam fundamentalmente, no caso de deficiência hídrica no solo, apenas amenizar as perdas que normalmente ocorrem durante eventos de seca, fazendo com que as plantas GMs geradas sejam capazes de tolerar períodos mais prolongados de seca, até que uma nova chuva ocorra, com o retorno do ambiente favorável ao desenvolvimento vegetal.

## Referências

Beneventi, M.A. Transformação genética em soja pela inserção da construção gênica contendo a região promotora do gene rd29A e a região codante do gene DREB1A de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca. 126 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, PR. 2006.

Chen, M.; Wang, Q.-Y.; Cheng, X.-G.; Xu, Z.-S.; Li, L.-C.; Ye, X.-G.; Xia, L.-Q.; Ma, Y.-Z. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 353:2, 299-305, 2007.

Farias, J. R. B.; Nepomuceno, A. L.; Neumaier, N.; Tobita, S.; Almeida, I. R. de. Restrições de disponibilidade hídrica: obtenção de elevados rendimentos de grãos de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 2006, Londrina. Resumos... Londrina, PR: Embrapa Soja. p. 32-33. 2006.

Furihata, T.; Maruyama, K.; Fujita, Y.; Umezawa, T.; Yoshida, R.; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. PNAS. 103(6): 1988-1993. 2006.

Maruyama, K.; Takeda, M.; Kidokoro, S.; Yamada, K.; Sakuma, Y.; Urano, K.; Fujita, M.; Yoshiwara, K.; Matsukura, S.; Morishita, Y.; Sasaki, R.; Suzuki, H.; Saito, K.; Shibata, D.; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. Metabolic Pathways Involved in Cold Acclimation Identified by Integrated Analysis of Metabolites and Transcripts Regulated by DREB1A and DREB2A. Plant Physiology. 150:1972–1980. 2009.

Nakashima, K.; Ito, Y. and Yamaguchi-Shinozaki, K Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis* and Grasses. Plant Physiology. 149: 88–95. 2009.

Polizel, A. M. Avaliações moleculares, morfo-anatômicas e fisiológicas de soja geneticamente modificada com a construção rd29A:DREB1A de *Arabidopsis thaliana*, visando tolerância à seca. 125 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, PR. 2007.

OECD *Observer* n°278, March. 2010.

Sakuma, Y.; Maruyama, K.; Qin, F.; Osakabe, Y.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water- stress-responsive and heat-stress - responsive gene expression. Proceedings National. Academy. Science. USA 103(49):18822-18827. 2006.

Schramm, F.; Larkindale, J.; Kiehlmann, E.; Englich, G.; Vierling, E.; Pascal, von K-D. A cascade of transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response in *Arabidopsis*. The Plant Journal. 53:264-274. 2008.

Stolf, R. Identificação e análise da expressão de genes relacionados com tolerância à seca em soja através de microarranjos de DNA e PCR em tempo real. 159 f. Tese de Doutorado. UNESP-Jaboticabal. 2007.

Stolf-Moreira, R. ; Medri, M.E. ; Neumaier, N. ; Lemos, N.G. ; Brogin, R.L.; Marcelino, F.C. ; de Oliveira, M.C.N. ; Farias, J.R.B. ; Abdelnoor, R.V. ; Marcelino, F.C.; Nepomuceno, A.L. . Cloning and quantitative expression analysis of drought-induced genes in soybean. Genetics and Molecular Research, v. 9, p. 858-867, 2010.

Kasuga, M.; Miura, S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiology*, 45(3), 346-350, 2004.

Pellegrineschi, A.; Ribaut, J.-M.; Trethowan, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Hoisintong, D. Progress in the genetic engineering of wheat for water-limited conditions. JIRCAS Working Report. p.55-60, 2002.

Qin, F.; Kakimoto, M.; Maruyama, K.; Osakabe, Y.; Tran, L-S.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. Regulation and functional analysis of ZMDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal*. 50:54-69, 2007.

Yoshida, T.; Fujita, Y.; Sayama, H.; Kidokoro, S.; Maruyama, K.; Mizoi, J.; Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal*. 61:672–685. 2010.

## THE MECHANISM OF BiP-MEDIATED INCREASES IN WATER STRESS TOLERANCE IN SOYBEAN

Pedro A. B. Reis, Jerusa Q. Faria, Murilo Alves, Gustavo L. Rosado, Luciano G. Fietto, Elizabeth P B Fontes<sup>1</sup>

Despite the potential of the endoplasmic reticulum (ER) stress response to accommodate adaptive pathways, its integration with other environmental-induced responses is poorly understood in plants. We have previously demonstrated that the ER-stress sensor binding protein (BiP) from soybean exhibits an unusual response to drought. The members of the soybean BiP gene family are differentially regulated by osmotic stress and soybean BiP confers tolerance to drought. As a first step towards understanding the BiP cross-tolerance mechanisms, we have performed a global transcriptional analysis to conduct a broad survey of genes whose expression is affected by both osmotic- and ER-stresses. Genes in this integrated pathway with the strongest synergistic induction encoded proteins with diverse roles, such as plant-specific development and cell death (DCD) domain-containing proteins (N-rich proteins), an ubiquitin-associated (UBA) protein homolog and NAC domain-containing proteins. This integrated pathway diverges further from characterized specific branches of ER-stress as downstream targets were inversely regulated by osmotic stress. We also found that this integrated pathway transduces a PCD signal generated by ER- and osmotic-stresses that results in the appearance of markers associated with leaf senescence. By using one-hybrid screening in yeast, we have isolated an Early Responsive Dehydration 15 (ERD15) homolog gene as a component of the integrated pathway that acts immediately upstream to N-rich proteins (NRP-A and NRP-B). We showed that *Glycine max* (Gm) ERD15 exhibited transcriptional activity in yeast and binds specifically the NRP-B promoter *in vitro*. Furthermore, GmERD15 was localized in the nucleus where it was found to be associated with NRP-B promoter *in vivo* and activates expression of NRP-B in protoplasts. In addition to deciphering the components of the integrated pathway, we found that BiP, an ER-resident molecular chaperone that regulates ER-stress response, also modulated the cell death response mediated by the integrated pathway. Enhanced expression of BiP attenuates ER-, osmotic-, drought and cycloheximide-induced cell death. Ectopic expression of BiP in transgenic lines attenuated the leaf necrotic lesions caused by the cell death inducers, tunicamycin and cycloheximide, as well as kept shoot turgidity under PEG-induced dehydration conditions. The BiP-mediated attenuation of cell death was also confirmed by the lack of induction and in some cases by delayed expression of senescence-associated marker genes in BiP-overexpressing lines. These phenotypes were also coordinated with a decrease or a delay in the induction of the cell death marker genes NRP-A and NRP-B that are involved in transducing a PCD signal emanated from the ER-stress and osmotic-stress. We directly assessed the BiP modulation

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular/ Bioagro, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. E-mail: bbfontes@ufv.br

of NRP-mediated cell death signaling response by using an *Agrobacterium* transient expression assay in tobacco lines with enhanced (sense lines) and suppressed (antisense lines) expression of BiP. Enhanced expression of BiP in sense transgenic lines prevents NRP-induced chlorosis in agroinfiltrated sectors, whereas silencing of endogenous BiP in antisense lines accelerates the onset of leaf senescence. Collectively, these results indicate a direct correlation between BiP mRNA abundance and NRP-induced leaf senescence and argue favorably for a direct involvement of BiP in modulating NRP-mediated cell death response.

## MELHORAMENTO DO FEIJÃO PARA TOLERÂNCIA À SECA VIA ENGENHARIA GENÉTICA

*Francisco J. L. Aragão<sup>1</sup>*

O desenvolvimento de uma planta depende de vários fatores ambientais que determinam a sua produtividade. O estresse ambiental é considerado primariamente como resposta a fatores físicos do meio ambiente e estão entre os principais fatores limitadores dos cultivos agrícolas, principalmente temperaturas inadequadas, excesso ou falta de água, e alta concentração salina nos solos. As plantas têm desenvolvido características adaptativas contra esses estresses. A resposta ao estresse por meio do desenvolvimento de mecanismos de defesa é a mais crucial função da célula vegetal. Esta defesa ocorre através da alteração no modelo de expressão gênica. Alterações sustentadas em nível chave de transmissão de metabólitos ou transcrição de fatores poderiam fornecer uma explanação de como o metabolismo das plantas é alterado por meio da exposição a variados estresses. Alternativamente trocas epigenéticas poderiam iniciar um papel por meio da permissão de alterações duradouras na expressão gênica.

O feijoeiro está entre as culturas mais vulneráveis a perdas de produção associadas ao estresse por déficit hídrico, que afeta praticamente todos os aspectos do crescimento da parte aérea e raiz. Em cerca de 93% da área de cultivo com feijoeiro na América Latina, a necessidade hídrica da planta não é plenamente satisfeita durante todo o seu crescimento. No Brasil todas as áreas de cultivo são vulneráveis, especialmente as regiões de cultivo no Nordeste e no oeste da Zona Central. Isso é ainda mais grave quando o estresse pelo déficit hídrico ocorre no período de pré-floração, na formação dos botões florais.

Nesse contexto, esforços têm sido feitos para a geração de variedades mais tolerantes ao estresse pelo déficit hídrico. Mais recentemente, começaram a ocorrer iniciativas para introduzir essa característica por engenharia genética. Eventos geneticamente modificados (GM) de várias espécies de importância agrônômica vêm sendo gerados com perspectiva de entrarem no processo regulatório, necessário para a autorização de plantios comerciais. No caso do feijoeiro, somente nos últimos três anos esse trabalho foi iniciado, objetivando a expressão de genes de forma regulada ou constitutiva. Entre os genes que se vêm introduzindo no feijoeiro, temos os de proteínas que se caracterizam pela regulação da transdução de sinais e na expressão gênica. Essas proteínas são fatores de transcrição, como por exemplo, a proteína DREB. Temos isolado proteínas tipo DREB de espécies nativas do Brasil ou exóticas, e inserido esses genes no genoma de plantas GM de feijoeiro. Alguns desses genes têm sido inseridos sob o controle de promotores induzidos por estresse, tais como o

---

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF.



do gene *rd29A*. Esses genes têm sido caracterizados em plantas modelo, demonstrando tolerância ao estresse hídrico.

Em associação com vários grupos de pesquisa (principalmente o consórcio de tolerância a seca coordenado pela *Universidad Autónoma del Estado de Morelos*, México; Universidade Federal de Viçosa (UFV); e JIRCAS, Japão), nosso grupo da Embrapa tem prospectado e identificado genes que podem gerar plantas de feijoeiros tolerantes ao estresse. Esses genes têm sido validados em plantas-modelo, como o fumo, ou outras plantas cultivadas, como a soja.

Em colaboração com a UFV, temos inserido genes de proteínas funcionais que protegem a célula vegetal contra a desidratação. Exemplos dessas proteínas protetoras de macromoléculas e membranas celulares incluem as chaperonas moleculares, como a HSP 70 BiP (70 kDa *Heat Shock Binding Protein*). Essas proteínas são expressas em resposta às condições de estresse térmico, funcionando como um “termômetro celular”. O estresse causado por alteração na temperatura pode ter efeitos devastadores no metabolismo vegetal. Quando o gene da proteína BiP de soja foi expresso em plantas GM de soja, gerou um retardo no processo de senescência foliar e proteção contra condições de estresse hídrico.

Vários outros genes estão sendo inseridos em feijoeiros GM, tais como aqueles relacionados com o metabolismo de trehalose e de prolina. Essas plantas estão sendo produzidas e avaliadas em condições controladas de casa de vegetação. Essas estratégias são complementares aos programas convencionais de melhoramento de plantas. Qualquer eventual linhagem GM gerada deve ser introduzida em um programa de teste de campo e, em caso de resultados positivos, devem ser introduzidas em programas de melhoramento e de biossegurança.



## **SESSÃO V - MELHORAMENTO GENÉTICO PARA TOLERÂNCIA À SECA**



## BREEDING FOR IMPROVED DROUGHT TOLERANCE IN MAIZE: CIMMYT'S EXPERIENCE

*G.N. Atlin and Jill Cairns<sup>1</sup>*

### The need for drought-tolerant maize

Maize is the staple food of hundreds of millions of people in tropical and subtropical areas of the developing world. In Meso-America, annual maize consumption exceeds 80 kg per capita in Guatemala, Honduras, and El Salvador, and rises to 125 kg in Mexico. But maize is also the most important cereal food crop in Sub-Saharan Africa (SSA), where consumption levels exceed 130 kg per capita per year in Lesotho, Malawi and Zambia (FAOSTAT 2006, 2003-2005 average). Maize is mainly a source of energy, providing over 20% of total calories in human diets in 21 countries, and over 30% in eleven. In countries with high maize consumption rates, it is also a critically important source of protein, particularly among low-income groups, who often cannot afford more expensive high-protein foods such as milk, eggs or meat. Maize accounts for more than 30% of total dietary protein in 12 countries.

Many of the countries in which maize is the staple food, particularly in SSA, have extremely low maize yields, and have been largely bypassed by the Green Revolution. The principal constraints on African maize yields are low soil fertility, drought, low use of chemical fertilizers, and low rates of hybrid adoption. In 2002-3, average fertilizer use was only 9 kg/ha of arable land in SSA, as opposed to 100 and 73 kg/ha in South Asia and Latin America respectively, and yields in Eastern and Southern Africa average 1.2 t/ha. Productivity increases are urgently needed. Farmgate prices for fertilizer are high, deterring use, and are unlikely to drop in the near term, but hybrid seed is becoming more accessible throughout the region. Development and delivery of maize hybrids and open-pollinated varieties combining improved yield potential with improved tolerance to drought and low-fertility stress appears to be the most promising approach to increasing maize productivity in Africa and other regions in Asia and Latin America facing similar constraints.

### Breeding for improved drought tolerance: wide-scale testing versus managed-stress screening

What is the most efficient approach to the development of high-yielding and stress-tolerant maize varieties for the developing world? Some lessons may be drawn from the US Corn Belt, where in Iowa, average rainfed yields increased from about 3 t ha<sup>-1</sup> in 1940 to over 10 in 2008. It has been well documented that genetic gains in the Corn Belt have resulted largely from increases in tolerance to a range of stresses such as drought, high plant density, low fertility, and cold (Castleberry et al., 1984; Duvick, 1997; Tollenaar et al., 2000), and that these increases have resulted from broad-scale selection within

---

<sup>1</sup> CIMMYT, Mexico. E-mail: g.atlin@cgiar.org

the target environment, via commercial testing networks sampling dozens or hundreds of rainfed locations, rather than through intentional selection for tolerance to specific stresses in purpose-designed screens. However, breeding programs in developing countries where drought is a frequent occurrence rarely have the resources to test new varieties on the scale required to reliably characterize germplasm for drought tolerance on the basis of naturally-occurring drought. For most stress-prone regions, information from multiple-environment trials (METs) conducted under rainfed conditions must be combined with information from managed-stress drought screens to ensure that, within any reasonable number of seasons for evaluation of new varieties, information on stress tolerance can be obtained. CIMMYT uses a managed-stress screening protocol that targets tolerance to drought at the flowering stage, by withholding irrigation approximately 4 weeks before anthesis, and that aims to generate a 60-70% yield reduction relative to a well-watered control.

The design and use of managed-stress environments as a selection tool is complex, and requires application of a selection theory framework. In this framework, yield in the target population of environments (TPE) is considered to be a trait that is correlated with yield in the breeder's selection environment (SE). In designing the selection strategy, breeders must take into account the frequency of occurrence of particular stresses within the TPE, the precision of yield estimation achievable within a managed-stress screen (broad-sense heritability, or  $H$ ) and the genetic correlation between yield in the screen and yield in the TPE. The genetic correlation between yield in the screen and yield in the TPE is difficult to measure and usually unknown, but for drought-prone environments, it should not be assumed *a priori* to be high. This is because managed drought screening trials are usually conducted outside the main production season, when photoperiod, temperature, humidity, and disease pressures differ from those in the rainy season. Nevertheless, out-of-season trials are usually the only possible option for ensuring the imposition of drought stress, and are routinely used by the CIMMYT maize program under the assumption that they are predictive of variety performance in drought events during the main season.

### **The problem of weights for stress versus non-stress trials**

Yield under drought, like yield under optimal conditions, is a highly polygenic trait with low heritability. In general, the broad-sense heritability or repeatability ( $H$ ) is somewhat lower in managed-stress trials than in adjacent, optimally-managed trials for both low-N and drought stress. For a series of comparisons conducted in managed-stress drought trials, Bolanos and Edmeades (1996) reported that  $H$  for grain yield on an entry-mean basis in single trials declined similarly from a mean of about 0.6 under well-watered conditions to 0.4 under very severe anthesis-stage stress. Part of the problem of low  $H$  for yield under drought stress results from the complexity of screening. Achieving appropriate stress levels in early-generation line populations with diverse flowering dates (because they have not yet been

characterized adequately) is difficult, with a considerable frequency of trials failing to differentiate materials due to excessive or insufficient stress. The problem of low heritability of yield in drought and low-N stress trials is compounded within many maize breeding programs, from a selection standpoint, by the fact that new genotypes are evaluated in Stage 1 testing (the preliminary testcross evaluation step) in only one or two managed stress trials for drought, whereas they are usually evaluated in three or more non-stress trials at the same stage. As a result, precision of estimation of yield under non-stress conditions is much higher than under stress, due to greater replication of the selection unit. Little attention has been paid to the problem of assigning proper weights to information from managed stress trials, which have relatively low precision due to low levels of environmental replication, when making selection decisions that also take into account more highly repeatable means estimated from non-stress trials conducted across more locations. Great care must be taken in incorporating this information in selection decisions. If the genetic correlation between performance in stress and non-stress environments is high, and  $H$  is low in stress trials relative to non-stress trials, assigning too much weight to data from managed stress screens may reduce gains in both stress and non-stress environments. Methods for combining data from trials differing in information content to predict performance in a target environment are available (Atlin et al. 2000; Piepho and Möhring 2005), but these methods depend on the availability of information on the frequency of drought within the TPE, and on an accurate estimation of the correlation between yield in natural droughts and managed stress environments, which is rarely available. In general, the safest and most practical way to use managed stress screening information is defensively, as in a disease screening nursery, ie, using the managed stress screen to discard highly sensitive materials, but not selecting at a high intensity.

Despite the problems inherent in selection based on combining data from yield trials conducted under optimal and managed-stress conditions, the CIMMYT maize breeding program has demonstrated that this approach is effective in drought-prone environments in SSA. Breeding for drought-prone environments was initiated in the 1970's, and selection for yield under managed stress was integrated into the product development pipeline in Southern Africa in 1997. In a series of 97 multi-location trials conducted over 3 years in eastern and southern Africa, and which yielded less than  $3 \text{ t ha}^{-1}$  due to drought and/or low-N stress, 42 CIMMYT hybrids developed via a protocol that included managed stress screening out-yielded 41 commercial hybrids by an average of 18% (Banziger et al. 2006). The proportionate advantage of hybrids developed using the CIMMYT managed-stress protocol was greatest in the lowest-yielding environments. The combined use of managed-stress testing in early generations and multi-location testing in trans-national networks at later stages has been expanded in SSA under the auspices of the Drought Tolerant Maize for Africa project, which links CIMMYT's breeding program with national and commercial programs in 13 African countries.

## Improving selection gains

CIMMYT and other institutions have invested considerable effort in investigating secondary traits that could be incorporated in selection indices to increase genetic gains. To be useful in selection in a commercial context, a secondary trait must be highly correlated with the target trait and either have higher H or be much cheaper to measure, permitting selection intensity to increase. To date, we have not found any traits that fulfill these criteria in maize.

The low repeatability of managed drought trials has emerged as the most serious constraint on gains in the drought tolerance breeding programs of both CIMMYT and its partners. Combined analysis of regional trials in CIMMYT's Southern African drought breeding network has shown that both the genotype  $\times$  trial and plot residual variances are much higher relative to genetic variance in stress trials than in non-stress trials; stress trials require approximately three times the number of replicates needed by non-stress trials to reach the same level of repeatability. Substantial effort is now being invested in environmental characterization and monitoring, and local error control via soil variability and yield mapping and appropriate statistical methods, to improve the signal-to-noise ratio in managed stress drought trials.

## Genomic selection for drought tolerance

Efforts to identify and pyramid QTL conferring improved drought tolerance have been disappointing in maize, likely due to the highly polygenic nature of the trait. Marker technologies based on next-generation sequencing of a genome representation will soon reduce the cost of detecting many thousands of polymorphic features in a breeding population to less than \$20 per DNA (E. Buckler, personal communication), permitting adoption of more efficient breeding plans. Genomic selection (GS) is a new method for marker-based improvement of polygenic traits. In "traditional" marker-based selection approaches, markers putatively associated with major QTL are first mapped in a segregating population. Then progeny are selected that combine favorable QTL alleles with large effects. When this selection is repeated for several cycles without additional phenotyping, it is referred to as marker-assisted recurrent selection (MARS). MARS increases the frequency of favorable QTL alleles in a population. Response to MARS has been mixed; Eathington et al. (2007) reported a large selection response in many commercial maize breeding populations, but Moreau et al. (2004) reported no improvement over phenotypic selection. Poor results from MARS likely result from biased QTL effect estimates (Heffner et al. 2009) that arise from identifying QTL using stringent significance tests (Beavis, 1994). In GS, instead of selecting on the basis of a few significant QTL, all marker or haplotype effects are incorporated in a genomic estimated breeding value to predict breeding or genotypic value (Meuwissen et al. 2001). This avoids problems of selection bias associated with QTL effect estimation with significance tests, and captures more genetic variability for highly polygenic traits (Bernardo 2008). GS allows selection to



be decoupled from phenotyping, allowing selection for drought tolerance even in years when conditions are not optimal for drought screening, since selection can be conducted on haplotype effect estimates from previous trials. GS will also permit selection for drought tolerance by breeding programs lacking the capacity to phenotype for the trait, since haplotype effect estimates can be shared among breeding programs with similar germplasm and TPE.

## Conclusions

Breeding for drought tolerance has been successful at CIMMYT using a breeding pipeline that incorporates managed stress screening. This is in contrast to the approach taken until recently by large seed companies, which have relied on wide-scale screening under rainfed conditions. CIMMYT's drought screen targets the sensitive flowering stage, and aims to reduce yield by 60-70%. Drought screens are characterized by very low repeatability, and care must be taken when using the data; assigning too much weight to low-precision means from stress trials can actually reduce gains in both stress and non-stress environments. A renewed effort in controlling noise in stress trials, both at the trial and plot levels, combined with the adoption of genomic selection technology, is likely to substantially improve breeding progress for drought tolerance.

## References

- Atlin GN, Baker RJ, Lu X, McRae KB. 2000. Selection response in subdivided target regions. **Crop Sci.** 40:7-13.
- Banziger M., Setimela PS, Hodson D, Vivek B. 2006. Breeding for improved abiotic stress tolerance in maize adapted to southern Africa. *Agricultural Water Management* 80: 212-224.
- Beavis WD. 1994 The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative QTL studies, in: D. B. Wilkinson (Ed.), *Proceedings of the 49th Annual Corn and Sorghum Research Conference, American Seed Trade Association, Washington, D.C.* pp. 250-265.
- Bernardo R. 2008. Molecular Markers and Selection for Complex Traits in Plants: Learning from the Last 20 Years. *Crop Science* 48:1649-1664. DOI: 10.2135/cropsci2008.03.0131.
- Bolanos J, Edmeades GO. (1996) The importance of anthesis-silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res.* 48:65-80.
- Castleberry RM, Crum CW, Krull F. 1984. Genetic yield improvement of U.S. maize cultivars under varying fertility and climatic environments. *Crop Science* 24: 33-36.
- Crawford EW, Jayne TS Kelly VA. 2005. Alternative approaches to promoting fertilizer use in Africa, with particular reference to the role of fertilizer subsidies. Discussion paper commissioned by the World Bank in support of the Africa Fertilizer Strategy

Duvick DN. 1997 Heterosis: Feeding people and protecting natural resources. p. 6–9. In *CIMMYT. Book of Abstracts*. The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. An International Symposium, Mexico City. 17–22 Aug. 1997. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico.

Eathington et. al. 2007. Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Sci* 47:S-154-S-163

Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157:1819-1829.

Piepho H-P, Möhring J. 2005. Best linear unbiased prediction of cultivar effects for subdivided target regions. *Crop Sci.* 45:1151–1159 .

## EVALUATION AND SELECTION OF DROUGHT TOLERANCE IN MAIZE AT MONSANTO

*Kevin Cook, David Butruille, Antônio Carlos Silva, Samuel Eathington<sup>1</sup>*

When aiming at developing more drought tolerant maize varieties, the breeder needs to make several considerations that will help drive toward a successful outcome. In the present abstract, we will review briefly the corn breeding process, what the impact of drought on corn is, and what breeding for drought tolerance corn may look like.

A large number of tools have been made available to support maize breeding in recent years, a few important examples are:

- Precision planters and twin-plot combines for better quality and lower cost plots.
- DNA markers used in mapping of quantitative trait loci, marker-assisted selection, marker-assisted backcrossing, germplasm characterization, and quality assurance.
- Doubled-haploids, providing inbred lines more rapidly.
- Multi-season programs where three or more generations can be grown in a year.
- More advanced statistical packages which permits widespread implementation of more sophisticated analyses on a routine basis.
- IT platforms and data transfer capabilities that enable sharing information in real time, making for better and faster decisions.
- More accurate weather forecasting and GPS tools, which facilitate some of the logistics surrounding breeding operations.

However, plant breeding remains defined by a few fundamental steps:

- Create new breeding populations with the best new germplasm.
- Test the new progenies.
- Select the best performing material.

Breeding for drought tolerance benefits from the same tools described above, what changes is how testing and selection are conducted.

Drought is one of the major causes of yield losses. For example, four days of visible wilting just before tasseling can reduce corn yields by 10 to 25 percent,

---

<sup>1</sup> Monsanto Inc. E-mail: david.butruille@monsanto.com

and, four days of visible wilting between the boot stage (only a week prior to tasseling) and the milk stage may reduce yield by 50 percent or more [1].

Irrigation is an obvious way to reduce the risk of yield loss in areas where water deficiency is a recurring problem, and it has been applied on a large scale in the Western US Corn Belt. However, the competition for water for other purposes such as electricity generation, recreational use, or urban and industrial uses, as well as the shrinking of aquifers with slow recharge, as it is the case for the Ogallala aquifer, have made water a resource increasingly scarce and expensive in many world areas.

Enhancing the tolerance of crops to drought or increasing their water use efficiency has met renewed interests in recent years in light of these restrictions in water availability and the ever-growing global demand for food and feed. We will just focus on two examples of application of drought breeding in maize. One aims at the US market and the other at the safrinha market in Brazil.

In the US, the more narrowly defined target market is composed of the dryland acres in the western Corn Belt. With drought stresses increasing in frequency and intensity as one moves from East to West in ND, SD, NE, KS, OK, and TX. Drought stress can be exacerbated with heat stress in the Southern part of that range. Additional target markets would include the irrigated acres in that same region with the aim of reducing water consumption, the central Corn Belt as an insurance against eventual drought years, and the Eastern coastal region with a smaller corn area but more frequent water deficit events.

The most severe impact of drought on yield occurs when it coincides with flowering and early grain fill, when it has the capacity of inflicting yield losses of 50% or more. Grain fill stress has a lesser impact but tends to be much more widespread.

An ideal yield trial network to test and select germplasm for drought tolerance will be geographically diverse and consist of a mix of:

- Managed environments in areas with consistently low rainfalls where supplemental irrigation can be applied to control timing and intensity of water stress.
- Dryland environments in the target markets.
- Opportunistic observations across the broader testing network.
- Greenhouse or growth chambers for specialized studies.

For managed and dryland environments, one should expect that the water stress will magnify within field differences, thus reducing the quality of the observations. All tools available need to be considered to minimize this problem at every step of the testing process:

- Field selection using prior knowledge such as satellite or airplane imagery, yield maps, or soil maps.
- Precision irrigation when in managed environment, as water needs to be applied as uniformly as possible.
- Monitoring soil moisture throughout the season.
- Proper experimental design including blocking, frequent use of checks, etc.
- Statistical analysis of the data that can include spatial adjustments, and other non-standard procedures.

For all environments, one needs to be able to accurately determine the type and level of stress prior to data analysis. Furthermore, enough replications are needed to allow for discarding or underweighting replications in locations that fall outside the targeted yield ranges or have marginal data quality levels.

There will be little tolerance for germplasm with sub-optimal productivity when growing conditions are favorable in target markets wherever drought stress does not occur every year. Thus, in these circumstances, drought tolerant products need also to demonstrate good level of top-end yield.

In the case of the Brazil safrinha market, we are faced with a more consistent, year-after-year drought stress, but other conditions differ substantially from the Western US Corn Belt example. In the safrinha situation, the planting is late into the season, the crop faces significant heat stress and disease pressure early on, while cold and even freezing temperatures become a concern at the grain fill stage. Earliness, which may be useful to avoid heat stress at flowering in Eastern Kansas, becomes advantageous in Brazil to escape frost before physiological maturity.

In Brazil, just as in the US case, using elite germplasm, breeding in the target environment, and understanding what are the key attributes for successful corn hybrids are all essential to succeed in developing successful products [2, 3, 4]

## References

- [1]<http://dirp3.pids.gov.ph/ACIAR/relatedresources/Impact%20of%20drought%20on%20corn%20productivity.pdf>
- [2][http://www.sementesagrocere.com.br/sementes\\_milho.asp](http://www.sementesagrocere.com.br/sementes_milho.asp)
- [3][http://www.dekalb.com.br/sementes\\_milho\\_safrinha.aspx](http://www.dekalb.com.br/sementes_milho_safrinha.aspx)
- [4][http://www.agroeste.com.br/pt\\_br/sementes\\_hibridos.php](http://www.agroeste.com.br/pt_br/sementes_hibridos.php)

## COMPARAÇÕES DAS SELEÇÕES FENOTÍPICA, BASEADA EM QTL E GENÔMICA EM MILHO TROPICAL

*Cláudio Lopes de Souza Jr.<sup>1</sup>*

### Introdução

A seleção assistida por marcadores moleculares (SAM) consiste na seleção de genótipos superiores de uma população com base em marcadores ligados significativamente a QTL ou com base nos QTL mapeados. A SAM não tem sido eficiente para o melhoramento de caracteres quantitativos como produção de grãos, leite, madeira e etc., pois não tem apresentado acurácia na predição dos genótipos da população. Uma metodologia para obter os valores genotípicos de indivíduos com base em informações de todos os marcadores moleculares do genoma (Meuwissen et al., 2001) permite aumentar a precisão dos processo preditivo, e como isso elevar a resposta à seleção utilizando marcadores moleculares em programas de melhoramento.

A seleção genômica (SG) consiste na seleção aplicada a genótipos de uma população preditos com base nos valores genéticos de todos os marcadores moleculares do genoma. Resultados de estudos de simulação e também com dados experimentais mostraram que a SG tem apresentado maior acurácia na seleção em relação a SAM. Meuwissen et al. (2001) mostraram que as correlações entre os valores genotípicos preditos e os verdadeiros valores genotípicos variaram de 0,73 a 0,85 com a predição de todos os marcadores e de apenas 0,32 com a utilização de marcadores ligados significativamente a QTL. Esses resultados mostraram que a utilização de todos os marcadores moleculares permite prever os valores genotípicos com maior precisão. Lorenzana e Bernardo (2009) utilizaram dados experimentais para estimar as acurácias na predição de genótipos com a metodologia de Meuwissen et al. (2001) e com a regressão múltipla na predição de genótipos em populações de milho. Os resultados mostraram que o primeiro foi muito superior ao método da regressão múltipla para a predição de valores genotípicos nas populações.

Bernardo e Yu (2007) sugeriram a utilização da seleção baseada nos valores genotípicos de todos os marcadores, e que foi denominada de Seleção Genômica (SG) no melhoramento de milho para aumentar a resposta à seleção. No primeiro ciclo de seleção, os genótipos são avaliados em experimentos com repetições em diversos ambientes e realiza-se a seleção fenotípica e recombina-se as plantas selecionadas da população. Nesta fase, também, as plantas que deram origem às progênes, testecrosses etc. avaliadas são genotipadas para estimar os efeitos genéticos dos marcadores. Posteriormente, realiza-se de dois a três ciclos de SG baseados nos valores genotípicos dos marcadores para prever as médias dos genótipos. Os resultados mostraram que a resposta à SG superaria de 18%

---

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, SP. E-mail: clsouza@esalq.usp.br

a 43% a resposta à SAM para caracteres quantitativos. Lorenzana e Bernardo (2009) mostraram que a resposta à SG seria pelo menos 50% da resposta à seleção fenotípica por ciclo de seleção para 38 dos 40 caracteres que avaliaram, e a resposta à seleção em três ciclos de SG poderia alcançar até 1,5 vezes da resposta à seleção fenotípica, pelo fato de poder ser aplicado em plântulas e com isso aumentar o número de ciclos por ano.

A SG tem se transformado no método de seleção utilizando marcadores moleculares mais promissora no melhoramento genético vegetal (Heffner et al., 2009). Entretanto, muitas pesquisas devem ser realizadas para validá-la experimentalmente e compará-la com os métodos de seleção existentes para mensurar a sua eficiência relativa. Os objetivos desta pesquisa foram i) comparar as médias preditas com base nos valores genotípicos dos marcadores e nos valores genotípicos dos QTL mapeados com as médias fenotípicas para caracteres quantitativos em duas populações de testecrosses de milho e ii) validar os procedimentos de seleção por meio da avaliação dos testecrosses selecionados em experimentos com repetições em vários ambientes.

## Material e Métodos

Uma amostra de 256 plantas de uma população  $F_2$ , obtidas do cruzamento das linhagens L1404B x L0805F, foi obtida pelo Programa de Melhoramento de Milho do Departamento de Genética da ESALQ/USP. Essas plantas  $F_2$  foram genotipadas com 177 marcadores microssatélites que gerou um mapa genético (10 cromossomos) com 2.056 cM e uma distância média entre intervalos adjacentes de 12,31 cM. As progênies  $F_{2:3}$  oriundas destas plantas  $F_2$  foram cruzadas com dois testadores elites de base genética distinta, as linhagens L0405F e L0203D, originando assim duas populações de 256 testecrosses, denominadas de TC1 e TC2, respectivamente. Estes testecrosses foram avaliados em três anos agrícolas em três ambientes distintos em Piracicaba, SP. Os caracteres analisados foram: produção de grãos (PG) ajustada para 155 g  $kg^{-1}$  de umidade e corrigido para o estande ( $t\ ha^{-1}$ ); acamamento e quebraimento de plantas corrigidas para o estande e transformadas em  $\sqrt{x\%+0.5}$  (ACQ, em %); e altura da planta (AP) e espiga (AE) utilizando a média de cinco plantas avaliadas por parcela. Foram realizadas as análises de variância conjuntas para se obter estimativas dos componentes de variância e dos coeficientes de herdabilidade ao nível de médias de parcelas ( $\hat{h}_{\bar{x}}^2 = \hat{\sigma}_{TC}^2 / \sigma_F^2$ ), e suas raízes quadradas como medidas de acurácias das médias fenotípicas em prever os valores genotípicos dos testecrosses. As médias fenotípicas ( $\bar{X}_F$ ) dos caracteres avaliados corresponderam às médias ajustadas das análises conjuntas, as quais foram consideradas como referências nas comparações por serem advindas de 18 observações. As médias preditas dos testecrosses baseados nos valores genotípicos dos marcadores foram obtidas utilizando-se o método BLUP (Mayor e Bernardo, 2009) pelo modelo:  $\hat{y} = \hat{u}1 + X\hat{g}$  em que:  $\hat{y}$  é o vetor das médias preditas;  $\hat{u}$  é a estimativa da média populacional; 1 é o vetor de 1s; X é a matriz de dimensões  $N \times Nm$  (N é o número de testecrosses da população e Nm é o número de marcadores moleculares), com elementos 1 se a planta  $F_2$

que deu origem ao testecross correspondente é homozigota para o marcador da linhagem L1404B, -1 se a planta  $F_2$  é homozigota para o marcador da linhagem L0805F e 0 se for heterozigoto; o valor 0 foi atribuído também aos marcadores perdidos;  $\hat{g}$  é o vetor dos BLUP dos valores genéticos preditos dos marcadores. As médias preditas pelos valores dos efeitos dos QTL mapeados foram obtidas utilizando-se o modelo:  $\hat{y} = \hat{\mu}1 + X\hat{\beta}$  em que  $\hat{y}$  é o vetor de médias preditas dos testecrosses;  $\hat{\mu}$  é a média populacional; 1 é um vetor de 1s; X é a matriz  $N_{F_2} \times N_{QTL}$ , sendo que cada elemento da matriz é a probabilidade condicional do QTL ter o genótipo QQ subtraída da probabilidade condicional de ser qq dado os genótipos dos marcadores flanqueadores de cada intervalo no qual o QTL foi mapeado;  $\hat{\beta}$  é o vetor dos efeitos de substituição alélica dos QTL mapeados. O mapeamento de QTL foi realizado com o mapeamento por intervalo composto para múltiplos ambientes (mCIM), e somente os QTL estáveis através dos ambientes mapeados foram considerados para a predição das médias. Foram mapeados para as populações TC1 e TC2, respectivamente: 17 e 14 QTL para produção de grãos (PG); 12 e 19 QTL para acamamento e quebramento de plantas (ACQ%); 19 e 16 para altura da planta (AP); e 18 e 21 para altura de espiga (AE). Foram então computadas as correlações entre as médias fenotípicas e aquelas preditas pelo mapeamento de QTL e pelos valores genotípicos dos marcadores. Para validar os procedimentos de seleção, os testecrosses foram selecionados por cada método (Fenotípico, SAM e SG) com uma intensidade de seleção de 10% (26 testecrosses), e uma amostra dos testecrosses sem seleção (material original) foi utilizada como referência. Estes materiais foram avaliados em dois anos agrícolas em cinco ambientes, para os caracteres PG, ACQ, AP e AE. Com base nas médias ajustadas das análises conjuntas para cada caráter nas populações (TC1 e TC2) e para a média das duas populações (TC), foram estimadas as repostas à seleção e as eficiências relativas entre os métodos de seleção.

## Resultados e Conclusão

Os coeficientes de herdabilidade ( $\hat{h}_X^2$ ) diferiram significativamente de zero para todos os caracteres nas duas populações de testecrosses, e as suas magnitudes foram moderadas para PG ( $\approx 0,67$ ) e para ACQ ( $\approx 0,50$ ), e elevadas para AP e AE (0,78 para AP e 0,81 para AE). Consequentemente, as magnitudes das acurácias foram elevadas para todos os caracteres variando de 0,71 para ACQ a 0,91 para AE, evidenciando a elevada precisão das médias fenotípicas em predizer os valores genotípicos dos testecrosses para todos os caracteres. Os coeficientes de correlações entre as médias fenotípicas e as médias preditas pelos BLUP dos marcadores moleculares ( $\hat{r}_{\bar{X}_F \bar{X}_{BLUP}}$ ), apresentaram elevadas magnitudes, variando de 0,63 para ACQ a 0,77 para AP, sendo que para PG esta correlação foi de 0,67; enquanto as correlações entre as médias fenotípicas e as médias preditas pelos QTL ( $\hat{r}_{\bar{X}_F \bar{X}_{QTL}}$ ) apresentaram baixas magnitudes, variando de 0,22 para ACQ a 0,52 para AP, e para PG foi de 0,35.



Esses resultados mostram que as médias preditas pelo método BLUP são mais precisas que aquelas baseadas nos QTL mapeados e, este método deve apresentar melhor resultado com a seleção. Embora os testadores utilizados neste estudo tenham bases genéticas distintas, não houve efeito pronunciado do testador nas magnitudes das correlações estimadas. As avaliações dos testecrosses selecionados em experimentos com repetições com base nos três métodos apresentaram resultados significativamente diferentes. Na média dos dois testecrosses, as respostas à seleção para a SF, SG e SQTL foram de 0,48 t ha<sup>-1</sup> (5,5%), 0,27 t ha<sup>-1</sup> (3,1%) e 0,13 t ha<sup>-1</sup> (1,5%) para PG; de -3,6%, -2,6% e -2,2% para AP; de -6,8%, -5,5% e -4,7% para AE; e de -6,5%, -6,0% e -4,7% para ACQ, respectivamente. Nota-se, portanto, que a Seleção Genômica (SG) foi muito mais eficiente que a Seleção Baseada nos QTL Mapeados (SAM) para todos os caracteres. Desta forma, as projeções baseadas em simulações por Meuwissen et al. (2001) e por Mayor e Bernardo (2009) são compatíveis com os resultados obtidos neste trabalho, isto é, que a SG é muito mais eficiente em identificar genótipos superiores que a SAM. Note-se, entretanto, que a SG é menos eficiente que a SF, mas a SG deve complementar a SF, isto é, a SG será utilizada após a SF. Como a SG pode ser aplicada em plântulas, esta pode ser utilizada por uma ou duas gerações de seleção em um mesmo ano ou ciclo. Assim, a combinação de um ciclo de SF e de SG poderá gerar uma resposta à seleção de 0,75 t ha<sup>-1</sup> (8,6%) para PG, e reduzir AP em 6,2%, AE em 12,3% e ACQ em 12,5% por ano. Obviamente, estes resultados são expressivos e sugerem que a SG complementa a SF resultando em uma resposta expressiva à seleção e, portanto, os resultados deste estudo e aqueles reportados na literatura indicam que a SG deve ser utilizada para aumentar a eficiência do melhoramento de caracteres quantitativos.

## Referências

- Bernardo, R.; Yu, J. 2007. Prospects for genome-wide selection for quantitative traits in maize. *Crop Sci.* 47:1082-1090.
- Heffner, EL; Sorrells, ME.; Jannink, JL. 2009. Genomic selection for crop improvement. *Crop Sci.* 49:1-12.
- Lorenzana, RE; Bernardo, R. 2009. Accuracy of genotypic value predictions for marker-based selection in biparental plant populations. *Theoretical and Applied Genetics* 120:151-161.
- Mayor, PJ; Bernardo, R. 2009. Genomewide selection and marker assisted recurrent selection in Doubled-Haploids versus F<sub>2</sub> populations. *Crop Sci.* 49:1719-1725.
- Meuwissen, T. H. E; Hayes, B. J., Goddard, M. E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157:1819-1829.

## DESENVOLVIMENTO DE CULTIVARES DE SOJA COM TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA

*Carlos A. Arrabal Arias, Marcelo F. de Oliveira, Antônio E. Pípolo, Geraldo Estevam S. Carneiro, José Ubirajara V. Moreira, Milton Kaster<sup>1</sup>*

### Introdução

Os estresses provocados por deficiência hídrica (DH) em lavouras de soja representam certamente um dos principais fatores responsáveis pela instabilidade na produção de grãos ao longo dos anos nas várias regiões brasileiras. Dependendo do nível de estresse hídrico e do estágio fisiológico em que se encontram as plantas de soja, diferentes processos podem ser afetados. Assim, determinado nível de estresse provocado por DH pode afetar o processo de fixação biológica de N (Sinclair et al., 2007) sem necessariamente afetar a produtividade de grãos, reduzindo o teor de proteína dos grãos e trazendo problemas para a indústria nacional e para as exportações. Níveis mais acentuados de DH ocorrendo especialmente durante as fases de floração e de enchimento de grãos provocam quebras de produtividade (Doss et al., 1974; Meckel et al., 1984; Saitoh, et al., 1999) colocando em risco a manutenção da atividade agrícola.

Nos diferentes estados brasileiros é clara a correlação entre estabilidade de produção de grãos e estabilidade na disponibilidade hídrica ao longo dos anos. Nos estados ou regiões com ambientes mais estáveis sob o ponto de vista de disponibilidade hídrica, percebe-se a existência de maiores investimentos em tecnologia e na melhoria do ambiente, formando um círculo virtuoso que beneficia toda a cadeia produtiva. Por outro lado, nas regiões com maior risco de DH, os investimentos tendem a ser menores e as lavouras de soja ficam ainda mais sensíveis ou pré-dispostas aos efeitos prejudiciais da seca.

Nesse contexto é fundamental o papel dos programas de melhoramento genético, os quais podem ajudar a reduzir os efeitos danosos provocados pela seca através do desenvolvimento de cultivares mais tolerantes. Com menor risco, o agricultor se sentirá mais seguro para investir mais em tecnologias que promovam a melhoria ambiental, as quais também darão sua contribuição para a estabilidade e longevidade da atividade agrícola.

### Caracterização dos ambientes

As regiões com características edafoclimáticas distintas estão bem mapeadas para a cultura da soja no Brasil. Em geral se conhece, para uma dada região, qual a probabilidade de ocorrência de DH em função do histórico da distribuição das precipitações ao longo do tempo, da demanda evaporativa da atmosfera, do tipo de solo, da época de semeadura, do tipo de manejo entre outros fatores. O padrão ou o tipo de tolerância que se busca em uma cultivar tolerante à DH deve ser definido a partir de uma caracterização detalhada do ambiente alvo da

<sup>1</sup> Embrapa Soja, Londrina, PR. E-mail: arias@cnpso.embrapa.br

mesma forma como se faz para outras características de importância. Gastar energia buscando um nível elevado de tolerância pode ser desnecessário para algumas regiões, o que certamente atrasa o processo de desenvolvimento e lançamento dessas cultivares e de seus potenciais impactos positivos. Já foi demonstrado (Sinclair et al., 2007) que determinados caracteres que conferem tolerância à seca e, portanto, aumentam o rendimento de grãos sob ambiente com DH, não mantiveram o mesmo potencial produtivo em ambientes favoráveis ou de alto rendimento. Este seria o preço a ser pago em troca da segurança proporcionada pela tolerância. Os ambientes devem ser bem caracterizados de forma que o acréscimo de produtividade proporcionado pela cultivar com tolerância à seca nos anos ruins e normais seja maior que uma pequena queda de rendimento num ano muito favorável. Fatos semelhantes já ocorreram no melhoramento para outros caracteres como resistência a insetos e doenças. O acúmulo de genes de resistência representa um gasto adicional de energia para a planta, sendo mais racional buscar apenas o nível necessário de resistência tentando ajustar a “dose” de resistência à necessidade regional. Assim, algumas cultivares não são efetivamente lançadas por apresentarem apenas níveis intermediários de resistência, embora pudessem representar uma contribuição para o setor produtivo.

## **Caracterização genética**

Julga-se que o controle genético do caráter tolerância à DH seja complexo e envolva múltiplos genes, como consequência dos diversos processos da planta envolvidos na resposta ao estresse. Como a expressão do caráter é naturalmente dependente do ambiente ou do nível de deficiência hídrica, espera-se que a interação entre genótipos e ambientes esteja presente entre as principais causas de variação. Ambientes com solos de baixa capacidade de retenção de umidade, uniformes e com ocorrência frequente de algum nível de DH a cada ano, seriam importantes para a eficiência dos processos seletivos, mas difíceis de conseguir na prática (Pathan et al, 2007). O resultado é uma grande dificuldade em caracterizar com segurança quais os genótipos tolerantes para os diferentes níveis de DH. Nos anos com ocorrência frequente de DH é comum receber relatos de vários agricultores sobre a maior tolerância de determinadas cultivares comerciais. Quando esses relatos se repetem ao longo dos anos, o melhorista passa a acreditar que tem um material diferenciado e que, provavelmente, tenha genes para tolerância à seca. Entretanto, a caracterização detalhada desses materiais na tentativa de determinar as causas da tolerância nem sempre são esclarecedoras. Além disso, descendentes desses genótipos tolerantes raramente herdaram tais características na ausência de seleção, ressaltando a dificuldade dos melhoristas para atender a essa importante demanda.

Qual caráter avaliar? Caracteres relacionados às raízes das plantas como comprimento e matéria seca devem contribuir para aumentar o nível de tolerância, mas são de difícil avaliação e não garantem um alto potencial produtivo. Avaliações da parte aérea dos genótipos sob diferentes níveis de

DH são igualmente trabalhosas e também pouco efetivas segundo alguns autores (Hudak & Patterson, 1995). Uma das importantes fontes de erro nas comparações entre genótipos diz respeito ao grupo de maturidade. Um mesmo nível de DH terá maior ou menor impacto dependendo do estágio fisiológico em que o genótipo se encontra. Assim, é importante agrupar cuidadosamente os genótipos dentro de intervalos restritos de maturidade antes de realizar tais comparações. Todas essas dificuldades levam a maioria dos programas de melhoramento a focar sobre o caráter rendimento de grãos, deixando a tolerância à seca em segundo plano. Para piorar o quadro, muitos dos ambientes desfavoráveis resultantes de DH são retirados da composição das médias cumulativas pois maior ênfase é dada para os ambientes de alto rendimento.

Um estudo detalhado sobre tolerância à seca, desenvolvido com cultivares brasileiras de soja (Oya et al., 2004), apontou a associação entre taxa de crescimento sob condição de seca durante o início da fase reprodutiva e rendimento. Nesse sentido, genótipos cujo processo de fixação de N seja menos afetado pela DH (Sinclair et al., 2007) são desejáveis e levam vantagem em relação a outros que não tem essa característica. A disponibilidade de equipamentos não destrutivos e capazes de avaliar rapidamente e a baixo custo esse tipo de característica nas linhagens em ambientes com algum nível de DH representaria uma contribuição para os programas de melhoramento.

São promissoras as pesquisas que buscam marcadores moleculares ligados a QTLs de tolerância à DH, pois pode ser uma forma de caracterizar sistematicamente as regiões do genoma envolvidas nesse tipo de reação. Novamente a maior dificuldade está na fenotipagem, sendo necessário incluir um grande número de genótipos em ambientes com estresse induzido (Pathan et al, 2007). Nesse tipo de pesquisa, o uso de linhas puras avançadas derivadas de um mesmo cruzamento envolvendo parentais divergentes seria desejável em função da complexidade do caráter e da necessidade de uma fenotipagem segura envolvendo repetições de cada linha. Outro ponto importante é adequar o nível de DH às necessidades da região alvo da indicação da cultivar, o que é um indicativo de que alguns QTLs terão uma aplicabilidade mais ampla enquanto outros serão mais restritos a algumas regiões. Tal pesquisa pode ser trabalhosa, mas uma vez detectados os marcadores ligados aos QTLs, pode-se utilizá-los de forma sistemática no processo de desenvolvimento de cultivares.

## **Estratégias de melhoramento**

Qualquer estratégia de desenvolvimento de cultivares tolerantes à DH deve levar em conta que os programas de melhoramento são muito dinâmicos e que as novas cultivares trazem sempre algumas adaptações às novas demandas ou mesmo mudanças ambientais na região para onde elas serão indicadas. Este é um lado positivo dos programas de melhoramento, pois garante uma resposta natural às mudanças climáticas globais que ocorrem e continuarão ocorrendo a

médio e longo prazo. Por outro lado, ressalta a necessidade de manutenção não só dos programas tradicionais de melhoramento, como também, das pesquisas envolvendo as novidades biotecnológicas. O desenvolvimento de OGMs para tolerância à DH, desenvolvido dentro da parceria entre Embrapa e JIRCAS é um bom exemplo. É uma linha de pesquisa que tem exigido esforço muito grande de um grupo multidisciplinar envolvendo biotecnologistas, fisiologistas e melhoristas e que já tem algumas linhagens transformadas sendo testadas em ambiente de contenção e a campo. É grande a expectativa por resultados a partir deste tipo de pesquisa, mas os pesquisadores estão cientes das dificuldades e do grande desafio para se alcançar uma tecnologia com potencial comercial e, principalmente, para obter sua regulamentação no Brasil e no mundo.

No melhoramento de uma cultura, procura-se aumentar a produtividade de grãos e a estabilidade de produção ao longo dos ambientes favoráveis e desfavoráveis. Esses dois caracteres já descritos como herdáveis e geneticamente independentes são avaliados em ensaios de campo envolvendo grande número de ambientes representativos da região alvo e repetidos por vários anos. No caso da soja, desde que outros fatores restritivos como doenças e pragas tenham sido devidamente controlados, é comum que a DH seja a principal determinante de um ambiente desfavorável. Um esforço no sentido de identificar esses ambientes onde efetivamente ocorreram os diferentes níveis de DH e de identificar aqueles genótipos que se destacaram em comparação aos demais nesses ambientes restritivos, trazem informações valiosas para dar prosseguimento neste tipo de trabalho. A vantagem, nesse caso, é que se trabalha com o caráter rendimento de grãos já comumente avaliado neste tipo de ensaio além de ser o caráter mais importante para a maioria das empresas.

Não é tarefa fácil realizar avaliações mais detalhadas como transpiração, eficiência no uso da água e índice de colheita em ambientes sob estresse em grande número de locais, assim como também é trabalhoso avaliar o rendimento de grãos em tais condições sem ter previsão da ocorrência de DH suficiente para permitir a comparação entre genótipos e a caracterização dos genótipos tolerantes. De qualquer forma, o que se tem hoje são experimentos com maior nível de detalhamento realizados com poucos genótipos e poucos ambientes normalmente com DH induzidas, ou grandes experimentos em rede com maior número de genótipos e ambientes aleatórios onde são avaliados os caracteres necessários para registro das cultivares como é o caso do rendimento de grãos. Estes dois tipos de experimento não têm permitido caracterizar, de forma segura, o nível de tolerância à seca de um determinado genótipo. Talvez uma rede com a participação de várias instituições públicas e privadas seja necessária para viabilizar esse tipo de pesquisa, dividindo custos e aumentando a qualidade da fenotipagem ou da caracterização de cada genótipo.

## **Lançamento comercial de cultivares tolerantes à seca**

A forma como uma cultivar tolerante à seca será apresentada aos agricultores é muito importante para o sucesso da tecnologia e para a empresa. A

comunicação imprecisa pode levar a interpretação equivocada do que a tecnologia pode oferecer. Muitas vezes a complexidade dessa comunicação é tamanha, que é preferível omitir essa informação no momento da apresentação da nova cultivar, e deixar essa característica de tolerância à seca como um bônus para o agricultor.

Considerando a complexidade do caráter tanto do ponto de vista genético como das relações com fatores ambientais, é provável que esses materiais sejam posicionados no mercado como cultivares para “alta produtividade” e não como “tolerantes à seca” uma vez que a empresa detentora do material genético não pode dar garantias de rendimento em resposta aos variados níveis de DH aos quais os materiais serão submetidos ao longo dos anos. Não é interessante para a empresa posicionar comercialmente uma cultivar apenas para ambientes desfavoráveis ou com maiores probabilidades de ocorrência de DH, o que possivelmente seria interpretado com o rótulo “tolerante à seca”.

## Referências

- Doss, B.D.; Pearson, R.W. and Rogers, H.T. 1974. Effect of soil water stress at various growth stages on soybean yield. *Agron. J.* 66: 297-299.
- Hudak, C.M. and Patterson, R.P. 1995. Vegetative growth analysis of a drought-resistant soybean plant introduction. *Crop Sci.* 35:464-471.
- Meckel, L., Egli, D.B., Phillips, R.E., Radcliffe, D. and Leggett, J.E. (1984) Effect of moisture stress on seed growth in soybeans. ***Agron. J.*** 75: 1027-1031.
- Oya, T.; Nepomuceno, A.L.; Neumaier, N.; Farias, J.R.B.; Tobita, S.; Ito, O. 2004. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars – evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. *Plant Prod. Sci.* 7(2):129-137.
- Pathan, M.S., Lee, J.D., Shannon, J.G. and Nguyen, H.T. (2007) Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean. *In* Advances in molecular-breeding toward drought and salt tolerant crops. Edited by Jenks, M.A., Hasegawa, P.M. and Jain, S.M. pp. 739-773. Springer USA.
- Saitoh, K.; Mahmood, T. and Kuroda, T. 1999. Effect of moisture stress at different growth stages on flowering and pod set in determinate and indeterminate soybean cultivars. *Jpn. J. Crop Sci.* 68:537-544
- Sinclair, T.R.; Purcell, L.C.; King, C.A.; Sneller, C.H.; Chen, P.; Vadez, V. 2007. Drought tolerance and yield increase of soybean resulting from improved symbiotic N<sub>2</sub> fixation. *Field Crops Research*, 101: 68-71.

# ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO PARA AMBIENTES SUJEITOS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA: O EXEMPLO DA CANA-DE-AÇÚCAR

*José Bressiani<sup>1</sup>, Michael Butterfield<sup>1</sup> e Jorge da Silva<sup>2</sup>*

## Introdução

A cana-de-açúcar ocupa vasta região no território brasileiro, sendo cultivada entre as latitudes 31° e 5° do hemisfério sul. Essa faixa climática tropical apresenta uma estação hiberna acentuada, com dias mais curtos e mais frios, característica acentuada próximo ao Trópico de Capricórnio, que compreende a região mais tradicional de cana do centro-sul do Brasil. Em grande parte, a região tropical caracteriza-se por verão chuvoso e inverno seco. As áreas mais próximas de latitudes menores são aquelas onde o déficit hídrico é bastante pronunciado, dado por uma distribuição de chuvas mais concentrada ao longo do ciclo e também pelas temperaturas máximas mais elevadas, que concorrem para uma maior evapotranspiração, afetando o acúmulo de biomassa da cana-de-açúcar. Os principais componentes climáticos que controlam o crescimento, a produção e qualidade da cana são temperatura, luz e umidade disponível (Camargo & Camargo, 2005). No Brasil, a cana-de-açúcar é plantada em solos bastante diversificados, tais como os Latossolos, Argissolos, Nitossolos, Cambissolos, Neossolos, Vertissolos, Plintossolos, Chernossolos, etc. Dentro de cada uma destas classes há também uma grande variabilidade na potencialidade química conferindo aos mesmos os caracteres eutróficos, mesotróficos, distróficos, ácricos, mesoálricos e álicos a esse universo (Prado, 2008). As regiões de expansão da canavieira brasileira são caracteristicamente regiões de cerrado, como o oeste e noroeste do estado de São Paulo, o triângulo mineiro, o leste do Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Maranhão e oeste da Bahia. Embora em latitudes diferentes, essas regiões apresentam algumas peculiaridades quando comparadas às regiões tradicionalmente ocupadas pela cultura da cana-de-açúcar, como deficiência hídrica bastante acentuada, e diferenças notáveis quanto ao crescimento vegetativo, florescimento, acúmulo de sacarose e reação a pragas e doenças. Nesse contexto, os programas de melhoramento genéticos de cana-de-açúcar têm adotado estratégias específicas para a obtenção de variedades adaptadas a esses novos ambientes de produção, reorientando os processos de hibridação e seleção e implantando estações experimentais regionais de seleção (Landell & Bressiani, 2008).

O processo de hibridação (reprodução sexuada) é a principal ferramenta para gerar variabilidade genética em cana-de-açúcar visando à seleção de indivíduos superiores. Uma população de *seedlings* de cana-de-açúcar detém essa condição que será tanto maior quanto maior a variabilidade dos genitores envolvidos na hibridação. A caracterização criteriosa do ambiente de produção

<sup>1</sup>Canavialis AS. Campinas, SP. E-mail: jose.bressiani@canavialis.com.br

<sup>2</sup>Texas Agrilife Research. Texas A&M University, Weslao, TX, USA

onde as populações de *seedlings* serão introduzidas permite isolar fatores ambientais importantes, como também possibilita que genótipos de adaptação regional se destaquem de forma clara. Assim, o mapeamento ambiental das regiões representativas para a cultura da cana torna-se uma estratégia fundamental para definição das etapas de hibridação e seleção. A alteração no comportamento relativo dos genótipos em função de diferenças de ambiente é conhecida como interação genótipo x ambiente (G x E). O conhecimento desta interação é importante em um programa de melhoramento para definir, logo de início, se o objetivo será o desenvolvimento de variedades para um amplo espectro de ambientes ou para um ambiente específico (Borém, 1998). Robertson (1959) define dois tipos de interação G x E: simples e complexa. A interação simples não acarreta grandes dificuldades ao melhorista, visto que um genótipo superior num determinado ambiente, também o será em outros ambientes. No entanto, o que predomina é a interação complexa, onde se observa uma inversão de comportamentos, refletida pelas diferentes respostas de genótipos às variações ambientais.

## A Regionalização das Estratégias de Melhoramento

A seleção regional reduz a diversidade ambiental e suas interações na população introduzida. Essa estratégia não impede a seleção de genótipos de adaptação ampla, baseada na média dos diversos locais, porém, a opção por uma seleção específica para cada local considerado deverá proporcionar ganhos superiores como constatado por Bressiani (2001). Além da adaptação ambiental para os caracteres de produção, um aspecto bastante importante na seleção regional diz respeito à importância relativa dos caracteres relacionados com a produtividade. No cerrado, por exemplo, ganha maior importância a capacidade do genótipo em manter um bom número de perfilhos/colmos o que é um indicador de tolerância a seca. Outras características importantes para estas condições são: brotação de soqueiras, manutenção da densidade do colmo ao longo do ciclo e ausência de florescimento. Tais características assumem importância estratégica na seleção. O objetivo dos programas de melhoramento genético é o de identificar, selecionar e multiplicar o genótipo superior de uma população, de forma que esse venha a ser cultivado pelos agricultores, isto é, torne-se uma cultivar comercial. Na cana-de-açúcar o genótipo de cada planta pode ser transmitido integralmente através das gerações e multiplicado via clonagem, através dos colmos. Assim, o genótipo de cada planta é multiplicado para permitir avaliações com altos níveis de precisão, permitindo a classificação dos genótipos das plantas clonadas e posteriormente, a seleção e a multiplicação dos indivíduos superiores. Para ser liberado como uma cultivar, o genótipo superior deve se situar próximo da extremidade da distribuição para diversos caracteres, simultaneamente.

Após os cruzamentos, a população gerada passa por uma seleção individual para os caracteres de alta herdabilidade, descartando-se as plantas em que estes caracteres estão abaixo dos níveis mínimos exigidos. Geralmente, nesta fase têm-se milhares de plantas e aquelas selecionadas são clonadas para



se iniciar a avaliação em experimentos com repetições. Inicialmente, têm-se muitos genótipos e pouco material de propagação de cada genótipo e, devido a isso, utilizam-se parcelas pequenas com poucas repetições e em geral apenas um local. A precisão experimental é baixa e não permite que a taxa de seleção seja reduzida, tendo-se na realidade apenas o descarte dos genótipos inferiores. À medida que o número de entradas (genótipos) diminui com as etapas de seleção, aumenta-se, de forma gradativa, o número de repetições, o número de locais em avaliação e, também, utilizam-se parcelas maiores. Assim, aos poucos, aumenta-se a precisão experimental e consequentemente diminui-se a taxa de seleção em cada etapa de avaliação. Nas avaliações finais têm-se poucos genótipos, as parcelas são maiores, o número de repetições por local e o número de locais são elevados, de forma que a precisão experimental seja alta o suficiente para permitir identificar e selecionar “o genótipo superior” (Souza Jr., 1989). A seleção, portanto, é praticada em etapas, de forma que à medida que aumenta a quantidade de repetições por genótipo, aumenta-se a precisão experimental e, consequentemente, reduz-se a taxa de seleção até o ponto em que é possível identificar com precisão o genótipo ou genótipos superiores. A distribuição dos dados de um caráter quantitativo frequentemente se ajusta a uma distribuição normal, como representado na Figura 1 (Souza Jr., 1995). Para um caráter complexo como a produtividade (TCH), por exemplo, geralmente estes dados referem-se às médias de tratamentos que foram avaliados em experimentos com repetições em diversos locais e/ou condições de ambiente. Assim, estas médias, que são valores fenotípicos, aproximam-se dos respectivos valores genotípicos e as variações das interações dos genótipos com ambientes são diminuídas devido ao uso de repetições e avaliações em diversos ambientes.

Tradicionalmente, o melhoramento genético de cana-de-açúcar proveu e tem provido cultivares tolerantes as condições de estresse hídrico do Estado de São Paulo. A Região de Ribeirão Preto, principal pólo canavieiro do Estado, apresenta historicamente deficiência hídrica entre os meses de junho a setembro. Essa deficiência, entretanto, é quase nula nos meses de junho e julho (Figura 2). Nessa condição a umidade residual presente no solo em associação aos mecanismos de tolerância de algumas cultivares tem sido suficiente para a manutenção da cultura, sem a necessidade de irrigação suplementar.

Com a expansão das lavouras canavieiras para as regiões de cerrado, o período e a intensidade da deficiência hídrica aumentaram (Figura 3). Para a região de Goiânia, por exemplo, a deficiência hídrica se estende de maio a setembro, com intensidade mais que o dobro das observadas em Ribeirão Preto, SP. Nesse novo cenário as cultivares comerciais atualmente existentes no mercado não suportam esses níveis de estresse e necessitam de irrigação complementar, a chamada “irrigação de salvamento”, para brotar. Outro ponto bastante particular nesse novo cenário diz respeito à manutenção dos canaviais adultos durante o período de safra. Em alguns cultivares é bastante expressiva a perda de peso das canas adultas que serão colhidas mais para o final da safra.

Mas Goiania não é, em termos de disponibilidade de água, a região mais restritiva do cerrado brasileiro considerada apta para a cultura da cana-de-açúcar. No Tocantins e no sul do Maranhão as chuvas são ainda mais concentradas e associadas a temperaturas maiores a evapotranspiração aumenta significativamente (Figura 4).

As estratégias para a seleção de cultivares mais tolerantes ao estresse hídrico ainda estão em desenvolvimento. Nesse sentido, esforços estão sendo empregados tanto no melhoramento tradicional quanto na biotecnologia. A cana-de-açúcar possui extensa variabilidade genética em relação à suscetibilidade ao estresse hídrico, sendo alguns genótipos capazes de tolerar estresses severos e, mesmo assim, completar o seu ciclo, enquanto outros não sobrevivem ou sofrem danos severos na sua produção. Essa variabilidade é uma ferramenta muito importante para o desenvolvimento de genótipos tolerantes. Sob condição de estresse, o desempenho de genótipos elite em relação aos genótipos tradicionais é melhor, e essa diferença é devida principalmente a uma maior tolerância aos estresses e não ao aumento da produtividade per se (Duvick et al., 2004).

Considerando essa ampla variação nos regimes hídricos, associadas a uma também variação no regime térmico, a CanaVialis, desde a sua criação em 2003, tem buscado posicionar criteriosamente os seus campos de melhoramento genético, em tamanho e quantidade, a fim de garantir o sucesso do programa que é a obtenção de variedades mais rústicas, tolerantes e produtivas. Em 2010 a Canavialis conta com 12 campos experimentais, que totalizam cerca de 1000 ha, distribuídos ao longo do País, com maior concentração nas áreas de cerrado, onde o déficit hídrico é mais severo (Figura 5).

Além destes doze campos experimentais, temos outros 50 pontos experimentais onde os clones superiores passam pela caracterização agrônômica antes de se tornarem comerciais. Em cada um dos campos a importância relativa dos caracteres agrônômicos sob seleção varia conforme a customização do programa de melhoramento. Para os campos localizados nas regiões onde o déficit hídrico é mais acentuado, além dos componentes normais da produtividade de açúcar – toneladas de cana por hectare e Pol % cana – existe a necessidade de avaliar-se também outros caracteres, como por exemplo:

1. atividade fotossintética, teor de clorofila, abertura e condução estomática e respiração;
2. número de folhas verdes;
3. teor de água no solo;
4. densidade dos colmos;
5. altura da parte aérea;
6. massa fresca e massa seca da parte aérea;

7. comprimento das raízes;
8. massa verde e massa seca do sistema radicular; e
9. Teor de prolina

A caracterização dos clones em seleção, dos parentais e também das populações segregantes será de extrema valia na definição dos critérios para a seleção clonal, na escolha dos parentais para cruzamento e também na identificação de genes candidatos para a utilização de ferramentas moleculares.

## **Os Mecanismos de Tolerância ao Estresse Hídrico**

O desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca tem sido uma das prioridades dos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar no país. No entanto, apesar dos avanços obtidos pelo melhoramento convencional, a escassez de informações genéticas e moleculares sobre os mecanismos de tolerância à seca e sua herança são fatores limitantes para o maior sucesso na geração de variedades melhoradas. Para que essa lacuna seja preenchida, é imprescindível que se estabeleçam associações entre genótipo e fenótipo, de modo a se explorar na seleção, a possibilidade de predição da performance fenotípica a partir de informações genéticas. Alguns dos indicadores de tolerância ao estresse hídrico são os componentes biométricos, especialmente perfilho e altura de colmos. Variação acentuada no perfil da cultivar em relação a essas características em regiões com déficit severo em comparação às condições mais favoráveis é um forte indicativo desta inadaptação. Na agricultura, a tolerância à seca refere-se à habilidade de uma planta produzir seu produto econômico, com mínima perda, em um ambiente com deficiência de água (Mitra, 2001). Em plantas, os mecanismos que conduzem a tolerância à seca podem ser divididos em dois grupos principais: a) mecanismo de fuga: quando a planta evita a falta de água nos tecidos durante a seca por meio da manutenção do turgor e volume celular, tanto pela absorção de água por um sistema radicular abundante ou pela redução da sua perda por transpiração ou por vias não estomáticas como a cutícula da folha (Sanchez, et al 2002, Verslues et al., 2006); e b) mecanismo de tolerância, na qual a planta mantém o metabolismo, mesmo sob baixos potenciais de água no solo, devido principalmente ao ajuste osmótico (AO) e à capacidade antioxidante. O ajuste osmótico resulta do acúmulo de solutos compatíveis ou osmólitos dentro da célula, reduzindo o potencial osmótico e auxiliando na manutenção do turgor à medida que a planta experimenta o déficit hídrico. O ajuste osmótico (AO) é considerado uma característica importante que contribui para reduzir os efeitos da seca sobre a produtividade em diversas culturas. Por sua vez, a capacidade antioxidante resulta da habilidade das plantas de desintoxicar espécies reativas a oxigênio (ROS - peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas e ânions superóxidos), as quais causam injúrias celulares como peroxidação de lipídeos e/ou proteínas e modificações em ácidos nucleicos (Sanchez et al, 2002). A eliminação de ROS é realizada por compostos antioxidantes, como ácido ascórbico, glutatona, tioreoxina e carotenóides e por enzimas sequestradoras de ROS (i.e. superoxidase dismutase, glutatona peroxidase e catalase). Em

plantas sob estresse hídrico, observa-se um aumento na atividade das enzimas sequestradoras de ROS sendo que esse aumento está relacionado ao aumento na tolerância à seca (Xiong & Zhu, 2002).

Em cana-de-açúcar foram observadas diferenças entre cultivares quanto à condutividade hidráulica, que, por sua vez, mostrou correlação com características anatômicas de raízes individualizadas e do sistema radicular como um todo (Saliendra & Meinzer, 1992). De acordo com Smith et al. (2005) a análise de caracteres anatômicos de raiz possibilita a seleção de genótipos de cana-de-açúcar com maior eficiência na absorção de água e nutrientes. O desenvolvimento de um programa de melhoramento buscando a seleção de cultivares adaptadas ao estresse hídrico deve primeiramente caracterizar o germoplasma de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao estresse hídrico. Para essa caracterização podem ser avaliados, por exemplo, os caracteres: atividade fotossintética, teor de clorofila, abertura e condução estomática e respiração; número de folhas verdes; teor de água no solo; densidade dos colmos; altura da parte aérea; massa fresca e massa seca da parte aérea; comprimento das raízes; massa verde e massa seca do sistema radicular; entre outros, além dos caracteres de produção.

Maior tolerância ao estresse hídrico não é a única característica importante no perfil varietal para o cerrado. Juntamente com essa característica a cultivar do cerrado devesse ter boa brotação de soqueiras, não perder peso de colmos durante o período seco, não florescer e apresentar resistência a doenças e a pragas potenciais da região, embora essa última característica possa ser contornada com o uso do controle biológico. Dada essa maior demanda de características, a adoção de ferramentas de biotecnologia é de grande valia para auxiliar o programa de melhoramento tradicional, melhorando sua eficiência e reduzindo os tempos e custos com a produção desse plantel varietal.

Buscando avaliar os efeitos do estresse hídrico sobre os componentes de produção e sua relação com a produtividade da cana-de-açúcar, Silva et al. (2008b) investigaram as relações entre os caracteres número de colmos, altura de colmos, diâmetro de colmos e massa de colmos com a produtividade de cana-de-açúcar cultivada em uma área, sob deficiência moderada de água, durante o período de maior desenvolvimento, a fim de prover informações que auxiliem melhoristas na adoção de características para selecionar variedades tolerantes à seca. Ao todo os autores avaliaram 78 genótipos e dois padrões, um tolerante e outro sensível ao estresse hídrico, sob deficiência moderada de água em campo e durante o ano agrícola 2005/2006 em Weslaco, Texas, Estados Unidos. Produtividade e componentes de produção foram avaliados. Sob estresse, o padrão tolerante (TCP93-4245) apresentou maior produtividade, número de colmos, altura de colmos e massa de colmos do que o padrão sensível (TCP87-3388). Entretanto, o padrão sensível apresentou maior diâmetro de colmos. Associação linear foi encontrada entre produtividade e seus componentes, mas diâmetro de colmos foi bastante instável entre os genótipos. Altura de colmos apresentou correlação positiva com número, diâmetro e massa de colmos. Diâmetro de colmos também apresentou correlação positiva com massa de

colmos. Ao final das avaliações os autores concluíram que, durante o processo de seleção, quando um desses componentes é melhorado para tolerância à seca, o componente correlacionado deverá também ser melhorado, tornando-se possível selecionar genótipos com elevada produtividade em número, altura e massa de colmos sob deficiência hídrica.

Nas áreas onde existe um período prolongado de seca, como na Região Centro-Oeste do Brasil, o déficit hídrico é um dos fatores mais importantes que limitam a produção da cana-de-açúcar. Uma forma de contornar esse problema é plantar variedades resistentes ou tolerantes à seca. Para entender melhor esse problema, Silva et al. (2008a), implementaram uma experimentação na Usina Jalles Machado, localizada próxima de Goianésia, no Estado de Goiás, Brasil, para avaliar o desempenho de várias famílias de cana-de-açúcar sob condições de déficit hídrico. Foi realizada uma análise comparativa entre as famílias que foram cultivadas sob duas condições de disponibilidade de água: ambientais regulares ou irrigações mensais durante o período de deficiência de água. O material avaliado consistiu de 25 famílias plantadas em um desenho factorial de três repetições com 20 plantas cada uma, no total de 60 indivíduos. Na colheita da primeira soqueira, avaliaram-se quatro componentes: altura, diâmetro, número de colmos e Brix. Por meio da análise de variância, o número e a altura dos colmos foram influenciados pelas condições de seca durante a fase de crescimento inicial, enquanto o regime de irrigação não afetou as médias de diâmetro do colmo e de Brix durante a fase de crescimento. Pelo método de separação em quatro categorias, em algumas famílias observaram-se elevados valores de diâmetro, número e altura de colmos quando cresceram sob condição de déficit hídrico. Esse estudo comprovou que é possível selecionar famílias de cana-de-açúcar sob estresse hídrico associadas com maiores diâmetro, número e altura de colmos.

A Identificação de ferramentas satisfatórias de seleção e de características quantitativas é de suma importância no processo de melhoramento de uma cultura para tolerância à seca. Nesse sentido Silva et al. (2007) estudaram a adequação de quatro parâmetros fisiológicos (razão entre fluorescências variável e máxima da clorofila *a*,  $F_v/F_m$ ; estimativa do conteúdo de clorofila na folha via o índice SPAD; temperatura da folha, TF; e conteúdo relativo de água na folha, CRA) para distinguir entre genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e suscetíveis submetidos a um ciclo de 90 dias de déficit hídrico. Foram avaliados oito genótipos, cultivados sob condições de campo. Aos 45 dias após o estabelecimento dos tratamentos,  $F_v/F_m$ , índice SPAD e CRA das plantas sob estresse declinaram significativamente em todos os genótipos, comparados aos respectivos controles sob condições ideais de irrigação. Entretanto, as reduções foram mais severas nas folhas dos genótipos suscetíveis à seca. Sob estresse hídrico, o grupo dos genótipos tolerantes manteve maiores valores de  $F_v/F_m$  (8%), índice SPAD (15%) e CRA (16%) do que os dos genótipos suscetíveis. Em geral, TF das plantas sob estresse foi maior ( $\sim 4^\circ\text{C}$ ) que TF das plantas sob condições ideais de água, mas o aumento relativo foi maior entre os genótipos suscetíveis. Sob

déficit hídrico, TF dos genótipos tolerantes foi, em média, 2,2°C menor do que a dos genótipos suscetíveis. Os resultados são consistentes com a classificação desses genótipos como tolerantes/suscetíveis e indicam que essas ferramentas podem ser confiáveis na seleção para tolerância à seca, com *Fv/Fm*, índice SPAD e TF tendo a vantagem adicional de serem técnicas não-destrutivas e de fácil e rápido emprego.

## O Emprego de Ferramentas Moleculares

Partindo dos dados de caracterização e das populações geradas pelo melhoramento clássico, pesquisas de natureza molecular permitirão a identificação e a manipulação dos genes envolvidos na resposta à tolerância à seca. Esses genes podem ser mapeados em populações segregantes e para identificar as vias metabólicas e os genes envolvidos na reação de tolerância. Os resultados obtidos nas duas linhas de ação possibilitam orientar a condução de processos de seleção assistida, no melhoramento genético clássico da cana-de-açúcar, visando incrementar sua tolerância ao estresse hídrico. Outra aplicação é utilizar esses genes diretamente na transformação, visando à obtenção de plantas transgênicas mais tolerantes ao estresse hídrico.

As ferramentas moleculares têm auxiliado na identificação, mapeamento e isolamento de locos de características quantitativas (*Quantitative Trait Loci*, QTL) e genes responsivos ao estresse hídrico em uma série de gramíneas (Sanchez et al., 2002; Campos et al., 2004; Liet al., 2005; Diab et al., 2004). O vasto conhecimento gerado pela aplicação de ferramentas biotecnologias em sistemas modelos, como *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Craterostigma plantagineum* e na briófito *Tortula ruralis* possibilitou aos cientistas analisar o genoma das plantas e compreender quais são as vias metabólicas que controlam processos bioquímicos e fisiológicos e elucidar como eles são regulados (Ribaut et al., 2002; Grover et al., 2001; Mitra, 2001; Seki et al., 2002). A compreensão desses processos tem sido um dos maiores desafios no melhoramento de plantas, dado que um fenômeno observado é o resultado de muitos processos fisiológicos e bioquímicos diferentes (Ribaut et al., 2002). Vários genes identificados por responderem à seca não possuem papel na adaptação ao estresse, mas são induzidos em resposta aos danos causados pelo estresse (Zhu, 2000). O principal questionamento sobre os genes identificados como resposta à deficiência hídrica refere-se à identificação de quais deles realmente possuem uma função adaptativa no estabelecimento da tolerância, e daqueles que apenas respondem às injúrias ocasionadas pela imposição do estresse hídrico (Oliver et al., 2004). Os danos induzem ou reprimem a expressão de genes específicos que não estão envolvidos nos mecanismos de adaptação. Por outro lado, genes envolvidos em processos que levam a funções adaptativas são identificados por apresentarem alteração na expressão em tecidos que adquirem tolerância à perda de mais de 90% da água celular, uma manifestação extrema da tolerância à desidratação, como em sementes maduras e folhas de plantas tolerantes à dessecação durante

períodos de seca (Oliver et al., 2004). A tolerância adaptativa ao estresse hídrico depende de alterações bioquímicas, anatômicas e morfológicas induzidas pela perda de água celular (Ramajulu & Bartels, 2002).

A sequência de DNA de genes expressos (Expressed Sequence Tags – ESTs) de cana-de-açúcar tem sido utilizada para obtenção de marcadores moleculares associados a tolerância a seca no programa de melhoramento de cana da Texas A&M University em Weslaco, Texas. Nesse estudo, marcadores microsatélites obtidos de ESTs (EST-SSR) foram obtidos e utilizados em 80 genótipos (híbridos comerciais) com sucesso para medir a diversidade genética relacionada a tolerância a seca (Da Silva, comunicação pessoal).

Outra técnica molecular que pode ser utilizada para estudar a reação a seca é a chamada cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragment Polymorphism) ou polimorfismo de fragmento amplificado de DNA complementar. Utilizando essa técnica um gene similar ao gene que codifica a proteína induzida por seca SoDip22 de *Saccharum officinarum* foi identificado como sendo induzido pelo stress hídrico no genótipo tolerante e pode explicar parte da tolerância num estudo também conduzido Texas AgriLife, em Weslaco, Texas (Da Silva, comunicação pessoal).

Diversos sistemas regulatórios transcricionais estão envolvidos na indução da resposta ao estresse hídrico, como os fatores *cis* e *trans*, envolvidos na transcrição em resposta à falta de água. Um subgrupo é controlado pelo ácido abscísico (ABA), enquanto outro é independente do fito hormônio, indicando a existência de sistemas regulatórios dependentes e independentes de ABA para expressão gênica responsiva ao estresse (revisão em Xiong et al., 2002; Riera et al 2005). As situações de estresse hídrico investigadas em plantas evidenciaram a existência de uma base molecular e fisiológica comum a outros estresses; entretanto, diferenças notáveis também foram identificadas (Bartels & Salami, 2001). Atualmente, há uma grande quantidade de informações, provenientes do mapeamento genético e de projetos “Genoma”, a respeito dos genes controlando as respostas das plantas a fatores abióticos (*Arabidopsis Genome Initiative*, 2000, *Sugarcane EST* - SUCEST, 1999). Entretanto, o entendimento de como estes genes promovem estas respostas ainda permanece um desafio para a biologia vegetal. Esse conhecimento depende não só da caracterização de genes, mas também de suas sequências regulatórias e de suas funções biológicas.

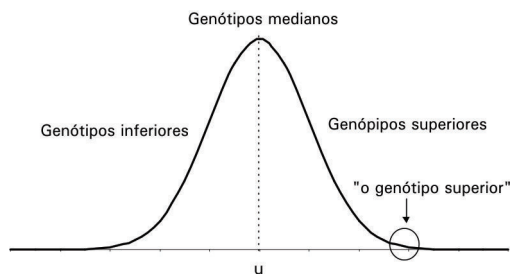
Apesar de muitos genes induzidos pela desidratação terem sido descobertos, a análise funcional revelou que seus efeitos individuais são mínimos na expressão de tolerância (Ramanjulu & Bartels, 2002). Os genes regulatórios parecem constituir-se numa estratégia mais eficiente no melhoramento para tolerância à seca. Caracteres secundários relacionados à estrutura do sistema radicular e parâmetros fisiológicos têm sido considerados no mapeamento de QTLs relacionados ao estresse hídrico em arroz (Li et al., 2005; Nguyen et al., 2004), cevada (Diab et al., 2004) e milho (Ribaut et al., 2002). De acordo com Zhang

et al. (1999), caracteres de raiz e ajuste osmótico levam a um sistema radicular bem desenvolvido e profundo facilitando a absorção de água, enquanto que o ajuste osmótico pode auxiliar na manutenção do turgor de brotos e raízes à medida em que as plantas sofrem deficiência hídrica.

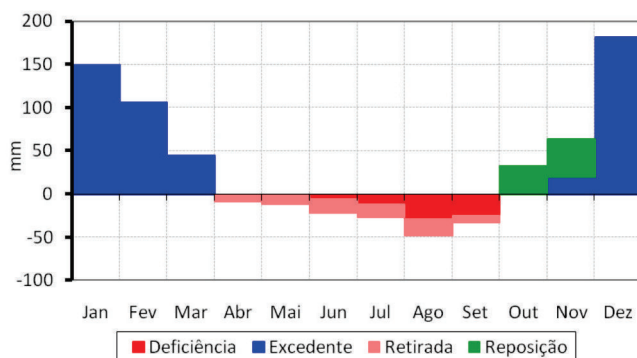
Usando ambientes controlados, populações segregantes em condição de estresse hídrico têm sido desenvolvidas para várias gramíneas e QTLs relacionados aos componentes de produção e caracteres secundários foram identificados (Ribaut et al., 2002, Li et al., 2005, Sanchez, et al., 2002, Diab et al., 2004). No entanto, há a necessidade de se explorar mais profundamente as respostas das plantas sob estresse hídrico, de modo a se identificar o(s) QTL(s) envolvido(s) na expressão diferencial dos processos fisiológicos-chave que induzem a tolerância à seca. O mapeamento de QTLs combinado a estudos de genômica funcional oferecem uma poderosa abordagem para identificar e caracterizar as principais vias bioquímicas e fisiológicas que controlam a tolerância à seca. Esse procedimento permitirá preencher a lacuna entre a função do gene e o fenótipo da planta (Ribaut et al., 2002). Além disso, o mapeamento de sequências diferencialmente expressas permite a identificação de genes candidatos envolvidos no controle da característica (Diab et al., 2004).

Em um trabalho visando identificar genes de cana-de-açúcar respondendo a estresse hídrico (Rocha et al., 2007) obtiveram expressão diferenciada de alguns fatores de transcrição conhecidos por apresentarem resposta à seca, assim como outros induzidos por ácido abscísico e que regulam o fechamento de estômatos. Um fator de transcrição homólogo a DREB2 de arroz também foi identificado e que pode ser importante, pois a superexpressão de genes desta família em outras plantas tem levado à produção de plantas resistentes à seca. Uma decarboxilase e uma desaturase também foram identificadas neste estudo que podem se tornar alvo importante para futuros estudos. O uso da transformação genética de cana-de-açúcar visando a obtenção de variedades tolerantes a diferentes estresses, especialmente o hídrico, sempre foi o objetivo de todos os programas de melhoramento que empregam essa tecnologia, mas a obtenção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar com essas características é bastante recente. Em 2006, Zhang et al. mostraram que plantas de cana-de-açúcar superexpressando o gene de trealose sintase do cogumelo comestível maitake (*Grifola frondosa*) apresentavam acúmulo de trealose, e desenvolvimento normal. O acúmulo de trealose resultou em aumento na resistência à seca, medida pelo desenvolvimento das plantas em condições de estresse hídrico no campo, e pelos resultados de diversos índices fisiológicos que foram avaliados. Em uma publicação mais recente, Molinari et al (2007) utilizaram um promotor estresse induzido para dirigir a expressão do gene P5CS de *Vigna aconitifolia*, que codifica a  $\gamma$ -1-pirrolina-5-carboxilato sintetase, enzima responsável pela biossíntese de prolina, em plantas transgênicas de cana-de-açúcar da variedade RB855156. Os resultados mostraram que um aumento na produção de prolina nas plantas transgênicas só ocorreu em condições de estresse e que ele foi suficiente para conferir a essas plantas tolerância à seca.

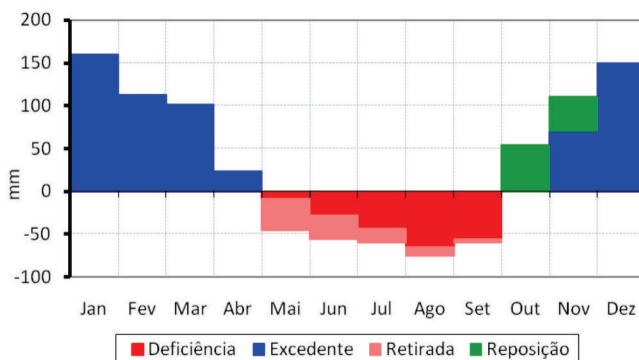




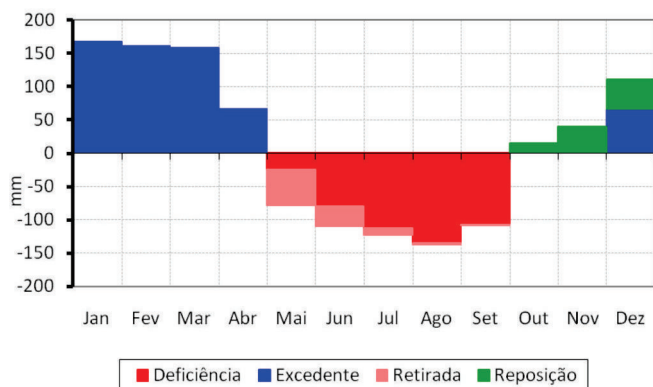
**Figura 1.** Distribuição fenotípica (genotípica) de um caráter quantitativo (Souza Jr., 1995, citado por Bressiani, 2001).



**Figura 2.** Deficiência, excedente, retirada e reposição hídrica ao longo do ano - Ribeirão Preto, SP. (Fonte: INMET, período 1961 a 1990).



**Figura 3.** Deficiência, excedente, retirada e reposição hídrica ao longo do ano - Goiânia, GO. (Fonte: INMET, período 1961 a 1990).



**Figura 4.** Deficiência, excedente, retirada e reposição hídrica ao longo do ano - Carolina, MA. (Fonte: INMET, período 1961 a 1990).



**Figura 5.** Distribuição dos campos experimentais CanaVialis em 2010 (em amarelo no formato de estrela).

## Referências

- Bartels, D.; Salamini, F. (2001). Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology* 127: 1346-1353.
- Borém, A. Interação Genótipo x Ambiente. In: Borém, A. Melhoramento de plantas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 1998. p. 105 – 116.
- BRESSIANI, J.A. (2001). Seleção seqüencial em cana-de-açúcar. (tese doutorado), Piracicaba: ESALQ/USP, 133p.

Camargo, A. P.; Camargo, M.B.P. Latitude e o tipo climático. *O Agrônomo*, Campinas, v.57, p. 17, 2005.

Campos, H; Cooper, M.; Habben, J.E. (2004). Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crop Res*, 90: 19-34.

Diab, A.A.; Teulat-Merah, B.; This, D. (2004). Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theor Appl Genet* 109: 1417–1425.

Duvick, D.N.; Smith, J.S.C.; Cooper, M. (2004). Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. *Plant Breed Rev* 24:109-151.

Grover, A.; Kapoor, A.; Lakshmi, O.S. (2001). Understanding molecular alphabets of the plant abiotic stress responses. *Curr Sci* 80:206-216.

Landell, M.G. A. & Bressiani, J. A. Melhoramento genético, caracterização e manejo varietal. In: Dinardo-Miranda, L. L., Vasconcelos, A. C. M., Landell, M.G. A. Cana-de-açúcar. Campinas, IAC, 2008 , p. 101-155.

Li, Z.; um, P.; Li, C. (2005). QTL mapping of root traits in a doubled haploid population from a cross between upland and lowland japonica rice in three environments, *Theor Appl Genet* 110: 1244–1252.

Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Curr Sci*, 80:758-762, 2001.

Molinari H.B.C., Marur C.J., Daros E., Campos M.K.F., Carvalho J.F.R.P., Bespalhok Filho J.C., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. (2007) Evaluation of the stress-inducible production of 6 proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress *Physiologia Plantarum* 130:2 218

Nguyen, T.T.T.; Klueva, N.; Chamareck, V. (2004). Saturation mapping of QTL regions and identification of putative candidate genes for drought tolerance in rice. *Mol Gen Genomics*, 272: 35-46.

Oliver, M.J.; Dowd, S.E.; Zaragoza, J. (2004). The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis. *BMC Genomics*, 5:1-19.

Prado, H. *Pedologia fácil: Aplicações na agricultura*. Piracicaba, SP. 145p, 2008.

Ramanjulu, S.; Bartels, D. (2002). Drought and dissection-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ* 25:141-151.

Ribaut, J.M.; Banziger, M.; Hoisington, D. (2002). Genetic dissection and plant improvement under abiotic stress conditions: drought tolerance in maize as an example. *JIRCAS Working Rep*: 85-92.

Riera, M.; Valon, C.; Fenzi, F. (2005). The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. *Physiol Plant* 123:111-119.

Robertson, A. Experimental design on the measurement of heritabilities and genetic correlations biometrical genetics. New York: Pergamon Press, 1959. 186p.

Saliendra, N.Z.; Meinzer, F.C. (1992). Genotypic, developmental and drought-induced differences in root hydraulic conductance of contrasting sugarcane cultivars. *J Exp Bot* 43: 1209-1217.

Sanchez, A.C.; Subudhi, P.K.; Rosenow, D.T. (2002). Mapping QTLs associated with drought resistance in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Plant Mol Biol* 48:713-726.

Seki, M.; Narusaka, M.; Ishida, J. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray *Plant J* 31: 279-292.

Silva, M.A.; Soares, R.A.B.; Landell, M.G.A.; Campana, M.P. (2007). Agronomic performance of sugarcane families in response to water stress. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 26., Durban, 2007. **Proceedings**. Durban: ISSCT, 2007. p.613-623.

Silva, M.A.; Da Silva, J.A.G.; Enciso, J.; Sharma, V. (2008b). yield components as indicators of drought tolerance of sugarcane. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.65, n.6, p.620-627.

Silva, M.A.; Soares, R.A.B.; Landell, M.G.de A.; Campana, M.P.(2008a). Agronomic performance of sugarcane families in response to water stress. *Bragantia*, Campinas, v.67, n.3, p.655-661.

Smith, D.M.; Inman-Bamber, N.G.; Thorburn, P.J. (2005). Growth and function of sugarcane root system. *Field Crop Res*, 92:169-183.

Souza Jr., C.L. (1989). Componentes da variância genética e suas implicações no melhoramento vegetal. Piracicaba: FEALQ, 134 p.

Souza Jr., C.L. (1995). Melhoramento de espécies de reprodução vegetativa. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Genética, 41 p. (Publicação Didática).

Verslues, P.E.; Agarwai, M.; Katiyar-Agarwai, S. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 46:523-539.

Xiong, L.; Zhu, J.K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 25: 131-139.

Zhang, J.; Nguyen, H.T.; Blum, A. (1999). Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J Exp Bot* 50: 292-302.

Zhu, J.K. (2000). Genetic Analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis. *Plant Physiol* 124:941-948.