

Fenotipagem para tolerância a seca visando o melhoramento genético de milho na EMBRAPA

Frederico Ozanan Machado Durães¹, Elto Eugênio Gomes Gama¹, Manoel Xavier dos Santos¹, Antônio Marcos Coelho¹, Paulo Emílio Pereira Albuquerque¹, Antônio Carlos de Oliveira¹

¹Embrapa Milho e Sorgo (<http://www.cnpms.embrapa.br>), Caixa Postal 151, CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG, Brasil; correio-e: fduraes@cnpms.embrapa.br

Resumo

Disponibilizar genótipos produtivos e com características de tolerância a estresses abióticos, principalmente ao estresse de seca, é um desafio contínuo para os programas de melhoramento, pois seca é a maior fonte de instabilidade do rendimento de grãos de cereais e legumes. Agrega-se a isto o fato de que a herdabilidade para a característica produção de grãos é baixa; portanto, genótipos melhor adaptados e com maior rendimento poderiam ser mais eficientes se atributos que conferem rendimento sob condições limitantes de água pudessem ser identificados e usados como critério de seleção. A adaptação de plantas a ambientes adversos ou situações sob fatores ambientais sub-ótimos envolve a adaptação a estresses múltiplos, com interações diretas ou indiretas. O objetivo desse trabalho é apresentar o conceito, a estratégia e a plataforma de fenotipagem da Embrapa Milho e Sorgo, exemplificando o caso de estresse de seca em milho. Os trabalhos focam a identificação, caracterização e organização de genótipos de milho, bem como estudos da interação e sobreposição de mecanismos, tanto do ponto de vista morfo-fisiológico, quanto bioquímico e molecular, para uso no melhoramento convencional e estudos genômicos moleculares. E ainda, apresentam a necessidade de protocolos de fenotipagem, adaptação de técnicas de *screening* por estresse "per se", caracterização de ambiente e implantação de sítios-específicos de áreas úteis para fenotipagem. Embora, cada estratégia discutida apresente um estágio do melhoramento diferenciados, bem como a busca de mecanismos de tolerância distintos, o foco comum é a associação do interesse de melhoramento para tolerância à seca com adequado rendimento de grãos sob condições adversas. Uma estratégia complementar de interesse trata-se de estudos de estresse "per se" e da interação com outros estresses, como o uso e eficiência de nitrogênio, em materiais tolerantes a seca. O desafio tem sido desenvolver efetivos e integrados arranjos entre o programa de melhoramento convencional e ferramentas moleculares, que permitam o desenvolvimento de cultivares úteis com aumentadas performances sob condições de adversidades abióticas e manutenção da produtividade, qualidade ambiental e sustentabilidade de ecossistemas.

Palavras-chave: caracterização, protocolos, estresse abiótico, sítios-específicos, técnicas de seleção, *Zea mays*.

Introdução

Fenotipagem, ou a caracterização de recursos genéticos para atributos diversos, tem sido um componente essencial em programas de melhoramento e atualmente está também se tornando um complemento chave para genotipagem em análise funcional e estratégias moleculares de melhoramento. Em suma, fenotipagem limita genotipagem. Com o progresso do trabalho em genômica, a necessidade de plataformas de fenotipagem especializadas na caracterização de grupos de acesso para características de importância em áreas tropicais tem-se tornado visível (Durães *et al.*, 2004a).

Áreas tropicais são afetadas por inúmeros estresses bióticos e abióticos combinados por intensa heterogeneidade ambiental e fragmentação física, o que se constitui em uma situação que imprime sérios desafios para maior compreensão de estratégias de fenotipagem.

A Embrapa Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, tem acumulado considerável conhecimento nesta área, tendo seus programas de melhoramento demandado durante anos vários arranjos multidisciplinares para fenotipagem para inúmeras características.

Programas de melhoramento para as mais importantes culturas do Brasil já tem definido que adaptação de plantas para condições adversas ou para ambientes desfavoráveis prevaletentes nos trópicos envolve a adaptação para estresses múltiplos.

Um desafio contínuo para os programas de melhoramento no Brasil tem sido gerar genótipos de alto rendimento com tolerância para diversos estresses abióticos como concentração de alumínio no solo, baixa disponibilidade de fósforo e seca, que tem sido uma das mais importantes, por ser uma das mais amplas fontes de instabilidade associada com a produção de grãos em cereais.

Disponibilizar genótipos produtivos e com características de tolerância a estresses abióticos, principalmente ao estresse de seca, é um desafio contínuo para os programas de melhoramento, pois seca é a maior fonte de instabilidade do rendimento de grãos de cereais e legumes. Agrega-se a isto o fato de que a herdabilidade para a característica produção de grãos é baixa; portanto, genótipos melhor adaptados e com maior rendimento poderiam ser mais eficientes se atributos que conferem rendimento sob condições limitantes de água pudessem ser identificados e usados como critério de seleção. A adaptação de plantas a ambientes adversos ou situações sob fatores ambientais subótimos envolve a adaptação a estresses múltiplos, com interações diretas ou indiretas.

Em milho, o estresse hídrico antes/durante o florescimento causa o retardamento no florescimento feminino e conseqüentemente aumenta o comprimento do intervalo entre florescimentos masculino e feminino (IFMF), em dias. O assincronismo entre florescimentos masculino (FM) e feminino (FF) tem sido associado com um decréscimo no rendimento de grãos sob seca (Bassetti y Westgate, 1993a,b; Betrán *et al.*, 2003; Bolaños *et al.*, 1993; Durães *et al.*, 1998, 1999a, 1999b, 2000, 2001, 2002, 2004a; Ribaut *et al.*, 1996, 1997).

O objetivo desse trabalho é apresentar o conceito, a estratégia e a plataforma de fenotipagem da Embrapa Milho e Sorgo, exemplificando o caso de estresse de seca em milho. Os trabalhos focam a identificação, caracterização e organização de genótipos de milho, bem como estudos da interação e sobreposição de mecanismos, tanto do ponto de vista morfo-fisiológico, quanto bioquímico e molecular, para uso no melhoramento convencional e estudos genômicos moleculares. E ainda, apresentam a necessidade de protocolos de fenotipagem, adaptação de técnicas de *screening* por estresse "per se", caracterização de ambiente e implantação de sítios-específicos de áreas úteis para fenotipagem.

Material e Métodos

Espécies vegetais diferentes apresentam estágios diferenciados de melhoramento, e o esforço corrente de caracterização de cada cultura para tolerância à seca implica na definição da estratégia de melhoramento, no parâmetro fenotípico (característica de planta), na tipificação da seca (descrição do potencial hídrico no solo e na planta, na fase fenológica crítica da cultura), e métodos e técnicas (identificação e monitoramento da duração e a intensidade do déficit hídrico imposto à planta) para avaliação adequada das respostas diferenciadas entre genótipos. Essas medidas, em condições controladas e a campo, são fundamentais para a caracterização do estresse hídrico, a avaliação do rendimento de grãos e o comportamento de características secundárias associadas ao rendimento.

Em milho (*Zea mays* L.), os esforços concentram-se, a partir de um sintético elite flint formado em 1987, na produção de linhagens e híbridos e de populações segregantes de linhagens selecionadas contrastantes para o intervalo entre florescimentos masculino e feminino (IFMF), sob condições plena e sob estresse hídrico no florescimento, em sítios ambientais adaptados. Complementarmente, são estudados os parâmetros de prolificidade, rendimento e seus componentes, enrolamento foliar, senescência foliar. Também, estudos de peroxidação de lipídios e de enzimas de estresse antioxidante, bem como, de fluorescência da clorofila estão sendo realizados para ampliar a caracterização de linhagens elite contrastantes, e apontar possíveis mecanismos. Estudos paralelos tem buscado a identificação de progênies endogâmicas de milho com tolerância a estresses múltiplos via seleção recorrente. A estratégia é a avaliação direta ao estresse de seca e indireta para estresses de P e N, objetivando-se linhagens heteróticas e produtivas com múltiplas características de tolerância e eficiência a estresses, para produção de híbridos e estudos genômicos.

Estudos e ações em andamento tem buscado a macro e microsentenia em regiões genômicas que

controlam genes de interesse econômico em arroz, milho e sorgo, com ênfase no mapeamento de marcadores microssatélites no genoma de milho e sorgo, no mapeamento genético comparativo de regiões do genoma de milho e sorgo associados ao controle genético da tolerância à seca, bem como de estudos de genética associativa para identificação de genes ortólogos candidatos para o controle da tolerância à seca em arroz, milho e sorgo.

Resultados e Discussão

Basicamente, três pontos chave definem uma efetiva fenotipagem para estresse abiótico, por exemplo, de seca, a saber (Durães *et al.*, 2004):

- a) o parâmetro fenotípico (característica de planta), para descrever adequadamente o estresse de seca;
- b) a descrição do potencial de água no solo e na planta; e,
- c) o *background* genético e o estágio de desenvolvimento da cultura (fase crítica para a tolerância ao estresse).

Essas medidas, em condições controladas de campo são fundamentais para a caracterização do estresse hídrico, e para a avaliação do rendimento de grãos e características secundárias do rendimento.

Arranjos de fenotipagem para seca

Basicamente, três estratégias de protocolos de fenotipagem tem sido implementada na Embrapa para os programas de melhoramento de culturas, visando a adaptação de culturas para ambientes sob estresses hídricos. São eles:

- a) Preliminar: O desenvolvimento de genótipos com alta performance de rendimento em ambientes propensos a seca seguindo um arranjo de melhoramento convencional;
- b) Intermediário: O desenvolvimento de genótipos tolerantes a seca seguindo um arranjo de melhoramento fisiológico, e obtenção de genótipos contrastantes por característica alvo e estresse típico e fase fenológica crítica da cultura;
- c) Avançada: Protocolos intermediários adicionados com estudos de mecanismos, e obtenção de adequado *background* genético para uso em melhoramento convencional e arranjos genômicos QTL e seleção assistida por marcadores.

Esses arranjos compreendem várias fontes de germoplasma com seus diversos *background* genéticos, focos no desenvolvimento de plantas tolerantes para estresses múltiplos.

Fenotipagem para tolerância a seca em programas de melhoramento genético de culturas, na Embrapa: *O caso do milho.*

a) *O estado da arte do programa de melhoramento de milho para tolerância a seca:*

1. Linhagens selecionadas para intervalo entre florescimentos masculino e feminino (IFMF, em dias) foram originadas de Sintético Elite composto em 1987;
2. Após três gerações de recombinação, progênies autofecundadas foram extraídas desse sintético com seleção para IFMF em área irrigada da Embrapa;
3. O Sintético Elite Flint foi formado com linhagens em S_4 e S_5 que apresentaram baixo IFMF, e dentro de 2-3 anos podem ser lançados no mercado;
4. Linhagens com IFMF: Está bem trabalhado um grupo de 80 linhagens originadas desse Sintético Elite selecionado para IFMF;
5. Protocolos de Fenotipagem Intermediária e Avançada: 12 linhagens S_6 foram caracterizadas e famílias segregantes (RIL) de duas linhagens contrastantes para IFMF e rendimento de grãos foram formadas para estudos de QTL;
6. Híbridos (Testes de campo para IFMF x Rendimento de Grãos sob diferentes regimes de água): Híbridos Simples, Híbrido Triplo e Híbrido Duplo com 100% IFMF e 50% IFMF.
7. Obtenção de progênies endogâmicas de milho com tolerância a estresses múltiplos através de seleção recorrente:

(Esquemático: Sintético (P e N) Progênies S_1 , Avaliação de S_1 sob seca Recombinação de progênies selecionadas (baixo P e N) Ciclo1 Progênies S_1 , Avaliação S_1 , Recombinação Ciclo 2 e assim por diante ...)

Os sintéticos foram feitos pelo uso de linhagens da Embrapa e outras introduzidas de programas de pesquisa colaborativos, usando seleção recorrente com progênies autofecundadas.

- **Sítios de avaliação** (selecionados): Janaúba e Sete Lagoas, MG, Brasil. Após o desenvolvimento do conceito de sítio-específico para estudos de estresse hídrico, bem como a adaptação de protocolos e métodos de monitoramento e aferição de controle de água, conteúdo em solo e planta, visando tipificação do estresse hídrico e eficiência de absorção e de uso de água em plantas de milho, considerou-se implantado o sítio-específico para fenotipagem para estresse hídrico em milho (Durães *et al.*, 2004b). Sistemática e continuamente cada local selecionado (em superfície e em profundidade) está sendo monitorado e/ou manejado quanto a parâmetros físico-químicos para o desenvolvimento de sítios-específicos para o fator-água, visando estudos de fenotipagem em milho.

- **Variáveis fenotípicas** (selecionadas): As características básicas que estão sendo avaliadas são: rendimento de espiga, rendimento de grãos, umidade de grão, número de espigas, estande, e florescimentos masculino e feminino (IFMF, em dias). A seleção das progênies é feita na seguinte ordem: rendimento de grãos, rendimento de espiga, prolificidade e IFMF.

- **Passos futuros:** Testar as linhagens tolerantes para estresses múltiplos em combinação com outras linhagens heteróticas para produção de híbrido e lançar no mercado uma cultivar (sintético) para ser utilizado em programas de pesquisa e para produção em agricultura familiar.

Em milho, cerca de oitenta linhagens endogâmicas caracterizadas para tolerância à seca estão sendo trabalhadas utilizando-se ferramentas do melhoramento convencional e moleculares. As populações segregantes de linhagens contrastantes para IFMF e rendimento de grãos foram produzidas para estudos genéticos, e, de curto prazo, está sendo desenvolvido um composto com características de tolerância a seca e rendimento de grãos. Exemplificando, alguns dos resultados e procedimentos de fenotipagem para tolerância a seca em milho são indicados na Tabela 1.

Conclusões

Embora cada estratégia discutida apresente um estágio do melhoramento diferenciado, bem como a busca de mecanismos de tolerância distintos, o foco comum é a associação do interesse de melhoramento para tolerância à seca com adequado rendimento de grãos sob condições adversas. Uma estratégia complementar de interesse trata-se de estudos de estresse "per se" e da interação com outros estresses, como o uso e eficiência de nitrogênio, em materiais tolerantes a seca. O desafio tem sido desenvolver efetivos e integrados arranjos entre o programa de melhoramento convencional e ferramentas moleculares, que permitam o desenvolvimento de cultivares úteis com aumentadas performances sob condições de adversidades abióticas e manutenção da produtividade, qualidade ambiental e sustentabilidade de ecossistemas.

Tabela 1. Resultados e procedimentos de fenotipagem para tolerância a seca em milho.

Espécie: Milho (<i>Zea mays</i> L.)	Genótipos tolerante a seca	Genótipo sensível a seca
1. Linhagens	L13.1.2, L6.1.1	L1147, L1170
2. <i>Background</i> Genético	S ₁₀	S ₁₀
3. Parâmetro fenotípico	IFMF, Rendimento Médio de Grãos	IFMF, Rendimento Médio de Grãos
4. Mecanismo	Turgidez durante florescimento	Turgidez durante florescimento
5. Técnica de <i>screening</i>	Irrigado x Não - Irrigado	Irrigado x Não - Irrigado
6. Local	Casa de vegetação e campo	Casa de vegetação e campo
7. Sítio	Sete Lagoas e Janaúba, MG	Sete Lagoas e Janaúba, MG
8. Referências	Durães, F.O.M.; Magalhães, P.C.; Oliveira, A.C.; Santos, M.X.; Gama, E.E.G.; Guimarães, C.T. Combining ability of tropical maize inbred lines under drought stress conditions. <i>Crop Breeding and Applied Biotechnology</i> . Londrina, v.2, n.2, p. 291-292, 2002. Durães, F.O.M.; Santos, M.X.; Gama, E.E.G.; Magalhães, P.C.; Albuquerque, P.E.P.; Guimarães, C.T. <i>Fenotipagem associada a tolerância a seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores</i> . Embrapa Milho e Sorgo. 17 p. 2004. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica No. 39).	
9. Responsável	Durães, F.O.M. <i>et al.</i>	
10. Observações:		
10.1. Outras características de interesse, etc.)	Rendimento de Grãos, Rendimento de Espiga, Prolificidade, Senescência Foliar	
10.2. Estudos complementares	Peroxidação de lipídios, enzimas do estresse antioxidante, fluorescência da clorofila, interações água x nitrogênio	
10.3. Projetos associados	Embrapa-SEP 04.0.94.261-01, SEP 03.0.94.340-05, SEP 04.0.98.280-01 e 02, SEP 04.0.04.000-01 a 04	

* Os materiais são linhagens de pedigree fechado, portanto disponíveis de acordo com a legislação vigente.

Literatura Citada

- Bassetti, P., y Westgate M.E. 1993a. Senescence and receptivity of maize silks. *Crop Science* 33, 275-278.
- Bassetti, P., y Westgate M.E. 1993b. Water deficit affects receptivity of maize silks. *Crop Science* 33, 279-282.
- Betrán, F.J., Beck, D., Bänziger, M., Edmeades, G.O. 2003. Secondary traits in parental inbreds and hybrids under stress and non-stress environments in tropical maize. *Field Crops Research* 83, 51-65.
- Bolaños, J., Edmeades, G.O., L. Martinez. 1993. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. III. Responses in drought-adaptive physiological and morphological traits. *Field Crops Research*, Amsterdam, v. 31, p. 269-286.
- Durães, F.O.M., Magalhães, P.C., Santos, M.X., Lopes, M.A., Paiva, E. 1998. Intervalo entre florescimentos masculino e feminino como parâmetro fenotípico útil ao melhoramento de milho tropical para tolerância à seca. pp. 27. *In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO*, 22., 1998, Recife, PE. Resumos... Recife: IPA.
- Durães, F.O.M., Magalhães, P.C., Santos, M.X.dos, Lopes, M.A., Paiva, E. 1999. Seleção de Genótipos de Milho visando tolerância à seca: estratégia de fenotipagem e utilização de marcadores moleculares. 718 pp. *In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA*, 45., 3-6/out./99 Gramado-RS, Brasil, 1999a. Resumos. Gramado-RS, SBG, 803p. (Rev. Genetics and Molecular Biology, vn.nn(Suplemento), 1999).
- Durães, F.O.M., Machado, R.A.F., Magalhães, P.C., Santos, M.X., Silva, R., Molina, M. 1999b. Adaptação de milho às condições de seca: 1. Caracterização de genótipos contrastantes quanto ao parâmetro fenotípico IFMF (Intervalo entre florescimentos masculino e feminino). pp. 53. *In: Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, São Carlos, v.11 (Suplemento), Resumos.
- Durães, F.O.M.; Santos, M.X.dos, Paiva, E., Couto, L., Oliveira, A.C. 2000. Estratégia de melhoramento de milho visando tolerância à seca. pp. 93. *In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO*, 23., Uberlândia., Resumos. Uberlândia, ABMS;Embrapa Milho e Sorgo. Maio, 2000.
- Durães, F.O.M., Magalhães, P.C., Santos, M.X., Oliveira, A.C. 2001. Adaptação de milho às condições de seca: 4. Identificação e caracterização de genótipos, estudos de mecanismos. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FIOLOGIA VEGETAL*, 8., SBFV, Ilhéus, BA, 1-7/set.
- Durães, F.O.M.; Magalhães, P.C., Oliveira, A.C., Santos, M.X.dos, Gama, E.E.G., Guimarães, C.T. 2002. Combining ability of tropical maize inbred lines under drought stress conditions. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.2, n.2, p. 291-298.

- Durães, F.O.M., Santos, M.X., Gama, E.E.G., Magalhães, P.C., Albuquerque, P.E.P., Guimarães, C.T. 2004a. Fenotipagem associada a tolerância a seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores. Embrapa Milho e Sorgo. 17 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica No. 39).
- Durães, F.O.M., Albuquerque, P.E.P., Gomide, R.L., Andrade, C.L.T., Coelho, A.M. 2004b. Desenvolvimento de sítios-específicos de fenotipagem para estresses abióticos em milho. Embrapa Milho e Sorgo. 10 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica). No prelo.
- Ribaut, J.-M., Hoisington, D.A., Deutsch, D.A., Jiang, C., González-de-León, D., 1996. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor. Appl. Genet.* 92, 905-914.
- Ribaut, J.-M., Jiang, C., González-de-León, D., Edmeades, G.O., Hoisington, D.A., 1997. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.* 94, 887-896.

Summary

Phenotyping, or the characterization of genetic resources for diverse attributes, has been an essential component of breeding programs and now is also becoming a key complement to genotyping in functional analysis and molecular breeding strategies. The response of the plants for drought stresses is associated with its internal water content. Although the effects of those stresses are known, the significant practical results are few. The adaptation of plants to adverse environments, or situations under sub-optimum environment factors, involves the adaptation to multiple stresses, with direct and indirect interactions. The elucidation of physiologic, biochemical and molecular mechanisms might boost the process of generation of new genetic materials, besides contributing for the development of selection techniques that could reduce the time and the work for evaluation of genetic sources for tolerance to abiotic stresses. The Embrapa Maize and Sorghum has dedicated strategic actions in its improvement program, considering preliminary, intermediate, and advanced phenotyping protocols. These approaches comprise various germoplasma sources with their diverse genetic background, focused on the development of tolerant plants to multiple stresses. As a result, there are available about eighty contrasting maize lines selected mainly for ASI and Grain Yield; and also segregating families (RIL) and two inbred lines groups characterized under different water regimes. The present work is related with adequate tropical germoplasma characterization for water stress and it summarizes the effort in the development of promising genetic material for maize improvement for typical drought tolerance in Brazil.

Key words: characterization, protocols, abiotic stress, site-specific, screening techniques, *Zea mays*.