

**AVALIAÇÃO DO USO DE AGENTES
OSMÓTICOS E MICROSSATÉLITES NA
SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE TRIGO
TOLERANTES À SECA**

LARISSA GIROTTO

2006

LARISSA GIROTTO

**AVALIAÇÃO DO USO DE AGENTES OSMÓTICOS E
MICROSSATÉLITES NA SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE TRIGO
TOLERANTES À SECA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador
Prof. Dr. José Donizeti Alves

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Giroto, Larissa

Avaliação do uso de agentes osmóticos e microssatélites na
seleção de genótipos de trigo tolerantes à seca / Larissa Giroto. –
Lavras: UFLA, 2006.

63 p.

Orientador: José Donizeti Alves
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Trigo. 2. Agentes osmóticos. 3. Tolerância. 4. Seca. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-633.1123

LARISSA GIROTTO

**AVALIAÇÃO DO USO DE AGENTES
OSMÓTICOS E MICROSSATÉLITES NA
SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE TRIGO
TOLERANTES À SECA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia, área de
concentração em Fisiologia
Vegetal, para a obtenção do
título de "Mestre".

APROVADA em 22/09/2006

Dra. Angela Maria Soares

UFLA

Dr. Marcelo Murad Magalhães

UFLA

Dr. Paulo César Magalhães

EMBRAPA-CNPMS

Prof. José Donizeti Alves

UFLA

(Orientador)

A Deus e aos meus pais, Euclides Santo Giroto e Clara
Bresolin Giroto,

OFEREÇO.

Ao meu irmão Paulo, e a minha irmã, Tatiana.

Aos meus sobrinhos, Bruno e Pedro Henrique.

Aos meus cunhados, Ricardo e Fernanda.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela grande força dado ao longo de todo o curso.

Ao meu irmão, Paulo e minha cunhada, Fernanda, pelo apoio e ajuda em todas as vezes que retornei a Lavras. A minha irmã, Tatiana, pelo incentivo e apoio nos momentos difíceis. Ao meu cunhado, Ricardo, por todas as caronas dadas.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Setor de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do curso.

À EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Trigo pela realização do experimento e por toda a infra-estrutura oferecida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Donizeti Alves, pela oportunidade concedida e, principalmente pelas correções e por todo o auxílio prestado.

À pesquisadora Ana Christina, pela oportunidade de fazer meus experimentos no CNPT e pelo auxílio nas correções.

Aos membros da banca examinadora.

Aos professores: Amauri, Luiz Edson, Evaristo e Donizeti, pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Edson Iorczeski, pela grande orientação nos momentos difíceis.

Ao Dr. João Carlos Ignaczak, pela incansável ajuda na realização da análise estatística.

À Dra. Ana Lúcia Variani Bonato e à Dra. Sandra Patussi Brammer, pelas correções e pelo enorme auxílio prestado durante todo o período.

Ao Alcir Signori, pela ajuda durante todos os experimentos.

A Neuza Pereira Jorge, pelo auxílio na confecção dos variados meios de cultura e apoio na coleta de embriões.

A Dra. Francismar Corrêa Marcelino por toda ajuda prestada, ensinamentos transmitidos e enorme colaboração, convivência e amizade.

Ao Dr. Jorge Pereira, por todos os ensinamentos passados durante o experimento no Laboratório de Biologia Molecular.

A todos os funcionários do Núcleo de Biotecnologia Aplicada a Cereais de Inverno (NBAC).

À estagiária de iniciação científica, Ana Paula Tomazoni, por todo o esforço, dedicação e amizade, em todas as etapas dos experimentos.

Aos estagiários do NBAC, que de alguma maneira, sempre deram uma grande ajuda: Aline, Dejane, Estevon, Gabriele, Marcel e Maria Fernanda, e aos outros, Cibele, Maira, Ricardo e Taiana, pelo convívio nesta etapa.

Ao Dr. Jorge Gouvêa, pelo auxílio nos cálculos de potencial osmótico.

A Franciane, Marilza, Fernanda Grisi e Patrícia, pela amizade, estudos para prova e trabalhos em grupo. A Fran e a Patrícia, pelo ótimo período que passei em Lavras e pela nossa divisão no apartamento. A Lenaldo e Mayara, por me acolherem no período final da dissertação.

À Dra. Daniela Deitos Fries, por ter me incentivado e apoiado na decisão de fazer o mestrado em Lavras e também pelos conselhos dados durante todo o curso.

Ao Izonel, por resolver sempre meus problemas, por e-mail.

Aos colegas e amigos da Fisiologia Vegetal: Thatiane, Sidnei, Marquinhos, Fernanda Nery, Fernanda Soares, Vanessa, Samantha, Antonio Augusto, Carlos Vinício, Maiana, Girlene, Karine, Morbeck, Graciele, Paula, Ivana e Anderson, por tornarem os meus dias de mestrado mais felizes.

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram para o encerramento desta etapa importante da minha vida e que, embora não citados aqui, não deixam de ter meu profundo agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Material vegetal	11
3.1.1 Comprimento de parte aérea e raiz principal em plântulas submetidas a estresse hídrico.....	12
3.1.2 Comprimento de parte aérea e raiz principal em embriões imaturos submetidos a estresse hídrico.....	13
3.2 Determinação da variabilidade genética em genótipos/linhagens de trigo para tolerância à seca	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1 Comprimento de parte aérea e raiz principal em plântulas submetidas a estresse hídrico.....	23
4.2 Comprimento de parte aérea e raiz principal em embriões imaturos submetidos a estresse hídrico.....	33
4.3 Determinação da variabilidade genética em genótipos/linhagens de trigo para tolerância à seca	48
5 CONCLUSÃO	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
Anexo I	62

RESUMO

GIROTTI, Larissa. **Avaliação do uso de agentes osmóticos e microssatélites na seleção de genótipos de trigo tolerantes à seca**. 2006. 63 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de agentes osmóticos e microssatélites na seleção de genótipos de trigo tolerantes à seca. Amostras de oito genótipos foram avaliadas pelo comprimento da parte aérea e raiz principal em plântulas e embriões imaturos após submissão a estresse hídrico. Para tanto, foram utilizados três indutores de perda de água na célula: polietilenoglicol 6000 (PEG), maltose e manitol e água como controle. Para acessar a variabilidade genética, o DNA de 93 cultivares/linhagens foi extraído e analisado empregando-se um conjunto de 42 marcadores microssatélites, distribuídos nos diferentes cromossomos do trigo para acessar a similaridade genética do material e também o polimorfismo. Os resultados obtidos no experimento de comprimento relativo da parte aérea e raiz principal em plântulas sob estresse hídrico evidenciaram que os agentes utilizados, PEG 6000 e manitol, causaram estresse nas cultivares testadas, tendo sido significativa a interação entre agente e cultivar. PEG 6000 causou efeitos negativos maiores que manitol. No experimento de comprimento relativo de parte aérea e raiz principal em embriões imaturos submetidos a estresse hídrico, verificou-se que, dentre os agentes estressantes utilizados, manitol e maltose foram mais tóxicos ao material vegetal em estudo e PEG 6000 o agente estressante mais adequado. No experimento de determinação da variabilidade genética em genótipos de trigo para tolerância à seca, o coeficiente médio de similaridade para as 93 cultivares/linhagens estudadas foi de 0,691. As linhagens com maior proximidade genética foram PF 81189 e PF 81191 (0,95), criadas na Embrapa Trigo e os materiais mais distantes geneticamente foram IPF 77781, IPF 77783 e IPF 78080 (0,50). Foi verificado alto nível de polimorfismo nas cultivares indicadas pelo Banco Ativo de Germoplasma. Os resultados do presente estudo, buscando verificar precocemente a tolerância diferencial ao estresse hídrico com plântulas e embriões imaturos de trigo, envolvendo diferentes agentes osmóticos e microssatélites, demonstraram divergências com as observações de campo, fornecidas pelo Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo.

¹ Comitê Orientador: José Donizeti Alves – UFLA (Orientador), Ana Christina Sagebin Albuquerque – EMBRAPA (Co-orientadora).

ABSTRACT

GIROTTTO, Larissa. **Evaluation os osmotic substances and microsateillits on selection of wheat genotypes tolerant to drought.** 2006. 63 p. Dissertation (Master in Plant Physiology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.²

The present paper aimed to evaluate the use of osmotic substances and microsateillits on selection of wheat genotypes tolerant to drought. Samples from eight genotypes werw evaluated by length of aerial part and main root in plantlets and immature embryos after water deficit. For this purpose there here used three induces of water loss in cell: polyetileneglicol 6000, maltose, mannitol and water as control. In order to acess the genetic variability the from 93 cultivars / lineages were extracted and analyzed using a set of 42 microsateillits markers, distributed in different chromosome to acess the genetic similarity of the material and also polymorphism. The results obtained with relative length of aerial part and main root in plantlet on water deficit showed that the chemicals used, PEG 6000 e mannitol, caused stress in cultivars tested, being significative the interaction between these agents and the cultivar. PEG 6000 caused higher negative effects than mannitol. Considering the relative length of aerial part and main root in immature embryos submitted to water deficit, it was verified among the stress agents used, the mannitol and maltose were more toxic to the plant tissue studied and the PEG 6000 the osmoticum agent more adequate. In the experiment related to genetic variability in wheat genotypes tolerant to drought, the similarity mean coefficient for 93 cultivars / lineages was 0,691. the lineage with more close genetically were PF 81189 and PF 81191 (0,95), developed by Embrapa Wheat, and the genotypes more distant genetically were IPF 77781, IPF 77783 and IPF 78080 (0,50). There were verified a high polymorphism level among the cultivars in the Active Germoplasm Bank, mainly Aliança and BRS 207. The results of this research, trying to search early the differential tolerance to water deficit in plantlets and immature embryos of wheat, involving different osmotic substances and microsateillits, showed divergence with the field observations, given by Active Germoplasm Bank of the Embrapa Wheat.

² Guidance Committee: José Donizeti Alves – UFLA (Adviser), Ana Christina Sagebin Albuquerque – EMBRAPA (Co- Adviser).

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, em escala mundial, grandes quantidades de trigo são perdidas em consequência de pragas e doenças, falhas nas operações de colheita, secagem, transporte e armazenamento do produto e fatores climáticos adversos. A falta de precipitações regulares, é o componente determinante das oscilações anuais de produção (IBGE, 2006). Em relatório sobre segurança agrícola, elaborado pelo Ministério do Planejamento (Göpfert et al., 1993), consta a ocorrência de secas como principal evento sinistrante (71% dos casos), seguida por chuva excessiva (22% dos casos), granizo, geada, pragas e doenças. As implicações são enormes, uma vez que não somente produtores, mas toda a cadeia produtiva é afetada, causando desemprego, aumento no preço de alimentos e instabilidade no mercado dentre outros.

Entre os vários fatores limitantes da produção vegetal, o déficit hídrico ocupa os primeiros lugares, pois, além de afetar as relações hídricas nas plantas, alterando-lhes o metabolismo, o fenômeno ocorre em grandes extensões de áreas cultiváveis. Estresses abióticos, como a seca, além de reduzir significativamente os rendimentos das lavouras, restringem as localizações geográficas e os solos onde espécies comercialmente importantes poderiam ser cultivadas. Por esta razão, o melhoramento para a tolerância à seca assume grande importância em programas de melhoramento de plantas para regiões que apresentam déficit hídrico em fases críticas do ciclo da cultura e, para áreas secas, a exemplo do semi-árido e centro-oeste brasileiro (Baptista, 2004).

Embora a região Centro-Oeste apresente extensa área potencial para cultivo desse cereal, equivalente a mais de quatro milhões de hectares, atualmente responde por apenas 4% da área cultivada com trigo no país. A produção anual na região, juntamente com os estados de Minas Gerais e Bahia, é de 286.800 toneladas de grãos (CONAB, 2004), enquanto a capacidade instalada de moagem

é de 2 milhões de toneladas/ano – 9,7% da capacidade brasileira –, determinando a necessidade de importação ou busca do produto em outras regiões do país (Só & Silva, 2004).

A maior limitação de um programa de melhoramento genético vegetal para tolerância ao déficit hídrico é o conhecimento insuficiente sobre as bases fisiológicas, moleculares e genéticas das respostas das plantas a esta condição (McCree & Fernandez, 1989). O aspecto multidisciplinar dessas pesquisas é crucial e fornecerá subsídios para a seleção de genótipos superiores durante o programa de melhoramento. É importante salientar que a tolerância à seca está associada a caracteres quantitativos (QTLs), o que significa o envolvimento de vários genes no controle da tolerância à seca (Carneiro & Vieira, 2002).

Os grandes desafios, em programas de melhoramento vegetal para tolerância à seca, são a identificação e a caracterização de genitores apropriados para regiões historicamente conhecidas como propensas ao déficit hídrico durante as estações de plantio. Neste contexto, uma das estratégias para a obtenção de genótipos tolerantes à seca é a seleção de germoplasma adaptado às condições de estresse, buscando como alternativa, submeter plântulas ou sementes dos diversos genótipos às condições de estresse osmótico *in vitro*. Dentre as substâncias mais usadas podem-se citar o polietilenoglicol (PEG), o manitol e a maltose.

Paralelamente a esta estratégia do uso de metodologias com agentes osmóticos nas fases iniciais de desenvolvimento, podem-se associar marcadores moleculares a estresse abiótico. Os microssatélites têm sido utilizados em diversas culturas de interesse agrônomico e tem se mostrado uma técnica facilmente reproduzível, apresentando co-dominância e, geralmente, uma distribuição freqüente e aleatória, permitindo uma ampla cobertura do genoma (Borem & Caixeta, 2006). A associação dessas estratégias fisiológicas e moleculares poderá fornecer, mais precocemente, fortes candidatos a genótipos

tolerantes ao estresse hídrico, que serão incorporados nos programas de melhoramento, reduzindo o custo e o tempo para a liberação de novas variedades.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de agentes osmóticos e microssatélites na seleção de genótipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) tolerantes à seca.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Cerca de um terço da área cultivada com trigo nos países em desenvolvimento está localizada em ambientes considerados marginais para o cultivo deste cereal, em virtude da seca, do calor e de problemas de solo que caracterizam estas áreas, sujeitas ao déficit hídrico durante o desenvolvimento da cultura. Todavia, a despeito das grandes limitações, estes ambientes áridos são considerados marginais para o desenvolvimento da agricultura e vêm assumindo papel cada vez mais importante em questões de segurança alimentar nos países em desenvolvimento. Portanto, a melhoria da produtividade de trigo, frente a essas condições de estresses abióticos, constitui importante objetivo da pesquisa mundial. O entendimento dos mecanismos de tolerância vão propiciar a adoção de estratégias corretas para a obtenção de genótipos superiores (Lantican et al., 2001; Ortiz et al., 2005)

À semelhança de outras plantas cultivadas, a tolerância ao déficit hídrico em trigo está associada a vários fatores fisiológicos, tais como níveis do hormônio ABA, que regulam a condutância estomática (Shinozaki & Yamaguchi, 1996) e, conseqüentemente, a perda de água sob dessecação, assim como o acúmulo de osmólitos, como a prolina, que contribui para favorecer a tolerância à seca dos trigos tetraplóides e hexaplóides (Fumis & Pedras, 2002), o

manitol e os açúcares solúveis, que levam à redução no potencial osmótico da seiva da célula, prevenindo, assim, o movimento de água para fora dela.

O ajuste osmótico é um dos mecanismos fisiológicos mais importantes para capacitar as plantas a tolerar o estresse hídrico. O uso de metodologias que verifiquem os níveis de prolina, que é um dos solutos envolvidos nesse ajustamento, atua como agente osmorregulador em muitas espécies cultivadas e mostra que o seu acúmulo nas folhas está relacionado com o déficit hídrico (Nogueira et al., 1998). Observa-se, de fato, que o aumento no déficit hídrico promove o aumento nos teores de prolina nas folhas de trigo, o que, pode ser atribuído ao aumento na atividade das enzimas envolvidas na síntese ou na inibição da oxidação desta molécula (Heerden & Villiers, 1996). Inclusive o aumento de prolina e putrescina nas plantas de trigo é uma forma de indicador de estresse hídrico na cv. Anahuac (Fumis & Pedras, 2002). O ajuste osmótico em consequência do déficit hídrico foi observado em gramíneas tropicais, assim como para sorgo, girassol e trigo (Durães et al., 2004; Vilela & Morais, 1986).

Uma outra estratégia de tolerância à seca em trigo se estende também aos parentes selvagens da espécie, a exemplo do ancestral tetraplóide *Triticum dicoccoides*, espécies *Aegilops* e também a progenitores de outras culturas, como a cevada. Uma grande diversidade genética vem sendo encontrada entre e em populações de *T. dicoccoides*: um considerável número de acessos vêm mostrando superioridade em relação às formas cultivadas, principalmente a um maior rendimento (Reynolds et al., 1999, Peleg et al., 2005).

A produtividade do trigo depende da quantidade de água disponível no solo, de forma que cultivares tolerantes à seca podem utilizar-se de, pelo menos, dois mecanismos distintos para um maior aproveitamento da água, como reduzir a quantidade de água consumida, ou produzirem mais grãos, por uma mesma quantidade de água (Denadai & Klar, 1995).

A água, além de ser necessária ao crescimento das células, é um elemento essencial para a manutenção da turgescência. Como a água de irrigação é um dos recursos cada vez mais limitados no universo, daí a necessidade de técnicas que permitam aumentar a produtividade das culturas a cada unidade de volume de água aplicada (Denadai & Klar, 1995). Para Serraj & Sinclair (2002), a importância da manutenção do turgor nas células está em permitir a continuidade dos processos de crescimento vegetal, expansão, divisão celular e fotossíntese; outro fator é a possibilidade de adiar a desidratação dos tecidos, podendo essas reservas serem usadas em períodos posteriores. Uma vez iniciado o primórdio foliar, o tamanho final atingido é determinado pelo índice de duração da divisão e expansão celular.

O potencial hídrico (ψ_w) é considerado uma característica confiável para medir a resposta da planta ao estresse hídrico, dependendo do tipo de planta e das condições ambientais. Foi listado um número de respostas de planta para estresse hídrico, que ocorre antes da dessecação se tornar letal. A maioria das respostas (crescimento da célula, síntese de parede e proteína, atividade enzimática, etc.) é afetada por reduções de ψ_w de abaixo de -1,5MPa. O controle passivo de dessecação de plantas ocorre quando o fechamento estomático resulta de reduzido ψ_w (Durães et al., 2004; Vilela & Morais 1986).

Várias técnicas vêm sendo usadas para detectar de forma precoce os sinais de estresse, monitorando as mudanças no estado da água, eficiência fotossintética, acúmulo de metabólitos secundários ou modificações estruturais. A termografia, a descoberta de refletância e a fluorescência são as técnicas atualmente exploradas e estudadas (Gaspar et al., 2002). Os principais aspectos avaliados para análise da planta em tolerar déficit hídrico elevado, principalmente sob baixa disponibilidade de água no solo, referem-se à sensibilidade estomática à troca gasosa e à capacidade de manter alto teor hídrico na folha e suportar a desidratação imposta pelo ambiente adverso. Tais

aspectos resumem-se à medida da resistência oferecida pelos estômatos a esta troca gasosa e pela análise do potencial da água na folha. Assim, medidas do potencial da água na folha têm se apresentado como importante instrumento para quantificação do estresse hídrico a que os vegetais são submetidos e, ainda, permitem observar e determinar a resistência ao transporte de água no sistema solo-planta (Brunini, 1998).

No entendimento das respostas das plantas ao déficit hídrico é de fundamental importância se quantificar a capacidade de armazenamento de água no solo e analisar a influência dos mecanismos de adaptação das plantas à redução da disponibilidade de água no solo. Isso porque a quantidade de água armazenada no solo e disponível às plantas varia com a textura e as características físicas do solo, o que leva a planta a apresentar diferentes respostas em seus mecanismos de resistência morfofisiológicos (Santos et al., 1998).

O sucesso da produção agrícola depende fortemente do uso de variedades com desempenho superiores e adaptadas aos ambientes de cultivo. Na inexistência de materiais genéticos superiores, não é possível obter alta produtividade e qualidade do produto (Milach, 1998). Dessa forma, Ferreira & Grattapaglia (1995) mencionam que o melhoramento de plantas tem tido papel fundamental no desenvolvimento da agricultura, gerando novas variedades em espécies de interesse agrônomo. O aumento na eficiência de seleção, o melhor conhecimento e caracterização do germoplasma e a maximização dos ganhos genéticos têm sido objetivos de melhoristas de plantas do mundo inteiro. Novas formas de alcançar estes objetivos têm sido constantemente perseguidas pelo melhoramento de plantas. Vem daí o interesse em tecnologias como as de marcadores de DNA ou moleculares (Pinto et al., 2001).

Segundo This & Teulat-Merah (1999), em várias espécies de cereais, mapas genéticos permitiram a identificação de regiões nos cromossomos que

controlam fatores genéticos associados à resposta de estresse de seca. Distintas populações segregantes de milho, sorgo, arroz, trigo e cevada vêm sendo estudadas para um grande número de características quantitativas ou fenológicas como atributos de raiz, crescimento e arquitetura da planta, acúmulo de ácido abscísico, fotossíntese, clorofila, eficiência do uso da água, isótopos de carbono, estado de água e parâmetros de ajuste osmóticos.

A biologia molecular assume papel-chave na identificação pontual de genes envolvidos nas respostas ao déficit hídrico, o que permitirá, futuramente, a identificação e a compreensão de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas à seca. Isso permitirá o uso desses genes como sondas moleculares em programas de melhoramento que busquem a identificação de genótipos que expressem mecanismos metabólicos que aumentem sua tolerância às condições de deficiência hídrica. Existe também a possibilidade, pela engenharia genética, de se transferir genes de interesse para outros genótipos, assim como, entre espécies incompatíveis (Beever, 2000).

Existe uma série de metodologias usadas para a identificação e o isolamento de genes expressos diferencialmente. Entre as metodologias que mais se destacam hoje estão a *library subtraction* (biblioteca de subtração), *differential display - DD* (apresentação diferenciada) e *DNA MicroArrays* (microarranjos de DNA). Estas técnicas têm assumido grande importância no descobrimento de novos genes envolvidos em vários processos metabólicos, tanto em plantas quanto em animais (Casagrande et al., 2001).

A importância de desenvolver uma técnica de *screening* para resistência à seca já foi percebida há muito tempo. Algumas das diferentes técnicas utilizadas são: uso de termometria de infravermelho para eficiente *screening* de água; procedimentos psicrométricos para avaliar ajuste osmótico; porômetro de difusão para medição de condutância de água na folha; uso da técnica mini-rhizotron para penetração da raiz, distribuição e densidade no campo; fotografia

aérea infravermelha para verificação da desidratação e uso da discriminação do isótopos de carbono para selecionar a eficiência do uso de água (Igran, 1996).

Os marcadores moleculares, por outro lado, têm despontado como uma forte ferramenta, que pode auxiliar estes ramos da genética e, evidentemente, o melhoramento de plantas. Muitos genes respondem experimentalmente para o estresse hídrico, mas suas funções precisas na determinação de qualquer tipo tolerância ou sensibilidade ainda permanecem obscuras (Suprunova et al., 2004).

Com a identificação direta dos genótipos, é possível determinar as frequências gênicas e, com isso, averiguar o sistema de acasalamento da espécie, a variabilidade genética das populações, o tipo de ação gênica predominante no controle de caracteres, assim como superar a maior parte das limitações da análise fenotípica. Além disso, a duração de programas de melhoramento pode ser reduzida, resultando em liberação mais rápida de cultivares e retorno mais rápido do investimento aplicado. É considerado marcador molecular qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas ou de um segmento específico de DNA, que corresponde a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira & Grattaplagia, 1995, Ferreira, 2003).

A disponibilidade de sistemas de marcadores moleculares mais novos, como SNPs (polimorfismo a nível de nucleotídeo), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) e microssatélites, pode aumentar a precisão e diminuir o tempo necessário para o alcance de melhores níveis de resistência a estresses bióticos ou abióticos em trigo. SNPs, AFLP e microssatélites são todos fundamentados na técnica de PCR, permitindo, simultaneamente, filtrar locus e descobrir níveis mais altos de polimorfismo de que outros sistemas. Além disso, os microssatélites têm apresentado uma reprodutibilidade consistente e um custo considerado de médio a baixo. Cabe ressaltar que estão disponíveis *primers* de microssatélites para milho, soja, trigo e outras grandes culturas (Fedak, 1998; Milach, 1998; Pinto et al., 2001).

Linhas no melhoramento para tolerância à seca têm evoluído. A primeira é a criação de cultivares para alto rendimento sob condições ótimas (livre de estresse por água). Como o máximo esperado é perceber o potencial genético de rendimento sob condições ótimas, uma correlação positiva alta existe entre desempenho em condições ótimas de um genótipo superior e seu desempenho relativo sob condição de seca (Ortiz et al., 2005). Porém, o conceito de expressão de máximo potencial genético em condição ótima é debatido como a interação do ambiente com o genótipo que pode restringir uma alta produtividade em condições de seca. Conseqüentemente, a seleção ambiental pressionará por mudanças no material de geração para geração. Este problema se liga a um baixo rendimento e torna o programa de melhoramento mais lento (Mitra, 2001).

A germinação da semente em solos com baixo potencial hídrico depende da habilidade de cada espécie. Em condições de laboratório, realizam-se estudos de germinação com o uso de soluções aquosas de sacarose, sais, manitol e polietilenoglicol, a fim de simular condições padronizadas de estresse hídrico para a seleção de espécies mais tolerantes (Santos et al., 1992).

A sensibilidade das sementes ao estresse hídrico pode ser influenciada pelos diferentes fatores ambientais, como luz, temperatura, teor de oxigênio, etc., que variam durante o processo de embebição. Além disso, sob condições de estresse muitas espécies possuem a habilidade de entrar em dormência secundária. Assim, a dormência assume importância ecofisiológica por ser uma estratégia que permite às sementes manterem o vigor e a viabilidade por um período prolongado de tempo para germinarem, quando as condições do ambiente se tornarem mais favoráveis. Nesse contexto, alguns trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando soluções com diferentes potenciais osmóticos para umedecer os substratos, normalmente papel-toalha, no qual as sementes são

colocadas para germinar, procurando simular condições de baixa umidade do solo (Bewley & Black, 1994).

Segundo Santos et al. (1998), a deficiência hídrica provoca alterações no comportamento vegetal, cuja irreversibilidade vai depender do genótipo, da duração, da severidade e do estágio de desenvolvimento da planta. É de fundamental importância quantificar a capacidade do solo de armazenar água e analisar a influência dos mecanismos de adaptação das plantas à redução da disponibilidade desta. A quantidade de água disponível no solo varia com a sua textura e características físicas, o que pode diferenciar respostas nos mecanismos de resistência morfofisiológicos das plantas. Uma das muitas atuações da pesquisa está em se direcionar para um entendimento mais completo das respostas das plantas ao déficit hídrico; para isso, é necessário um programa amplo, multidisciplinar, que aborde os elementos de meteorologia, física do solo, agronomia, fisiologia e o conhecimento do crescimento e desenvolvimento das plantas, para que esses elementos possam contribuir para uma solução comum no entendimento da resposta das plantas ao déficit hídrico (Rajaram et al., 1996; Reeves et al., 1999).

Experimentos de Páez & González (1995) demonstraram que a expansão da célula foi o processo da planta mais sensível ao déficit hídrico, cujos incluem a redução no desenvolvimento das células na expansão das folhas, a transpiração e a redução na translocação de assimilados. Muitos trabalhos têm procurado usar metodologias para definir o limite crítico de água no solo, a partir do qual o desenvolvimento da planta e a produção da cultura são afetados significativamente. A limitação na área foliar pode ser considerada como uma primeira reação das plantas em relação ao déficit hídrico. Essa sensibilidade das folhas pode mudar durante o dia, ou nas diferentes estações do ano, porém, de modo geral, o entendimento dos mecanismos utilizados pela planta é, ainda, limitado (Santos et al., 1998).

Duncan (1997) explicou que quando melhoristas fazem seleções em condições de campo, não se têm ferramentas precisas para selecionar as características desejáveis, levando vários anos e muitas gerações para que a meta seja alcançada. A seleção *in vitro* pode encurtar consideravelmente o tempo de criação de uma cultivar por permitir a seleção de características desejáveis com interação ambiental mínima, que seria posteriormente complementada em campo. De acordo com Hardegree & Emmerich (1994), o uso de agentes de estresse osmótico para simular condições de seca permitirá que, antecipadamente, se proceda à seleção de material, agregando maior eficiência e eficácia a um programa de melhoramento para tolerância à seca. Associada a essa estratégia, o uso de microssatélites pode ser mais seguro para o melhorista na escolha dos genótipos superiores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Para avaliação de metodologias em germoplasma de trigo (*Triticum aestivum* L.) visando a caracterização para uso em programas de melhoramento da espécie para tolerância à seca, foram utilizados oito genótipos de trigo comum brasileiro, fornecidos pelo Banco Ativo de Germoplasma de Cereais de Inverno da Embrapa Trigo, agrupados como: Grupo 1 - potencialmente tolerantes ('Aliança', 'BH 1146' e 'Ocepar 14') e Grupo 2 - suscetíveis à seca ('BR 18', 'BRS 207', 'BRS 208', 'BRS 210' e 'BRS 264').

Nos experimentos realizados, o material vegetal foi utilizado sob forma de sementes, embriões imaturos e plântulas.

3.1.1 Comprimento de parte aérea e raiz principal em plântulas submetidas a estresse hídrico

Sementes dos oito genótipos de trigo potencialmente tolerantes e suscetíveis à seca, Grupo 1 e Grupo 2, foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio (50%) por 15 minutos e, em seguida, enxaguadas em água destilada. Cinquenta sementes de cada acesso foram dispostas sobre uma camada de papel filtro com o auxílio de um plantador automático e acondicionadas em gerbox.

As sementes dos distintos genótipos de trigo em estudo foram submetidas a seis potenciais osmóticos estabelecidos por meio dos agentes estressantes polietilenoglicol (PEG 6000) ou manitol, quais sejam, -0,05; -0,10; -0,20; -0,40; -0,60 e -0,80 MPa. Empregando água destilada como controle, as sementes foram umedecidas em 20mL de solução. Foram utilizadas três repetições de cada gradiente osmótico para cada uma das oito cultivares e os gerbox contendo as sementes submetidas aos diferentes tratamentos foram colocados em câmara de crescimento, onde permaneceram por 10 dias, à uma temperatura média de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 50% umidade relativa (UR).

A quantidade de PEG 6000 ou manitol adicionada para se obter os diferentes níveis de tensão de água aos quais as sementes foram submetidas encontra-se na Tabela 1.

Após 10 dias em câmara de crescimento, foi determinada a relação parte aérea:raiz principal em 20 plântulas avaliadas ao acaso para cada um dos oito genótipos em estudo. O comprimento da parte aérea e da raiz principal de cada plântula foi determinado com o auxílio de uma régua milimetrada. Em seqüência ao estabelecimento da matéria fresca, o material foi transferido para estufa, a 65°C , até a obtenção de massa constante para determinação da matéria seca.

TABELA 1. Relação entre as concentrações de PEG 6000 e manitol utilizadas e os distintos níveis de potencial osmótico. UFLA, Lavras, MG, 2006.

Concentração (g PEG 6000/L H ₂ O)	Concentração (g manitol/L H ₂ O)	Potencial osmótico estimado* (MPa)
0,00	0,00	0,00
50,080 (5%)	3,823 (0,3%)	-0,05
78,490 (7%)	7,660 (0,7%)	-0,10
119,571 (11%)	15,300 (1,5%)	-0,20
178,343 (17%)	30,600 (3%)	-0,40
223,664 (22%)	44,820 (4%)	-0,60
261,948 (26%)	58,840 (5%)	-0,80

* Por meio da equação proposta por Michel & Kaufmann (1973). $\psi_{os} = - (1,18 \times 10^{-2}) C - (1,18 \times 10^{-4}) C^2 + (2,67 \times 10^{-4}) CT + (8,39 \times 10^{-7}) C^2T$, em que: ψ_{os} = potencial osmótico (bar ou Mpa); C = concentração (gramas de PEG 6000 ou manitol/litro de água); T = temperatura (°C).

Realizou-se análise de regressão para determinar se houve efeito estressante das doses dos agentes utilizados sobre as diferentes cultivares e o tipo de curva de resposta representativa dos resultados obtidos (linear e quadrática), pelo *software* SAS 9.1.3. Utilizou-se o teste F para definir a significância do modelo e o teste "t" para se comparar os valores de Beta.

3.1.2 Comprimento de parte aérea e raiz principal em embriões imaturos submetidos a estresse hídrico

Embriões imaturos dos oito genótipos de trigo testados foram coletados 10-20 dias após a antese e cultivados *in vitro*.

Após colhidas, as espigas de trigo foram transferidas para laboratório. Os grãos foram cuidadosamente removidos com auxílio de uma pinça e, então, levados para esterilização em câmara de fluxo laminar, onde permaneceram imersos em álcool 70%, por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio 50%, por 10 minutos. Ao final deste tempo, os grãos foram lavados em água Milli-Q e seus embriões foram retirados com o auxílio de pinças e bisturis

esterilizados e transferidos para tubos de ensaio, onde foram submetidos a distintos tratamentos, simulando-se níveis de estresse hídrico.

Para provocar estresse hídrico no material, utilizou-se o meio de indução macrobatata, que é um extrato aquoso obtido pela fervura de 500g de batata, por 30 minutos, em 1,250 mL de água destilada. Após a fervura, o extrato é filtrado em tecido de gaze e cerca de 1/5 do volume é utilizado para obtenção de 1 litro de meio de cultura. Antes da autoclavagem, o meio é corrigido para pH 5,8 e suplementado com FeEDTA (10^{-4} M), vitaminas (1mg/L), AIA (10^{-6} M) e 30,0g L⁻¹ de sacarose. A solidificação do meio é obtida com a adição de ágar 7 g/L., adicionados também antes da autoclavagem. O meio foi suplementado com três agentes estressantes em diferentes concentrações, 0 (controle): manitol 10% (-1,36MPa), 20% (-2,72MPa) e 30% (-4,09MPa); PEG 6000 10% (-0,05MPa), 20% (-0,07MPa) e 30% (-0,12MPa) e maltose 10% (-0,69MPa), 20% (-1,39MPa) e 30% (-2,06MPa), totalizando 10 meios de culturas distintos. Para cada um dos tratamentos, foram coletados 30 embriões de cada genótipo testado.

Os tubos de ensaio contendo os embriões imaturos foram levados para câmara de crescimento e mantidos no escuro por 96 horas, a 20°C. Após este período, os tubos foram mantidos sob irradiância de $36\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e temperatura de $20\pm 2^\circ\text{C}$.

Aos 10, 20 e 30 dias de incubação, foi realizada a avaliação do comprimento da raiz e da parte aérea das plântulas e, aos 30 dias, após sua retirada do meio de cultura, foram determinados a matéria fresca e o comprimento da raiz principal e da parte aérea de cada plântula. A matéria seca foi determinada após secagem até massa constante em estufa a 65°C.

O material em teste foi arranjado em um fatorial (8 x 3 x 3) + 1, sendo 8 cultivares, 3 agentes estressantes em 3 diferentes concentrações mais a água como testemunha, distribuído em delineamento estatístico inteiramente

casualizado com três repetições. A análise de variância foi realizada pelo *software* SAS 9.1.3 e teste de médias pelo teste “t”.

3.2 Determinação da variabilidade genética em genótipos/linhagens de trigo para tolerância à seca

Uma coleção de 93 cultivares/linhagens de trigo (Tabela 2) com potencial para tolerância à seca vem sendo avaliada em duas localidades, caracterizada pela ocorrência de déficit hídrico durante o desenvolvimento da cultura, visando a sua utilização no programa de melhoramento da espécie para tolerância à seca conduzido na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), sob a coordenação da Embrapa Trigo em execução conjunta com a Embrapa Arroz e Feijão e a Embrapa Cerrados. As localidades são:

1- Santo Antônio de Goiás, GO - Embrapa Arroz e Feijão: latitude 16° 28', longitude 49° 17' e altitude 823 m. Segundo a classificação de Köppen, o município de Santo Antônio de Goiás, GO, apresenta clima Aw, tropical de savana, megatérmico. A temperatura média anual do ar é de 22,5°C, e o mês de junho apresenta a menor média de temperatura mínima do ar (14,0°C), enquanto o mês de setembro apresenta a maior média de temperatura máxima do ar (31,3°C). O regime pluvial é bem definido, ou seja, período chuvoso de outubro a abril e período seco de maio a setembro. A precipitação pluvial média anual é de 1.461 mm, e a umidade relativa do ar, média anual, é de 71%, com o mês de agosto apresentando o menor índice (50%). A perda por evaporação, média anual medida pelo tanque classe “A”, é da ordem de 1.938 mm;

2- Planaltina, DF - Embrapa Cerrados: segundo a classificação de Köppen, o município de Planaltina, DF, onde se localiza a Embrapa Cerrados, apresenta clima AW Tropical de savana megatérmico. A temperatura mínima anual é de 15,9° C e a temperatura máxima de 26,4° C. O índice pluviométrico é em torno de 1.368 mm.

Para acessar a variabilidade genética dos germoplasmas, cerca de 200 grãos de cada genótipo procedente dos sítios descritos, foram homogeneizados em triturador e o DNA foi extraído segundo o método CTAB (Rögers et al., 1988).

Após a quantificação e a verificação da qualidade do DNA extraído, este foi amplificado com os iniciadores de um conjunto de 42 marcadores microssatélite (SSR - *Simple Sequence Repeat*) identificados para trigo, distribuídos aleatoriamente no genoma da espécie, um em cada braço dos 21 cromossomos que a constituem (Tabela 3).

Após a adequação das reações de amplificação dos 42 marcadores microssatélites selecionados para uso neste estudo, este conjunto de marcadores foi utilizado para a caracterização das 93 cultivares/linhagens de trigo. As reações de amplificação do DNA alvo foram efetuadas em termociclador PTC-100 da marca MJ Research, INC, com volume final de 25 μ L, empregando-se o programa adequado à temperatura de anelamento dos iniciadores utilizados, de acordo com Röder et al. (1998) e Stachel et al. (2000). Os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio, visualizados em luz ultravioleta e fotografados com filme Polaroid.

TABELA 2. Nome, cruzamento e genealogia de genótipos de trigo em avaliação para uso no programa de melhoramento de trigo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), coordenado pela Embrapa Trigo e executado em conjunto com a Embrapa Arroz e Feijão e a Embrapa Cerrados. UFLA, Lavras, MG, 2006.

	NOME	CRUZAMENTO	GENEALOGIA	PAÍS DE ORIGEM
1	IPF77165			
2	IAC18			BRASIL
3	IAC19	BH 1146*4/S 12		BRASIL
4	IAC20	BH 1146*2 FRONTANA BRAWLEY		BRASIL
5	IPF75778	BH 1146*2/im 471. 63		
6	IPF77008			
7	IPF77149			
8	IPF77161			
9	IPF77163			
10	IPF77774	BAVIACORA M 92	CM92066-J-OY-OM-OY-4M-OY-MEXICO	
11	IPF77777	MILAN	OMEX CM75113-B-5M-1Y-O5M-7Y-1B-MEXICO OY-9TSB-OY	
12	IPF77781	NING MAI 9558	-OCHN	CHINA
13	IPF77783	SHANGHAI 4	-OCHN	CHINA
14	IPF77784	YANG MAI 6	YMI6-26B-OY	CHINA
15	IPF77795	JARUMBA	CG94-099Y-099M-9Y-1M-3Y-0B	MEXICO
16	IPF77798	PARASTOO	CMSS92Y00540S-030Y-015M- 0Y-0Y-18M-0Y	MEXICO
17	IPF77803	TRAP#1/BOW	CM84548-34Y-0M-0Y-6M-0Y- 1B-0Y-1SJ-OY	MEXICO
18	IPF77805	SWF/GEN//PFAU/3/2*CNO79/PRL	CMBW89Y00814-0TOPM-9R- 0C-2R-3C-0R	MEXICO
19	IPF77811	TEC/NKT	TC930015.S-1R-4C-0R-1C-0R	MEXICO
20	IPF77812	MON/TAN//ROMO96	TC930026.S-3R-6C-0R-1C-0R	MEXICO
21	IPF77849	PASTOR/2*SITTA	CMSS92Y01650T-41Y-010M- 010Y-010Y-2M-0Y-0HTY	MEXICO
22	IPF77859	CHIRYA. 7	CIGM87,1017-6Y2M-3PR-1M- 3PR-3B-0PR	MEXICO
23	IPF77813	BAU/MILAN	CM103873-2M-030Y-020Y- 010M-4Y-0M-0PZ	MEXICO
24	IPF77877	CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ	CIGM90.248-1Y-2B-11Y-0B-3Y- 0M	MEXICO
25	IPF77885	CHIL/CHUM18	CASS94Y00009S-18PR-3M-0M- 1Y-0M	MEXICO
26	IPF77932	MUNIA/ALTAR 84//AMSEL	CASS94Y00125S-5Y-2M-0M	MEXICO
27	IPF77939	RAYON//VEE #6/TRAP #1	CMSS93Y00004S-48B-1B-1B- 0100B	MEXICO
28	IPF77960	WEBILL 1	CMSS92Y00639S-1-5SCM-1SJ- 0Y	MEXICO
29	IPF77988	NG 8319//SHA 4/LIRA	CMH83.2517-1B-1Y-3B-2Y-1M- 0Y	MEXICO
30	IPF77987	AGA/2*CMH74A.582//CMH76A.912/3/CMH79. 681/4/BOW	CMH82A.480-1B-3Y-2B-1Y-1B- 1Y-0B	MEXICO

31	IPF77990	BOW//BUC/BUL/3/KAUZ	CMH83.617-2Y-1B-1Y-1B-1Y-0BMEXICO	
32	IPF78037	VEE/CMH77A.917//VEE/6/CMH79A.955/4/AG A/3/4*SN64/CNO67//INIA66/5/NAC	CMSS96MO4251S-24M-13Y-0B	MEXICO
33	IPF78076	BAU/MILAN	CM103873-2M-030Y-020Y- 010M-4Y-0M-5PZ-0Y-0SJ-0SCM	MEXICO
34	IPF78080	CHIL/CHUM18	CM92687-7PS-0Y-030M-7Y-1Y- 0Y-2M-010Y-0FUS-2FUS-1FUS- 0Y-0ECU-0Y-0SCM	MEXICO
35	IPF78113	CHIR3/MAYOOR	CASS94B00053S-2Y-010M-1Y- 0M-0SCM	MEXICO
36	IPF78188	CHEN/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)//BCN/3/W175.6.SC3.2	CMSS96M00824S-050M-040Y- 0100M-020Y-27M-0Y	MEXICO
37	IPF78191	ALTAR 84/AE.SQUARROSA (221)//3*BORL95/3/ESDA/VEE#10/4/WEAVER	CMSS96M04465T-040Y-050M- 040Y-0100M-020Y-43M-0Y	MEXICO
38	IPF78202	SKAUZ/BAV92	CMSS96M03611S-1M-010SY- 010M-010SY-10M-0Y	MEXICO
39	IPF78206	SERI*3//RL6010/4*YR/3/PASTOR/4/BAV92	CMSS9605696T-040Y-14M- 010SY-010M-010SY-8M-0Y -0CHN	MEXICO CHINA
40	IPF78223	YANG MAI 5		
41	IPF78912	KAUZ//PRL/VEE#6/3/BAV92		
42	IPF78913	KAUZ//PRL/VEE#6/3/BAV92		
43	IPF78914	KAUZ//PRL/VEE#6/3/BAV92		
44	IPF78915	KAUZ//PRL/VEE#6/3/BAV92		
45	IPF78923	BARBET#1		
46	IPF78933	FRET2		
47	IPF79806	BABAX		
48	IPF79812	HXL7573/2*BAU		
49	IPF79813	PASTOR		
50	KSN1081			
51	NESSER	W3918A/JUP		
52	OCEPAR14	IAS64/ALDAN//COC/AMD		BRASIL
53	PF8190	IAS58/IAS55//PAMIR SIB/3/BH1146	F 10906-103F-2F-0R-1F-0R-2F- 0R-0F	BRASIL
54	PF81189	BH1146*3//ALONDRA SIB		BRASIL
55	PF81191	BH1146*3//ALONDRA SIB		BRASIL
56	PF81196	BH1146*3//ALONDRA SIB		BRASIL
57	PF81200	BH1146*3//ALONDRA SIB		BRASIL
58	PF81207	BH1146*3//ALONDRA SIB		BRASIL
59	PF81227	BH1146*3//ALONDRA SIB		BRASIL
60	PF81230	BH1146*3//ALONDRA SIB		BRASIL
61	PF84141	BH1146*6//ALONDRA SIB		BRASIL
62	PF8515	MS7851/2*BH1146	F 24035-A.51F-1F-52F-0F	BRASIL
63	PF85270	BH1146*2//CMH71-567//BH1156*6//ALONDRA SIB	F 22802-A-902F-901N-903F- 902G-900F	BRASIL
64	PF88616	BH1146*//LONDRINA*3//KLEIN LUCERO		BRASIL
65	PF88820	BH1146*4//LONDRINA*3//KLEIN LUCERO		BRASIL
66	PF89310	PF8515/BH1146		BRASIL
67	PF9052	PF8237//LAP689/3*CNT10		BRASIL

68	PF92482	BR35*5//BR14*2/LARGO		BRASIL
69	PF940324	KLEIN CHAMACO/PF87511		BRASIL
70	PF990176	CEP8538SEL/TB136		BRASIL
71	PF995098-A	PF 869114//BH 1146/TB 941		BRASIL
72	PF010008	CEP 24/2*PF 89375		BRASIL
73	PF010010	CEP 24/2*PF 89376		BRASIL
74	PF023690	EMBRAPA21/EP93561//EP93561/BRS210		BRASIL
75	PF023694	ALIANÇA/IPR85		BRASIL
76	PF031239	BH 1146/ANAHUAC 75		BRASIL
77	PF031240	KATEPAWA*3/IAC 5-MARINGA		BRASIL
78	PF031241	BH 1146/MAX		BRASIL
79	PF031242	TOROPI/ANAHUAC 75		BRASIL
80	PF031273	BH 1146/ MAX 1		BRASIL
81	PF031274	BH 1146/ MAX 2		BRASIL
82	PF031276	PF 89375/PF990607		BRASIL
83	BR25	BH 1146*3/ALONDRA SIB		BRASIL
84	BR41	BH 1146*3/ALONDRA SIB		BRASIL
85	OCEPAR16	SISKIN SIB/VEERY SIB		BRASIL
86	IPF76945			BRASIL
87	ALIANÇA	PF858/OCEPAR11		BRASIL
88	BRS 207	SERI 82/PF 813	R 1448-14R-4R-0R	BRASIL
89	BRS 208	CPAC 89118/3/BR 23/CEP 19/PF 85490		BRASIL
90	BRS 210	CPAC 89118/3/BR 23/CEP 19/PF 85490	F 41062-E-4W-1W-3W-0W	BRASIL
91	BRS 264	BUCK BUCK/CHIROCA//TUI	CM 106434-2R-2R-0R-0R-1R-0R	MÉXICO
92	BR 18	D 6301/NAINARI 60/WEIQUE RED MACE/3/CIANO*2/CHRIS=ALONDRA SIB	CM 11683-A-1Y-1M-3Y-11M-0Y	MEXICO
93	BH 1146	PG 1//FRONTEIRA/MENTANA		BRASIL

A partir da amplificação do DNA dos 93 genótipos de trigo com os iniciadores dos 42 microssatélites selecionados, as bandas detectadas foram codificadas para presença (um, 1) e ausência (zero, 0) e os resultados analisados utilizando o software NTSYS, versão 2.02pc (Rohlf, 1992).

A diversidade genética desta população de trigo em avaliação para utilização em programas de melhoramento para tolerância à seca foi descrita a partir do número de variantes encontrados, considerando, basicamente, o polimorfismo observado, levando em conta a proporção de locus polimórficos (P) dada por:

$$P = npj/n_{total}$$

em que:

P = a proporção de locus polimórficos

npj = o número de locus polimórficos

n_{total} = o número total de locus,

A abundância de variantes alélicas (A), isto é, o número de variantes na amostra de 93 indivíduos foi considerada neste estudo. Calculou-se o número médio de alelos por loco, ou seja, a soma de todos os alelos detectados em todos os locus (marcadores) empregados, dividida pelo número total de locus, informação complementar sobre polimorfismo:

$$n = (1/K) \sum_{i=1}^K n_i$$

em que,

K = o número de locus

n_i = o número de alelos detectados por loco

Finalmente, os diferentes genótipos avaliados foram agrupados, utilizando-se os resultados obtidos para os locus (marcadores SSR) investigados neste estudo. A similaridade genética do germoplasma foi estimada pelo coeficiente de Jaccard, em que os genótipos são agrupados, com base em uma matriz de similaridade genética, usando UPGMA (*Unweighted pairgroup method, arithmetic average*), para a construção do dendrograma. Foi avaliado também o nível de polimorfismo encontrado nos oito genótipos em estudo nos dois primeiros experimentos.

TABELA 3. Relação de marcadores microssatélite (SSR) para trigo, localização no genoma da espécie e seqüência do iniciador utilizado para amplificação via reação em cadeia da polimerase (PCR). UFLA, Lavras, MG, 2006.

	MARCADOR SSR	LOCALIZAÇÃO ¹	SEQÜÊNCIA DO INICIADOR 5'-3' / 3'-5'
1	WMS 135	1AL	TGT CAA CAT CGT TTT GAA AAG G ACA CTG TCA ACC TGG CAA TG
2	WMS 136	1AS	GAC AGC ACC TTG CCC TTT G CAT CGG CAA CAT GCT CAT C
3	WMS 294	2AL	GGA TTG GAG TTA AGA GAG AAC CG GCA GAG TGA TCA ATG CCA GA
4	WMS 95	2AS	GAT CAA ACA CAC ACC CCT CC AAT GCA AAG TGA AAA ACC CG
5	WMS 153	3AL	ATGAGGACTCGAAGCTTGGC CTGAGCTTTTGC GCGTTGAC
6	WMS 369	3AS	CTG CAG GCC ATG ATG ATG ACC GTG GGT GTT GTG AGC
7	WMS 160	4AL	TTC AAT TCA GTC TTG GCT TGG CTG CAG GAA AAA AAG TAC ACC C
8	WMS 4	4AS	GCT GAT GCA TAT AAT GCT GT CAC TGT CTG TAT CAC TCT GCT
9	WMS 595	5AL	GCA TAG CAT CGC ATA TGC AT GCC ACG CTT GGA CAA GAT AT
10	WMS 304	5AS	AGG AAA CAG AAA TAT CGC GG AGG ACT GTG GGG AAT GAA TG
11	WMS 169	6AL	ACC ACT GCA GAG AAC ACA TAC GTG CTC TGC TCT AAG TGT GGG
12	WMS 334	6AS	AAT TTC AAA AAG GAG AGA GA AAC ATG TGT TTT TAG CTA TC
13	WMS 282	7AL	TTG GCC GTG TAA GGC AG TCT CAT TCA CAC ACA ACA CTA GC
14	WMS 60	7AS	TGT CCT ACA CGG ACC ACG T GCA TTG ACA GAT GCA CAC G
15	WMS 259	1BL	AGG GAA AAG ACA TCT TTT TTT TC CGA CCG ACT TCG GGT TC
16	WMS 18	1BS	TGG CGC CAT GAT TGC ATT ATC TTC GGT TGC TGA AGA ACC TTA TTT AGG
17	WMS 120	2BL	GAT CCA CCT TCC TCT CTC TC GAT TAT ACT GGT GCC GAA AC
18	WMS 148	2BS	GTG AGG CAG CAA GAG AGA AA CAA AGC TTG ACT CAG ACC AAA
19	WMS 340	3BL	GCA ATC TTT TTT CTG ACC ACG ACA CTG TCA ACC TGG CAA TG
20	WMS 389	3BS	ATC ATG TCG ATC TCC TTG ACG TGC CAT GCA CAT TAG CAG AT
21	WMS 375	4BL	ATT GGC GAC TCT AGC ATA TAC G GGG ATG TCT GTT CCA TCT TAG C
22	WMS 368	4BS	CCATTTACCTAATGCCTGC AATAAAAACCATGAGCTCACTTGC
23	WMS 408	5BL	TCG ATT TAT TTG GGC CAC TG GTA TAA TTC GTT CAC AGC ACG C

24	WMS 234	5BS	GAG TCC TGA TGT GAA GCT GTT G CTC ATT GGG GTG TGT ACG TG
25	WMS 219	6BL	GAT GAG CGA CAC CTA GCC TC GGG GTC CGA GTC CAC AAC
26	WMS 518	6BS	AAT CAC AAC AAG GCG TGA CA CAG GGT GGT GCA TGC AT
27	WMS 166	7BL	ATAAAGCTGTCTCTTTAGTTCG GTTTTAACACATATGCATACCT
28	WMS 43	7BS	CACCGACGGTTCCCTAGAGT GGTGAGTGCAAATGTCATGTG
29	WMS 232	1DL	ATC TCA ACG GCA AGC CG CTG ATG CAA GCA ATC CAC C
30	WMS 106	1DS	AAT AAG GAC ACA ATT GGG ATG G CTG TTC TTG CGT GGC ATT AA
31	WMS 157	2DL	GTC GTC GCG GTA AGC TTG GAG TGA ACA CAC GAG GCT TG
32	WMS 261	2DS	CTC CCT GTA CGC CTA AGG C CTC GCG CTA CTA GCC ATT G
33	WMS 383	3DL	ACG CCA GTT GAT CCG TAA AC GAC ATC AAT AAC CGT GGA TGG
34	WMS 161	3DS	GAT CGA GTG ATG GCA GAT GG TGT GAA TTA CTT GGA CGT GG
35	WMS 194	4DL	GAT CTG CTC TAC TCT CCT CC CGA CGC AGA ACT TAA ACA AG
36	WMS 608	4DS	ACA TTG TGT GTG CGG CC GAT CCC TCT CCG CTA GAA GC
37	WMS 272	5DL	TGC TCT TTG GCG AAT ATA TGG GTT CAA AAC AAA TTA AAA GGC CC
38	WMS 192	5DS	GGT TTT CTT TCA GAT TGC GC CGT TGT CTA ATC TTG CCT TGC
39	WMS 325	6DL	TTT CTT CTG TCG TTC TCT TCC C TTT TTA CGC GTC AAC GAC G
40	WMS 469	6DS	GTT GAG CTT TTC AGT TCG GC ACT GGC ATC CAC TGA GCT G
41	WMS 437	7DL	GAT CAA GAC TTT TGT ATC TCT C GAT GTC CAA CAG TTA GCT TA
42	WMS 44	7DS	GAT CAA GAC TTT TGT ATC TCT C GAT GTC CAA CAG TTA GCT TA

¹ Cromossomo, genoma e braço, longo (L) ou curto (S), do trigo em que o marcador está localizado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comprimento de parte aérea e raiz principal em plântulas submetidas a estresse hídrico

A análise de regressão indicou que, na maioria das cultivares, o efeito linear foi significativo ($P < 0,01$ e $P < 0,05$), para as três variáveis utilizadas na avaliação dos genótipos de trigo (parte aérea – CPA, comprimento de raiz - CR e matéria fresca total – MFT). Desta forma, fica demonstrado que os agentes indutores de estresse hídrico utilizados (PEG 6000 e manitol) causaram estresse nas cultivares testadas, tendo sido significativa a interação agente e cultivar (Anexo I).

Para a cultivar Aliança, o modelo quadrático mostrou melhor ajuste se consideradas as variáveis CPA e MFT, quando as sementes foram tratadas com PEG 6000, o mesmo tendo sido observado para a cultivar BH 1146 com relação a MFT. Nesta última, o efeito quadrático foi significativo, ao nível de 10% de probabilidade, pelo teste F ($P < 0,10$), valores aceitáveis em resultados biológicos do tipo em estudo e também pelo fato de o incremento no R^2 foi considerável (Anexo I).

Os agentes indutores de déficit hídrico afetaram significativamente o comprimento da parte aérea (Figura 1). Embora a análise estatística mostre diferenças significativas entre ‘BRS 208’ para ‘BR 18’, ‘BH 1146’ e ‘BRS 207’ e também ‘BR 18’ para ‘BH 1146’ e ‘BRS 207’ quando se utilizou o PEG 6000 (Tabela 4), observa-se que no menor potencial osmótico (-0,80 MPa) (Figura 1), todos os genótipos estudados praticamente não germinaram, emitindo apenas uma radícula de tamanho incipiente.

Na presença do manitol não foram observadas diferenças estatísticas do comprimento da parte aérea entre os genótipos estudados (Tabela 4). Entretanto, ao se observar a inibição do crescimento da parte aérea em função dos níveis de

manitol, percebe-se a presença de dois grupos distintos (Figura 1): um menos afetado, em que se incluem ‘BRS 207’, ‘BH 1146’, ‘Ocepar 14’ e ‘BR 18’ e outro mais afetado representado por ‘Aliança’, ‘BRS 210’ e ‘BRS 208’.

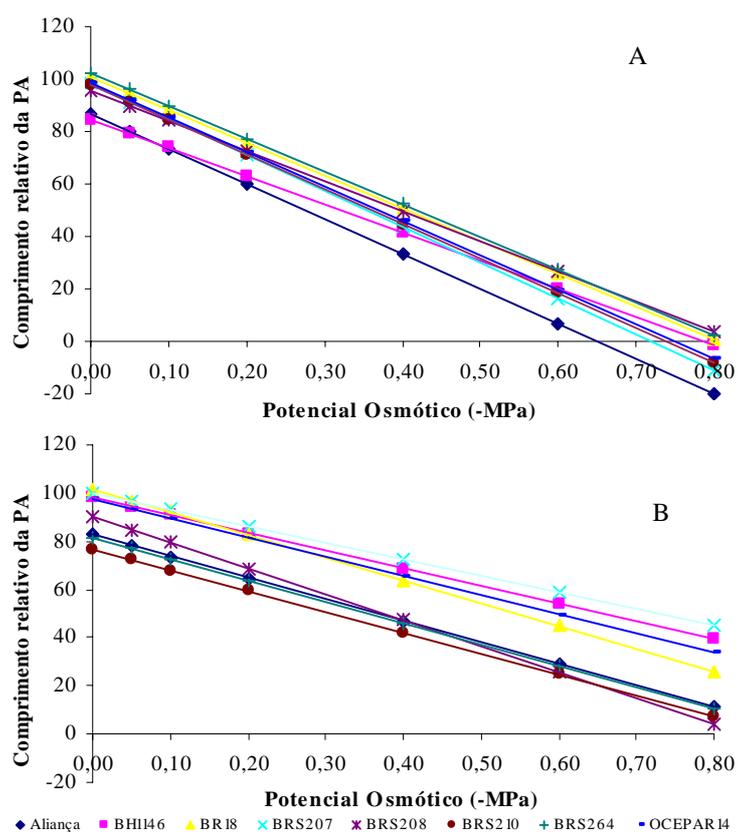


FIGURA 1. Efeito dos agentes indutores de déficit hídrico PEG 6000 (A) e manitol (B) sobre o comprimento relativo da PA (parte aérea) das oito cultivares de trigo. O material osmótico foi estimado conforme Michel & Kaufmann (1973). UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 4. Diferenças entre as declividades das retas dos oito genótipos para os agentes PEG 6000 e manitol para o comprimento relativo da parte aérea. UFLA, Lavras, MG, 2006.

	ALIANÇA	BH1146	BR18	BRS207	BRS208	BRS210	BRS264
PEG 6000							
BH 1146	-0.75 0.4689 (ns)	-	-	-	-	-	-
BR 18	0.28 0.7827 (ns)	1.85 0.0945*	-	-	-	-	-
BRS 207	-1.03 0.3275 (ns)	-0.48 0.6384 (ns)	-2.71 0.0221*	-	-	-	-
BRS 208	0.72 0.4876 (ns)	1.89 0.0882*	0.67 0.5169 (ns)	2.31 0.0432*	-	-	-
BRS 210	-0.08 0.9384 (ns)	0.57 0.5790(ns)	-0.35 0.7325 (ns)	0.81 0.4387 (ns)	-0.75 0.4712 (ns)	-	-
BRS 264	-0.00 0.9985 (ns)	0.74 0.4751 (ns)	-0.28 0.7832 (ns)	1.01 0.3343 (ns)	-0.72 0.4897 (ns)	0.08 0.9401 (ns)	-
OCEPAR 14	-0.23 0.8266(ns)	0.75 0.4721 (ns)	-0.79 0.4484(ns)	1.25 0.2434 (ns)	-1.16 0.2769 (ns)	-0.11 0.9124 (ns)	-0.22 0.8299 (ns)
MANITOL							
BH 1146	-0.63 0.5445 (ns)	-	-	-	-	-	-
BR 18	-0.23 0.8197 (ns)	0.77 0.4597 (ns)	-	-	-	-	-
BRS 207	0.07 0.9441 (ns)	1.16 0.2741 (ns)	0.62 0.5474 (ns)	-	-	-	-
BRS 208	-0.49 0.6353 (ns)	0.31 0.7656 (ns)	-0.61 0.5573 (ns)	-1.09 0.3016 (ns)	-	-	-
BRS 210	-0.03 0.9732 (ns)	1.09 0.2999 (ns)	0.48 0.6381 (ns)	-0.22 0.8332 (ns)	1.04 0.3237 (ns)	-	-
BRS 264	-0.23 0.8209 (ns)	0.70 0.5012 (ns)	-0.01 0.9908 (ns)	-0.57 0.5839 (ns)	0.51 0.6184 (ns)	-0.43 0.6793 (ns)	-
OCEPAR 14	-0.05 0.9628 (ns)	0.91 0.3837 (ns)	0.34 0.7444 (ns)	-0.20 0.8433 (ns)	0.78 0.4541(ns)	-0.03 0.9770 (ns)	0.31 0.7600 (ns)

Valores significativos a 1% (**), 5% (*) e 10% (*) e não significativos (ns) pelo teste “t”.

Nas medidas da raiz principal, também observou-se o efeito diferenciado dos agentes indutores de déficit hídrico, PEG 6000 e manitol, sobre os genótipos estudados (Figura 2).

As cultivares que mais se destacaram, em ordem da menos afetada para a mais afetada pelo estresse imposto com PEG 6000 foram: ‘BH 1146’, ‘BRS 264’, ‘BRS 210’, ‘Ocepar 14’, ‘BR 18’, ‘BRS 207’, ‘BRS 208’ e ‘Aliança’ (Figura 2), havendo diferença significativa entre as cultivares ‘BH 1146’, ‘BRS 210’ e ‘BRS 264’ e entre ‘BRS 264’, ‘BRS 210’ e ‘Ocepar 14’ (Tabela 5). A

ordem decrescente com manitol foi: ‘BH 1146’, ‘Ocepar 14’, ‘BRS 210’, ‘BR 18’, ‘BRS 207’, ‘BRS 208’, ‘BRS 264’ e ‘Aliança’ (Figura 2), com diferença significativa para ‘BH 1146’, ‘BRS 208’, ‘Aliança’ e ‘Ocepar 14’ (Tabela 5).

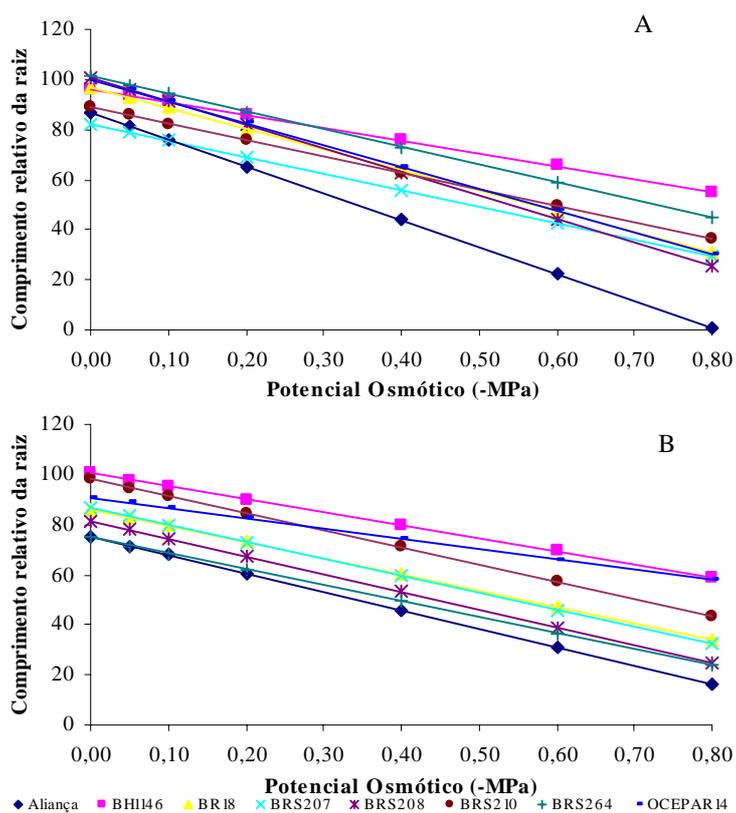


FIGURA 2. Efeito dos agentes indutores de déficit hídrico PEG 6000 (A) e manitol (B) sobre o comprimento relativo da raiz das oito cultivares de trigo. O material osmótico foi estimado conforme Michel & Kaufmann (1973). UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 5. Diferenças entre as declividades das retas dos oito genótipos para os agentes PEG 6000 e manitol para o comprimento relativo da raiz. UFLA, Lavras, MG, 2006.

	ALIANÇA	BH1146	BR18	BRS207	BRS208	BRS210	BRS264
PEG 6000							
BH 1146	-0.96 0.3599 (ns)	-	-	-	-	-	-
BR 18	-0.31 0.7643 (ns)	1.01 0.3371 (ns)	-	-	-	-	-
BRS 207	-0.20 0.8430 (ns)	0.89 0.3930 (ns)	0.10 0.9212 (ns)	-	-	-	-
BRS 208	-0.11 0.9149 (ns)	1.18 0.2658 (ns)	0.25 0.8106 (ns)	0.12 0.9075 (ns)	-	-	-
BRS 210	-0.24 0.8172 (ns)	2.24 0.0487*	0.17 0.8695 (ns)	0.01 0.9896 (ns)	-0.15 0.8830 (ns)	-	-
BRS 264	0.69 0.5067 (ns)	4.60 0.0017**	1.54 0.1617 (ns)	1.12 0.2962 (ns)	1.10 0.3016 (ns)	2.24 0.0557*	-
OCEPAR 14	-0.85 0.4187 (ns)	0.08 0.9397(ns)	-0.86 0.4103 (ns)	-0.78 0.4570 (ns)	-1.03 0.3314(ns)	-1.81 0.1037 (ns)	-3.77 0.0070**
MANITOL							
BH 1146	-2.08 0.0647*	-	-	-	-	-	-
BR 18	-0.79 0.4488 (ns)	1.48 0.1697 (ns)	-	-	-	-	-
BRS 207	-1.38 0.1967 (ns)	0.74 0.4774 (ns)	-0.68 0.5117 (ns)	-	-	-	-
BRS 208	-0.47 0.6459 (ns)	2.45 0.0345*	0.47 0.6453 (ns)	1.29 0.2264 (ns)	-	-	-
BRS 210	-1.26 0.2360 (ns)	0.60 0.5639 (ns)	-0.60 0.5610 (ns)	-0.01 0.9947 (ns)	-1.09 0.2999 (ns)	-	-
BRS 264	-1.14 0.2801 (ns)	0.84 0.4230 (ns)	-0.45 0.6649 (ns)	0.18 0.8638 (ns)	-0.94 0.3679 (ns)	0.16 0.8744 (ns)	-
OCEPAR 14	-0.68 0.5141(ns)	1.88 0.0900*	0.18 0.8597(ns)	0.93 0.3765 (ns)	-0.31 0.7640(ns)	0.80 0.4418 (ns)	0.65 0.5334(ns)

Valores significativos a 1% (**), 5% (*) e 10% (*) e não significativos (ns) pelo teste "t".

Em relação ao efeito dos agentes indutores de déficit hídrico sobre a matéria fresca dos genótipos estudados, as cultivares que mais se destacaram, em ordem da menos afetada para a mais sensível ao estresse imposto com PEG 6000, foram: 'BR18', 'Ocepar14', 'BRS 210', 'BH 1146', 'BRS 207', 'BRS 264', 'BRS 208' e 'Aliança' (Figura 3), havendo diferenças significativas entre os quatro primeiros cultivares e a 'Aliança' (Tabela 6).

Com manitol, a ordem decrescente foi: 'Ocepar 14', 'BRS 207', 'BR 18', 'BRS 210' e 'BH 1146' e, mais abaixo, 'BRS 208' e 'Aliança' e, por

último, a BRS 264 (Figura 3), havendo diferenças significativas entre ‘BRS 208’ e ‘BRS 207’, ‘BRS 210’ e ‘Ocepar 14’ (Tabela 6).

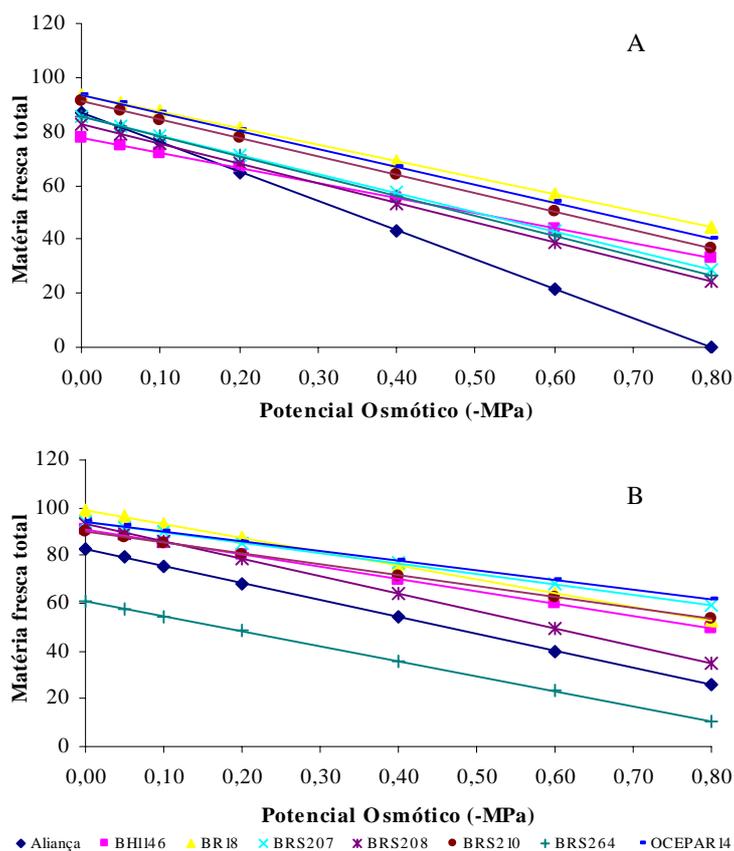


FIGURA 3. Efeito dos agentes indutores de déficit hídrico PEG 6000 (A) e manitol (B) sobre a matéria fresca total das plântulas das oito cultivares de trigo. O material osmótico foi estimado conforme Michel & Kaufmann (1973). UFLA, Lavras, MG, 2006.

TABELA 6. Diferenças entre as declividades das retas dos oito genótipos para os agentes PEG 6000 e manitol para matéria fresca total. UFLA, Lavras, MG, 2006.

	ALIANÇA	BH1146	BR18	BRS207	BRS208	BRS210	BRS264
PEG 6000							
BH 1146	-1.94 0.0813*	-	-	-	-	-	-
BR 18	-2.21 0.0517*	0.28 0.7835 (ns)	-	-	-	-	-
BRS 207	-1.54 0.1546 (ns)	0.63 0.5421(ns)	0.57 0.5809 (ns)	-	-	-	-
BRS 208	-1.40 0.1919 (ns)	0.71 0.4922 (ns)	0.68 0.5137 (ns)	0.12 0.9100 (ns)	-	-	-
BRS 210	-1.81 0.1000*	0.56 0.5870 (ns)	0.50 0.6283 (ns)	-0.16 0.8726 (ns)	-0.29 0.7798 (ns)	-	-
BRS 264	-1.37 0.2016 (ns)	0.77 0.4578 (ns)	0.77 0.4615 (ns)	0.18 0.8642 (ns)	0.06 0.9568 (ns)	0.36 0.7270 (ns)	-
OCEPAR 14	-1.81 0.0997*	0.49 0.6340 (ns)	0.37 0.7155 (ns)	-0.22 0.8302 (ns)	-0.34 0.7440	-0.07 0.9421 (ns)	-0.41 0.6937 (ns)
MANITOL							
BH 1146	1.32 0.2176 (ns)	-	-	-	-	-	-
BR 18	-0.61 0.5547(ns)	0.52 0.6111 (ns)	-	-	-	-	-
BRS 207	-1.36 0.2044(ns)	-0.89 0.3930 (ns)	-1.35 0.2066(ns)	-	-	-	-
BRS 208	0.06 0.9520(ns)	1.68 0.1231(ns)	1.09 0.3017(ns)	2.55 0.0287**	-	-	-
BRS 210	-1.14 0.2795(ns)	-0.47 0.6456(ns)	-0.88 0.3998(ns)	0.19 0.8560(ns)	-1.86 0.0932*	-	-
BRS 264	-0.21 0.8388(ns)	0.28 0.7843(ns)	0.12 0.9091(ns)	0.51 0.6226(ns)	-0.26 0.7973(ns)	0.44 0.6726(ns)	-
OCEPAR 14	-1.48 0.1691 (ns)	-1.16 0.2729(ns)	-1.58 0.1444(ns)	-0.31 0.7615(ns)	-2.77 0.0198 **	-0.40 0.6991(ns)	-0.58 0.5770(ns)

Valores significativos a 1% (**), 5% e 10% (*) e não significativos (ns) pelo teste “t”.

Avaliando-se a influência do estresse hídrico sobre o crescimento das plântulas, levando-se em consideração os comprimentos relativos de parte aérea, raiz principal e matéria fresca total, observa-se que, de maneira geral, ‘BH 1146’ e ‘Ocepar 14’ se destacaram como genótipos tolerantes ao estresse imposto. Por outro lado, Aliança demonstrou ser o material mais sensível.

Ao se comparar a resposta dos diferentes materiais neste trabalho frente à imposição de déficit hídrico, observa-se que o comportamento da ‘BH 1146’ e ‘Ocepar 14’ coincide com as informações cedidas pelo Banco Ativo de Germoplasma de Cereais de Inverno da Embrapa Trigo, classificando-os como

potencialmente tolerantes à seca. Já para a cultivar Aliança houve uma discrepância com as informações cedidas, uma vez que, neste estudo, as plântulas apresentaram uma alta sensibilidade ao estresse hídrico.

A cultivar BH 1146 tem sido estudada em varias regiões do mundo devido a sua resistência à acidez do solo (toxicidade de alumínio) e resistência à mancha marrom, tendo se destacado também por sua adaptação a ambientes semi-áridos, caracterizados por déficit hídrico e calor. Já a cultivar Ocepar 14 é precoce, apresenta um excelente tipo agrônômico, foi desenvolvida pela CODETEC na região Sudoeste e Norte do Paraná e, portanto, também apresenta boa tolerância à seca (Osorio, 1992).

A cultivar Aliança vem sendo recomendada para cultivo em ambientes nos quais o déficit hídrico e as altas temperaturas caracterizam o período de desenvolvimento da lavoura de trigo (Osorio, 1992). Entretanto, os resultados obtidos para Aliança nesse experimento realizado com plântulas sugerem que a adaptação desta cultivar a ambientes semi-áridos poderia estar relacionada a outros fatores de tolerância à seca, tais como: idade da planta, profundidade do sistema radicular, mecanismos de abertura e fechamento de estômatos, características foliares xeromórficas, ajustamento osmótico, intensidade e duração do período de estresse, entre outros.

Os resultados obtidos neste experimento com a 'Aliança', se assemelham aos obtidos por Braga et al. (1999) trabalhando com a mesma metodologia em feijão, na disponibilidade hídrica do substrato afetando o potencial das sementes. Nos potenciais hídricos do substrato de $-0,4$ e $-0,6$ MPa houve redução na porcentagem de germinação, nas plântulas normais obtidas na primeira contagem do teste de germinação, na velocidade de germinação, no comprimento do hipocótilo e da radícula e na matéria seca das plântulas, bem como aumento na porcentagem de plântulas anormais em sementes de feijão cv. IAC-Carioca. Em um estudo com sementes de soja, a cv. IAC 15 sofreu redução

na emissão da raiz primária e da porcentagem de germinação em potenciais hídricos do substrato de $-0,20$ e $-0,40$ MPa (Rossetto et al., 1997).

A primeira e mais sensível resposta ao déficit hídrico é a redução da turgescência celular, que leva à diminuição do crescimento, uma vez que a divisão, alongamento e diferenciação celular são afetados por déficits hídricos. Em condições não tão severas de déficit hídrico, o vegetal pode evitar a redução na turgescência celular, iniciando medidas osmorregulatórias, como a síntese de compostos orgânicos e a conversão do amido em carboidratos solúveis, garantindo, desse modo, o influxo de água e a manutenção do volume da célula (Larcher, 2000).

Segundo Fanti et al. (2004), a menor tolerância ao estresse hídrico simulado foi apresentada pelos tratamentos com PEG 6000, em relação ao manitol. O limite máximo de tolerância ao PEG 6000 esteve entre $-0,6$ e $-0,7$ MPa e ao manitol, entre $-1,4$ e $-1,6$ MPa.

Comparativamente, e nas condições testadas, os resultados obtidos neste estudo indicaram que o agente indutor de déficit hídrico PEG 6000 causou efeitos negativos maiores que manitol, independente da cultivar e da variável analisada. Na avaliação dos dados de raiz, PEG 6000 causou maior estresse em cinco das oito cultivares, equiparando-se ao efeito do manitol em duas delas e tendo sido menor que este em um genótipo. Da mesma forma que nos dados de parte aérea e de matéria fresca total, PEG 6000 também se manteve como agente estressante maior em sete das oito cultivares, pois a sua porcentagem nas soluções utilizadas nesta metodologia foi maior que a do agente manitol.

A observação da resposta das oito cultivares testadas aos diferentes níveis de tensão de água, aos quais as plântulas foram submetidas, indica que os genótipos menos afetados pelo estresse foram: 'BH 1146' e 'Ocepar 14'. Para a variável relativa ao desenvolvimento da parte aérea, só houve significância nas cultivares 'BR 18', 'BRS 207' e 'BRS210' (Tabela 7). Os efeitos das retas dos

dois agentes foram diferentes, mostrando que PEG foi o maior causador do estresse observado. Já para a variável matéria fresca que, de certa forma, descreve as respostas de parte aérea e sistema radicular, os efeitos dos dois agentes foram semelhantes em todas as cultivares, visto que, em nenhum genótipo, houve significância para o teste dos coeficientes dos Betas, pois estes não diferiram entre si. Os efeitos dos dois agentes sobre a cultivar foram semelhantes.

TABELA 7. Comparação da resposta de oito genótipos de trigo ao efeito de PEG 6000 e manitol sobre o comprimento relativo da raiz, parte aérea e da matéria fresca das plântulas. UFLA, Lavras, MG, 2006.

CULTIVAR	RAIZ		PARTE AÉREA		MATÉRIA FRESCA	
	Prob (t)	Valor t	Prob (t)	Valor t	Prob (t)	Valor t
ALIANÇA	0.0008**	0.70	0.2982	0.76	0.2176	0.81
BH 1146	0.0010**	0.66	0.1242	0.90	0.8277	0.79
BR 18	0.0063**	0.80	0.0491*	0.97	0.7598	0.92
BRS 207	0.3672	0.39	0.0018**	0.95	0.1049	0.88
BRS 208	0.0470*	0.66	0.6903	0.93	0.9845	0.87
BRS 210	0.1455	0.49	0.0934*	0.89	0.1637	0.86
BRS 264	0.0208*	0.72	0.3202	0.13	0.1447	0.91
OCEPAR 14	0.0192*	0.72	0.2869	0.23	0.0711	0.87

Valores significativos a 1% (**), 5% e 10% (*) pelo teste “t”.

Por outro lado, observa-se também que, a exceção de ‘BRS 210’ e ‘BRS 207’, todas as cultivares mostraram significância para o efeito de PEG 6000 e manitol sobre o desenvolvimento do sistema radicular, indicado, também, pela maior inclinação da reta daquele agente que mais afeta a resposta do genótipo à sua presença. De fato, as cultivares mostraram respostas distintas aos agentes testados, evidenciando valores significativos a 1%, 5% e 10%, indicando que os Betas da reta do PEG 6000 e da reta relativa ao manitol são diferentes, atingindo o objetivo da análise que foi determinar se os efeitos dos dois agentes sobre a mesma cultivar foram diferentes.

4.2 Comprimento de parte aérea e raiz principal, em embriões imaturos submetidos a estresse hídrico

A análise realizada em embriões imaturos de oito genótipos de trigo cultivados por 30 dias em meio macrobatata demonstraram o efeito não apenas dos agentes indutores de déficit hídrico sobre o desenvolvimento das plântulas, mas também da cultura *in vitro per se* sobre o desenvolvimento do material (Tabela 8).

TABELA 8. Resumo da análise de variância de oito genótipos de trigo brasileiro obtidos a partir de embriões imaturos cultivados por 30 dias em meio de cultura. CV = cultivar, AG = agente, CV*AG = cultivar*agente, D = dose, CV*D = cultivar*dose, AG*D = agente*dose e CV*AG*D = cultivar*agente*dose. UFLA, Lavras, MG, 2006.

FONTE VARIÁÇÃO	GL	RAIZ		PARTE AÉREA		MATÉRIA FRESCA		MATÉRIA SECA	
		QM	Pr>F	QM	Pr>F	QM	Pr>F	QM	Pr>F
CV	7	73843.6073	<.0001	904006.653	<.0001	9837133.83	<.0001	2098.06174	<.0001
AG	2	1337.3366	<.0001	338564.423	<.0001	4.43	0.0032	0.00282	0.0006
CV*AG	14	253.3231	<.0001	213810.699	<.0001	4.39	<.0001	0.00280	<.0001
D	2	1289.3584	<.0001	54239.814	<.0001	4.32	0.0037	0.00316	0.0003
CV*D	14	211.3385	<.0001	15665.995	<.0001	4.28	<.0001	0.00315	<.0001
AG*D	4	280.9153	<.0001	13287.226	<.0001	0.28	0.8341	0.00018	0.7518
CV*AG*D	28	62.2181	0.0296	6018.058	<.0001	0.27	0.9992	0.00018	0.9907

Significativo a 10%, pelo teste de Duncan.

Para as medidas de parte aérea e raiz, as cultivares BRS 207 e BRS 264 obtiveram o maior comprimento, seguidas por 'BRS 208', 'BR 18', 'BRS 210', 'BH 1146', 'Ocepar 14' e 'Aliança'. Nesta avaliação ficou demonstrado que as três cultivares indicadas como tolerantes à seca, pelo Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo, apresentaram os piores resultados, demonstrando, com isso, uma menor adaptação ao cultivo *in vitro* para o meio controle (Tabela 13).

Para as medidas das matérias fresca e seca, os resultados para o meio controle foram, de maneira geral, semelhantes (Tabela 9).

Tabela 9. Comprimento médio da parte aérea, raiz, matérias fresca e seca das plântulas de oito genótipos de trigo obtidos a partir de embriões imaturos cultivados por 30 dias em meio de cultura macrobatata não suplementado com agente estressante. UFLA, Lavras, MG, 2006.

CULTIVAR	COMPRIMENTO PARTE AÉREA (cm)			CULTIVAR	COMPRIMENTO RAIZ (cm)				
BRS 207	20,130	A		BRS 207	9,800	A			
BRS 264	14,770	A	B	BRS 264	6,390	A	B		
BRS 208	10,340	B		BR 18	4,530	B	C		
BR 18	9,760	B	C	BH 1146	3,790	B	C		
BRS 210	9,270	B	C	BRS 208	3,280	B	C		
BH 1146	7,790	B	C	D	BRS 210	3,220	B	C	
OCEPAR 14	3,260	C		D	OCEPAR 14	1,950	C		
ALIANÇA	1,610	D			ALIANÇA	1,290	C		

CULTIVAR	MATÉRIA FRESCA (g)			CULTIVAR	MATÉRIA SECA (g)				
BRS 207	0,30600	A		BRS 207	0,037000	A			
BRS 264	0,11940	B		BRS 264	0,015300	B			
BH 1146	0,08100	B	C	BR 18	0,012000	B	C		
BR 18	0,07500	B	C	BH 1146	0,010000	B	C	D	
BRS 208	0,06800	B	C	BRS 208	0,010000	B	C	D	
BRS 210	0,05590	B	C	BRS 210	0,006600	B	C	D	
OCEPAR 14	0,02200	C		OCEPAR 14	0,003000	C		D	
ALIANÇA	0,01700	C			ALIANÇA	0,001000	D		

Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0,05$) pelo teste “t”.

Na análise englobando os três agentes conjuntamente, verificou-se que, de maneira geral, as cultivares que mais se destacaram por apresentar maior crescimento foram: ‘BH 1146’, ‘BRS 207’, ‘BRS 208’ e ‘BRS 210’, enquanto

‘Aliança’, ‘Ocepar 14’ e ‘BR 18’ foram as mais afetadas pelo estresse imposto (Tabela 10).

TABELA 10. Comprimento médio da parte aérea, da raiz, matérias fresca e seca, das plântulas de oito genótipos de trigo obtidos a partir de embriões imaturos cultivados por 30 dias em meio de cultura suplementado com três concentrações de PEG 6000, maltose e manitol. UFLA, Lavras, MG, 2006.

CULTIVAR	COMPRIMENTO			CULTIVAR	COMPRIMENTO		
	PARTE AÉREA (cm)				RAIZ (cm)		
BH 1146	3,3633	A		BRS 208	0,7189	A	
BRS 207	2,5833	A	B	BRS 210	0,6978	A	
BRS 208	2,5544	A	B	BH 1146	0,6689	A	
BRS 210	2,4578	B		BRS 207	0,4889	A	B
BRS 264	1,8844	B		BRS 264	0,4744	A	B
ALIANÇA	0,8489	C		ALIANÇA	0,2511	B	C
OCEPAR 14	0,6511	C		BR 18	0,1700	C	
BR 18	0,6200	C		OCEPAR 14	0,1611	C	
CULTIVAR	MATÉRIA FRESCA (g)			CULTIVAR	MATÉRIA SECA (g)		
BRS 210	0,0217	A		BRS 207	0,0044	A	
BH 1146	0,0216	A		BH 1146	0,0038	A	
BRS 207	0,0205	A		BRS 210	0,0032	A	B
BRS 208	0,0130	B		BRS 264	0,0025	B	
BRS 264	0,0108	B	C	BRS 208	0,0023	B	
ALIANÇA	0,0056	C		ALIANÇA	0,0009	B	C
BR 18	0,0040	C		BR 18	0,0004	C	
OCEPAR 14	0,0026	D		OCEPAR 14	0,0002	C	

Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0,05$), pelo teste “t”.

A partir dos resultados obtidos verificou-se que 'BH 1146' concidiu com as indicações apresentadas pelo Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo, como sendo uma cultivar potencialmente tolerante à seca. De forma adversa aos resultados encontrados, 'Aliança' e 'Ocepar 14' não foram tolerantes aos estresses impostos, sendo estas cultivadas em regiões semi-áridas, supostamente tolerantes ao déficit hídrico, mas não ao cultivo *in vitro* a que foram expostas. Ademais, estas cultivares possuem variadas outras características adaptativas a estes ambientes, como já citado anteriormente.

Em comparação com o experimento realizado com sementes 'BH 1146' e 'Ocepar 14' evidenciaram os melhores resultados e 'Aliança' os piores. Numa inversão neste experimento com embriões imaturos, somente 'Ocepar 14' diferiu dos resultados anteriormente encontrados e 'BH 1146' e 'Aliança' confirmaram, portanto, confirmaram-nos.

A partir da observação do desenvolvimento das plântulas sob distintos níveis de tensão de água provocados pelos agentes indutores de déficit hídrico, aferido pela medida do comprimento relativo da parte aérea, raiz, matérias fresca e seca, determinou-se que manitol, maltose e PEG 6000, nesta ordem, causaram maior decréscimo no desenvolvimento do material vegetal (Tabela 11).

TABELA 11. Média do comprimento da raiz, parte aérea, matérias fresca e seca das plântulas de oito genótipos de trigo submetidos a 3 concentrações dos agentes de estresse osmótico PEG 6000, maltose e manitol, por 30 dias de cultivo, em meio macrobatata. UFLA, Lavras, MG, 2006.

AGENTE	CARACTERÍSTICAS			
	RAIZ	PARTE AÉREA	MATÉRIA FRESCA	MATÉRIA SECA
Manitol	0,0229 A	0,0279 A	0,0010 A	0,0003 A
Maltose	0,4475 B	1,3729 B	0,0139 A	0,0024 A
PEG 6000	0,8912 C	4,2104 C	0,0226 B	0,0041 B
C.V.	28,0021	35,082	0,7477	1,1382
R²	0,9543	0,8992	0,9999	0,9999

Médias seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes ($P > 0,05$), pelo teste “t”.

Almansouri et al. (2001) trabalhando com *Triticum durum*, verificaram que manitol não afetou a porcentagem de germinação final dos embriões isolados em concentrações baixas e PEG afetou o desenvolvimento dos embriões a partir de concentrações de 30%, demonstrando que PEG foi mais prejudicial que manitol a concentrações altas.

O PEG vem, de fato, sendo utilizado com sucesso em trabalhos de pesquisa para simular os efeitos do déficit hídrico nas plantas já há mais de 30 anos (Michel & Kaufmann, 1973). Quanto ao PEG 6000, vários autores o consideram como o soluto mais adequado para a simulação de estresse osmótico em plantas de trigo, uma vez que possui elevado peso molecular; não é tóxico; não penetra nas células e não é eletrolítico (Hasegawa et al., 1984). Em um estudo na qual compara-se o efeito das soluções de PEG e do manitol, observou-se que o teor de água das sementes de alfaca foi mais baixo quando elas foram mantidas em solução de PEG, apesar de o potencial hídrico de manitol apresentar-se mais negativo. O autor creditou tal fenômeno às propriedades da solução (Eira, 1988).

Nesse contexto, apesar do uso de agentes de estresse osmótico para simular condições de déficit hídrico ser uma possibilidade para,

antecipadamente, se proceder a seleção de material genético, agregando maior eficiência e eficácia a um programa de melhoramento para tolerância à seca, para tal há que se evitar o mascaramento de resultados como esse verificado para manitol e maltose no experimento conduzido no presente estudo. A este respeito, Frett et al. (1991) estão entre os autores que discutem o efeito negativo de moléculas de baixo peso molecular sobre sementes, por exemplo, uma vez que podem penetrar nas células e causar toxidez ao organismo. Ao mesmo tempo, apesar de severamente afetados, os demais genótipos chegaram a se desenvolver, caracterizando um comportamento diferencial das cultivares para este fator. O efeito tóxico do manitol foi mais evidente no crescimento das raízes e da parte aérea que na matéria fresca ou seca do material (Tabela 11), determinando a importância destas medidas para a caracterização *in vitro* do comportamento de genótipos de trigo frente ao déficit hídrico.

Segundo estudo de Kerepsi & Galiba (2000), com cultivares de trigo foi comprovado que a aplicação de PEG e NaCl em volume crescentemente acentuado reduziu significativamente a produção de matéria seca, o conteúdo relativo de água na folha e também a perda relativa de água. Estas tendências foram observadas dentro de todas as cultivares estudadas, mas sob graus diferentes.

De fato, a falta d'água reflete diretamente e em primeira ordem no desenvolvimento das raízes e da parte aérea das plantas. Comumente, quando em déficit hídrico, as plantas são reidratadas à noite, em consequência do que verifica-se substancial crescimento foliar neste período. De forma que a redução da área foliar pode ser considerada a primeira linha de defesa dos vegetais contra a seca (Taiz & Zeiger, 2004), reforçando a importância dessa medida como fator de caracterização da tolerância à seca das plantas, observado também neste estudo. Segundo Munns (2002), houve redução de crescimento das raízes de trigo, após 24h, com a adição de 200mM (3,64%) de manitol. Essa redução foi

mais acentuada após o tratamento com doses de 300mM (5,46%) ou 400mM (7,29%) de manitol, quando a plasmólise das células foi evidente.

Para todas as características avaliadas neste experimento, verificou-se que houve diminuição das medidas de crescimento devido às concentrações do índice de déficit hídrico. Manitol foi o agente estressante mais tóxico, seguido por maltose e PEG 6000, que foi considerado o agente estressante mais adequado para a seleção dos genótipos. Esse resultado é relevante em razão das concentrações estarem adequadas à metodologia. Em concentrações mais baixas (10%), manitol já foi extremamente tóxico ao material, não ocorrendo nem crescimento ou diferenciação celular, pois a sua concentração inicial já estava alta. O mesmo ocorreu para maltose que, com o nível intermediário (20%), também praticamente paralisou o crescimento (Figuras 4 a 11).

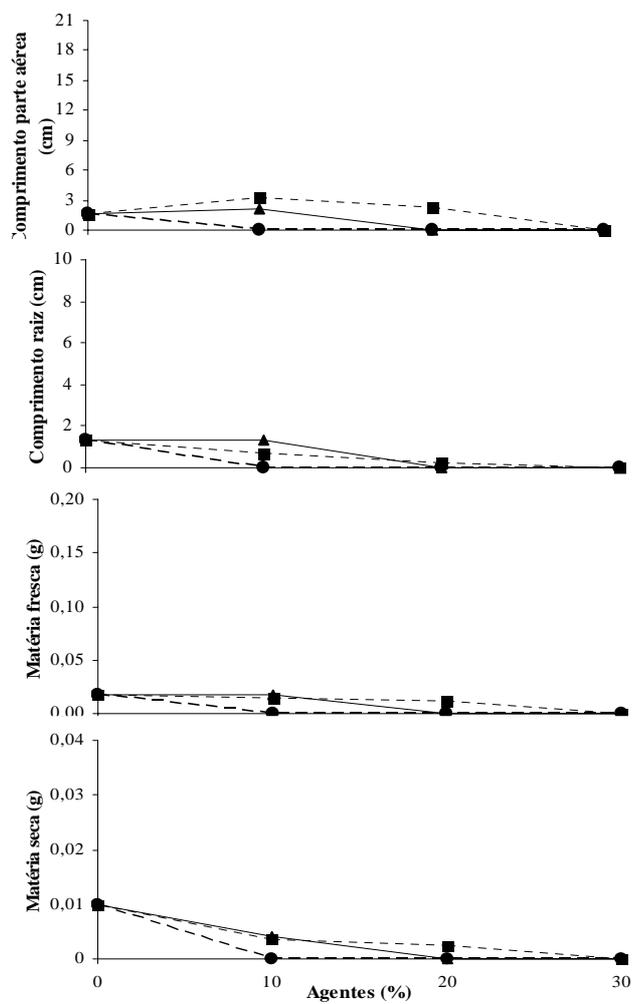


FIGURA 4. Efeito de PEG 6000 (■), manitol (●) e maltose (▲) sobre o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, matéria fresca e matéria fresca dos embriões imaturos da cultivar de trigo Aliança. UFLA, Lavras, MG, 2006.

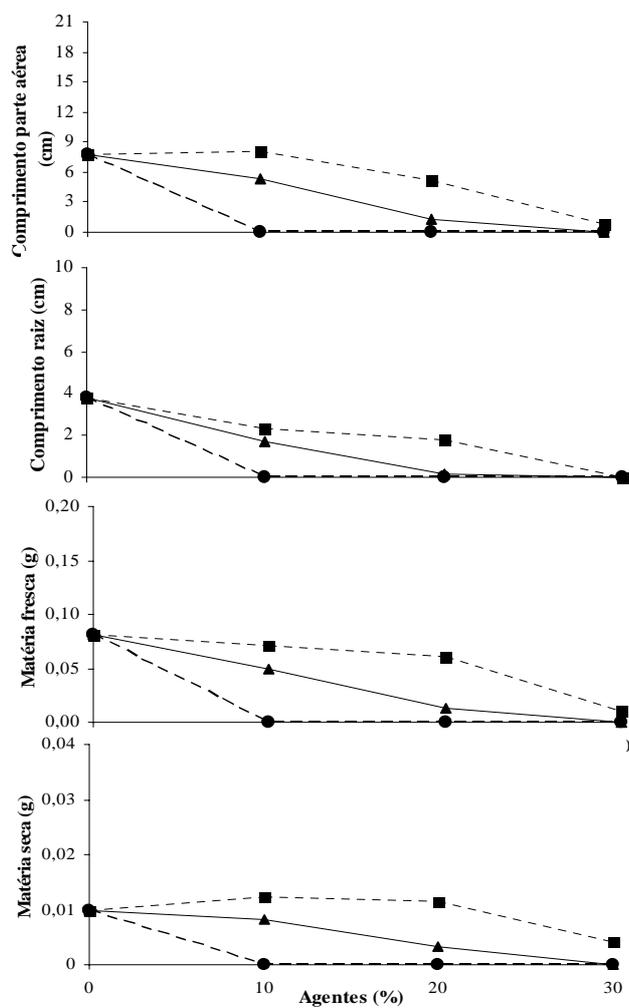


FIGURA 5. Efeito de PEG 6000 (■), manitol (●) e maltose (▲) sobre o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, matéria fresca e matéria fresca dos embriões imaturos da cultivar de trigo BH 1146. UFLA, Lavras, MG, 2006.

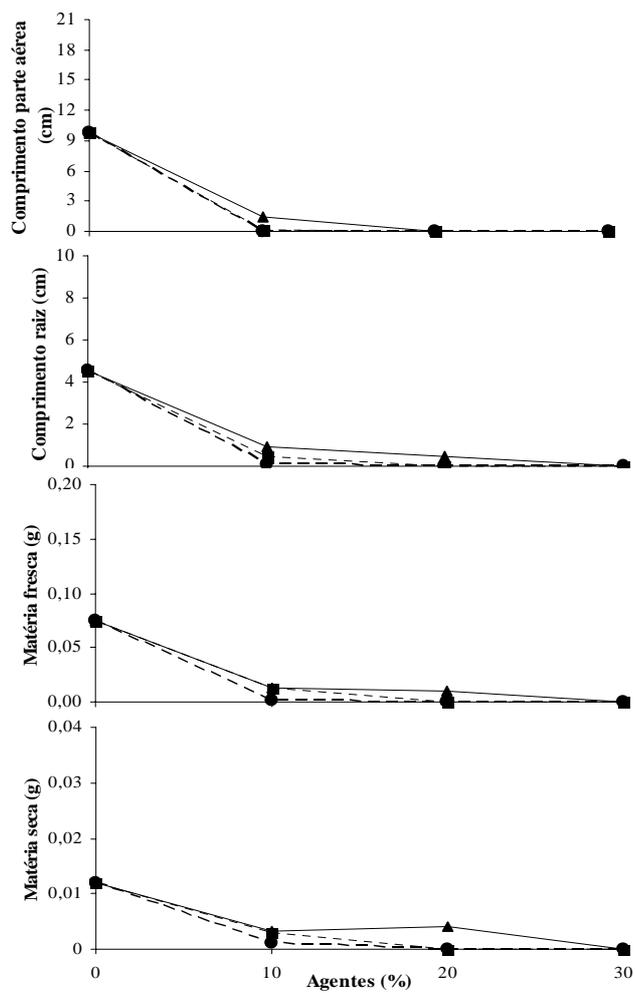


FIGURA 6. Efeito de PEG 6000 (■), manitol (●) e maltose (▲) sobre o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, matéria fresca e matéria fresca dos embriões imaturos da cultivar de trigo BR 18. UFLA, Lavras, MG, 2006.

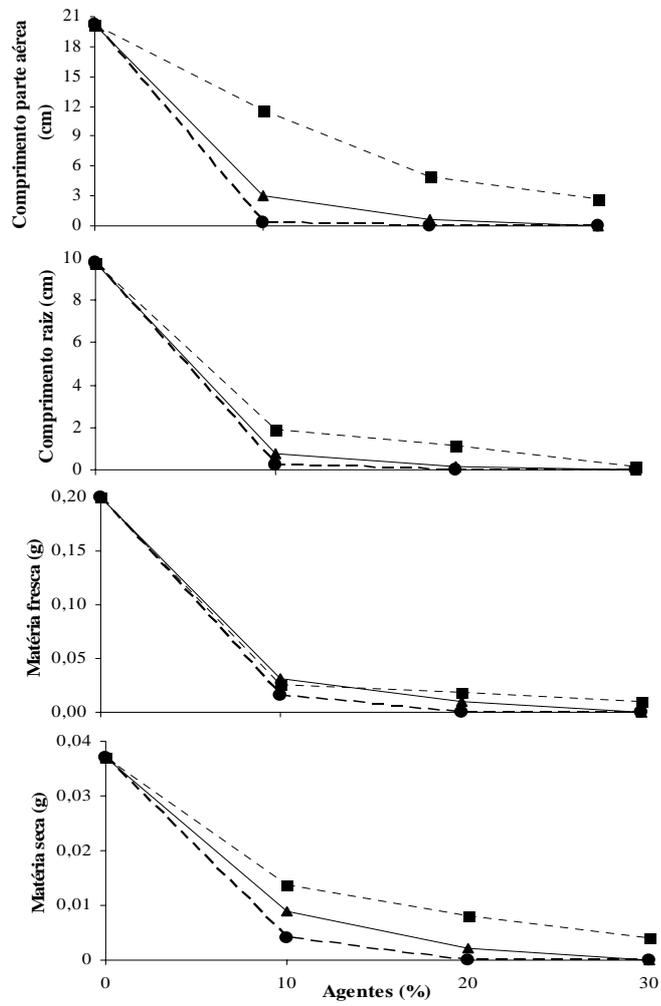


FIGURA 7. Efeito de PEG 6000 (■), manitol (●) e maltose (▲) sobre o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, matéria fresca e matéria fresca dos embriões imaturos da cultivar de trigo BRS 207. UFLA, Lavras, MG, 2006.

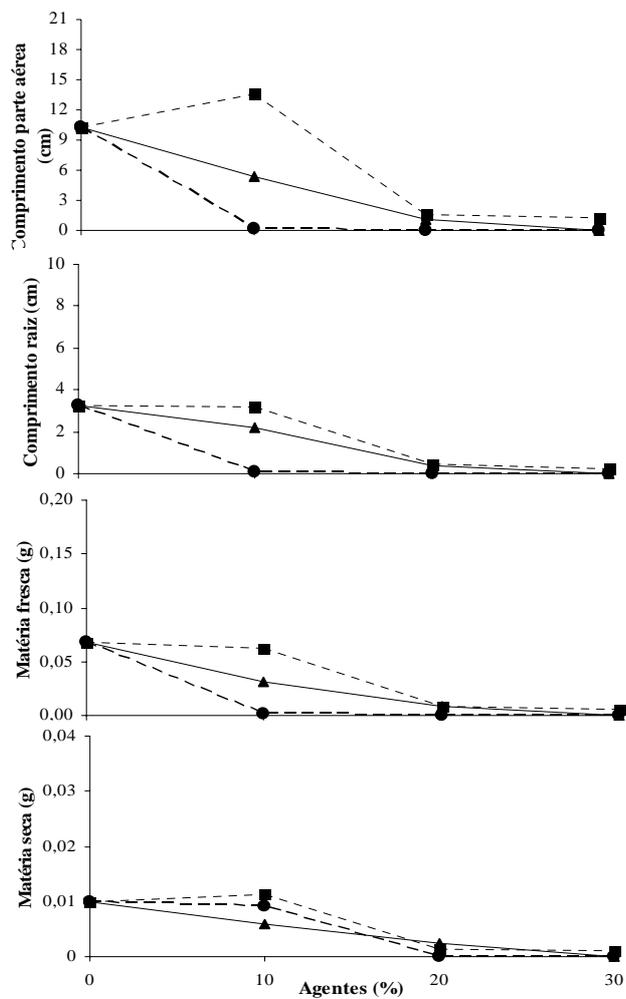


FIGURA 8. Efeito de PEG 6000 (■), manitol (●) e maltose (▲) sobre o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, matéria fresca e matéria fresca dos embriões imaturos da cultivar de trigo BRS 208. UFLA, Lavras, MG, 2006.

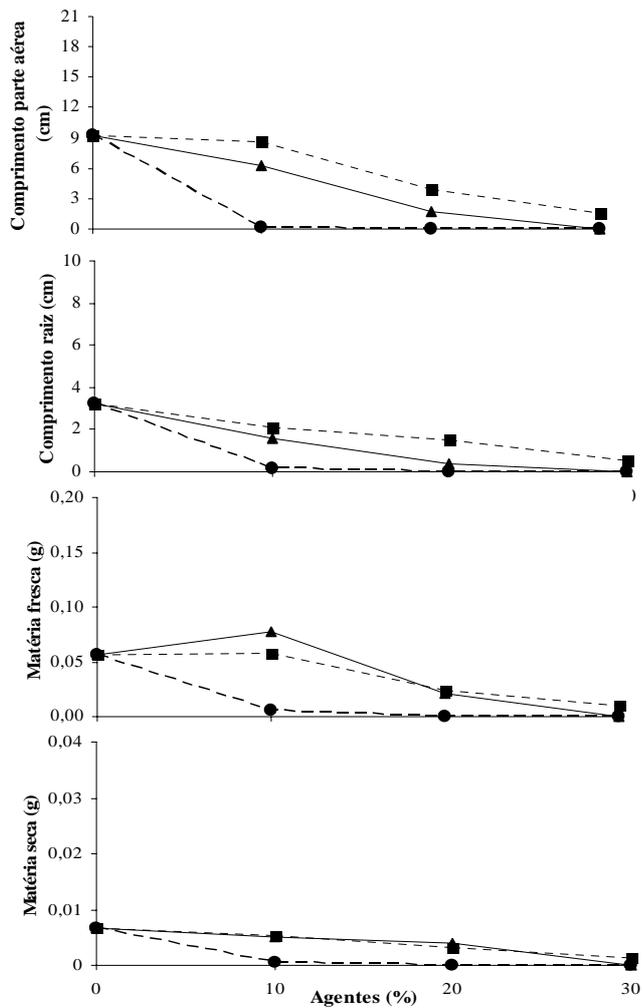


FIGURA 9. Efeito de PEG 6000 (■), manitol (●) e maltose (▲) sobre o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, matéria fresca e matéria fresca dos embriões imaturos da cultivar de trigo BRS 210. UFLA, Lavras, MG, 2006.

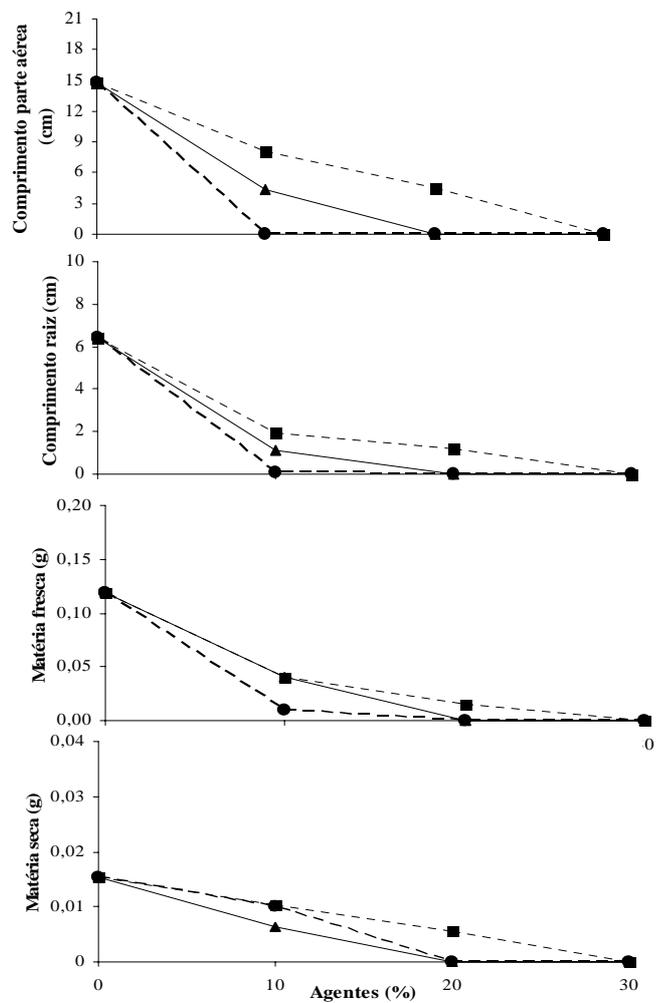


FIGURA 10. Efeito de PEG 6000 (■), manitol (●) e maltose (▲) sobre o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, matéria fresca e matéria seca dos embriões imaturos da cultivar de trigo BRS 264. UFLA, Lavras, MG, 2006.

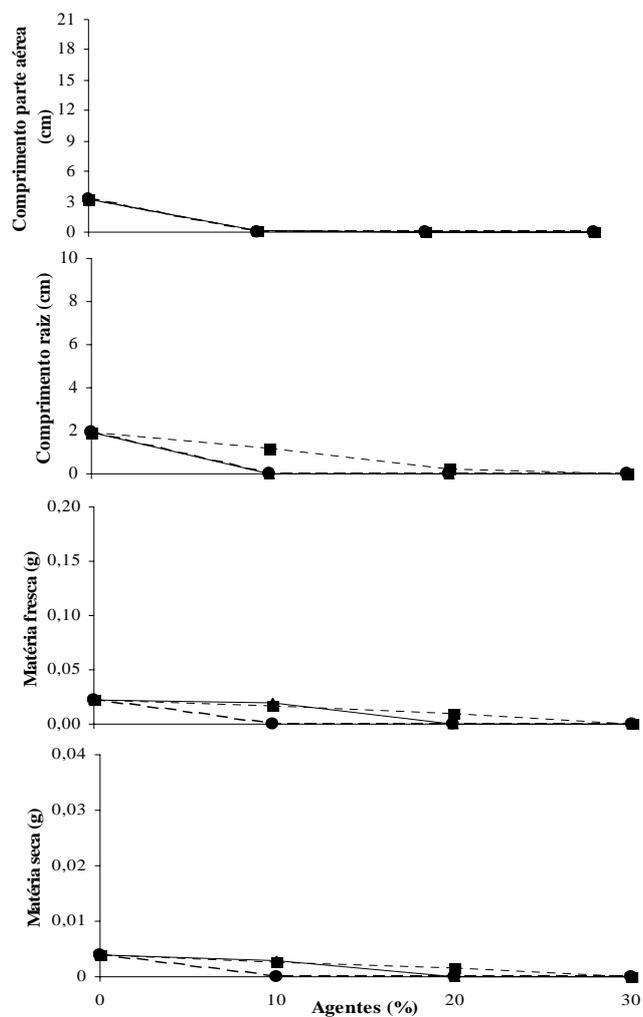


FIGURA 11. Efeito de PEG 6000 (■), manitol (●) e maltose (▲) sobre o comprimento da parte aérea, comprimento da raiz, matéria fresca e matéria seca dos embriões imaturos da cultivar de trigo Ocepar 14. UFLA, Lavras, MG, 2006.

4.3. Determinação da variabilidade genética em genótipos / linhagens de trigo para tolerância à seca

A análise da diversidade genética de uma população de trigos em avaliação, para incorporação a um programa de melhoramento da espécie para tolerância à seca, foi realizada utilizando-se dados de marcadores moleculares, mais especificamente, microssatélites distribuídos ao acaso no genoma.

A partir das observações feitas para os 42 microssatélites selecionados para caracterizar esta população, estabeleceu-se a proporção de locus polimórficos (P), informação que expressa a porcentagem de locus variáveis presentes que, neste caso, foi estabelecida como sendo de 78,57% (Tabela 12). Este valor é bastante significativo, se considerar-se que a base genética trabalhada é tida como sendo, de certa forma, estreita. Nesse contexto, procurou-se estabelecer, também, quantas variantes alélicas podem ser encontradas nesta população, ou seja, a abundância de variantes alélicas disponíveis (A), determinando-se 90 alelos variando nesta população, valor até certo ponto afetado pelo tamanho da amostra trabalhada, não tanto no que diz respeito à distribuição de alelos, mas ao número máximo.

Complementando a informação sobre polimorfismo, foi estabelecido que o número médio de alelos (n) na população em questão é de 2,14 e, em seguida, calculou-se a diversidade gênica dentro de cada loco (H_t), ou marcador microssatélite utilizado, assim como a diversidade gênica média esperada (H_e).

Finalmente, de forma a se ter uma primeira visualização das relações entre os indivíduos, ou seja, as linhas que compõem a população, procurou-se agrupá-las, ou conglomerar em categorias ou classes, com base em suas relações genéticas comuns. Para tanto, o método de agrupamento selecionado foi o método de agrupamento de pares não ponderados usando a média aritmética

UPGMA), que minimiza a distância entre grupos ao usar distância média de todos os pares entre os indivíduos da amostra.

TABELA 12. Número de alelos, diversidade genética em cada loco (Ht), diversidade média esperada (H), proporção de locus polimórficos (P), abundância de variantes alélicas (A), número médio de alelos (N) e média de todos locus (He) estimados para 42 microssatélites para trigo utilizados na caracterização de uma população de cultivares e linhagens para utilização em um programa de melhoramento da espécie para tolerância à seca. UFLA, Lavras, MG, 2006.

SSR	Nº ALELOS	Ht	H	SSR	Nº ALELOS	Ht	H
WMS 4	1	0	0	WMS 282	2	0	0
WMS 18	2	0	0	WMS 294	2	0,0215	0,9892
WMS 43	1	0	0	WMS 304	3	0	0
WMS 44	2	0	0	WMS 325	2	0,0430	0,978
WMS 60	3	0,0538	0,9730	WMS 334	3	0,1828	0,9086
WMS 120	2	0,0108	0,9950	WMS 340	2	0,1075	0,9462
WMS 135	4	0,0430	0,9780	WMS 95	2	0	0
WMS 136	3	0,0860	0,9570	WMS 166	1	0	0
WMS 148	3	0,0645	0,9680	WMS 369	3	0	0
WMS 157	3	0	0	WMS 383	2	0,0645	0,9355
WMS 160	2	0,3763	0,8120	WMS 375	2	0	0
WMS161	3	0,0108	0,9950	WMS389	2	0,0108	0,995
WMS 169	3	0,0215	0,9892	WMS 408	3	0	0
WMS 192	2	0,0753	0,9624	WMS 437	2	0,0538	0,9731
WMS 194	2	0	0	WMS 469	1	0	0
WMS 219	2	0,0538	0,9730	WMS 518	1	0	0
WMS 232	2	0	0	WMS 595	2	0,0108	0,9892
WMS 234	2	0	0	WMS 608	1	0	0
WMS 259	1	0	0	WMS 153	2	0	0
WMS 261	3	0,1828	0,9086	WMS 106	2	0	0
WMS 272	2	0	0	WMS 368	2	0	0
P = 78,57%				A = 90			
N = 2,14				He = 0,04			

A análise da similaridade genética gerou uma matriz de similaridade com 8.649 dados e um dendrograma (Figura 12) com a ocorrência de três grupos principais. O coeficiente médio de similaridade genética observado para as 93 cultivares/linhagens analisadas foi de 0,691, tendo sido detectados 23 locus monomórficos e 19 primers polimórficos, a exemplo do microssatélite WMS 160 (Figura 13, a seta indica o polimorfismo), dentre os 42 utilizados para

caracterizar os 93 genótipos que formam a população em estudo. Estes são valores, até certo ponto, esperados para uma população de fim específico como esta, em que muitos dos genótipos são aparentados e possuem características comuns.

De fato, a maior proximidade genética verificada foi entre as linhagens da Embrapa Trigo PF81189-PF81191 (0,95), e entre o germoplasma introduzido do Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT), IPF 78912-IPF 78913 (0,96) e IPF 78923-IPF 79806 (0,96), dentre muitas outras. Acrescido a isso está o fato de o trigo ser uma espécie altamente domesticada, constituída por três genomas homólogos. Tanto que os marcadores microsatélites mostram um nível muito mais alto de polimorfismo e informações para trigo hexaplóide do que qualquer outro sistema de marcador (Bryan et al., 1997). Por meio dos 33 marcadores que estão variando nesta população, foi possível detectar também genótipos bastante distantes. Dentre os que mais se distanciaram estão: IPF 77781, IPF 77783, provenientes da China e IPF 78080, do México, cujos coeficientes giraram ao redor de 0,50.

Entre os oito genótipos empregados nos experimentos de caracterização da tolerância à seca desenvolvidos neste estudo estão as cultivares Ocepar 14 e cultivar BH 1146, reconhecidamente adaptadas a ambiente semi-áridos ou áridos. Na genotipagem deste material, determinou-se a similaridade de 'BH 1146' com quatro linhagens PF, suas descendentes, PF 031273, PF 031240, PF 031241 e PF 031242, com índice de 0,85. Em um futuro breve, estas poderão ser lançadas para cultivo no cerrado brasileiro.

Outras cultivares reconhecidas como tendo adaptação a ambientes áridos foram também agrupadas. Dentre elas, destacam-se 'KSN 1081' e a mexicana 'Nesser'. Esta última vem sendo muito estudada no mundo inteiro, pois além de apresentar tolerância à seca, é um genótipo altamente produtivo e de grande estabilidade de rendimento sob diferentes condições ambientais. De acordo com

Okuyama et al. (2005), 'Nesser' combina alto rendimento de grãos, adaptabilidade e estabilidade, podendo, dessa forma, ser considerado como o genótipo mais apropriado para ambientes caracterizados por estresse hídrico, principalmente os de final de ciclo.

Considerando-se tolerância à seca como uma característica poligênica e difícil de ser trabalhada no melhoramento genético clássico, poucos programas se preocupam com esse aspecto. Conseqüentemente, poucas cultivares têm sido desenvolvidas com características de tolerância à seca. Dessa maneira, a biologia molecular assume papel-chave, não apenas na determinação da diversidade disponível para os programas de melhoramento e da distribuição desta diversidade no germoplasma utilizado, mas permitindo também a identificação pontual de genes envolvidos nas respostas ao déficit hídrico, o que possibilitará, futuramente, a identificação e a compreensão de rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas à seca. Isso permitirá o uso desses genes como sondas moleculares em programas de melhoramento que busquem a identificação de genótipos e expressem mecanismos metabólicos que aumentem sua tolerância às condições de deficiência hídrica. Existe também a possibilidade pela engenharia genética, transformando-se plantas, de se transferir genes de interesse para outros genótipos, assim como entre espécies incompatíveis (Beever, 2000).

Entretanto, o Brasil não é o principal produtor de trigo no mundo, e assim, dados de polimorfismo das cultivares plantadas no país e suas características agronomicamente importante ainda são escassos. Os resultados aqui obtidos com os microssatélites representam um primeiro esforço com as variedades brasileiras que podem ser ampliadas para incluir genes de interesse, principalmente ligado à tolerância à seca.

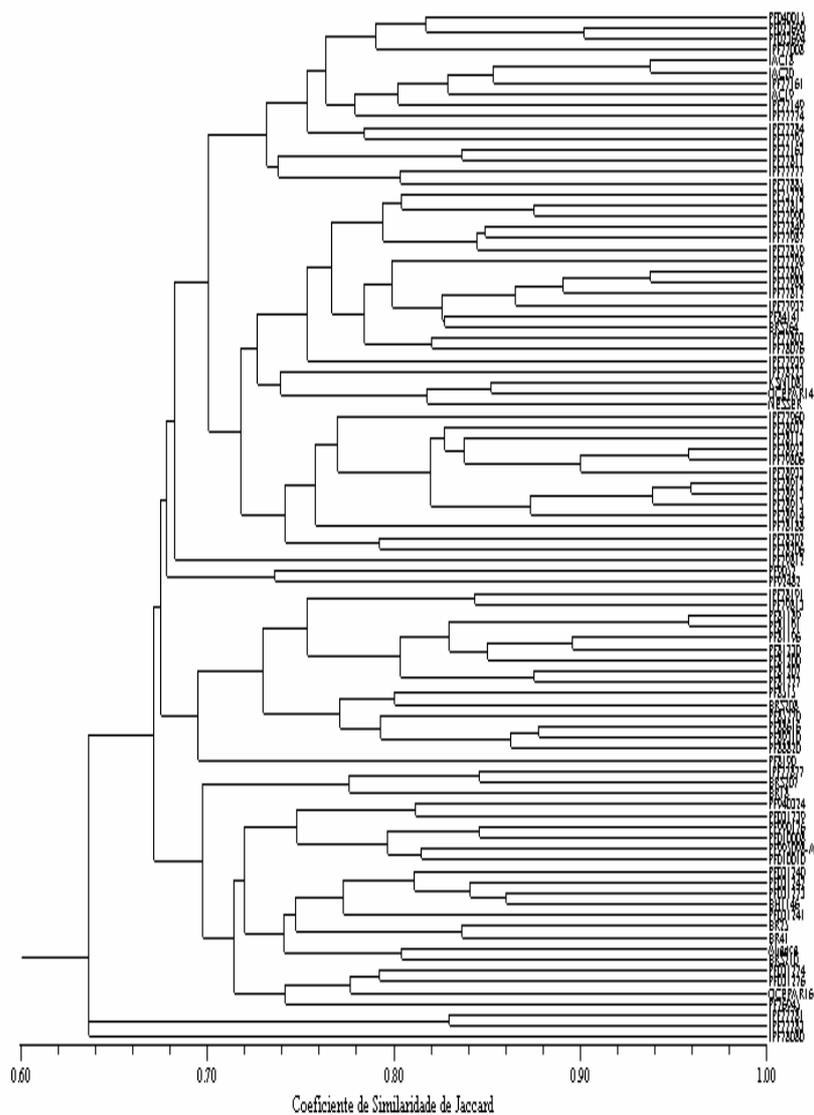


FIGURA 12. Dendrograma das 93 cultivares/linhagens de trigo obtido a partir de análise de SSR, utilizando-se o índice de similaridade Jaccard e o método de agrupamento UPGMA. UFLA, Lavras, MG, 2006.

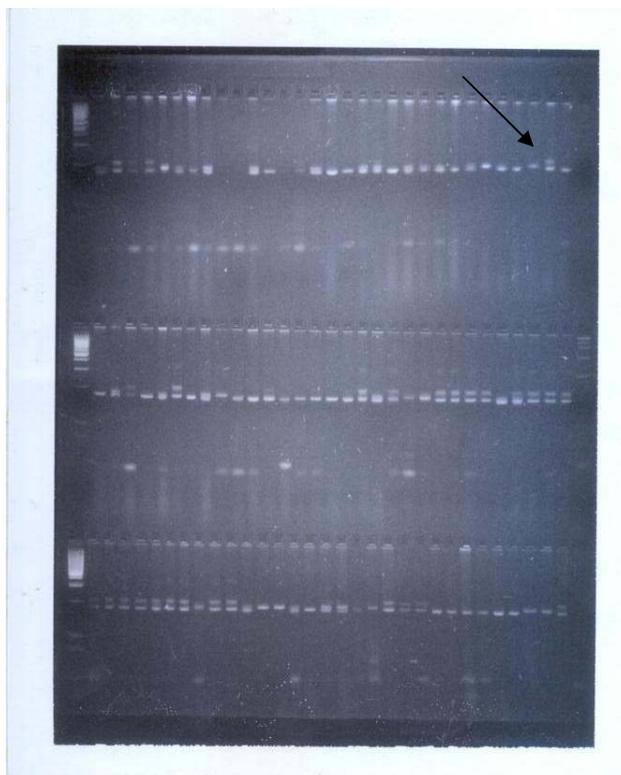


FIGURA 13. Análise eletroforética de regiões de microssatélite em trigo. Os 93 genótipos/linhagens de trigo foram amplificados com o *primer* microssatélite WMS 160. UFLA, Lavras, 2006.

As cultivares Aliança e BRS 207 apresentaram o mais alto coeficiente polimórfico (Tabela 13), tendo os genes ligados à resistência à seca um maior nível de polimorfismo (Brammer, 2003). Os marcadores microssatélites mostram um nível muito mais alto de polimorfismo e informações para trigo do que qualquer outro sistema de marcador (Bray et al., 1993). Neste estudo com os *primers* microssatélites foi confirmada a posição de ‘Aliança’ como integrante de grupo tolerante à seca, como indicado pelo Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo. Em segundo lugar, ficaram as cultivares Ocepar 14 e BRS 264

seguidas pelas cultivares BH 1146 e BR 18 e, com mais baixo nível de polimorfismo ‘BRS 208’ e ‘BRS 210’, já que estas são utilizadas para o cultivo em sistema irrigado.

TABELA 13. Polimorfismo obtido nos oito genótipos de trigo no estudo de tolerância à seca por meio de microssatélites. UFLA, Lavras, MG, 2006.

PRIMER	GENÓTIPOS	TAMANHO DA BANDA
WMS44	OCEPAR 14	178 e 176pb
	ALIANÇA	178 e 176pb
	BRS 207	178 e 176pb
	BRS 208	178 e 176pb
	BRS 210	178 e 176pb
	BRS 264	178 e 176pb
	BR 18	178 e 176pb
	BH 1146	178 e 176pb
WMS60	ALIANÇA	224 e 190pb
WMS135	OCEPAR 14	176, 153 e 143pb
	ALIANÇA	176, 153 e 143pb
	BRS 207	176, 153 e 143pb
	BRS 264	176, 153 e 143pb
	BH 1146	176, 153 e 143pb
WMS160	BH 1146	196 e 184pb
WMS194	BRS 207	136 e 131pb
WMS334	ALIANÇA	114 e 110pb
	BRS 207	114 e 110pb
	BR 18	114 e 110pb
	BH 1146	114 e 110pb
WMS340	BRS 264	183 e 179pb
	BR 18	183 e 179pb
WMS408	OCEPAR 14	182 e 148pb
	ALIANÇA	182 e 148pb
	BRS 207	182 e 148pb
	BRS 208	182 e 148pb
	BRS 210	182 e 148pb
	BRS 264	182 e 148pb
	BR 18	182 e 148pb
	BH 1146	182 e 148pb
WMS437	BRS 207	111 e 109pb
WMS106	OCEPAR 14	105 e 118pb
	ALIANÇA	105 e 118pb

5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo, buscando verificar, precocemente, a tolerância diferencial ao estresse hídrico com plântulas e embriões imaturos de trigo, envolvendo diferentes agentes osmóticos e microssatélites, demonstraram divergências com as observações de campo, fornecidas pelo Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Trigo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMANSOURI, M.; KINET, J.M.; LUTTS, S. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 231, n. 2, p. 243-254, Apr. 2001.

BAPTISTA, N. A asa e a mobilização social no semi-árido. Disponível em: <http://www2.mre.gov.br/aspa/semiarido/data/naidison_baptista.htm>. Acesso em: 2004.

BEEVER, D. Os transgênicos e o futuro da agricultura. **Biotecnologia e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 4-7, jul./ago. 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BRAGA, L. F.; SOUSA, M. P.; BRAGA, J. F.; SÁ, M. E. Efeito da disponibilidade hídrica no substrato na qualidade fisiológica de semente de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 95-102, 1999.

BRAMMER, S. P. **A citogenética na caracterização genômica do trigo**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2003. 6 p. (Embrapa Trigo. Documentos Online; 31). Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do31.htm>. Acesso em: 25 jul. 2006.

BOREM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG, 2006. 374 p.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dec. 1993.

BRYAN, G. J., A. J. COLLINS, P. STEPHENSON, A. ORRY, J. B. SMITH. Isolation and characterisation of microsatellites from hexaploid bread wheat. **Theoretical and Applied Genetics**. 94:557-563.1997.

BRUNINI, O.; CARDOSO, M. Efeito do déficit hídrico no solo sobre o comportamento estomático e potencial da água em mudas de seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 7, p. 32-38, jul. 1998.

CASAGRANDE, E. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N. et al. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.13, n.2, p.168-184, ago. 2001.

CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Mapas genéticos em plantas. **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 2, p.89-100, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 2006.

DENADAI, I. A. M.; KLAR, A. E. Resistência à seca em quatro cultivares de trigo: parâmetros fisiológicos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, n. 2, p. 274-281, maio/ago. 1995.

DUNCAN, R. R. Tissue culture-induced variation and crop improvement. **Advances in Agronomy**, New York, v. 58, p. 201-240, 1997.

DURÃES, F. O. M.; GAMA, E. E. G.; SANTOS, F. G.; GUIMARÃES, C. M. et al. **Fenotipagem para tolerância a seca: protocolos e características específicas visando o melhoramento genético de cereais**. Sete Lagoas, MG: EMBRAPA-CNPMS, 2004. 15 p. (EMBRAPA-CNPMS. Circular Técnica, 54).

EIRA, M. T. S. **Condicionamento osmótico de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.): efeitos sobre a germinação e desempenho sob estresses hídrico, salino e térmico**. 1988. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FANTI, S. C.; PEREZ, S. C. J. G. A. Seed germination of paineira under water and salt stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 9, p. 903-909, set. 2004.

FEDAK, G. Procedures for transferring agronomic traits from alien species to crops plants. In: INTERNATIONAL WHEAT GENETICS SYMPOSIUM, 9., 1998, Saskatoo. **Proceedings...** Saskatoon: University of Saskatchewan, 1998. v. 1, p. 1-7.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.

FERREIRA, M. A. J. F. **Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2003. 63 p.

FRETT, J. J.; PILL, W. G.; MORNEAU, D. C. A comparison of priming agents for tomato and asparagus seeds. **HortScience**, Alexandria, v. 26, n. 9, p. 1158-1158, Sept. 1991.

FUMIS, T. F.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 449-453, abr. 2002

GASPAR, T.; FRANCK, T.; BISBIS, B.; KEVERS, C.; JOUVE, L.; HANSMAN, J. F.; DOMMES, J. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 37, n. 3, p. 263-285, July 2002.

GÖPFERT, H.; ROSSETTI, L. A.; SOUZA, J. **Eventos generalizados e segurança agrícola**. Brasília: IPEA, Ministério do Planejamento, 1993. 78 p.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; HANDA, S.; HANDA, A. K. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. **HortScience**, Alexandria, v. 19, n. 3, p. 371-377, June 1984.

HARDEGREE, S. P.; EMMERICH, W. E. Seed germination response to polyethylene glycol solution depth. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 22, n. 1, p. 1-7, 1994.

HEERDEN, P. D. R.; VILLIERS, O. T. Evaluation of proline accumulation as an indicator of drought tolerance in spring wheat cultivars. **South African Journal of Plant and Soil**, Pretoria, v. 13, n. 1, p. 17-21, 1996.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE.
Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 2006.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, 1996.

KEREPESI, I.; GALIBA, G. Osmotic and Salt Stress-Induced Alteration in Soluble Carbohydrate Content in Wheat Seedlings. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 3, p. 482-487, May/June 2000.

LANTICAN, M.; PINGALI, P. L. Growth in wheat yield potential in marginal environments. In: WARREN E. KRONSTAD MEMORIAL SYMPOSIUM, 2001, Mexico City. **Proceedings...** Mexico City: International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), 2001.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531 p.

MCCREE, K.; FERNANDEZ, C. J. Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 2, p.353-360, Mar./Apr. 1989.

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 51, n. 6, p. 914-916, June 1973.

MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 1, n. 5, p. 14-17, 1998.

MITRA, J. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. **Current Science**, Bangalore, v. 80, n. 6, p. 25, p. 758-763, Mar. 2001.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 239-250, Feb. 2002.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; SANTOS, R. C.; NETO, E. B.; SANTOS, V. F. Comportamento fisiológico de duas cultivares de amendoim submetidas a diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 12, p. 1963-1969, dez. 1998.

OKUYAMA, L. A.; FEDERIZZI, L. C.; BARBOSA NETO, J. F. Grain yield stability of wheat genotypes under irrigated and non-irrigated conditions. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 5, p. 697-704, Sept. 2005.

OSORIO, E. A. **A cultura do Trigo**. São Paulo: Globo, 1992. 218 p. (Coleção do Agricultor).

ORTIZ, R.; BRAMEL-COX, P. J.; HASH, C. T.; MALLIKARJUNA, N.; REDDY, D. V. R.; SEETHARAMA, N.; SHARMA, H. C.; SHARMA, K. K.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; THAKUR, R. P.; WINSLOW, M. D. Potential for improving agricultural production through biotechnology in the semi-arid tropics. **Biotechnology in the Semi-Arid Tropics**. International Crops Research Institute for the Semi-arid Tropics (ICRISAT), Patancheru, 502 324 Andhra Pradesh, India. 2005.

PÁEZ, A. O.; GONZÁLEZ, M. E. Water stress and clipping management effects of guineagrass: II. Photosynthesis and water relations. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 4, p. 706-711, July/Aug. 1995.

PELEG, Z.; FAHIMA, T.; ABBO, S.; KRUGMAN, T.; NEVO, E.; YAKIR, D.; SARANGA, Y. Genetic diversity for drought resistance in wild emmer wheat

and its ecogeographical associations. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 2, p.176-191, Feb. 2005.

PINTO, L. R.; VIEIRA, L. M. C.; SOUZA, A. P.; SOUZA JÚNIOR, C. L. Izoenzimas e Microsatélites em Plantas. **Biociência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 4, n. 20, p. 16-19, maio/jun. 2001.

RAJARAM, S.; BRAUN, H. J.; VAN GINKEL, M. CIMMYT'S approach to breed for drought tolerance. **Euphytica**, Wageningen, v. 92, n. 1/2, p.147-153, 1996.

REEVES, T. G.; RAJARAM, S.; VAN GINKEL, M.; TRETOWAN, R.; BRAUN, H. J.; CASSADAY, K. **New Wheats for a Secure, Sustainable Future**. Mexico, D.F.: CIMMYT, 1999.

REYNOLDS, M.; EKOVMAND, B.; TRETOWAN, R.; PFEIFFER, W. Evaluation a concept model for drought tolerance. In: **Molecular Approaches for the genetic improvement for cereals for stable production in water-limited environments**. A strategic workshop held at CIMMYT, El Batan Mexico, 21-25 June. 1999.

RÖDER, M. S.; KORZUM, V.; WENDEHAKKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M. H.; LEROY, P.; GANAL, M. W. A microsatellite map of wheat. **Genetics**, Austin, v. 149, n. 4, p. 2007-2023, Aug. 1998.

RÖGERS, S. O.; BENEDICH, A. J. Extraction of DNA from plant tissues. In: GELVIN, S. B.; SCHILPEROORT, R. A.; VERMA, D. P. S. **Plant molecular biology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988. p A6:1-10.

ROHLF, F. J. NTSYS – PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.02. New York: Exeter Software, 1992. 1 CDROM.

ROSSETTO, C. A. V.; NOVENBRE, A. D. L. C.; MARCOS FILHO, J. NAKAGAWA, J. Efeito da disponibilidade hídrica do substrato da qualidade fisiológica e do teor de água inicial da semente de soja no processo de germinação. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 1/2, p. 97-105, Jan./ago. 1997.

SANTOS, V. L. M.; CALIL, A. C.; RUIZ, H. A.; ALVARENGA, E. M.; SANTOS, C. M. Efeito do estresse salino e hídrico na germinação e vigor de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.14, n.2, p.189-194, 1992.

SANTOS, R. F. CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 287-294, set./dez. 1998.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 333-341, Feb. 2002.

SÓ e SILVA, M.; JÚNIOR, W. Q. R.; TRINDADE, M. G.; ZANATTA, A. C. **A. Fenotipagem para resistência à seca visando o melhoramento genético do trigo na Embrapa/Brasil**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought and cold stress. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.7, n. 2, p.161-167, Apr. 1996.

STACHEL, M.; LELLEY, T.; GRAUSGRUBER, H.; VOLLMANN, J. Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 100, n. 2, p. 242-248, Jan. 2000.

SUPRUNOVA, T.; KRUGMAN, T.; FAHIMA, T.; CHEN, G.; SHAMS, I.; KOROL, A.; NEVO, E. Differential expression of dehydrin genes in wild barley, *Hordeum spontaneum*, associated with resistance to water déficit. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1297-1308, Oct. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre, 2004. 719 p.

THIS, D.; TEULAT-MERAH, B. Towards a comparative genomics of drought tolerance in cereals: lessons from a QTL analysis in barley. **International workshop-CIMMYT Mexico** June 21-25 1999.
http://www.cimmyt.org/english/docs/proceedings/molecApproaches/pdfs/towards_comparative.pdf.

VILELA, E. A.; MORAES, J. A. P. V. Ajustamento osmótico em folhas de trigo em função de níveis de água no solo e estádios de crescimento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 1129-1137, 1986.

Anexo I. Valores estimados para α , β , probabilidade de t e R_2 para o efeito linear e quadrático para as oito cultivares testadas, dois agentes estressantes (P- PEG 6000 e M – manitol) nas três variáveis testadas, comprimento relativo da parte aérea (CPA); comprimento raiz principal (CR) e matéria fresca total (MFT).

	GENÓTIPO	Ag	LINEAR				QUADRÁTICA				
			a	b1	Pr(t)	R2	a	b1	b2	Pr(t)	R2
CPA	ALIANÇA	P	86,94	-133,71	0,0137	0,73	107,6	-379,54	316,57	0,05	0,91
	BH 1146	P	84,81	-108,15	0,0024	0,86					
	BR 18	P	100,74	-124,94	<,0001	0,96					
	BRS 207	P	98,19	-136,52	0,0003	0,94					
	BRS 208	P	95,71	-115,12	0,0002	0,94					
	BRS 210	P	97,59	-132,41	<,0001	0,96					
	BRS 264	P	102,22	-124,73	0,0003	0,93					
	OCEPAR 14	P	98,47	-131,8	0,0007	0,91					
	ALIANÇA	M	82,6	-88,95	0,0057	0,81					
	BH 1146	M	97,97	-73,16	0,0003	0,93					
	BR 18	M	101,77	-94,89	<,0001	0,96					
	BRS 207	M	99,92	-68,44	<,0001	0,97					
	BRS 208	M	90,05	-106,9	0,0011	0,9					
	BRS 210	M	76,75	-86,63	0,0109	0,75					
BRS 264	M	81,78	-88,89	0,0061	0,8						
OCEPAR 14	M	94,66	-83,73	0,002	0,93						
CR	ALIANÇA	P	86,8	-107,49	0,0076	0,78					
	BH 1146	P	96,25	-51,28	0,0048	0,82					
	BR 18	P	96,98	-82,98	0,0066	0,79					
	BRS 207	P	82,28	-65,94	0,0111	0,75					
	BRS 208	P	100,52	-93,99	0,0011	0,9					
	BRS 210	P	88,93	-65,75	0,0295	0,64					
	BRS 264	P	101,21	-70,61	0,0185	0,7					
	OCEPAR 14	P	100,17	-87,44	0,0028	0,85					
	ALIANÇA	M	75,11	-73,63	0,0229	0,67					
	BH 1146	M	100,48	-51,6	<,0001	0,98					
	BR 18	M	86,3	-65,5	0,0045	0,82					
	BRS 207	M	86,69	-67,76	0,0126	0,74					
	BRS 208	M	81,44	-70,6	0,0066	0,8					
	BRS 210	M	98,06	-68,02	0,0001	0,95					
BRS 264	M	97,45	-52,09	0,007	0,96						
OCEPAR 14	M	94,19	-93,73	0,0028	0,97						
MFT	ALIANÇA	P	86,67	-108,32	0,0029	0,85	98,73	-251,72	184,68	0,03	0,96
	BH 1146	P	77,67	-56,01	0,0271	0,65					
	BR 18	P	93,56	-61,5	0,0003	0,93					
	BRS 207	P	85,4	-70,55	0,0042	0,83					
	BRS 208	P	82,53	-72,98	0,0052	0,81					
	BRS 210	P	90,91	-67,68	0,0012	0,89					
	BRS 264	P	85,84	-74,17	0,0043	0,83					

OCEPAR 14	P	93,73	-66,54	0,002	0,90
ALIANÇA	M	82,72	-71,24	0,0158	0,72
BH 1146	M	90,62	-51,63	0,001	0,9
BR 18	M	99,04	-57,86	0,0015	0,88
BRS 207	M	93,99	-43,12	0,0007	0,91
BRS 208	M	93,09	-72,61	0,0008	0,91
BRS 210	M	89,71	-45,4	0,0084	0,78
BRS 264	M	91,29	-109,11	0,0047	0,95
OCEPAR 14	M	94,13	-40,5	0,0011	0,90