

## RESULTADOS DE PESQUISA DA EMBRAPA SOJA - 2002

### Ecofisiologia e Biologia Molecular

JPSO  
599r  
003

7-2004.00084

Resultados de pesquisa da  
2003 IV-2004.00084



25939-1





**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**

*Luiz Inácio Lula da Silva*

Presidente

*Roberto Rodrigues*

Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



---

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*José Amauri Dimarzio*

Presidente

*Clayton Campanhola*

Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Sérgio Fausto*

*Dietrich Gerhard Quast*

*Urbano Campos Ribeiral*

Membros

**Diretoria Executiva da Embrapa**

*Clayton Campanhola*

Diretor-Presidente

*Mariza Marilena Tanajura Luz Barbosa*

*Herbert Cavalcante de Lima*

*Gustavo Kauark Chianca*

Diretores Executivos

**Embrapa Soja**

*Caio Vidor*

Chefe Geral

*José Renato Bouças Farias*

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Alexandre José Cattelan*

Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios

*Norman Neumaier*

Chefe Adjunto de Administração

**Exemplares desta publicação podem ser solicitadas a:**

Área de Negócios Tecnológicos da Embrapa Soja

Caixa Postal 231 - 86001-970 - Londrina, PR

Telefone (43) 3371-6000 Fax (43) 3371-6100

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa do Comitê de Publicações da Embrapa Soja



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Soja  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1516-781X

Agosto, 2003

# ***Documentos217***

## **Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja - 2002**

### **Ecofisiologia e Biologia Molecular**

**Organizado por:**

**Clara Beatriz Hoffmann-Campo**

**Odilon Ferreira Saraiva**

Londrina, PR  
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Soja**

Rodovia Carlos João Strass - Acesso Orlando Amaral  
Caixa Postal 231  
86001-970 - Londrina, PR  
Fone: (43) 3371-6000  
Fax: (43) 3371-6100  
<http://www.cnpso.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpso.embrapa.br](mailto:sac@cnpso.embrapa.br)

Embrapa Soja	
Unidade:	AI - SEDE
Valor a junção:	
Data aquisição:	16/03/04
N.º N.º Fiscal/Fatura:	
Formocodex:	
N.º OCS:	
Origem:	EMB
N.º RECEBIM.	084/03

**Comitê de Publicações da Embrapa Soja**

Presidente:

*José Renato Bouças Farias*

Secretária executiva:

*Clara Beatriz Hoffmann-Campo*

Membros:

*Álvaro Manuel Rodrigues Almeida  
Geraldo Estevam de Souza Carneiro  
Ivan Carlos Corso  
José de Barros França Neto  
Léo Pires Ferreira  
Manoel Carlos Basso  
Norman Neumaier  
Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite*

Supervisor editorial:

*Odilon Ferreira Saraiva*

Normalização bibliográfica:

*Ademir Benedito Alves de Lima*

Editoração eletrônica:

*Neide Makiko Furukawa*

**1ª Edição**

1ª impressão 08/2003: tiragem: 200 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

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

Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2002: ecofisiologia e biologia molecular / organizado por Clara Beatriz Hoffmann Campo, Odilon Ferreira Saraiva. - Londrina: Embrapa Soja, 2003.  
92p. : 21cm. - (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.217)

1. Soja-Pesquisa. 2. Soja-Ecofisiologia. 3. Soja-Biologia molecular. I. Hoffmann Campo, Clara Beatriz. II. Saraiva, Odilon Ferreira. III. Título. IV. Série.

CDD 633.34072

© Embrapa 2003

## ***Apresentação***

“Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja” é uma publicação anual, onde os pesquisadores relatam os principais resultados e avanços obtidos, no último ano, em seus projetos de pesquisa e de transferência de tecnologia em soja, girassol e trigo. Tem como principal objetivo registrar nossa memória técnica e informar pesquisadores, professores, assistência técnica e demais interessados sobre o andamento das pesquisas durante a última safra. Muitos desses resultados são oriundos de trabalhos em andamento e, portanto, ainda não conclusivos. Sendo assim, a utilização das informações contidas nesta publicação deve ser feita com cuidado. As tecnologias prontas para utilização à campo são discutidas em reuniões específicas e repassadas para a assistência técnica e para os produtores rurais, como Sistema de Produção ou outras publicações das séries Documentos ou Circular Técnica, as de caráter emergencial são divulgadas na forma de Comunicado Técnico e os resultados de interesse para a comunidade científica são publicados em revistas periódicas especializadas, de alcances nacional e internacional.

Para facilitar o manuseio, a publicação foi dividida em nove volumes, contemplando os resultados dos projetos de uma área específica de conhecimento ou de áreas correlatas. O presente volume apresenta os resultados obtidos em 2002, nas áreas de Ecofisiologia e Biologia Molecular.

***José Renato Bouças Farias***

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Embrapa Soja*



## **Sumário**

<b>1 GENÉTICA APLICADA AO MELHORAMENTO DA SOJA</b> .....	<b>7</b>
1.1 Identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças (04.2000.322-01) .....	8
1.2 Estudo da diversidade genética de patógenos de soja (04.2000.322-02) .....	21
1.3 Caracterização do germoplasma ativo de soja com marcadores moleculares tipo AFLP e Microsatélites (04.2000.322-03) .....	27
1.4 Genética quantitativa aplicada ao melhoramento da soja: diversidade genética e resistência a doenças (04.2000.322-04) .....	32
1.5 Transformação de plantas de soja por biobalística com genes de interesse (04.2000.322-05) .....	39
<b>2 MAXIMIZAÇÃO DO APROVEITAMENTO DAS DISPONIBILIDADES CLIMÁTICAS PELA SOJA</b> .....	<b>47</b>
2.1 Bases agronômicas e fisiológicas das respostas da soja às condições hídricas (04.2000.331-01) .....	49
2.2 Bases agronômicas e fisiológicas das respostas da soja às condições térmicas e fotoperiódicas (04.2000.331-02) .....	59
2.3 Identificação, clonagem e seqüenciamento de genes diferencialmente expressos em resposta às variações climáticas em soja (04.2000.331-03) .....	75

2.4	Estratégias para amenizar impactos decorrentes das adversidades climáticas (04.2000.331-05) .....	79
2.5	Modelos de simulação do desenvolvimento da cultura da soja em resposta às variáveis do ambiente (04.2000.331-06) .....	81
3	ZONEAMENTO DE RISCO CLIMÁTICO NO BRASIL .....	87
3.1	Caracterização da aptidão climática de regiões para o cultivo de soja no Brasil (01.2000.051-03) .....	88



## GENÉTICA APLICADA AO MELHORAMENTO DA SOJA

**Projeto:** 04.2000.322    **Líder:** Carlos Alberto Arrabal Arias

**Nº de subprojetos que compõem o projeto:** 05

**Unidades/Instituições participantes:** Embrapa Soja; BIOAGRO (Universidade Federal de Viçosa), Viçosa, MG; Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF; Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, São Paulo, SP; Milenia Biotecnologia & Genética Ltda, Londrina, PR

Desde os primórdios da agricultura, o homem procura melhorar as plantas com o objetivo de obter maiores quantidades de alimentos. O melhoramento genético moderno está baseado na existência de variabilidade genética e na possibilidade de se ter acesso a ela e se fundamenta principalmente em seleção de tipos superiores em populações naturais ou populações criadas artificialmente. Para dar suporte ao programa de melhoramento, utilizando as mais modernas técnicas disponíveis em genética, o projeto tem como objetivos específicos: auxiliar o programa na identificação de genótipos com genes de resistência a doenças, com ênfase para a mancha parda e nematóides de cisto (NCS) e de galhas; incrementar o conhecimento da diversidade genética de fitopatógenos; identificar e incorporar genes de interesse no germoplasma de soja; e dar subsídios genéticos para aumentar a eficiência na escolha de genótipos parentais e para armazenar o máximo de variabilidade genética no banco ativo de germoplasma (BAG).

Para atender a esses objetivos propostos, foram desenvolvidos cinco subprojetos, que tiveram início no ano de 2000 e término no final de 2002, cujos resultados serão relatados à seguir:

## 1.1 Identificação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência a doenças (04.2000.322-01)

João Flávio Veloso Silva; Maurílio Alves Moreira<sup>1</sup>; Carlos Alberto Arrabal Arias;  
Álvaro Manuel Rodrigues Almeida; José Tadashi Yorinori;  
Romeu Afonso de Souza Kiihl<sup>2</sup>

As perdas na produção brasileira de soja causadas pela ocorrência de doenças vêm aumentando. Em 1994, elas somaram US\$1.269.485.000 e, em 2000, chegou a US\$1.388.047.000. A avaliação tradicional de plantas, visando a seleção dos genótipos resistentes apresenta alguns inconvenientes. Nesse contexto, este subprojeto tem como objetivos: Identificar marcadores moleculares ligados a genes da soja que conferem resistência ao nematóide de cisto da soja (NCS), *Heterodera glycines*; identificar marcadores moleculares ligados a genes da soja que conferem resistência ao nematóide de galhas, *Meloidogyne javanica*; e identificar marcadores moleculares ligados a genes da soja que conferem resistência à mancha parda, *Septoria glycines*.

### 1.1.1 Nematóide de cisto da soja (*Heterodera glycines*)

Para o NCS, várias regiões do genoma contendo genes de resistência já foram identificadas em trabalhos desenvolvidos nos Estados Unidos. Dessas, duas se destacaram como sendo importantes no controle da resistência, uma localizada no grupo de ligação A2 e outra no grupo de ligação G. Essas regiões estão mapeando genes de resistência para as raças 3 e 6 do NCS. Recentemente, em trabalhos desenvolvidos na Embrapa Soja, foi identificada uma terceira região, localizada no grupo de ligação D2, que contém genes de resistência às raças 9 e 14 do NCS. Também foram mapeadas duas regiões que conferem resistência à raça 3. A existência de vários genes de resis-

---

<sup>1</sup> BIOAGRO - Universidade Federal de Viçosa

<sup>2</sup> Consultor da Embrapa Soja

tência e o aparecimento de novas raças têm justificado o mapeamento de outros genes de resistência.

A cultivar Hartwig, originada do cruzamento da PI 437654 x Forrest, era considerada, até então, fonte de resistência a todas as raças de NCS e utilizada em vários estudos visando o melhoramento da soja. Entretanto, no ano de 1998, no município de Sorriso, Estado do Mato Grosso, foi identificada uma população do nematóide de cisto, classificada como raça 4, mas que foi capaz de se reproduzir na cultivar Hartwig. Essa nova raça foi denominada, então, de raça 4+, a qual na PI 437654, fonte de resistência da cultivar Hartwig, não foi capaz de se desenvolver. Diante disso, este trabalho teve como objetivo a identificação de marcadores RAPD e microsátélites ligados à resistência de *Glycine max* (L) Merrill, cultivar Hartwig, ao NCS raça 4+.

Utilizou-se uma população de 121 linhagens descendentes de um retrocruzamento formado pelo parental PI 437654 com a cultivar Hartwig. Sementes  $F_{2,3}$  dessas 121 linhagens foram semeadas juntamente com os parentais, em casa-de-vegetação, para a obtenção de tecido vegetal para a extração de DNA e também para a multiplicação de sementes para o ensaio com o NCS.

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação com sete repetições de cada uma das 121 linhagens e das diferenciadoras, em vasos de argila. Em cada vaso, foi deixada apenas uma plântula para avaliação individual. Oito dias após a semeadura, 2mL da suspensão de ovos de NCS raça 4+ foram inoculados em cada plântula. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação por 30 dias. Foi determinado o número de fêmeas e cistos e o índice de parasitismo (I) para cada planta comparado ao padrão de suscetibilidade Lee-68.

Os testes com as diferenciadoras confirmaram tratar-se da raça 4+. O número de genes envolvidos na resistência ao NCS, raça 4+, na população de soja estudada, foi estimado com base nos resultados das 121 linhagens  $F_3$ ; a média de cada linhagem foi utilizada como valor fenotípico de uma população  $F_2$ , pois a avaliação de plantas individuais não fornece estimativa confiável do valor fenotípico. Na Tabela 1.1, encontram-se listadas a média do número de fêmeas e a reação encontrada para

**TABELA 1.1. Médias do número de fêmeas e reação encontradas para cada uma das 121 linhagens inoculadas com o NCS raça 4+.**

Amostras	Média	Reação	Amostras	Média	Reação	Amostras	Média	Reação
P 6-9	0,00	R	P 5-2	68,50	S	P 3-5	156,00	S
P 5-21	3,00	R	P 3-14	72,40	S	P 2-4	156,50	S
P 4-7	3,86	R	P 5-18	75,43	S	P 2-18	158,86	S
P 4-3	4,43	R	P 4-14	75,57	S	P 2-15	159,50	S
P 1-23	8,00	R	P 3-6	76,71	S	P 2-16	159,57	S
P 3-16	9,20	R	P 4-5	77,00	S	P 5-6	161,00	S
P 2-8	9,43	R	P 1-11	78,57	S	P 1-22	165,50	S
P 5-24	10,43	R	P 5-23	80,00	S	P 2-19	165,50	S
P 1-16	11,00	R	P 3-10	80,57	S	P 1-15-	169,29	S
P 3-20	13,83	R	P 4-4	83,00	S	P 2-12	170,00	S
P 2-13	13,86	R	P 1-17	83,29	S	P 5-13	171,29	S
P 5-16	16,17	R	P 2-20	84,57	S	P 2-22	174,00	S
P 6-5	16,50	R	P 6-6	85,17	S	P 1-2	175,14	S
P 5-10	17,00	R	P 5-12	85,43	S	P 5-14	177,80	S
P 3-11	19,71	R	P 1-9	86,43	S	P 3-13	180,57	S
P 1-4	20,00	R	P 2-5	86,57	S	P 3-8	181,57	S
P 3-21	21,14	R	P 3-1	87,29	S	P 3-18	185,57	S
P 2-2	22,00	R	P 2-21	88,71	S	P 3-23	186,00	S
P 6-2	24,29	R	P 3-7	91,29	S	P 5-9	190,83	S
P 4-1	25,14	R	P 1-20	91,86	S	P 1-3	194,00	S
P 2-11	25,33	R	P 5-11	92,00	S	P 5-7	197,29	S
P 5-19	26,57	R	P 6-3	92,33	S	P 4-2	200,14	S

Continua...

...Continuação Tabela 1.1

Amostras	Média	Reação	Amostras	Média	Reação	Amostras	Média	Reação
P 5-20	35,25	R	P 5-1	93,86	S	P 4-12	201,71	S
P 1-10	36,86	S	P 6-1	95,29	S	P 5-8	203,57	S
P 3-9	39,14	S	P 2-23	98,71	S	P 2-7	203,86	S
P 1-5	40,29	S	P 3-12	100,43	S	P 3-15	207,50	S
P 5-25	42,00	S	P 4-13	102,71	S	P 5-15	217,43	S
P 1-7	48,40	S	P 6-4	103,57	S	P 1-13	232,00	S
P 5-22	50,57	S	P 2-6	104,14	S	P 3-3	247,71	S
P 2-14	50,86	S	P 4-10	104,71	S	P 1-6	250,57	S
P 6-7	53,57	S	P 3-2	107,67	S	P 1-24	260,20	S
P 6-11	54,43	S	P 2-3	109,86	S	P 3-17	274,14	S
P 2-1	55,80	S	P 1-21	117,57	S	P 6-8	334,29	S
P 5-4	56,29	S	P 3-24	119,43	S	P 1-12	376,17	S
P 1-8	56,71	S	P 5-17	121,50	S	P 3-22	399,00	S
P 4-8	58,14	S	P 1-19	132,29	S			
OP 4-9	58,14	S	P 3-19	135,43	S			
P 2-9	61,86	S	P 6-10	139,86	S			
P 2-10	61,86	S	P 2-17	141,29	S			
P 5-3	63,43	S	P 3-4	143,86	S			
P 1-1	64,71	S	P 4-6	145,43	S			
P 1-18	66,71	S	P 1-14	152,71	S			
P 5-5	68,43	S	P 2-24	154,17	S			

cada uma das 121 linhagens estudadas. Das 121 linhagens testadas, foi obtida uma proporção de 23:98 (resistentes: suscetíveis), ou seja, 3:13. Com base nesses resultados, a hipótese mais aceitável estatisticamente, com probabilidade de 94% (qui-quadrado 0,0052), foi a de que dois genes epistáticos, um dominante e um recessivo, estariam controlando a resistência ao NCS, raça 4+, no cruzamento Hartwig X PI 437654.

Para a análise molecular, foram testados 1000 *primers* decâmeros (RAPD) da Operon Technologies e 270 *primers* de microsatélite, selecionados de regiões do genoma da soja. Os *primers* que apresentaram polimorfismos entre os parentais resistente e suscetível foram testados nas 121 linhagens. Dos 1000 *primers* testados entre os parentais, somente 50 apresentaram polimorfismo, ou seja, apenas 5% desses *primers* foram analisados na população. No caso de microsatélite, apenas 32 *primers* mostraram-se polimórficos, ou seja, 11,8% do total de *primers* analisados.

Análises de regressão e de variância, com nível de significância  $P < 0,1$ , foram utilizadas para verificar quais marcadores estavam associados com a resistência ao NCS, utilizando-se como parâmetro a variação fenotípica encontrada na população  $F_{2,3}$  estudada.

Foram encontradas duas regiões genômicas que mostraram significativa associação com a resistência ao NCS raça 4+. Essas regiões encontram-se em grupos de ligação distintos. Uma dessas regiões é definida entre os marcadores Satt187 e AG20, explicando grande proporção da variação fenotípica (aproximadamente 60%). Comparando esses dados com o mapa genético da soja, o marcador Satt187 pertence ao grupo de ligação A2. Segundo a literatura, está proximoamente ligado a um gene de resistência ao NCS, o *Rhg4*. Diante disso, supõe-se que este marcador esteja bem próximo a um gene de efeito maior relacionado à resistência ao NCS, pois há apenas 2% de recombinação.

A outra região encontrada, é definida entre os marcadores H4a e M17, explicando menor porção (aproximadamente 19%), mas sendo também considerada significativamente associada à resistência ao NCS

raça 4+. Dentro do mapa de ligação construído, esses *primers* encontram-se ligados ao *primer* de microsátélite Satt191 que, de acordo com o mapa genético da soja, pertence ao grupo de ligação G.

Com base nos resultados acima citados, provavelmente dois QTLs estariam relacionados com a resistência ao NCS raça 4+, um com efeito maior, localizado no grupo de ligação A2, e outro com efeito menor, localizado no grupo de ligação G.

Os demais marcadores selecionados Satt516, Satt142 e Satt228 explicam muito pouco da variação fenotípica, cerca de 2%, 4% e 2%, respectivamente.

Para verificar a interação entre os marcadores, foram realizadas análises de variância onde as marcas selecionadas foram incluídas duas a duas com interação entre elas. Dentre todas as combinações envolvendo os seis marcadores, verificou-se que aquelas envolvendo o marcador produzido pelo *primer* Satt 187 apresentaram melhor resultado, sendo o valor de  $R^2$  de até 56%. Entretanto, esse aumento não é muito significativo, visto que a utilização do marcador produzido pelo *primer* Satt187 sozinho apresenta um  $R^2$  igual a 53%.

Na ausência do marcador produzido pelo *primer* Satt187, a combinação dos marcadores AG20 e H4a ( $R^2 = 20\%$ ), ou Satt228 e H4a ( $R^2 = 18\%$ ) poderia até ser utilizada.

Uma aplicação viável para a utilização da combinação desses marcadores, principalmente com as associações envolvendo os *primers* Satt187 e H4a, seria a de monitorar os cruzamentos, já que marcam duas regiões distintas, podendo, assim, acompanhar a segregação dos genes envolvidos. Marcadores genéticos ligados próximos a importantes genes, podem ser utilizados para indiretamente selecionar alelos favoráveis de forma mais eficiente do que pela seleção fenotípica direta.

A eficiência de seleção foi também calculada para verificar qual seria a margem de acerto, caso uma seleção plantas seja feita para a característica em questão, baseada nos marcadores adquiridos. Os resultados obtidos tanto na análise de variância como na eficiência de seleção foram semelhantes. Foi verificado dos marcadores analisados, que o

que mostrou a maior eficiência foi o marcador Satt187, com 99,2%, seguindo dos marcadores Satt142, com 74%, Satt516, com 73% e Satt228 com 62%. O marcadores produzidos com os *primers* AG20 e H4a apresentaram menor eficiência de seleção, 40% e 44%, respectivamente. Como esses *primers* estão ligados ao alelo de suscetibilidade, a sua menor eficiência pode ser explicada pelo fato do alelo de suscetibilidade ser recessivo.

Outros estudos com marcadores genéticos e análise de ligação e mapeamento relatam a presença de dois locos na PI 437654, ligados aos grupos A e G onde, juntos, dão a resistência completa do NCS raça 3. Segundo estes resultados, no grupo A2, encontra-se o gene Rhg4, que estaria relacionado com a resistência ao NCS e que se localiza próximo ao loco *i* (que confere coloração preta ao tegumento da soja). No grupo G, encontram-se três genes rhg1, rhg2 e rhg3, que segundo a literatura, conferem resistência parcial a diversas raças.

Diante desse contexto e com basea nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que nos grupos de ligação A2 e G do mapa genético da soja estaria localizado um loco multialélico conferindo resistência ao NCS a algumas raças e, dentre essas, a raça 4+ e que, possivelmente, a cultivar Hartwig não tenha herdado todos esses alelos da PI 437654, já que esta continua resistente a todas as raças de nematóide, inclusive à raça 4+. Outra possibilidade é que a cultivar Hartwig perdeu alguns desses alelos durante os retrocruzamentos com a cultivar Forrest.

Também existe a possibilidade da existência, dentro desses grupos de ligação, de *cluster* gênico, contendo um intervalo genômico distinto mas altamente ligado, com genes de resistência ao NCS. O fato de que a existência de *cluster* gênico já ter sido documentada em vários patossistemas, inclusive no patossistema *Heterodera glycines*-soja. E, do mesmo modo que na hipótese anterior, a quebra da resistência da cultivar Hartwig, estaria relacionada com a não transferência total desses genes, vindos do parental PI 437654 ou com a perda de alguns desses alelos durante os retrocruzamentos com a cultivar Forrest.



### 1.1.2 Nematóide de galha (*Meloidogyne javanica*)

Para a realização deste estudo, foram utilizados como parentais os genótipos de soja BRS 133 (susceptível) e PI 595099 (resistente). A partir desse cruzamento, obtiveram-se 25 linhagens altamente resistentes e 26 de elevada susceptibilidade ao *M. javanica*.

Em casa-de-vegetação, essas gerações foram avaliadas quanto à resistência ao nematóide. A população de *M. javanica* utilizada foi originária do Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Embrapa Soja) e foi multiplicada em plantas de soja cv. Doko durante todo o período das inoculações, de modo a se dispor sempre de ovos com boa viabilidade.

As plantas foram cultivadas em tubetes plásticos (4,5 x 19 cm), contendo substrato esterilizado. Após três a quatro dias da emergência, foram inoculadas individualmente com 3.000 ovos de *M. javanica*. A avaliação foi feita aos 30 dias após a inoculação, contando-se o número de galhas/planta. Plantas com maiores níveis de resistência ou suscetibilidade foram utilizadas para as amplificações do DNA.

O DNA foi extraído das populações resistente, susceptível e dos parentais e sua concentração foi estimada utilizando-se as leituras espectrofotométricas a 260 nm e 280 nm.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Perkin Elmer 9600 e foram constituídas de 3,0  $\mu$ L de DNA molde (10 ng/ $\mu$ L); 10,8  $\mu$ L de água MilliQ; 2,0  $\mu$ L de tampão de reação 10x (100 mM de Tris-HCl pH 8,3; 500 mM de KCl e 400  $\mu$ L de água milliQ); 1,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1,0  $\mu$ L de desoxinucleosídeotrifosfato (2,5 mM); 0,2  $\mu$ L de Taq-polimerase (5 U/ $\mu$ L) e 1,0  $\mu$ L dos primers F e R (Research Genetics Inc.-Map Pairs™), completando um volume final para cada amostra de 20  $\mu$ L. Esses passos foram repetidos para cada combinação genótipo x marcador microssatélite.

Os programas de termociclagem foram compostos de desnaturação inicial a 94°C, por sete minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94°C, por um minuto, anelamento a 50°C, por um minuto e extensão a 72°C, por dois minutos. Um ciclo de 72°C, por sete minutos foi feito ao final. O produto da amplificação foi resolvido em gel de 0,7% de agarose

(GibcoBRL) e 1,15% de aditivo clarificador de agarose (Synergel), preparado com TBE 1x (108g tris base, 55g ácido bórico e 40 mL EDTA 0,5M pH 8,0) e corado com brometo de etídio (10mg/mL). A aquisição das imagens foi feita utilizando o Sistema Kodak Digital DC 290.

Os 93 primers utilizados foram previamente escolhidos a partir de banco de dados de DNA de soja e estão localizados nos 20 grupos de ligação da soja, quatro em cada grupo, com exceção dos grupos D1b + W e F, onde foram escolhidos seis e 15 *primers*, respectivamente. Atenção maior foi dada ao grupo de ligação F, uma vez que nesse grupo foram detectados QTLs de resistência a *M. javanica*.

Análises de variância foram realizadas para todas as combinações entre os marcadores polimórficos e o número de galhas, obtido com a média da família F3 da população resistente, como efeitos principais. Todas as análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa de computador SAS.

O efeito de cada marca molecular polimórfica sobre a resistência foi considerado significativo, quando a probabilidade fosse menor que 1% ( $P < 0.01$ ), pelo teste F obtido na análise de variância. Marcadores com probabilidades entre 1% e 10% ( $0.01 < P < 0.10$ ) também foram selecionados para verificação de seus efeitos sobre a população de plantas suscetíveis.

O mapeamento e a análise de QTL (locos de caracteres quantitativos) foram realizados utilizando os programas MAPMAKER EXP e MAPMAKER QTL, respectivamente.

Após análise de QTL realizada sobre os grupos de ligação, os fragmentos gerados por marcadores microssatélite que apresentaram efeito significativo sobre o número de galhas foram clonados e seqüenciados.

A partir do fragmento amplificado, o DNA foi purificado e, a seguir, células de *Escherichia coli* (cepa XL-blue) foram transformadas via eletroporação, utilizando o plasmídeo pGEM Easy Vector (Promega Corp.). O local de inserto no vetor de clonagem, inativa a região codante (gene lacZ) para um a-peptídeo, componente da enzima b- galactosidase, comprometendo a atividade da mesma. Isso permite que os clones

recombinantes sejam identificados diretamente pela coloração da colônia, pois as que recebem o inserto (transformadas) apresentam coloração branca enquanto as colônias sem o inserto (não-transformadas) são azuis, quando cultivadas em meio de cultura contendo IPTG (isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside) e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside). Esse vetor possui ainda gene para resistência à ampicilina, o que auxilia na seleção das colônias recombinantes, pois a bactéria não transformada é sensível ao antibiótico.

Após a clonagem, os fragmentos de interesse foram seqüenciados em seqüenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied BioSystem). As seqüências finais foram submetidas à análise no NCBI Blast, a fim de verificar sua homologia com genes disponíveis em bancos de dados (e.g. Gene Bank).

As concentrações do DNA medidas para os parentais BRS 133 e PI 595099 foi de 122 e 123 ng/mL, respectivamente, enquanto que para os materiais resistentes variou entre 74 a 207 ng/mL (média de 125,0 ng/mL) e para os materiais suscetíveis entre 29 e 832 ng/mL (média de 184,6 ng/mL).

Entre os 93 locos analisados, os marcadores de microssatélite Satt 155, Satt 236, Satt 509, Satt 202, Satt 266, Satt 290, Satt 543, Satt 423, Satt 554, Satt 192, Satt 418, Satt 584, Satt 041, Satt 434, Satt 571, Sat\_128, Sat\_132, Soy HSP 176 e Satt 114 foram polimórficos para os parentais BRS 133 e PI 595099 e todos os 19 locos foram utilizados para amplificar a população resistente.

A análise sobre a amplificação dos 19 marcadores polimórficos, realizada sobre a população resistente, indicou cinco marcas significativas ( $P < 0,10$ ): Satt 571, Sat\_128, Sat\_132, Soy HSP 176 e Satt 114, pertencentes, respectivamente, aos grupos de ligação I, B1, O e F.

Essas marcas foram testadas sobre a população suscetível e dois marcadores, Soy HSP 176 e Satt 114, do mesmo grupo de ligação, confirmaram sua significância sobre o caráter ( $P < 0,05$ ).

Utilizando o programa MAPMAKER QTL, foi realizada análise sobre as marcas do grupo de ligação F e os resultados indicaram a presença de

pelo menos um gene localizado próximo ao marcador Soy HSP 176, com um Lod de 27.5. Toda a extensão coberta pelos marcadores Satt 114 e Soy HSP 176, distantes em 8,3 cM, apresentou Lod's elevados, variando de 22,6 a 27,5.

A análise das seqüências resultantes do seqüenciamento do fragmento gerado pelo marcador microssatélite Soy HSP 176, presente nos indivíduos suscetíveis e ausente nos resistentes, mostrou homologia de 98% com uma proteína de choque térmico presente na soja; a seqüência analisada consistia em 95 pb, incluindo a seqüência dos primers utilizados.

### 1.1.3 Mancha Parda (*Septoria glycines*)

A procura de marcadores para resistência à mancha parda foi feita sobre a população  $F_{2,3}$  derivada do cruzamento FT-2 x Davis e desenvolvida na Embrapa Soja. A primeira avaliação foi realizada em casa-de-vegetação, na safra 2000/2001, incluindo 20 repetições de cada parental e cinco repetições de cada uma das 116 progênies  $F_3$ . A distribuição de freqüências para o nível de infecção médio nas folhas das famílias  $F_3$  aproximou-se da distribuição normal, não sendo possível a separação de classes fenotípicas bem definidas, indicando tratar-se de um caráter quantitativo. A herdabilidade para o caráter variou de 12,4% a 50,65% para os trifólios avaliados individualmente, indicando que é possível obter respostas à seleção para resistência à mancha parda.

Outra avaliação foi feita com as famílias F4 do mesmo cruzamento, em casa-de-vegetação, sob um delineamento inteiramente casualizado, avaliando-se seis plantas em cada família. A semeadura foi feita em setembro de 2001 (safra 2001/02) em vasos de plástico, inoculando-se o patógeno 15 dias depois. Em cada vaso, foi sempre incluída uma planta da cultivar Davis, suscetível, considerada como controle. Aos 20, 24, 26, 28, 33 e 40 dias após a inoculação, foi avaliado o nível de infecção na folha unifoliolada, utilizando escala diagramática com níveis de área foliar lesionada variando de 0% a 75%. A maior diferença

entre os parentais ocorreu na última avaliação (40 dias) com médias de 1,10 e 67,7 para FT-2 e Davis, respectivamente (Tabela 1.3). As avaliações para *S. glycines* foram realizadas conforme descrito no subprojeto 04.2000.322-04.

Os marcadores microssatélites foram selecionados com base em sua posição nos mapas de ligação disponíveis para a soja. Procurou-se testar um número eqüitativo de marcas por grupo de ligação. As marcas que produziram polimorfismo nos genótipos parentais foram testadas na população segregante. Foram realizadas a extração, quantificação e reação de amplificação, com primers microssatélites para os DNA's das folhas F2. O resultado foi observado através de luz-ultravioleta e fotografado. Um total de 170 primers de microssatélite foram testados nos parentais. Destes, somente 18 foram polimórficos nos pais e utilizados para avaliar a população segregante (Tabela 1.2).

**TABELA 1.2. Primers polimórficos testados para a população segregante.**

<i>Primer</i>	Grupo	<i>Primer</i>	Grupo
Satt 329	A2	Satt 252	F
Satt 187	A2	Satt 235	G
Satt 233	A2	Satt 570	G
Satt 509	B1	Satt 285	J
Satt 577	B2 + p	Satt 380	J
Satt 307	C2	Satt 475	K
Satt 184	D1a + q	Satt 182	L
Satt 436	D1a + q	Satt 143	L
Satt 269	F	Satt 584	N

Em posse dos dados fenotípicos e de marcas para cada planta da população, foram realizadas análises de variância e de regressão para cada marca, procurando marcas significativas para o caráter, com potencial para serem utilizadas na seleção de genótipos resistentes. No primeiro ensaio, análises de variância univariadas, utilizando cada marca como

variável classificatória, não detectaram significância ( $p < 0,05$ ) para nenhum dos marcadores. Contudo, alguns deles foram levados em consideração por possuírem efeitos aditivos ou de dominância com probabilidade abaixo de 13%. Nesse sentido, destacaram-se os marcadores Satt 509, Satt 577 e Satt 584, com presença de efeitos aditivos e de dominância, tanto para a resistência como para a suscetibilidade do caráter. Pela análise bivariada, foram detectados dois casos de interação entre os marcadores, indicando que há epistasia, ou seja, que uma marca é influenciada pela outra, o que aumenta a complexidade do caráter estudado.

No segundo ensaio (safra 2001/02), houve significância apenas para os marcadores Satt 436 e Satt 570 (Tabela 1.3), os quais explicaram 6,2% e 5,2% da variabilidade do caráter, respectivamente. O Satt 436 pertence ao grupo de ligação D1a + q, onde já foi testada outra marca, e apresentou efeito de dominância para resistência, ou seja, os dois homozigotos apresentaram médias similares e altas para o nível de infecção na folha, o que impede seu uso para seleção. O marcador Satt 570 (grupo G) apresentou menor média para o genótipo com alelos vindos do parental resistente, aumentando a importância e o potencial de uso para fins seletivos. O marcador Satt 187 (grupo A2), embora não significativo, apresentou probabilidade relativamente baixa ( $p = 0,14$ ). Nesse grupo de ligação (A2), já houve duas outras marcas

**TABELA 1.3.** Médias do nível de infecção na folha com mancha parda, para os parentais e as combinações genotípicas obtidas para os marcadores SSR com probabilidade abaixo de 13% de estarem afetando o caráter em soja.

Marcas	Grupo	Genótipos			P%	R <sup>2</sup> %
		M1M1 FT-2	M1M2	M2M2 Davis		
Parentais	-	1,10	-	67,7	-	-
Satt436	Da1 + q	10,8	5,0	8,1	2,7	6,2
Satt187	A2	6,8	6,4	10,9	13,8	3,6
Satt570	G	4,8	10,0	7,0	5,2	5,2

polimórficas e não significativas, indicando que provavelmente o efeito do gene envolvido deva ser muito pequeno.

Observa-se que houve interação entre marcas x ambientes, pois os marcadores importantes em cada ambiente não foram os mesmos, indicando a complexidade da avaliação fenotípica, também em consequência da interação genótipo x ambiente. Mais avaliações fenotípicas sobre essas progênies serão necessárias para diminuir esse efeito. Mais marcas deverão ser estudadas, principalmente no grupo G, onde houve significância, e em outros grupos como B1, B2 e N, com significâncias baixas e para os grupos A1, C1, E, e H, onde houve pouco ou nenhum polimorfismo com o conjunto de marcas estudadas.

Este trabalho terá continuidade como parte da tese de doutorado do pesquisador Rodrigo Luis Brogin pela ESALQ/USP em parceria com a Embrapa em projetos futuros.

#### RESUMO

## 1.2 Estudo da diversidade genética de patógenos de soja (04.2000.322-02)

Álvaro Manuel Rodrigues Almeida; Fernanda F. Piuga<sup>1</sup>; Thalita G. Oliveira<sup>1</sup>; Silvana Regina Rockenbach Marin; Paula Z.R. Ribeiro do Valle<sup>2</sup>; Luis Carlos Benato; Mauro Caetano Pinto; Nilson Valentin

A produtividade da soja é função de diferentes fatores, entre eles, a ocorrência de doenças. A geração de cultivares procura associar características agrônomicas desejáveis e resistência a doenças. Para isso, é necessário que haja informações quanto à descrição de genes de resistência a determinado patógeno, com posteriores testes-desafio, onde submetem-se as linhagens à infecção pelo patógeno desafiador. Para que o teste tenha máxima eficiência, é necessário que o patógeno seja

---

<sup>1</sup> Estagiária Embrapa Soja/UNOPAR

<sup>2</sup> Estagiária Embrapa Soja/UEL

utilizado com a máxima variabilidade possível, de modo a evitar possíveis escapes e conclusões errôneas.

Para isso, é necessário determinar a variabilidade genética do patógeno, através de testes de patogenicidade. Essa técnica requer o uso de método adequado de inoculação, sistema de avaliação e grande espaço de trabalho. Uma solução é utilizar métodos moleculares, os quais determinam variabilidades genéticas entre isolados de um mesmo patógeno. Essa variabilidade é determinada utilizando o DNA total, incluindo inúmeros genes que não possuem associação com patogenicidade. Por isso, é necessária uma etapa adicional que procure identificar variabilidade na patogenicidade. Este subprojeto procurou identificar as diversidades de isolados brasileiros de *Cercospora kikuchii*, *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, *Sclerotium rolfsii*, *Corynespora cassiicola* e *Macrophomina phaseolina*. Os resultados obtidos demonstraram que todos os patógenos utilizados nos processos de seleção de cultivares apresentaram diversidade genética, em maior ou menor escala, indicando que a estratégia de utilizar mistura de isolados constitui maneira adequada para evitar que as cultivares tenham sua resistência quebrada prematuramente.

Isolados de um mesmo organismo nem sempre apresentam morfologia idêntica. É comum isolados do mesmo organismo apresentarem micélio de coloração e aspecto diferente, o que acaba por confundir o pesquisador e exigir testes adicionais de taxonomia. Através de métodos moleculares que utilizam DNA total e DNA ribossômico essa tarefa passou a ter uma nova ferramenta auxiliar.

No ano de 2001/02, estudaram-se as diversidades genéticas de *Cercospora kikuchii* e *Microsphaera diffusa*. Outros oídios coletados de folhas de *Emilia sonchifolia* (L.) DC., *Sonchus oleraceus* L., girassol, feijão e caupí também foram utilizados.

No caso de *C. kikuchii*, sementes com mancha púrpura coletadas em diferentes regiões do Brasil foram utilizadas para isolamento do fungo *C. kikuchii*. Setenta e cinco colônias foram isoladas e desenvolvidas em meio líquido de BD obtendo-se micélio para extração de DNA total. A seguir, procedeu-se à amplificação por RAPD, utilizando-se *primers*



randômicos. As avaliações das ampliações foram utilizadas para determinação de agrupamentos, de acordo com os coeficientes de similaridade (método Dice). Os isolados foram agrupados em seis grupos, demonstrando grande diversidade genética entre eles (Fig. 1.1). Isolados mais patogênicos foram associados ao teor de cercosporina, determinada em meio alcalino (Tabela 1.4), indicando que o método pode ser utilizado na seleção de isolados mais patogênicos. Não se constatou relação entre os agrupamentos e o teor de cercosporina. A preocupação de que outras espécies de *Cercospora* poderiam causar mancha púrpura em sementes foi avaliada através do seqüenciamento das regiões ITS1 e ITS2, incluindo o gene 5,8S. Dezesete isolados, escolhidos aleatoriamente, dentro dos grupos de similaridade foram utilizados para amplificação das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal. Os fragmentos amplificados com os *primers* ITS1 e ITS4 foram purificados, clonados e seqüenciados. As seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com seqüência do GenBank (AF 291708). As homologies variaram de 82% a 100%, provando que todos os isolados coletados de sementes com mancha púrpura pertenciam à espécie *C. kikuchii* (Tabela 1.5). A contra-prova foi feita utilizando a seqüência de um isolado de *C. sojina* obtido de folhas de soja coletadas em Imperatriz (MA). As porcentagens de homologia dos isolados de *C. kikuchii* com o isolado de *C. sojina* variaram de 55% a 78% (Tabela 1.5).

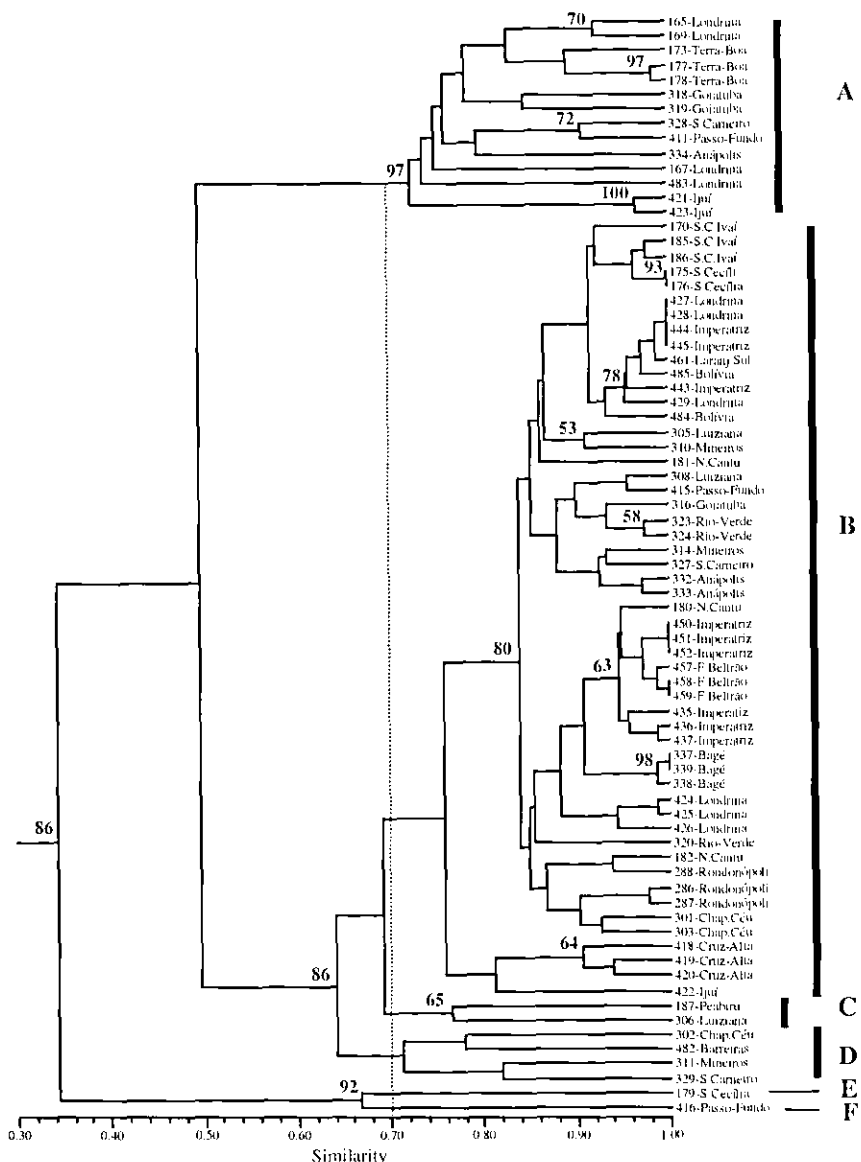


FIG. 1.1. Similaridade genética entre isolados de *Cercospora kikuchii*, originários de diferentes locais do Brasil, com seis grupos. Dendograma obtido através de matriz de distância, utilizando coeficiente de Dice (NTSyst ver. 2.0). Valores representam a porcentagem de ocorrência em 1000 análises bootstrap. Apenas valores iguais ou superiores a 50% foram incluídos.

**TABELA 1.4. Relação entre patogenicidade e teor de cercosporina determinada em quatro isolados de *Cercospora kikuchii* inoculados em cinco genótipos de soja.**

Cultivar	Isolado (teor de cercosporina)				Média
	179 (6.1*)	169 (12.5)	301 (16.9)	444 (33.0)	
IAS-2	1.00A**	1.67A	2.00 B	2.67 B	1.83 B
Davis	1.67A	3.33A	3.00A	4.67A	3.16A
Sambaíba	1.67A	3.67A	3.67A	5.33A	3.58A
Paraná	1.67A	2.67A	3.00A	5.00A	3.08A
Conquista	2.00A	3.00A	3.67A	5.33A	3.50A
Média	1.60c	2.87b	3.07b	4.60a	

\* Teor de cercosporina medido de acordo com Jens et al., (Phytopathology, 79:213-219, 1989).

\*\*1 = 0%-1% área foliar lesionada (AFL); 2 = 2%-5% AFL; 3 = 6%-10% AFL; 4 = 11%-25% AFL; 5 = 26%-50% AFL; 6 = 51% -75% AFL; 7 = > 75% AFL (adaptado de James, 1971).

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, nas colunas, e minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.



### 1.3 Caracterização do germoplasma ativo de soja com marcadores moleculares tipo AFLP e Microssatélites (04.2000.322-03)

Carlos Alberto Arrabal Arias; Ana Lídia Variani Bonato<sup>1</sup>;  
Silvana Regina Rockenbach Marin; Maurílio Alves Moreira<sup>2</sup>;  
Leones Alves de Almeida; Lizandra L. Catteli<sup>3</sup>

À partir da aprovação da Lei de Proteção de Cultivares, tornou-se possível a proteção daquelas cultivares de soja comprovadamente distintas, homogêneas e estáveis (DHE). A determinação da distinguibilidade no DHE e a caracterização genética de cultivares e acessos do banco de germoplasma (BAG) são atividades que podem ser muito beneficiadas com o auxílio de marcadores moleculares. Os objetivos deste subprojeto foram caracterizar molecularmente cultivares e outros acessos do banco de germoplasma de soja e selecionar marcadores com potencial para fins de DHE.

A caracterização molecular de cultivares de soja foi feita com 317 cultivares, liberadas no período de 1962 a 1998, com marcadores AFLP, envolvendo seis combinações de *primers EcoRI/MseI*. Obtiveram-se 394 bandas, sendo 78 polimórficas. Foram calculados os coeficientes de similaridade genética de Nei & Li, que variaram de 0,17 a 0,97, com média de 0,61. As cultivares foram agrupadas pelo método UPGMA, envolvendo todo o grupo. Para facilitar a visualização dos agrupamentos, também foi feito um dendrograma composto por apenas 63 cultivares. Os agrupamentos disponibilizados aos melhoristas podem ser utilizados no planejamento de cruzamentos com maior chance de produzir cultivares. Das atividades de caracterização molecular dos acessos do BAG, foi possível organizar cerca de 2640 acessos com informações sobre origem e caracteres fenológicos, para eleger 700 acessos para a realização deste estudo. Parte desse grupo de acessos,

<sup>1</sup> Embrapa Trigo

<sup>2</sup> BIOAGRO / UFV

<sup>3</sup> Graduação pela UNIFIL

correspondente às cultivares, foi analisada molecularmente até o final de 2002.

Alguns marcadores moleculares, como os microsátélites, apresentam características interessantes, como o fato de poderem ser multialélicos e de apresentarem repetibilidade dos resultados, ideais para esse tipo de trabalho. Com o objetivo de selecionar marcadores microsátélites multialélicos para fins de diferenciação e caracterização de genótipos de soja, 17 cultivares, selecionadas com base nos agrupamentos da análise de AFLP's do objetivo 1, tiveram seus DNAs extraídos e foram submetidos às análises moleculares. Dos 13 pares de *primers* SSR testados, apenas o Satt238 e Satt253 não apresentaram polimorfismo para o grupo de 17 cultivares (Tabela 1.6). Esse fato diminui a possibilidade de uso desses dois marcadores em estudos futuros. Todos os 11 pares de *primers* restantes produziram polimorfismo, com dois ou três alelos moleculares (Tabela 1.7). Esse polimorfismo permitiu diferenciar 15 das 17 cultivares estudadas. Os *primers* utilizados demonstraram ter grande potencial para diferenciação de cultivares de soja. Apenas as cultivares MSBR 19 (Pequi) e Cariri RCH ainda não foram diferenciadas pelo conjunto de bandas disponíveis (Figura 1.2). Esse fato era esperado, pois, geneticamente, elas são muito relacionadas.

Outros *primers* multialélicos foram selecionados com base nos trabalhos realizados em outros subprojetos da Embrapa, principalmente os relacionados a marcadores para resistência a doenças (NCS, nematóides de galhas e mancha parda) e também nos trabalhos realizados pela parceria com o Bioagro da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Dessas seleções, foram identificados mais 19 *primers* multialélicos, os quais somados aos 11 já encontrados, totalizam 30 *primers*.

O conhecimento que vem sendo adquirido sobre o padrão molecular das cultivares e sobre marcadores microsátélites multialélicos já está sendo utilizado no processo de desenvolvimento de cultivares de soja (escolha de parentais com maior ou menor similaridade genética) e de manutenção e caracterização de germoplasma para fins de manutenção do banco de germoplasma e de distinção entre linhagens e cultivares.

TABELA 1.6. Resultados das análises moleculares obtidas com os 13 primers testados sobre as 17 cultivares de soja indicadas para diversas regiões do Brasil. Embrapa Soja. Londrina, PR.

Amostras	Satt242	Satt238	Satt038	Satt266	Satt202	Satt527	Satt253	Satt387	Satt319	Sat_123	Satt114	Satt276	Satt472
MS/BR19 Pequi	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
FT-Cristalina	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
Embrapa 4	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
MGBR-46 Conquista	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
MS/BR-59 Mandi	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
Embrapa 20	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
Nobre (DM Nobre)	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1
MG/BR 68 Vencedora	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0
UFV-06 (Rio Doce)	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
BR-16	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
CD 201	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0
Cariri RHC	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
Emgopa 302	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0
Embrapa 48	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
BRS 133	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Dourados	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0
Embrapa 59	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0

**TABELA 1.7. Primers, amplitude de fragmentos e número de alelos detectados à partir das 17 cultivares de soja. Embrapa Soja. Londrina, PR.**

Primers	Amplitude de fragmentos	Número de alelos
Satt 202	236-343 pb	2
Satt 266	349-376 pb	2
Satt 319	105-125 pb	3
Sat_123	245-324 pb	2
Satt 038	103-117 pb	3
Satt 472	— *	3
Satt 114	50-71 pb	3
Satt 238	133pb	1
Satt 242	128-139 pb	2
Satt 276	240-355 pb	3
Satt 527	—	2
Satt 253	—	1
Satt 387	—	2
Satt 133	169-194 pb	2

\* Ainda não foi possível estimar o tamanho do fragmento.



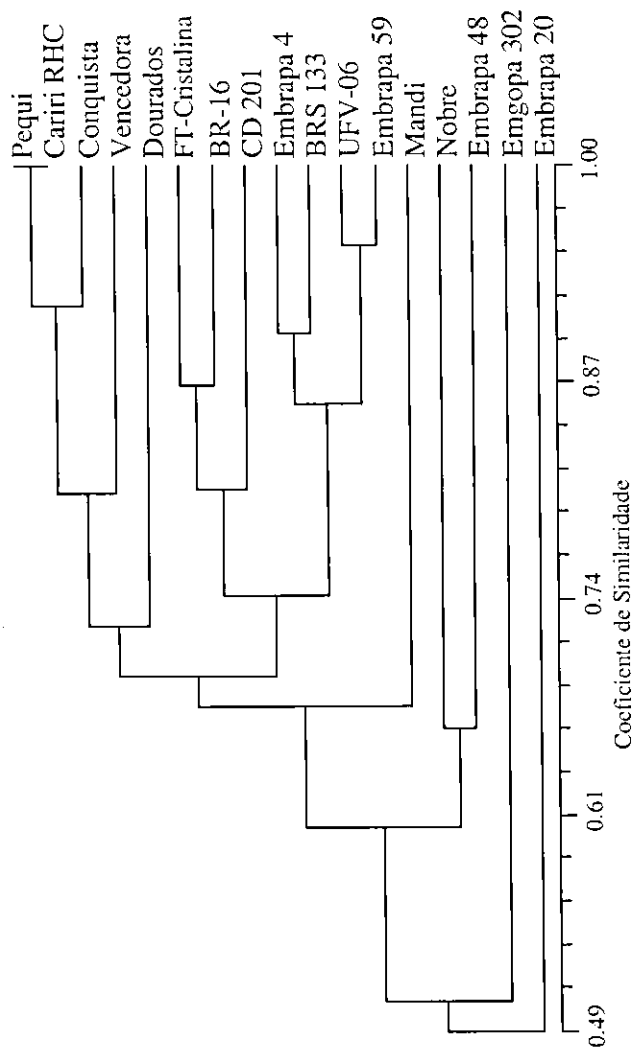


Fig. 1.2. Agrupamentos obtidos após análise com 12 primers de microsátélites e 26 bandas polimórficas sobre 17 cultivares de soja.

## 1.4 Genética quantitativa aplicada ao melhoramento da soja: diversidade genética e resistência a doenças (04.2000.322-04)

Carlos Alberto Arrabal Arias; José Francisco Ferraz de Toledo;  
João Flávio Veloso Silva; Marcelo Fernandes de Oliveira; José Tadashi Yorinori;  
Rodrigo L. Brogin<sup>1</sup>; Cláudio C. Portela<sup>2</sup>; Willyam Stern Porto<sup>3</sup>

Programas de melhoramento genético eficientes precisam contar com informações básicas, como as genealogias dos parentais usados em cruzamentos e tipo de herança dos principais caracteres, para tirar proveito da variabilidade genética. Com o objetivo de facilitar o acesso dos programas de melhoramento à variabilidade genética de caracteres de importância em soja, foram traçados os seguintes objetivos: averiguar a eficiência do uso de marcadores moleculares como estimadores da diversidade genética; estudar a herança da resistência à mancha parda nos estádios iniciais de desenvolvimento da soja; e estudar a herança da tolerância da soja ao nematóide de galha *Meloidogyne javanica*.

### 1.4.1 Divergência genética

No âmbito do subprojeto 04.2000.322-03, têm-se desenvolvido trabalhos com marcadores moleculares tipo AFLP para caracterizar todas as cultivares recomendadas no Brasil e conhecer a distância genética entre elas. Esse trabalho foi desenvolvido pela Dra. Ana Lídia Variani Bonato, atualmente pesquisadora da Embrapa Trigo, como assunto de sua tese de doutorado produzida na ESALQ / USP.

Com o objetivo de averiguar a eficiência do uso de marcadores moleculares para medir a diversidade genética entre genótipos elites de

---

<sup>1</sup> Mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Estadual de Londrina

<sup>2</sup> Bolsista Recém-Doutor pelo CNPq

<sup>3</sup> Bolsista Iniciação Científica pelo CNPq

soja foram selecionadas, com base nesse trabalho, 16 cultivares classificadas em diferentes grupos de divergência. Essas cultivares foram utilizadas para produzir 19 combinações híbridas. Os 16 genótipos parentais e as gerações F2 derivadas de cada combinação híbrida foram semeados em 16/10 e 13/11/2000, os parentais mais as gerações F3 e F4 foram semeados em 15/10 e 15/11/2001, segundo um delineamento inteiramente casualizado com 30 plantas de cada parental e 60 plantas de cada geração F2, na safra 2000/01 e 30 plantas de cada parental e 30 progênies das gerações F3 e F4 (cinco e quatro plantas por progênie, respectivamente) de cada combinação híbrida, na safra 2001/02. Esses materiais foram produzidos em casa-de-vegetação nos invernos imediatamente anteriores à instalação dos experimentos para garantir uniformidade no vigor das sementes. Em todos os experimentos, houve aleatorização individual de plantas (01 planta = 01 cova = 01 parcela). O espaçamento entre covas na linha e entre linhas foi de 20 cm e 1,5 m, respectivamente. Entre cada linha útil foram semeadas duas linhas de bordadura com as sementes remanescentes dos experimentos, resultando no espaçamento final de 0,50 m entre linhas. Esse procedimento foi usado para facilitar a locomoção dentro dos experimentos, necessária para as coletas de dados e para aumentar a densidade e a competição entre plantas.

Nas duas safras, foram avaliados o peso total de grãos, dias para o florescimento e para a maturação, altura de planta na floração e maturação e número de nós. As estimativas das variâncias genéticas aditivas (D) foram obtidas para todas as combinações híbridas para cada uma das épocas de semeadura. Nas tabelas 1.8 a 1.10, estão as estimativas obtidas para os caracteres peso de grãos, dias para a maturação e dias para a floração, respectivamente, para a safra 2001/02. As estimativas de D para outubro e novembro, nas diferentes combinações, variaram bem mais para os caracteres peso de grãos e dias para maturação do que dias para floração. A maior herdabilidade do caráter dias para a floração, permite obter estimativas com valores proporcionalmente similares, nas duas épocas. Pode-se verificar que os cruzamentos com maiores estimativas de D de dias para floração foram os mesmos nas duas épocas de semeaduras (Tabela 1.10). Para

**TABELA 1.8.** Estimativas da variância aditiva (D) para o caráter peso de grãos obtidas para as semeaduras de outubro e novembro, da safra 2001/02, e as distâncias genéticas (DNL) calculadas com base em marcadores AFLP para cada combinação híbrida.

Combinação híbrida	Estimativas de D		DNL
	Outubro	Novembro	
Embrapa 66 x Embrapa 59	38,33 ± 18,23	10,69 ± 16,89	11,10
Pequi x Embrapa 59	159,34 ± 39,49	90,42 ± 30,54	34,40
Embrapa 59 x Conquista	89,62 ± 31,42	107,12 ± 34,81	54,70
FT-2 x Embrapa 59	84,79 ± 25,18	46,45 ± 20,46	52,50
CD 201 x Mandi	360,26 ± 90,49	70,25 ± 33,31	12,70
BR-6 x Pequi	93,27 ± 26,99	46,61 ± 20,58	25,80
Embrapa 47 x BR-16	31,49 ± 14,81	13,70 ± 16,32	20,80
Conquista x Pequi	53,75 ± 30,12	57,86 ± 27,75	52,40
Embrapa 58 x Embrapa 59	75,78 ± 22,66	57,47 ± 26,10	26,80
Embrapa 48 x Embrapa 47	58,43 ± 22,45	-0,68 ± 19,99	12,80
Embrapa 61 x Embrapa 48	90,99 ± 28,12	65,48 ± 26,50	60,00
Embrapa 59 x CD 201	108,90 ± 28,09	46,44 ± 19,76	46,30
BR-16 x Embrapa 59	35,20 ± 16,75	15,33 ± 14,88	53,60
Vencedora x Conquista	322,76 ± 86,80	1,93 ± 22,94	50,00
Pequi x Embrapa 48	207,51 ± 52,31	288,78 ± 68,78	50,00
Vencedora x Apaiari	703,99 ± 151,49	21,93 ± 28,17	17,60
Embrapa 133 x Conquista	77,75 ± 32,56	57,00 ± 26,41	38,50
Pequi x FT-2	117,88 ± 33,99	25,38 ± 19,61	61,40
CD 201 x Pequi	118,62 ± 36,66	125,85 ± 37,07	48,50

peso de grãos (Tabela 1.8), as maiores estimativas de D em outubro não são as maiores estimativas de novembro, demonstrando que existe interação de cruzamento x época de semeadura afetando as estimativas de D para caracteres de menor herdabilidade. Para esses caracteres, será muito difícil obter distâncias genéticas de qualquer tipo, capazes de prever a variabilidade a ser gerada nas diferentes épocas.

Na Tabela 1.11, estão representadas as correlações, tomando as 19 combinações híbridas, entre a raiz quadrada da variância genética (DG) e a distância molecular com base em marcadores AFLP (DM), para os

**TABELA 1.9.** Estimativas da variância aditiva (D) para o caráter dias para a maturação obtidas para as sementeiras de outubro e novembro, da safra 2001/02, e as distâncias genéticas calculadas com base em marcadores AFLP para cada combinação híbrida.

Combinação híbrida	Estimativas de D		DNL
	Outubro	Novembro	
Embrapa 66 x Embrapa 59	3,72 ± 3,83	4,81 ± 1,40	11,10
Pequi x Embrapa 59	60,69 ± 8,38	26,95 ± 4,58	34,40
Embrapa 59 x Conquista	69,87 ± 9,79	30,93 ± 5,49	54,70
FT-2 x Embrapa 59	34,57 ± 6,61	25,06 ± 4,40	52,50
CD 201 x Mandi	321,47 ± 32,73	142,82 ± 17,36	12,70
BR-6 x Pequi	80,47 ± 14,37	29,93 ± 5,06	25,80
Embrapa 47 x BR-16	15,58 ± 3,74	2,20 ± 0,88	20,80
Conquista x Pequi	24,88 ± 11,08	20,27 ± 4,46	52,40
Embrapa 58 x Embrapa 59	110,40 ± 13,60	29,66 ± 4,56	26,80
Embrapa 48 x Embrapa 47	39,58 ± 6,79	16,78 ± 3,83	12,80
Embrapa 61 x Embrapa 48	70,32 ± 9,09	17,65 ± 2,97	60,00
Embrapa 59 x CD 201	91,76 ± 11,78	22,85 ± 4,53	46,30
BR-16 x Embrapa 59	48,07 ± 18,81	77,51 ± 8,55	53,60
Vencedora x Conquista	150,71 ± 17,64	59,75 ± 22,12	50,00
Pequi x Embrapa 48	205,77 ± 21,67	56,92 ± 7,87	50,00
Vencedora x Apaiari	271,34 ± 28,40	110,38 ± 17,17	17,60
Embrapa 133 x Conquista	89,68 ± 10,41	43,65 ± 7,06	38,50
Pequi x FT-2	126,86 ± 15,48	31,91 ± 5,65	61,40
CD 201 x Pequi	118,15 ± 15,62	37,38 ± 13,21	48,50

caracteres peso de grãos e dias para floração e maturação. Essas correlações foram nulas ou muito baixas, com valores próximos de zero e até negativos, indicando que as distâncias moleculares não foram bons estimadores do nível de variabilidade gerada nos cruzamentos para essas características. Algumas combinações particularmente apresentaram comportamentos totalmente contrários em relação à sua distância genética (Figuras 1.3 a 1.5), como por exemplo as combinações CD 201 x Mandi, Vencedora x Apaiari e Vencedora x Conquista. Todas elas contêm parentais com gene para período juvenil longo, o qual pode

TABELA 1.10. Estimativas da variância aditiva (D) para o caráter dias para a floração obtidas para as semeaduras de outubro e novembro, da safra 2001/02, e as distâncias genéticas calculadas com base em marcadores AFLP para cada combinação híbrida.

Combinação híbrida	Estimativas de D		DNL
	Outubro	Novembro	
Embrapa 66 x Embrapa 59	2,20 ± 0,66	0,79 ± 0,27	11,10
Pequi x Embrapa 59	13,58 ± 2,73	23,77 ± 3,29	34,40
Embrapa 59 x Conquista	10,01 ± 2,08	12,31 ± 2,00	54,70
FT-2 x Embrapa 59	27,68 ± 3,15	10,15 ± 1,76	52,50
CD 201 x Mandi	293,06 ± 27,87	151,29 ± 15,56	12,70
BR-6 x Pequi	5,68 ± 1,68	11,89 ± 2,08	25,80
Embrapa 47 x BR-16	1,73 ± 0,57	2,15 ± 0,58	20,80
Conquista x Pequi	29,61 ± 5,52	32,42 ± 4,37	52,40
Embrapa 58 x Embrapa 59	6,99 ± 1,65	10,96 ± 1,55	26,80
Embrapa 48 x Embrapa 47	4,04 ± 0,89	9,32 ± 1,99	12,80
Embrapa 61 x Embrapa 48	6,95 ± 1,41	3,87 ± 1,44	60,00
Embrapa 59 x CD 201	10,65 ± 1,96	12,34 ± 2,17	46,30
BR-16 x Embrapa 59	6,14 ± 1,38	8,48 ± 1,37	53,60
Vencedora x Conquista	100,80 ± 11,71	100,28 ± 9,95	50,00
Pequi x Embrapa 48	23,52 ± 4,03	23,06 ± 3,96	50,00
Vencedora x Apaiari	158,98 ± 16,12	120,53 ± 11,17	17,60
Embrapa 133 x Conquista	16,68 ± 3,05	14,32 ± 2,68	38,50
Pequi x FT-2	13,63 ± 2,51	26,71 ± 3,64	61,40
CD 201 x Pequi	16,90 ± 3,17	24,32 ± 3,95	48,50

estar provocando mudanças nas variâncias genéticas desses caracteres, explicando em parte as correlações baixas. A correlação sem essas três combinações (geral - *outliers* na Tabela 1.11) aumentou consideravelmente, variando de 0,39 a 0,64.

Considerando apenas as sete combinações híbridas em que participa a cultivar Embrapa 59, essas correlações foram de 0,18 e 0,34 em outubro e novembro, respectivamente, para peso de grãos (Tabela 1.5), bem abaixo das correlações de 0,43, em outubro, e 0,60, em novembro, obtidas em 2000/01. Como as estimativas de D da safra 2001/02

**TABELA 1.11. Correlações entre a raiz quadrada das estimativas da variância genética aditiva e as distâncias moleculares obtidas com marcadores AFLP.**

Tipo de correlação <sup>1</sup>	N	Peso		Dias p/ maturação		Dias p/ floração	
		Out	Nov	Out	Nov	Out	Nov
Geral	19	-0,17	0,34	-0,02	-0,02	-0,21	-0,14
Geral - outliers	16	0,39	0,47	0,46	0,54	0,64	0,5
Embrapa 59	7	0,18	0,34	0,42	0,69	0,6	0,5
Pequi	6	-0,03	0,03	0,25	0,16	0,65	0,79
Conquista	4	0,08	0,12	-0,29	-0,41	0,09	0,18

<sup>1</sup> Geral: inclui todas as combinações estudadas; Geral-outliers: exclui as combinações CD 201 x Mandi, Vencedora x Apaiari e Vencedora x Conquista; Embrapa 59, Pequi e Conquista: todas as combinações com cada uma dessas cultivares.

são mais confiáveis, já que o número de gerações envolvidas foi maior, a tendência é que, de fato, essas correlações sejam baixas. Isso foi confirmado quando foram tomadas as combinações envolvendo o parental Pequi e o parental Conquista (Tabela 1.11), com valores praticamente nulos, com exceção das correlações envolvendo Pequi para o caráter dias para a floração, que alcançou correlações de 0,65 e 0,79 para as semeaduras de outubro e novembro, respectivamente.

Apesar de todas essas correlações baixas, a informação sobre a relação genética em genótipos de soja pode e deve ser realizada com base em marcadores moleculares, já que funcionam como alelos presentes no genoma e podem estar livres de efeitos seletivos, o que não vale para genes diretamente relacionados com caracteres de importância para o melhoramento. Ao usar essas informações, não se deve ter a pretensão de gerar maior ou menor variabilidade para caracteres específicos, pois os resultados deste projeto têm demonstrado que existe apenas uma tendência e que várias exceções importantes reprovam essa hipótese. Mais informações sobre distância genética entre genótipos de soja com o uso de marcadores SSR estarão brevemente disponíveis e poderão ser usadas para fortalecer esses resultados.

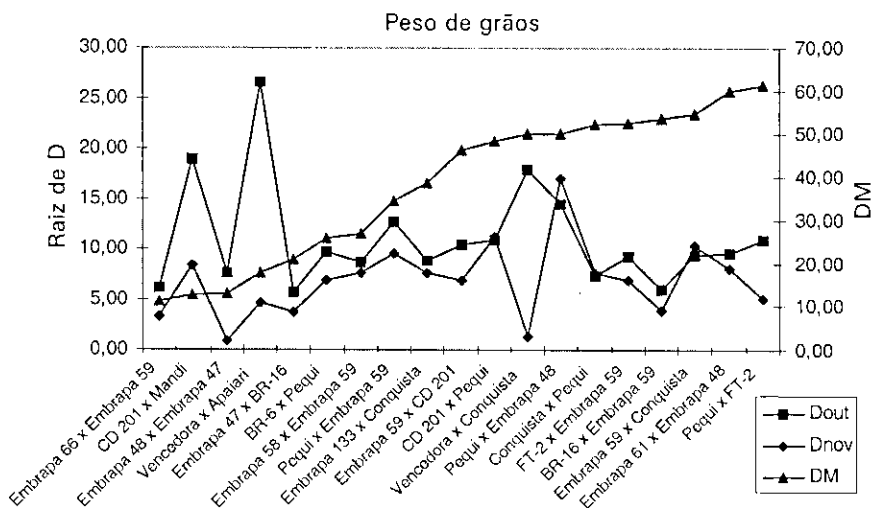


FIG. 1.3. Relações entre as distâncias moleculares com base em AFLP e as variâncias genéticas aditivas obtidas para o caráter peso de grãos em sementes de outubro e novembro para 19 combinações híbridas em soja.

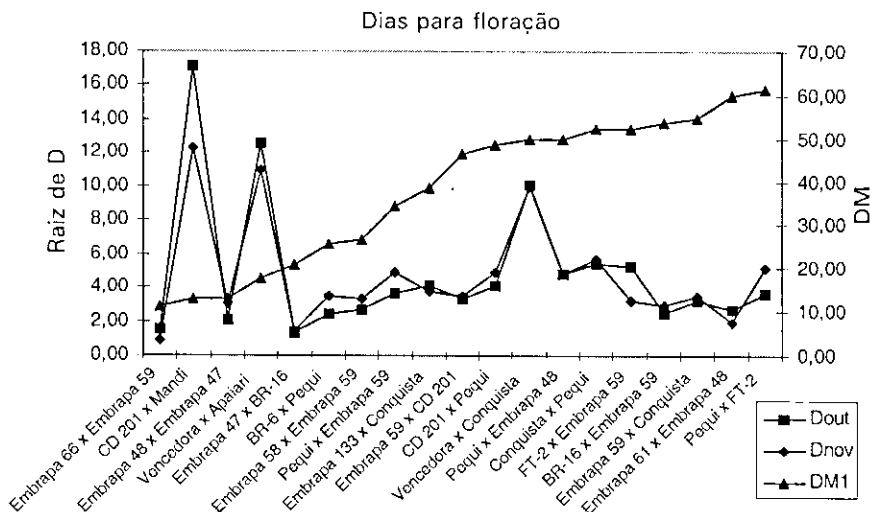
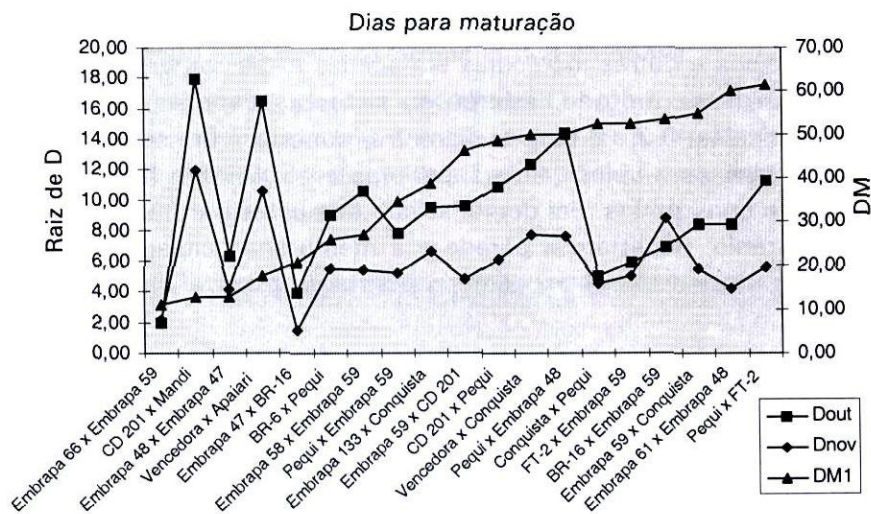


FIG. 1.4. Relações entre as distâncias moleculares com base em AFLP e as variâncias genéticas aditivas obtidas para o caráter dias para a floração em sementes de outubro e novembro para 19 combinações híbridas em soja.





**FIG. 1.5.** Relações entre as distâncias moleculares com base em AFLP e as variâncias genéticas aditivas obtidas para o caráter dias para a maturação em sementeiras de outubro e novembro para 19 combinações híbridas em soja.

## 1.5 Transformação de plantas de soja por biobalística com genes de interesse (04.2000.322-05)

Alexandre Lima Nepomuceno; Solange Maria Lugle<sup>1</sup>;  
 Carlos Alberto Arrabal Arias; Alexandre Magno Brighenti; Norman Neumaier;  
 José Renato Bouças Farias; Silvana Regina Rockenbach Marin;  
 Cesar Augusto da Silveira; Eliseu Binneck<sup>2</sup>; Juliana Molina<sup>3</sup>;  
 Noelle Giacomini Lemos<sup>3</sup>; Renata Stolf<sup>3</sup>

Nos três anos do projeto foi possível estabelecer e adaptar o protocolo de biobalística no laboratório de biotecnologia da Embrapa Soja. A

<sup>1</sup> FAPEAGRO, bolsista do CNPq

<sup>2</sup> Bolsista de Pós-doutorado pelo CNPq

<sup>3</sup> Estagiária, Universidade Estadual de Londrina

biobalística utiliza microprojéteis em alta velocidade para introduzir ácidos nucléicos e outras moléculas em células e tecidos *in vivo*. Para a utilização desse método, diferentes sistemas capazes de acelerar micropartículas (0,2 a 4 mm de diâmetro) cobertas com seqüências de ácidos nucléicos a velocidades superiores a 1500 km/h foram desenvolvidos e construídos. Foi demonstrado que estas partículas (de ouro ou tungstênio) penetram a parede e a membrana celular de maneira não letal, alojando-se aleatoriamente nas organelas celulares. Posteriormente, o DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, e integrado ao genoma nuclear do organismo receptor. Muitos desses sistemas de aceleração de micropartículas são baseados na geração de uma onda de choque com energia suficiente para deslocar uma membrana carreadora contendo as micropartículas cobertas com DNA. Os sistemas que utilizam gás hélio sob alta pressão têm demonstrado possuir um amplo espectro de utilização e ser mais eficientes para a obtenção de altas freqüências de transformação em diferentes espécies vegetais.

Para calibração do sistema, os disparos foram efetuados inicialmente em embriões de soja com o gene marcador GUS e o gene *ahas* (fornecido por Elíbio Rech, Cenargen, Brasília) que expressa a enzima sintetase ácida hidroxiaética (acetohydroxyacid synthase, E.C. 4.1.3.18) que catalisa uma etapa inicial da síntese dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina. Normalmente, essa enzima é inativada por herbicidas da classe das imidazolinonas. O gene *ahas*, utilizado nas transformações, foi obtido de *Arabidopsis thaliana*, onde uma mutação de ponto na posição 653 pb do gene resultou na substituição de uma serina por uma asparagina, conferindo a esse mutante resistência aos herbicidas da classe das imidazolinonas.

Após a calibração, os disparos foram reiniciados com a utilização do plasmídeo contendo o gene *ahas* (pAC321) e o plasmídeo contendo os elementos para expressão do Hormônio Humano de Crescimento, em sementes de soja (pFas GH)(fornecido por Adilson Leite, Unicamp, Campinas). Nessa construção gênica, é utilizado um promotor específico (Faseolina) para expressão de proteínas em sementes de

leguminosas. Os plasmídios têm sido utilizados inteiros e, ao mesmo tempo, visando uma co-transformação dos embriões.

Foram obtidas várias plantas em  $r3$  positivas (recombinantes em 3ª geração) para ahas que agora serão testadas quanto ao número de inserções no genoma transformado. O gene HGH foi presente no genoma de plantas até a geração  $r2$ .

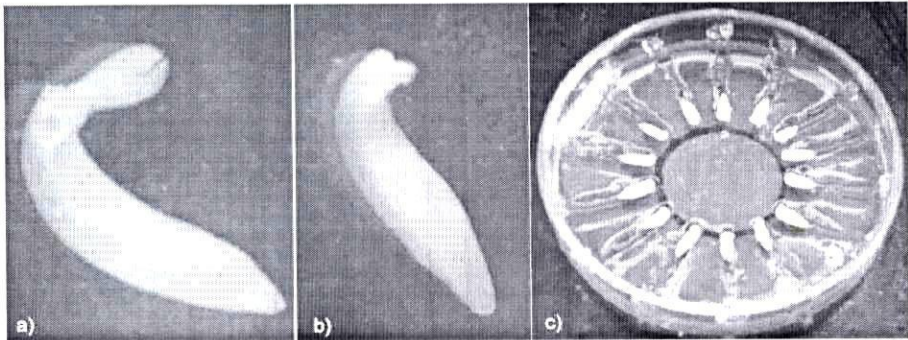


FIG. 1.6. Eixo embrionário após retirada dos cotilédones (a). Eixo embrionário após retirada da folhas primárias (b). Embriões distribuídos em placa com meio MS com a região apical voltada para o centro da placa, pronta para bombardeamento (c).

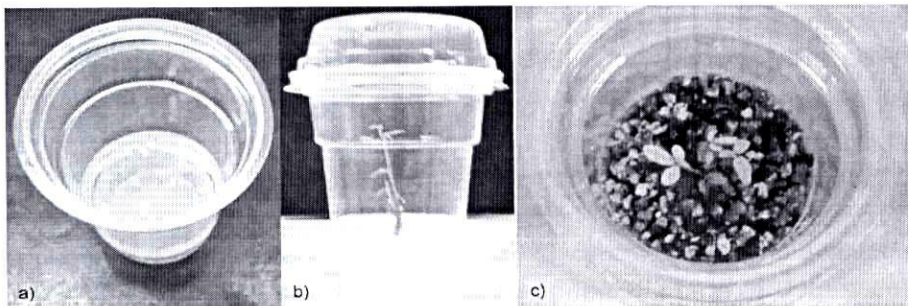


FIG. 1.7. Embriões em meio seletivo (MS/IMZ) (a). Multibrotos em meio seletivo aptos a aclimação (b). Multibrotos em areia:vermiculita (c).



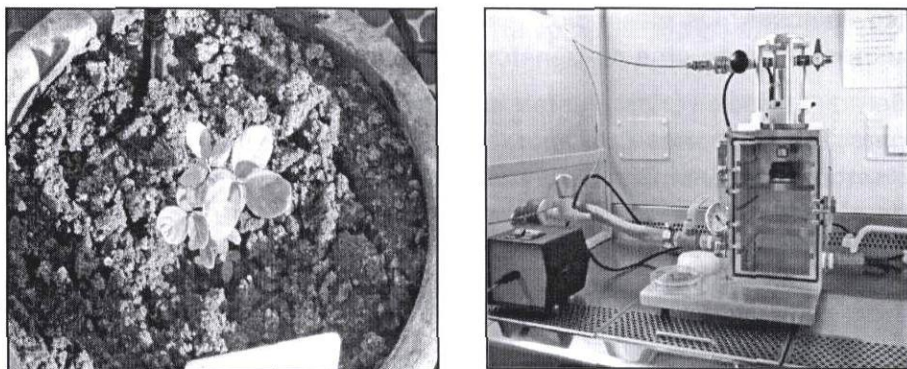


FIG. 1.8. Multibrotos em vasos na casa-de-vegetação e acelerador de partículas – processo de biobalística.

Em 2001, os trabalhos continuaram com o plasmídeo pAG1 e também com o plasmídeo pAC321 (*ahas* cortado), que foi obtido através da digestão do plasmídeo com a enzima *Xba* I que cortou o plasmídeo em dois fragmentos de 5500 pb e 2900 pb, respectivamente. O fragmento correspondendo ao gene *ahas* (5500 pb) foi cortado do gel e purificado.

Das transformações realizadas no período de dezembro 2001 a janeiro de 2002, foram obtidas 11 plantas recombinantes *r0* (recombinante geração 0): plantas 79, 115, 119, 120, 121, 123A, 130, 132, 133A, 136, 145 (apenas o vaso 145 foi positivo para Hormônio HGH).

As sementes (*r1*) dessas 11 plantas (*r0*) foram etiquetadas, colhidas e plantadas em dois grupos (Grupo 1, plantas: 79, 115, 119, 120, 121, 123A, 130, 132, 133A, 136 e Grupo 2, plantas: 137, 137A, 138, 138A, 139, 139A, 142, 145, 147, 147A). Denominadas Gerações *r1*, dessas plantas foi extraído DNA, feito PCR e apresentaram o seguinte resultado: no grupo 1, nenhuma das "filhas" apresentou resultado positivo no PCR. Foi aplicado herbicida IMAZAPIR, porém, devido à aplicação tardia (a planta já possuía vagens formadas, estágio de desenvolvimento R6), não foi possível uma análise adequada. Um dos sintomas, que é a nervura posterior da folha avermelhada, foi observado em

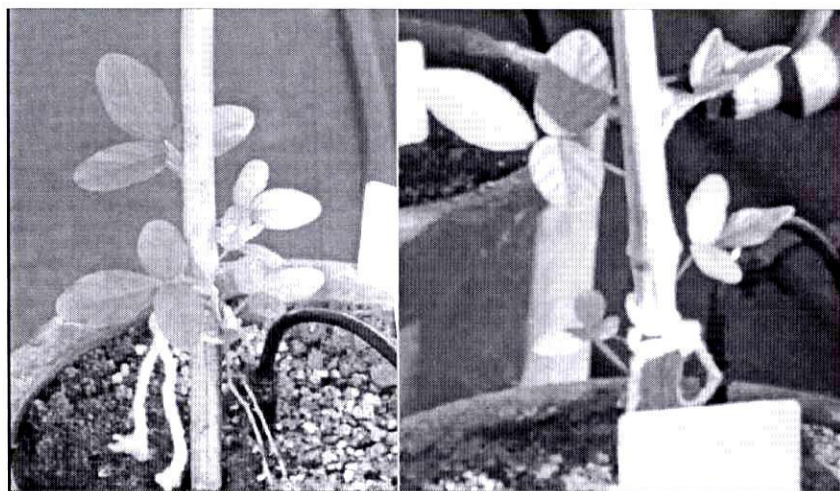


FIG. 1.9. Plantas transformadas por biobalística e regeneradas com gene *ahas*.

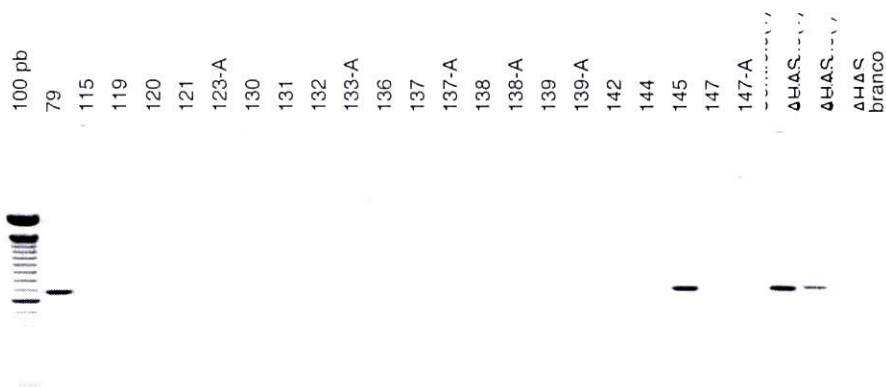
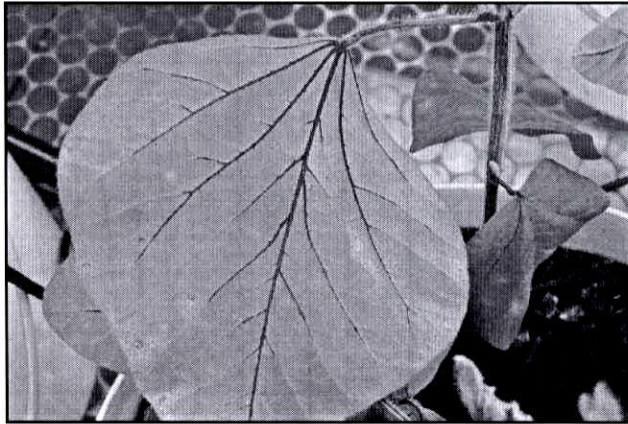


FIG. 1.10. Confirmação por PCR da presença no gene *ahas* no genoma de plantas de soja transformadas por biobalística.



**FIG. 1.11.** Folha de soja mostrando sintoma de aplicação do herbicida imazapir em plantas negativas para a presença do gene *ahas*.

algumas folhas, porém sem evolução. As sementes (*r2*) de cada planta (*r1*) desses vasos foram coletadas individualmente e, mesmo não tendo apresentado resultado positivo para *ahas* e Hormônio de Crescimento, em *r1*, essas sementes foram semeadas e testadas. Novamente, confirmou-se a ausência dos genes *ahas* e HGH. Entretanto, foi possível observar que a aplicação tardia (estádio R6) de herbicida nas plantas possibilitou que as sementes germinassem, mostrando sintomas de toxicidade por imidazolinonas. Isso sugere que, mesmo depois de um período de seis meses, ainda havia resíduos do herbicida nas sementes.

Do outro grupo, as plantas 137, 137A, 138, 138A, 139, 139A, 142, 145, 147, 147A também foram avançadas para plantas (*r2*), juntamente com a planta 145 que foi positiva para os dois conjuntos de primers usados: *ahas* e Hormônio de Crescimento. Entretanto, somente a progênie da planta 145, plantas: 1, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 18, 20, 22, 23, 25 foi positiva para *ahas* e a planta 5 foi também positiva para HGH. Todas as sementes (*r3*) de cada planta (*r2*) desse grupo também foram coletadas individualmente.





FIG. 1.12. Plantas PCR positivas da progênie 145 em  $r3$  após aplicação do herbicida IMAZAPIR: antes (a) e após desbaste (b).

Diante desses resultados, as sementes ( $r3$ ) coletadas das plantas  $r2$  dos vasos 79, 115, 119, 120, 121, 123A, 130, 132, 133A, 136 e também as sementes das plantas do vaso 145 positivas, foram semeadas, avançando mais uma geração. Foram usadas cinco sementes  $r3$ , de cada planta  $r2$ .

Após 20 dias da semeadura, foi aplicado o herbicida IMAZAPIR (100 g i.a./ha), em todas as plantas (período V3). Antes da aplicação do herbicida, foi feita extração de DNA do tecido vegetal de todas as plantas 145 positivas em  $r_2$ , estando agora em  $r_3$ . A análise de PCR constatou a presença do gene *ahas* em diferentes níveis de expressão nas plantas R3, provenientes de sementes de plantas  $r_2$  positivas da progênie da planta 145.

A progênie da planta 145-5 em que foi observada, na geração  $r_1$  e  $r_2$ , além do gene AHAS, a presença do gene HGH, não manteve a sua expressão em  $r_3$ .

Amostras de tecido das plantas  $r_3$  positivas (da progênie 145) foram coletadas individualmente e serão analisadas quanto ao número de cópias (*southern hybridization*). Progênies das plantas 145-1, 145-3, 145-5, 145-7, 145-10, 145-11, 145-12, 145-15, 145-17, 145-18, 145-20, 145-22, 145-25 PCR positivas para *ahas* em  $r_3$ , serão cultivadas e analisadas conforme os procedimentos já citados, observando expressão do gene *ahas* na geração R4.



## 2 MAXIMIZAÇÃO DO APROVEITAMENTO DAS DISPONIBILIDADES CLIMÁTICAS PELA SOJA

**Projeto:** 04.2000.331    **Líder:** Alexandre Lima Nepomuceno

**Nº de subprojetos que compõem o projeto:** 05

**Unidades/Instituições participantes:** Embrapa Soja; Embrapa Trigo; Jircas - Japan International Research Center for Agricultural

No último ano de execução, os seis subprojetos componentes do projeto 04.2000.331 analisaram as respostas da soja ao ambiente. Nos subprojetos 04.2000.331-01 e 02, as respostas de diversos genótipos de soja aos fatores do clima foram avaliados objetivando identificar as diferenças entre genótipos e quais os melhores parâmetros a serem utilizados neste tipo de estudo. As informações obtidas nestes dois subprojetos visam fornecer bases para a tomada de decisão por parte de melhoristas, assistência técnica e produtores no que diz respeito à escolha de genótipos menos sensíveis a adversidades climáticas. Foi possível identificar uma relativa variação em termos de tolerância à seca em dez genótipos estudados durante três anos de projeto. Apesar de, no terceiro ano, as produtividades terem sido prejudicadas devido a ocorrência de uma forte chuva de granizo imediatamente antes da colheita. Entretanto, foi possível observar que, no mínimo, uma alta taxa de desenvolvimento durante condições de seca nos estádios iniciais do período reprodutivo foi associada a altos rendimentos. Essas informações também foram essenciais na condução dos subprojetos 03 e 06. No subprojeto 03, os genótipos identificados como sensíveis e tolerantes à seca foram analisados ao nível de expressão gênica. O produto final gerado é a disponibilização de genes envolvidos nas respostas a estresses abióticos como a seca através da criação de banco de genes *in vivo*, *in vitro*, e *in silico* ([www.cnpso.embrapa.br/bioinformatica](http://www.cnpso.embrapa.br/bioinformatica)), permitindo rápido acesso e uso em programas de melhoramento genético clássico, por transgenia, ou assistido por marcadores moleculares. No subprojeto 04 buscou-se maximizar o uso dos recursos do ambiente, através da alteração de práticas de manejo já estabelecidas para genótipos mais antigos. Entre as metas atingidas está a determinação do melhor arranjo espa-

cial e temporal dos principais genótipos de soja desenvolvido pela Embrapa Trigo e recomendado para o RS, assim como, a geração de informações ecofisiológicas que auxiliam a criação e adaptação de genótipos de soja para semeaduras precoce e tardias em ambientes específicos. Com os resultados do subprojeto 04 foi possível identificar que existe margem para alterações nas práticas de manejo e com isso, potencialmente, obter ganhos em produtividade e redução de perdas durante situações de estresse. No sub-projeto 05 foram testados dois produtos químicos com potencial para reduzir perdas devido a estresses causados por seca. Nos dois primeiros anos foi testado o produto Thiamethoxan. As observações empíricas de produtores e pesquisadores foram confirmadas, pois o produto apresenta efeitos significativos positivos sobre a produtividade de soja quando aplicado nas doses de 17,5 a 52,5 g i.a./ 100 kg de semente e pode favorecer o desenvolvimento de plantas submetidas a condições de estresse. Já o ácido acetil salicílico (ASA) não apresentou nenhum efeito significativo sobre a capacidade das plantas de soja de suportar, por períodos maiores, situações de seca. Entretanto, no ano em que foi testado, não houve déficit hídrico significativo, sendo, então, interessante que o produto fosse testado novamente. No subprojeto 06 utilizou-se as variáveis estudadas nos subprojetos 01 e 02 para calibrar modelos de simulação objetivando a obtenção de modelos precisos e confiáveis que expressem de forma satisfatória a realidade. Praticamente todas as metas inicialmente previstas na formulação desse subprojeto foram alcançadas. Devido ao sucesso dos resultados alcançados no subprojeto 06 com a cultura da soja e à precisão dos dados obtidos com as simulações, o DSSAT passou a ser usado nos trabalhos de "Zoneamento agroclimático das culturas de grãos no Brasil". A maximização das disponibilidades climáticas para a cultura da soja, além de permitir aumentos de produtividade, possibilita a busca de alternativas e de soluções para eliminar problemas ou reduzir perdas de produtividade na cultura durante situações de estresse do ambiente. Os objetivos propostos no projeto "Maximização do aproveitamento das disponibilidades climáticas pela soja" foram basicamente todos alcançados. Vários genótipos de soja foram caracterizados quanto as suas respostas às variáveis do ambiente, como condições hídricas, fotoperiódicas e de temperatura. Vários genes diferencialmente expressos foram identificados, clonados, seqüenciados e podem ser acessados e estudados no endereço

www.cnpso.embrapa.br/bioinformatica. Modelos de simulação foram calibrados e hoje são utilizados no zoneamento agrícola da cultura da soja no Brasil. Entretanto, muito ainda deve ser feito e é por essa razão que várias das atividades desenvolvidas no projeto 04.2000.331 foram submetidas e aprovadas em outros programas de pesquisa (Macroprogramas 1, 2 e 3; PRODETAB; CNPq; PADCT). O projeto gerou ainda mais de 60 publicações em periódicos indexados, em revistas, em anais de congressos e eventos, etc. Mais de 15 estudantes de Doutorado, Mestrado e Graduação foram treinados a partir dos trabalhos executados no projeto. Várias entrevistas à mídia foram prestadas relacionando os resultados do projeto, assim como, várias palestras foram proferidas e visitas atendidas em resposta a procura pelos resultados do projeto, por parte da sociedade, instituições parceiras e outros pesquisadores.

Para atender a esses objetivos propostos, foram desenvolvidos cinco subprojetos, que tiveram início no ano de 2000 e término no final de 2002, cujos resultados serão relatados à seguir:

## **2.1 Bases agrônômicas e fisiológicas das respostas da soja às condições hídricas (04.2000.331-01)**

Norman Neumaier; Alexandre Lima Nepomuceno; José Renato Bouças Farias;  
Tetsuji Oya<sup>1</sup>; Nelson Delattre

O maior fator de risco e de insucesso na exploração da cultura da soja é a variabilidade na ocorrência de adversidades climáticas. As secas (71% dos casos) foram o principal evento sinistrante no PROAGRO, seguido por chuva excessiva (22% dos casos), granizo e geada (dados de 1993). Apesar dos grandes prejuízos advindos da ocorrência de secas, pouco ou quase nada se tem para apresentar como solução ao produtor, sem aumentar seu custo de produção. Isto justifica a busca de novas informações no sentido de otimizar o seu cultivo, possibilitan-

---

<sup>1</sup> JIRCAS - Japan International Research Center for Agricultural Sciences

do a obtenção de maiores rendimentos e menores riscos. A busca de parâmetros que permitam uma avaliação da capacidade da planta em resistir/tolerar a seca, tem grande interesse ao processo de seleção, no melhoramento de plantas. O objetivo do presente estudo foi o de caracterizar as respostas agrônômicas e/ou fisiológicas das cultivares de soja da Embrapa em resposta à diferentes intensidades de déficits hídricos, em distintas fases do desenvolvimento. Com isso, busca-se, também, a identificação das características que conferem aos genótipos maior tolerância ou sensibilidade à seca, visando gerar conhecimento básico e subsídios aos programas de melhoramento genético e ao setor produtivo, contribuindo para a redução dos riscos climáticos e dos prejuízos decorrentes dos déficits hídricos. Durante a duração do subprojeto, foram instalados ensaios em casa de vegetação e em campo. Foram avaliadas respostas fenológicas, morfológicas, agrônômicas e fisiológicas de dez cultivares de soja.

No ensaio de casa de vegetação, em blocos completos casualizados (BCC), foram testadas duas cultivares tolerantes à seca (BR 4 e MG/BR 46 - Conquista) e uma suscetível (BR 16), em vasos contendo mistura de areia e de vermiculita. Os tratamentos foram: Estressado PV (5% umidade gravimétrica (UG) no período vegetativo); Não Estressado PV (15% UG no período vegetativo); Estressado PR (5% UG no período reprodutivo); Não Estressado PR (15% UG no período reprodutivo). Durante a condução do ensaio, foram medidos taxa fotossintética, eficiência fotossintética, teor relativo de água na folha, comprimento de raízes e massa verde e massa seca de partes aéreas e de raízes. Houve forte inibição do crescimento e da taxa fotossintética das plantas no tratamento Estressado em todas as cultivares. O estresse não diminuiu o teor de clorofila por unidade de área da folha no PV, entretanto, reduziu-o no início do PR, com subsequente menor redução no final do PR. O estresse reduziu a relação Parte Aérea/Raízes das plantas. Sob déficit hídrico, as duas cultivares tolerantes mostraram maior redução do que a suscetível, durante o PV, porém, menor redução durante o PR. Uma cultivar tolerante mostrou menor redução no comprimento da raiz principal durante o PR.

Os experimentos de campo foram conduzidos, na Embrapa Soja, em Londrina, PR, em duas safras (1999/2000 e 2000/2001, na safra 2001/2002, experimentos de campo foram executados, porém, seus resultados considerados perdidos devido a completa destruição das parcelas por intensa chuva de granizo ocorrida uma semana antes da maturação). Nos ensaios, o delineamento foi BCC com parcelas subdividas, os tratamentos foram (nas parcelas) níveis de disponibilidade hídrica: 1) Irrigado (IRR) = potencial matricial de água, no solo, mantido entre -0,03 e -0,05 MPa); 2) Não Irrigado (NIRR) e (nas subparcelas) as cultivares BR 16 e 37; Embrapa 48 e 59; e BRS 132; 133; 134; 183; 184 e 185; Num outro experimento complementar, também em BCC, foram testadas as mesmas dez cultivares sob abrigos móveis automáticos e sem nenhum suprimento de água (ESTR), por 38 dias, a partir do florescimento. Todas as cultivares são adaptadas e recomendadas para a Região Sul do Brasil, especialmente no Paraná. Dentre elas, a BR-16 é considerada uma cultivar muito pouco tolerante à seca, de acordo com estudos prévios realizados.

Para a instalação dos ensaios de campo, práticas culturais de uso corrente foram usadas, incluindo adubação com P e K nas doses de 250 kg ha<sup>-1</sup> da fórmula 0-28-20 e inoculação das sementes com *Bradyrhizobium japonicum* na semeadura. Herbicidas e pesticidas foram aplicados quando necessário. O solo no local do experimento é classificado como Latossolo Vermelho distroférico. O volume total da reserva de água disponível para a transpiração desse solo foi de 0.15 m<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O m<sup>-3</sup> e a profundidade de extração foi estabelecida como sendo 0.6 m. As dez cultivares foram semeadas em 11 e 22 de novembro e colhidas em 24 a 27 e 27 de março, nas safras de 1999/2000 and 2000/2001, respectivamente. Cada tratamento teve quatro repetições que consistiram de oito fileiras de soja de 4 m de comprimento e espaçadas de 0,5 m (6 m × 4 m). A população de plantas foi de aproximadamente de 40 plantas m<sup>-2</sup>. A irrigação foi aplicada manualmente, no tratamento irrigado (IRR), quando o potencial hídrico do solo, medido por tensiômetros a 30 cm de profundidade, atingiu -0.05 MPa. As parcelas sob o tratamento não irrigado (NIRR) não receberam qualquer irrigação e dependeram exclusivamente da chuva. A duração do

tratamento ESTR foi de um mês, logo após o florescimento (do estágio R1 ao R5, Fehr & Caviness, 1977).

Pode-se considerar que os rendimentos das parcelas irrigadas representam o rendimento potencial, os rendimentos das parcelas NIRR representam os rendimentos sob condições naturais (de chuva) e os rendimentos do tratamento ESTR representam os rendimentos sob estresse de seca durante o início do período reprodutivo.

Para a realização de leituras e determinações, dez plantas foram periodicamente colhidas de cada repetição para determinar o desenvolvimento da área foliar e da massa seca de planta. As folhas foram destacadas e a área foliar foi medida em um medidor de área foliar (LI-3100, Li-Cor, Lincoln, NE. EUA). O material vegetal foi seco a 60° C, por, pelo menos 48 h, pesado e a massa seca de planta por unidade de área de solo anotada. Taxas de crescimento da cultura (CGR) foram calculadas para três períodos em 1999/2000, ou seja, da semeadura até o início do florescimento (I), trinta dias a partir do início do florescimento (II), e final do período reprodutivo até maturação (III). Análise de crescimento foi efetuada para o período (II), ou seja, o período em que o tratamento ESTR foi aplicado nas parcelas sob os abrigos de chuva. Na maturação, plantas de uma seção de 1m x 2m foram colhida à mão e trilhadas em uma trilhadeira de parcelas. O rendimento de grãos foi calculado a 13% de umidade.

A cada safra, dados meteorológicos diários foram registrados a cerca de 50m das parcelas. A quantidade total de chuva recebida pelas plantas de soja em 1999/2000 (471,0 mm) foi aproximadamente a metade da de 2000/2001 (741,8 mm), entretanto, as parcelas ESTR receberam aproximadamente a mesma quantidade de chuva nas duas safras (354,3 e 335,0 mm em 1999/2000 e 2000/2001, respectivamente). A quantidade de chuva até o florescimento também diferiu entre as safras (121,7 mm em 1999/2000 e 256,8 mm em 2000/2001).

Em comparação com os tratamentos IRR e NIRR, foi observado um significativo decréscimo na umidade do solo já aos 7 dias após o início do tratamento ESTR em ambas as safras. Não existiu diferença significativa entre os tratamentos IRR e NIRR para umidade do solo.

A irrigação não teve efeito significativo no rendimento em ambas as safras ao se comparar os tratamentos IRR e NIRR. Isto mostra que não ocorreu déficit hídrico que pudesse causar perdas de rendimento. Entretanto, o tratamento ESTR causou substanciais reduções do rendimento, 66 a 78% em 1999/2000 e 22 a 64% em 2000/2001, respectivamente. No tratamento ESTR, apesar dos rendimentos não terem apresentado diferenças significativas entre cultivares em 1999/2000, a cultivar BRS 183 mostrou rendimento significativamente maior do que BR-16, Embrapa 59 e BRS 134 em 2000/2001. No tratamento IRR, apesar das diferenças entre cultivares não terem sido significativas em 2000/2001, a cultivar BRS 134 apresentou rendimento significativamente maior do que BR 16 em 1999/2000. Com base no rendimento de grãos no tratamento ESTR, a cultivar BRS 183 foi considerada altamente tolerante à seca enquanto que BR-16, Embrapa 59, and BRS 134 foram consideradas de baixa tolerância à seca.

A classificação das cultivares, de acordo com o rendimento, no tratamento ESTR foi semelhante em ambas as safras. Os coeficientes de correlação entre rendimentos no tratamento ESTR e os rendimentos relativos ao rendimento potencial (tratamento IRRR) foram 0,64 e 0,69, respectivamente (significativo a  $P < 0,05$ ). As cultivares BRS 134 e Embrapa 59 apresentaram baixos rendimentos relativos (26% e 36% para BRS 134, e 22% e 42% para Embrapa 59, em 1999/2000 e 2000/2001, respectivamente), enquanto seus rendimentos potenciais foram os maiores e relativamente mais altos entre as cultivares, respectivamente. Contrariamente, apesar do rendimento potencial de BRS 183 não ter sido tão alto, os rendimentos relativos foram altos (34% e 78% em 1999/2000 e 2000/2001, respectivamente), o que resultou em maiores rendimentos no tratamento ESTR. Os baixos rendimentos de BR-16, no tratamento ESTR, foram devido mais ao seu baixo rendimento potencial do que ao seu rendimento relativo (30% e 48% em 1999/2000 e 2000/2001, respectivamente). Do ponto de vista do rendimento relativo, BRS 183 foi considerada a cultivar com a mais alta tolerância à seca, enquanto que Embrapa 59 e BRS 134 foram consideradas de baixa tolerância à seca.

Os valores médios de cada componente do rendimento, para as dez cultivares, no tratamento ESTR, em relação ao tratamento IRRRI foram 36 e 61% (número de vagens por unidade de área), 75 e 106% (número de sementes por vagem), 109 e 87% (tamanho de semente) em 1999/2000 e 2000/2001, respectivamente. A redução do rendimento pelo estresse hídrico (seca) no tratamento ESTR foi causado principalmente pela redução no número de vagens por unidade de área. O tratamento ESTR reduziu o número de sementes por vagem em 1999/2000 e tamanho da semente em 2000/2001, entretanto, aumentou o tamanho da semente em 1999/2000 e não afetou número de sementes por vagem em 2000/2001.

A redução do número de vagens por unidade de área no tratamento ESTR variou entre cultivares em ambas as safras, porém, não foram detectadas diferenças significativas entre as taxas de redução. Somente BRS 183, a cultivar com a mais alta tolerância à seca, mostrou relativa menor taxa de redução no número de vagens em 2000/2001.

As cultivares com grandes reduções no tamanho de semente em 1999/2000 foram Embrapa 48 (valores, no tratamento ESTR, relativos ao tratamento IRRRI, 90%), BRS 134 (94%), e BRS 184 (97%), e aquelas com grandes aumentos foram BRS 132 (126%), BR 37 (123%), e BRS 183 (122%). Os valores relativos destes dois grupos foram significativamente diferentes. No outro ano, não houve diferença significativa nos valores relativos entre cultivares.

As cultivares com grandes reduções no número de sementes por vagem em 2000/2001 foram BRS 134 (redução de 73% no ESTR em relação ao IRRRI) e Embrapa 59 (87%), e a com o maior aumento foi Embrapa 48 (137%). Os valores relativos nestes dois grupos foram significativamente diferentes. Em 2001/2002, nenhuma diferença significativa nos valores relativos entre cultivares foi observada.

A maior tolerância à seca de BRS 183 resultou de uma menor redução no número de vagens e no tamanho das sementes, quando comparados com as outras cultivares, sob condições de seca. Por outro lado, Embrapa 59 mostrou maior redução em tamanho de semente e BRS



134 mostrou maior redução em número de sementes por vagem e tamanho de semente, em comparação com outras cultivares.

Na análise de crescimento, correlações significativas foram encontradas entre taxa de crescimento da cultura (CGR), durante o início do período de desenvolvimento reprodutivo, e rendimento de grãos, independentemente da disponibilidade de água, em 1999/2000, indicando a importância do período para a determinação do rendimento. As taxas de crescimento da cultura dos outros períodos não mostram-se relacionadas com os rendimentos. Entretanto, uma relativamente alta (mas não significativa), correlação foi observada entre CGR durante o período de crescimento vegetativo e rendimento de grãos, nas parcelas ESTR. O mesmo não aconteceu nas parcelas IRRI.

Os resultados da análise de crescimento, durante o período sem chuva, em 1999/2000, indicam que a cultivar BRS 183, com alta tolerância à seca, e com base no rendimento de grãos, mostrou alta taxa de crescimento relativo (RGR), e que BR 16, Embrapa 59 e BRS 134, cultivares com baixa tolerância à seca, apresentaram baixas taxas de crescimento relativo (RGR). As diferenças em RGR entre cultivares refletiram diferenças na taxa de assimilação líquida (NAR), mas o índice de área foliar (LAR) não diferiu entre cultivares. As reduções em RGR e NAR nas parcelas ESTR, comparadas às parcelas IRRI, foram maiores para BR 16, Embrapa 48, Embrapa 59 e BRS 134, e menores para as cultivares BRS 183 e BRS 185. LAR não foi afetado pela ausência de chuva, provavelmente porque quando o tratamento de seca foi iniciado a área foliar já estava estabelecida.

Neste estudo o ranking das dez cultivares de soja foi semelhante nas parcelas IRRI e nas ESTR, nas duas safras ( $r = 0,90$  e  $0,64$  nas parcelas IRRI e ESTR, respectivamente). Nas parcelas IRRI, isso deveu-se ao fato do rendimento potencial de cada cultivar ter sido alcançado através da irrigação em cada ano. Sneller e Dombek (1977) relataram que a correlação do ranking de rendimento entre conjuntos de dois anos não foi significativa sob condição sem irrigação mas foi sempre significativa sob condição irrigada. Eles enfatizam a utilidade da seleção para tolerância à seca baseada no rendimento sob condição de irrigação.

Neste estudo o estável ranking de rendimento nas parcelas ESTR podem estar indicando que o efeito da seca de um mês, após o início do florescimento, foi suficientemente grande para ser detectado pela análise baseada no rendimento. O rendimento nas parcelas ESTR é o produto do rendimento potencial pelo rendimento das parcelas ESTR relativo ao das parcelas IRR1. Portanto, como material para o melhoramento e para a análise dos mecanismos fisiológicos de tolerância à seca, o rendimento relativo pode ser um bom e importante índice. Altos coeficientes de correlação entre rendimento das parcelas ESTR e rendimento relativo foram observados em ambas as safras ( $r=0,89$  e  $0,98$  em 1999/2000 e 2000/2001, respectivamente). Isso indica que, nesse estudo, o rendimento em ESTR esteve mais relacionado ao rendimento relativo do que ao rendimento potencial.

Segundo Sneller e Dombek (1977), uma cultivar é considerada tolerante e outra é considerada sensível quando a diferença em rendimento entre as cultivares é significativa em ambiente de seca mas não em ambiente sem seca, ou vice versa e, também, quando a diferença em rendimento entre cultivares é significativa em ambos os ambientes e as cultivares mudam de posição no ranking entre ambientes. Aplicando esse conceito aos rendimentos das parcelas IRR1 e ESTR, a cultivar BRS 183 foi considerada como tolerante à seca e BR 16, Embrapa 59 e BRS 134 foram consideradas com baixa tolerância. Além disso, BRS 134 foi menos tolerante do que BR 16 porque seu rendimento nas parcelas IRR1 foi significativamente maior do que o da BR 16. Este fato é consistente com o rendimento relativo mais alto da BR 16 do que da BRS 134.

O fato de que correlações significativas entre CGRs e rendimentos foram observadas somente durante o início do período reprodutivo, sugere a importância desse período para a determinação do rendimento em soja. Presume-se que isto aconteça porque a soja apresenta um período no qual ambos os crescimentos, vegetativo e reprodutivo, avançam simultaneamente. Além disso, é nesse período que a área foliar atinge seu máximo e a produção de massa seca é mais ativa. Spaeth et al. (1984) relataram que os índices de colheita foram estáveis em uma

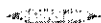
cultivar, a menos que as plantas tivessem sido submetidas à seca no final do período reprodutivo. Assim, nesse estudo, a cultivar que manteve alta produção de massa seca durante o período de estresse foi a que apresentou maior rendimento. Manter uma alta RGR durante um período de seca parece ser a chave para altos rendimentos, isto é, tolerância à seca. Uma vez que foi encontrada uma alta correlação, porém não significativa, entre CGR antes do florescimento e rendimento nas parcelas ESTR, a quantidade de crescimento vegetativo foi considerada afetando o crescimento subsequente, durante o período de ESTR presumivelmente através do desenvolvimento de raízes. Comparando as duas safras, a precipitação acumulada em 1999/2000 foi a metade da de 2000/2001. A escassez de umidade do solo pode ter restringido a produção de massa seca antes do florescimento em 1999/2000 causando um efeito mais forte da seca após o florescimento. O estresse, talvez, exagerado pode ter mascarado as diferenças em tolerância à seca entre as cultivares.

Nos EUA, a PI416937 é conhecida como um genótipo tolerante à seca. Suas características relacionadas à tolerância à seca são alta capacidade de ajuste osmótico e desenvolvimento abundante de finas raízes adventícias, em camadas superficiais do solo (Sloane et al., 1990; Hudak e Patterson, 1996). Entretanto, a característica que deveria ser mais importante é seu vigoroso crescimento vegetativo comparado à cultivar testemunha (Hudak e Patterson, 1996). Hirasawa et al. (1994) mostraram que altos rendimentos de grãos sob condições de seca após o florescimento foram conseguidos em plantas de soja que experimentaram seca antes do florescimento, porque elas haviam desenvolvido extensos sistemas de raízes antes do florescimento. Esses relatos indicam claramente que um enfoque centrado na análise de crescimento da parte aérea das plantas pode ser insuficiente para explicar tolerância à seca. Para se adaptarem à condição de dias curtos nas baixas latitudes, muitas cultivares brasileiras de soja possuem a característica período juvenil longo que evita o florescimento precoce, sem um razoável crescimento vegetativo (Hartwig e Kiihl, 1979). Apesar desta característica ser considerada favorável à tolerância à seca, a relação entre elas é ainda desconhecida.

Os efeitos do estresse de seca nos componentes do rendimento podem mudar com o progresso dos estádios de desenvolvimento (Fukui, 1965; Saitoh, 1999; Desclaux et al. 2000). Estresse de seca reduz: número de vagens por planta e tamanho da semente quando aplicado a partir da iniciação da flor até o período de florescimento; número de vagens por planta quando aplicado no florescimento; número de sementes por vagem quando aplicado a partir do final do florescimento até o período de enchimento do grão; e tamanho de semente quando aplicado no final do período de enchimento do grão. Hida et al. (1995) formularam três diferentes conjuntos de cultivares de soja, cada conjunto possuía um par de cultivares com fenologia similar, porém, com diferentes respostas à seca. Diferenças entre as cultivares, em resposta à seca, existiram no tamanho da semente mas não em número de vagens por planta em todos os casos. As cultivares com pequena redução no rendimento em resposta à seca antes do florescimento mostraram pequena redução no tamanho da semente. Também, nesse estudo, apesar da redução no número de vagens ter sido maior, as diferenças nas respostas à seca entre cultivares foi maior nos outros componentes do rendimento. A redução, pelo estresse de seca a partir da iniciação floral até o florescimento, no número de vagens e no tamanho da semente é expressa através da redução da produção de massa seca (Fukui, 1965). Portanto, tolerância à seca com base no rendimento pode refletir a produção de massa seca sob déficit hídrico e a resposta do tamanho da semente à seca. Neste estudo, a BRS 183 mostrou pequena redução no rendimento, bem como na produção de massa seca durante o período de ESTR, com menor redução no tamanho da semente, quando comparada às outras cultivares.

A soja tem a característica de remobilizar carbono e nitrogênio das folhas e caules para as sementes. Westgate et al. (1989) observaram que o crescimento constante da semente era mantido mesmo quando a taxa fotossintética era reduzida pelo estresse de seca. Folhas, caules e pericarpos reduzem seus teores de carboidratos durante o período do estresse, sugerindo que a remobilização do carbono suportava o crescimento da semente. A redução no tamanho da semente pode ser inevitável quando a seca tiver uma duração maior. Entretanto, a cultivar

com menor redução em tamanho de semente pode ser considerada superior na capacidade de remobilização. Assim, é possível especular que ambos, o vigor no crescimento vegetativo e a capacidade de remobilização podem ser importantes características fisiológicas para a tolerância à seca em soja.



## **2.2 Bases agronômicas e fisiológicas das respostas da soja às condições térmicas e fotoperiódicas (04.2000.331-02)**

Norman Neumaier; José Renato Bouças Farias; Alexandre Lima Nepomuceno; Celso Wobeto<sup>1</sup>; Tetsuji Oya<sup>2</sup>; Nelson Delattre; Cesar Augusto Ortiz

A cada ano são lançadas novas cultivares de soja com potencial de produtividade (5 a 6 tons ha<sup>-1</sup>) muito superior à produtividade conseguida na prática (1,7 a 3,0 tons ha<sup>-1</sup>, na média dos Estados produtores de soja na safra brasileira de 2001/02). As diferenças entre produtividade real e potencial são devidas, principalmente, à influência do ambiente. Assim, a maximização do uso das disponibilidades ambientais pela soja é a base para o aumento da produtividade para níveis próximos do potencial. A temperatura e o comprimento do dia (fotoperíodo) constituem importantes sinais do ambiente capazes de sensibilizar as plantas provocando respostas moleculares, fisiológicas e agronômicas das mesmas. A caracterização das respostas ao ambiente e o entendimento dos mecanismos envolvidos são a chave para a maximização do uso das disponibilidades climáticas por genótipos de soja. O objetivo geral do presente subprojeto é o de caracterizar as respostas agronômicas e fisiológicas da soja às condições térmicas, fotoperiódicas e de radiação luminosa, buscando entender os mecanismos envolvidos nestas respostas. Com este entendimento será possível: melhor compreender o

---

<sup>1</sup> FAPA

<sup>2</sup> JIRCAS

florescimento tardio sob dias curtos em soja; determinar as reais causas do tombamento fisiológico (tombamento e morte da plântula de soja livres de patógenos) e; caracterizar o desenvolvimento da soja sob condições de baixa radiação luminosa que normalmente acompanha as condições de excesso de chuva. Como resultados espera-se ampliar o conhecimento para subsidiar o desenvolvimento de cultivares melhor adaptadas às condições específicas de ambientes-alvo, restritos ou não, e para o atendimento de demandas pontuais de agricultores, assistência técnica pública e privada, departamentos comerciais de cooperativas, órgãos ou empresas de securitização agrícola, etc.

### **2.2.1 Caracterização das respostas agrônômicas e fisiológicas de genótipos de soja ao fotoperíodo e temperatura**

Para a caracterização das respostas da soja às condições termofoto-periódicas foram utilizados modelos de simulação aplicados a dados de experimentos anteriores, desenvolvidos em casa de vegetação, na Embrapa Soja. Os experimentos constaram de oito cultivares de soja semeadas semanalmente por 54 semanas consecutivas, o delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados. As cultivares foram escolhidas de acordo com o suas características de florescimento. As cultivares foram: Paraná (cultivar precoce com comportamento de período juvenil longo - PJJ); OCEPAR 8 (cultivar semi-precoce com comportamento de PJJ); OCEPAR 9 (cultivar semi-tardia com comportamento característico de PJJ); Paranagoiana (cultivar tardia com comportamento característico de PJJ); IAS-5 (cultivar precoce com comportamento tradicional); Bragg (cultivar precoce com comportamento tradicional); BR 27 - Cariri (cultivar tardia com comportamento característico de PJJ); e BR 15 - Mato Grosso (cultivar tardia com comportamento tradicional). A semeadura foi feita em vasos de 5,5 L, furados na base, contendo uma mistura de Latosolo Vermelho distroférico (65%), composto orgânico (25%) e areia média lavada (10%). Foram semeadas oito sementes por vaso. Foi feito desbaste, deixando-se duas plantas uniformes e saudáveis por vaso, quando as plantas estavam em V1 (Fehr e Caviness, Special Report 80, Iowa

State Univ., 1977). A irrigação de cada vaso foi feita manualmente duas vezes ao dia de modo a se atingir, temporariamente, a saturação hídrica do solo. As cultivares foram submetidas ao fotoperíodo natural, calculado como a duração do período compreendido entre o início e o fim do dia (considerando  $-6^\circ$  de elevação solar, "civil twilight") da localidade (Distrito da Warta, Londrina, PR), que variou de 11h31m (21 de junho) e 14h25m (23 de dezembro). As temperaturas na casa de vegetação, medidas com um termohigrógrafo, foram mantidas entre a mínima de  $17,5^\circ\text{C}$  e a máxima de  $35,5^\circ\text{C}$ . As leituras foram feitas em cada uma das duas plantas por vaso e constaram de: datas de emergência (VE) e florescimento (R1); estágio vegetativo, número de nós no caule e altura da planta em R1. A partir dessas leituras foram calculados período vegetativo e período reprodutivo. As leituras para cada repetição de tratamento foram representadas pela média das leituras nas duas plantas de cada vaso.

Pesquisas anteriores indicaram que a resposta da soja à temperatura é aproximadamente linear. O modelo linear foi testado para variedades brasileiras de soja e mostrou-se adequado. Para a descrição do período semeadura-emergência, um modelo linear, como função da temperatura, foi ajustado aos dados. Nessa fase, a resposta de todas as cultivares à temperatura foi essencialmente a mesma. A temperatura base, na qual não houve emergência foi de  $7^\circ\text{C}$ . A temperatura acumulada para emergência foi  $65^\circ\text{C}$ . Especificamente para o florescimento, o modelo linear de plateau de Grimm et al. (1996) mostrou-se adequado, para as cultivares testadas, com uma resposta de temperatura de saturação em  $25,8^\circ\text{C}$ . Um modelo exponencial (Sinclair et al., *Crop Sci.* 31:786-790, 1991) foi testado para a descrição das variações nas datas de florescimento sendo influenciadas pelo fotoperíodo. Essa equação descreveu bem a resposta não linear das cultivares brasileiras ao fotoperíodo. A temperatura base para o florescimento de todas as cultivares foi de  $11^\circ\text{C}$ , o que é consistente com cultivares de soja de grupos de maturação elevados nos EUA. As cultivares apresentaram consideráveis diferenças nos seus coeficientes, obtidos no componente do modelo referente ao fotoperíodo. O comprimento do dia que teoricamente inibiu o desenvolvimento rumo ao florescimento foi de aproximadamente 1,5 horas

maior em cultivares com período juvenil longo (PJL) em comparação com cultivares tradicionais. Entretanto, o maior efeito entre as cultivares com PJL e as cultivares tradicionais foi a taxa potencial de desenvolvimento rumo ao florescimento que foi bem menor nas cultivares com PJL do que nas cultivares tradicionais. O número de nós produzido por cada cultivar foi altamente correlacionado com a temperatura acumulada. Todas as cultivares produziram nós essencialmente à mesma taxa, exceto para duas cultivares com PJL. Essas duas exceções provaram, novamente, terem uma taxa potencial de desenvolvimento rumo ao florescimento muito menor do que as outras cultivares. Foi observado, ainda, uma alta correlação entre altura de planta e a duração do período semeadura emergência.

### **2.2.2 Respostas da soja a níveis de radiação fotossinteticamente ativa (RFA)**

Nos três anos do subprojeto (1999/2000, 2000/2001 e 2001/2002), em Londrina e nos dois primeiros anos (1999/2000 e 2000/2001) em Guarapuava, PR, foram executados experimentos para o estudo das respostas da soja a diferentes níveis de radiação solar. Em Londrina, no ano de 1999/2000 os tratamentos constaram de: (1) testemunha (100% da RFA) e; (2) 45% da RFA, por 20 dias a partir do florescimento (R1) ou; (3) por 25 dias durante o enchimento dos grãos (R5). A cultivar teste foi a Embrapa 48. O experimento foi semeado em 26/11/1999 e colhido em 25/03/2000. No segundo e no terceiro ano (2000/2001 e 2001/2002) os tratamentos em Londrina foram: dois níveis de dois fatores, em blocos ao acaso, com quatro repetições. Os fatores e níveis constaram de: 1) Radiação solar (a) testemunha (100% da RFA) e (b) 45% da RFA, por 22 dias durante o enchimento dos grãos (R5); 2) Cultivar (a) Embrapa 48 e (b) Embrapa 59. O experimento foi semeado em 22/11/2000 e colhido em 21/03/2000. Da mesma forma que no ano anterior, a cobertura de sombrite, montada a 1,80 m da superfície do solo, sobre as parcelas, permitiu a passagem e a incidência no dossel vegetal de 45% da RFA, em média, em R5. Portanto, a redução conseguida na RFA incidente no dossel vegetal foi de 55%, quando



comparada com a RFA incidente fora do sombrite (100%RFA). Em 2001/2003 o experimento foi semeado em 15/11/2001, porém foi considerado perdido devido a uma intensa chuva de granizo ocorrida em 14/03/2002, cerca de uma semana antes da maturação (R8).

No experimentos de Guarapuava, em delineamento de blocos ao acaso com parcelas subdivididas, foram testados, nas parcelas, três níveis de RFA (100%; 70% e 45% da RFA) e, nas subparcelas, quatro genótipos: Embrapa 59, BRS 132, OC12158 e OC127837 no experimento de 1999/2000. Em 2000/2001 as cultivares BRS 132 e OC12158 foram substituídas por BRS154 e OC142573. Os experimentos foram semeados em 26/11/1999 e 06/12/2000, respectivamente, e colhidos no mês 04, em ambos os anos. O sombrite foi montado a 1,50 m da superfície do solo.

Tanto em Londrina quanto em Guarapuava, em todos os anos, durante o desenvolvimento dos experimentos, foram efetuadas avaliações fenológicas, fisiológicas e agronômicas.

### **2.2.2.1 Londrina**

Em 1999/2000, os tratamentos não influenciaram a altura de plantas e o número de nós no caule. As plantas submetidas a 100%RFA apresentaram número de vagens significativamente maior do que as plantas submetidas aos tratamentos com restrição da RFA. O número de grãos por vagem foi significativamente maior nos tratamentos 100%RFA e 45%RFA em R1. O número de grãos por planta foi máximo no tratamento com 100%RFA e mínimo no tratamento 45%RFA em R5. Os dados referentes à resposta dos componentes do rendimento à baixa disponibilidade de RFA demonstram os efeitos das baixas intensidades dessa radiação, principalmente durante o enchimento de grãos, na diminuição dos rendimentos. A restrição da RFA incidente no dossel vegetal causou decréscimo na fotossíntese, tanto em R1 quanto em R5. O tratamento com 45%RFA, por 20 dias, após o florescimento não restringiu o rendimento, enquanto que, a mesma restrição, por 25 dias, durante o enchimento dos grãos, causou significativa diminuição de 22% do rendimento.

No ano seguinte, 2000/2001, a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), medida na segunda folha completamente desenvolvida, assim como os níveis de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) não mostraram diferenças significativas entre as cultivares testadas, porém, nas parcelas que receberam o tratamento 45%RFA, durante os 22 dias em R5, tanto  $A$ , na leitura de 21/2, quanto RFA, nas leituras de 21/2 e 28/2, tiveram reduções estatisticamente significativas. As diferenças foram mais visíveis em baixas radiações, pois, nas altas radiações há tendência de saturação de luz. A eficiência fotossintética ( $F_v/F_m$  = rendimento quântico da fotossíntese líquida) das cultivares foi a mesma, em todas as datas de leitura, exceto em 21/2 na qual a 'Embrapa 48' apresentou maior eficiência. A  $F_v/F_m$  foi significativamente maior no tratamento de 45%RFA nas duas leituras feitas durante a aplicação do tratamento mas, na última data de leitura, ocorrida após a extinção do tratamento 45%RFA, a eficiência fotossintética foi maior nas plantas submetidas ao tratamento 100%RFA. O teor de clorofila das cultivares, estimado pelo índice SPAD, foi semelhante na primeira e nas três últimas datas de amostragem mas, da segunda à quinta leitura, foi maior na cultivar Embrapa 48 do que na 'Embrapa 59'. O tratamento 45%RFA apresentou, em todas as datas de leitura, índice SPAD maior do que o do tratamento 100%RFA. Essa resposta, é uma típica adaptação da planta submetida a intensidades subótimas de luminosidade. A resistência estomática (RS) da segunda folha completamente desenvolvida aumentou de forma drástica ao longo das datas de leitura, indicando, provavelmente o envelhecimento da lâmina foliar. Na última data de leitura a 'Embrapa 48' apresentou RS significativamente menor do que a 'Embrapa 59'. A RS não foi influenciada pelos tratamentos de RFA, exceto, na terceira data de leitura, que coincidiu com o primeiro dia do tratamento 45%RFA, onde RS mostrou-se maior do que em 100%RFA. Essa, também, é uma típica resposta à redução drástica da luminosidade, mas que não perdurou nas leituras seguintes, indicando uma adaptação dos estômatos à nova condição de menor RFA. Os tratamentos não influenciaram a altura final de plantas nem o número de nós no caule, que foram, em média, 49 cm e 12 nós, respectivamente. As cultivares apresentaram diferenças significativas em uma

série de características agronômicas. Na média das radiações, a cultivar Embrapa 48 produziu maior número de vagens/planta (com e sem grãos), bem como maior MS de caule/planta. A 'Embrapa 59' apresentou maior número de grãos/vagem. As cultivares não diferiram, entre si, nas seguintes características: número de grãos/planta; massa seca (MS) de vagens com grãos/planta; MS de grãos/planta e índice de colheita aparente  $\{ICA [MS \text{ de grãos}/(MS \text{ de grãos} + MS \text{ de caule})]\}$ . Em contraste com o experimento de 1999/2000, em 2000/2001 não houve diferenças significativas entre os tratamentos de radiação (100%RFA e 45%RFA por 22 dias, em R5) nas características acima citadas, exceto para ICA. Houve uma tendência ( $P=0,053$ ) do número de vagens vazias/planta ser maior no tratamento com restrição da radiação (45%RFA). Possivelmente, a restrição da RFA, em R5, deve ter causado uma menor disponibilidade de fotoassimilados e, conseqüentemente, maior abortamento de grãos. O ICA, medido numa amostra de dez plantas em R8, diferiu significativamente entre os tratamentos de RFA. O tratamento sem restrição de radiação (100%RFA) apresentou ICA de 0,65, portanto, maior do que o ICA de 0,60 apresentado pelo tratamento 45%RFA. A área foliar (AF) foi medida em 10/01, 07/02, 21/02, 13/03 e 21/03 e, em nenhuma data houve diferença significativa entre cultivares ou tratamentos de RFA, exceto na penúltima amostragem, onde plantas sob o tratamento 45%RFA apresentaram AF significativamente maior do que sob 100%RFA. Esse resultado pode ser uma indicação de que a restrição de RFA em R5, imposta pelo tratamento 45%RFA, pode ter estimulado um crescimento tardio de área foliar. Não houve diferença significativa, tanto entre cultivares quanto entre tratamentos na MS de raiz/planta, medida em 10/01, 07/02 e 21/01/01, apesar de ter havido uma tendência da 'Embrapa 48' apresentar maior MS de raiz/planta do que a 'Embrapa 59'. No entanto, a MS de nódulos que foi maior, na segunda data de amostragem, para o tratamento 45%RFA, decresceu drasticamente, a partir do início do tratamento, ou seja, da segunda para a terceira amostragem, enquanto que, nesse período, no tratamento 100%RFA, apresentou um leve crescimento. Os dados referentes à resposta dos componentes do rendimento à baixa disponibilidade de RFA, em R5, em contraste com o experimento

de 1999/2000, não demonstraram de forma clara os efeitos das baixas intensidades dessa radiação, na diminuição dos rendimentos. Não houve diferença significativa, no rendimento, entre as cultivares testadas. Entretanto, a redução em 55% na RFA, por 22 dias, durante o enchimento dos grãos, causou significativa diminuição de 21% do rendimento, repetindo a redução observada em 1999/2000 (22%). Assim, ficou consubstanciado que intensidades subótimas de RFA durante o enchimento dos grãos afetam negativamente o rendimento da soja, confirmando que, a disponibilidade de altas intensidades de RFA, nessa fase, é essencial para garantir altos rendimentos. O enchimento dos grãos constitui a última etapa da formação do rendimento e, nessa fase, a demanda por produtos da fotossíntese é máxima. Por isso, nesse período, limitações como baixa RFA podem afetar negativamente a fotossíntese e outros mecanismos fisiológicos e, conseqüentemente, o rendimento.

#### 2.2.2.2 Guarapuava

Na safra 1999/2000, a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  (A) mostrou redução significativa nas parcelas submetidas a 45%RFA e a 70%RFA. Na comparação entre genótipos, OC12158 apresentou taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  menor que a dos outros genótipos. A resistência estomática foi significativamente reduzida nos tratamentos de 45%RFA e 70%RFA. O genótipo BRS 132 apresentou resistência estomática menor que a dos outros genótipos. A partir do enchimento de grãos (R5), a massa seca total foi significativamente maior sob 100%RFA, em comparação aos outros dois níveis. Na maturação (R8), os genótipos Embrapa 59 e OC12158 apresentaram massa seca total significativamente maior do que o genótipo OC127837. Níveis subótimos de RFA favoreceram a ocorrência de doenças de final de ciclo, DFC. Essa resposta foi dependente do genótipo. A duração dos períodos vegetativo, reprodutivo e ciclo total, não foi influenciada pelos níveis de RFA. A altura de plantas, tanto em R1 quanto em R5, e o crescimento pós-florescimento não foram influenciados pelos níveis de RFA, entretanto ambas as características diferiram entre genótipos. O acamamento foi significativa-

mente maior nos tratamentos com restrição de RFA. 'Embrapa 59' apresentou acamamento próximo do máximo, seguido do genótipo OC127837. As restrições na RFA causaram reduções significativas no rendimento dos genótipos. As reduções nos rendimentos, causadas pela maior restrição de radiação (45%RFA), variaram de 25,6% para 'Embrapa 59' a 67,3% para OC127837. Os genótipos Embrapa 59 e BRS 132 apesar de terem seus rendimentos reduzidos, com maiores restrições de RFA, foram menos sensíveis às baixas radiações do que os genótipos OC12158 e OC127837.

Em 200/2001, exceto para eficiência fotossintética, todas as características relacionadas com a fotossíntese, (radiação fotossinteticamente ativa - RFA, taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  - *A*, resistência estomática - *RS*, teor de clorofila - *SPAD*), medidas em 25 e 26/03/01, na segunda folha completamente desenvolvida, não mostraram diferenças significativas, entre os genótipos e entre os tratamentos de 100%RFA, 70%RFA e 45%RFA, esses dois últimos aplicados por 38 dias, a partir do florescimento pleno, e durante o enchimento dos grãos (de 15/02 a 25/03/01). A falta de resposta deveu-se, provavelmente, às avaliações tardias, feitas após a extinção dos tratamentos de restrição de RFA. Caso as avaliações tivessem sido feitas durante a aplicação dos tratamentos de restrição de RFA, muito possivelmente, haveria diferenças significativas, entre esses tratamentos, para as características fisiológicas relacionadas à fotossíntese. No entanto, a cultivar Embrapa 59 apresentou eficiência fotossintética significativamente maior do que OC127837.

Não houve diferença significativa entre níveis de radiação para massa seca (MS) de folhas em R1, R5 e R6, mas houve entre genótipos, nesses três estádios. Em R1, o genótipo OC127837 apresentou maior MS de folhas do que OC142573. Em R5, nos genótipos OC142573 e 'Embrapa 59', a MS de folhas foi maior do que em OC127837 e BRS 154. Em R6, OC142573 teve maior MS de folhas do que 'BRS 154'. Entre os níveis de radiação, não houve diferença significativa para MS de caules, em nenhum dos estádios. Também, não houve diferença significativa entre genótipos para MS de caules, exceto para Embrapa

59 e OC142573, em R1, que apresentaram menor MS de caules do que OC127837. Em R8, houve interação significativa radiação x genótipo para MS do caule, onde, em 70%RFA, o genótipo OC142573 apresentou maior MS de caule do que os genótipos OC127837 e Embrapa 59. A MS total em R1, variou significativamente apenas entre genótipos, com OC127837 mostrando maior MS total do que OC142573 e 'Embrapa 59'. Nos demais estádios (R5, R6 e R8), apenas os tratamentos de restrição de RFA causaram diminuição significativa na MS total, portanto, não houve diferença entre os genótipos. Em R8, no entanto, houve efeito de interação radiação x genótipo para esta característica, onde, sob 70%RFA, OC142573 mostrou maior MS total do que OC127837 e Embrapa 59.

Apenas os genótipos apresentaram diferenças significativas com relação às DFC. O índice de DFC foi significativamente menor na 'BRS 154' comparado aos demais genótipos. A incidência de Oídio em 45%RFA foi dependente de genótipo (dados não mostrados). Essa mesma resposta foi observada para o ano de 1999/2000, os quais indicaram que níveis subótimos de RFA favorecem o aparecimento das DFC, mas esta resposta é dependente do genótipo.

Não houve influência do nível de RFA na duração dos períodos vegetativo, reprodutivo e ciclo total, entretanto, os genótipos apresentaram algumas pequenas diferenças. 'Embrapa 59' apresentou menor período reprodutivo do que os demais genótipos, tanto em valor absoluto quanto relativo ao ciclo total.

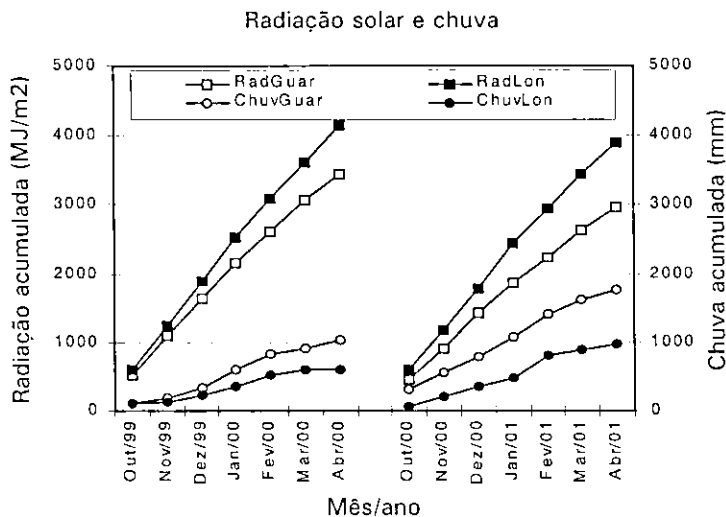
Os níveis de RFA e genótipos apresentaram diferenças significativas na altura de plantas, apenas no florescimento (R1). Foram observadas diferenças significativas para o crescimento pós-florescimento (CPF) entre RFAs e entre os genótipos, com 100%RFA, 70%RFA e 'Embrapa 59' apresentando maior CPF do que 45%RFA e, 'BRS 154 e OC127837, respectivamente. O índice de acamamento diferiu entre os níveis de RFA e entre os genótipos. Nos níveis de 45%RFA e de 70%RFA, o acamamento foi significativamente maior ao observado no nível de 100%RFA. Entre os genótipos, 'Embrapa 59' e OC127837 apresentaram acamamento maior do que OC142537 e BRS 154.

O rendimento foi significativamente reduzido com a diminuição da disponibilidade de RFA, o mesmo acontecendo com o ICA, indicando que, em condições de radiação restrita, o particionamento relativo de fotoassimilados aos grãos é menor do que em condições não restritivas. Ao contrário do acontecido no ano anterior (1999/2000), não houve diferença significativa entre os genótipos. A redução no rendimento, causada pelo nível mais baixo de radiação (45%RFA), foi de 40%, enquanto que para 70%RFA a redução foi de cerca de 15%. Estes resultados praticamente repetem os resultados do ano anterior e indicam que lavouras de soja localizadas em regiões com níveis menores de RFA podem estar tendo seus rendimentos limitados pela radiação solar subótima. Além disso, mostraram que, em um dos anos (1999/2000), existiu variabilidade genética para adaptabilidade a regiões com menores níveis de radiação, o que possibilitaria o melhoramento genético de genótipos adaptados a esses ambientes-alvo específicos, mas não no ano seguinte (2000/2001) apontando para respostas diferenciadas dos genótipos em função do ano.

### 2.2.2.3 Londrina x Guarapuava

Os rendimentos em Londrina (3,98 tons ha<sup>-1</sup> em 1999/2000 e 2,33 tons ha<sup>-1</sup> em 2000/2001, média de 3,16 tons ha<sup>-1</sup>) na média, ainda foram superiores aos de Guarapuava (2,16 tons ha<sup>-1</sup> em 1999/2000 e 2,82 tons ha<sup>-1</sup> em 2000/2001, média de 2,49 tons ha<sup>-1</sup>). Nos experimentos de Londrina apenas as cultivares Embrapa 48 e Embrapa 59 foram testadas, enquanto que em Guarapuava o experimento foi executado utilizando outros genótipos. Os solos, em ambos os locais, são considerados de alta fertilidade. Três grandes diferenças, entre os locais, são temperatura, precipitação pluviométrica e radiação solar durante a safra de soja (Figura 2.1). Os dados de chuva acumulada durante as safras de soja mostram que, em Guarapuava, chove bem mais que em Londrina. Com isso, a radiação solar acumulada é menor em Guarapuava e a taxa fotossintética (*A*) é dependente da RFA (Figura 2.2). Também, as temperaturas médias são menores em Guarapuava, indicando que as temperaturas noturnas também são menores. Em

(a)



(b)

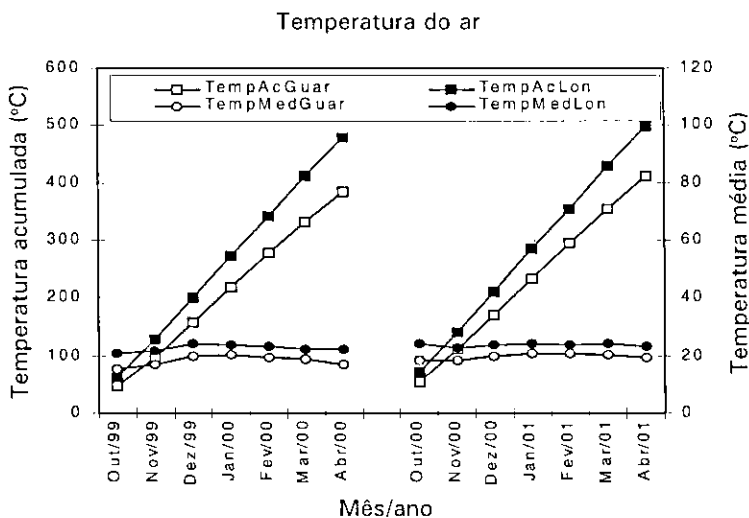


FIG. 2.1. (a) Radiação acumulada, calculada como a soma das médias dos decêndios (MJ/m<sup>2</sup>) e chuva acumulada, calculada como a soma das precipitações mensais e, (b) temperatura acumulada, calculada pela soma das médias de decêndios (em °C) e temperaturas médias mensais, nas safras 1999/2000 e 2000/2001, em Londrina e em Guarapuava, PR. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2003.



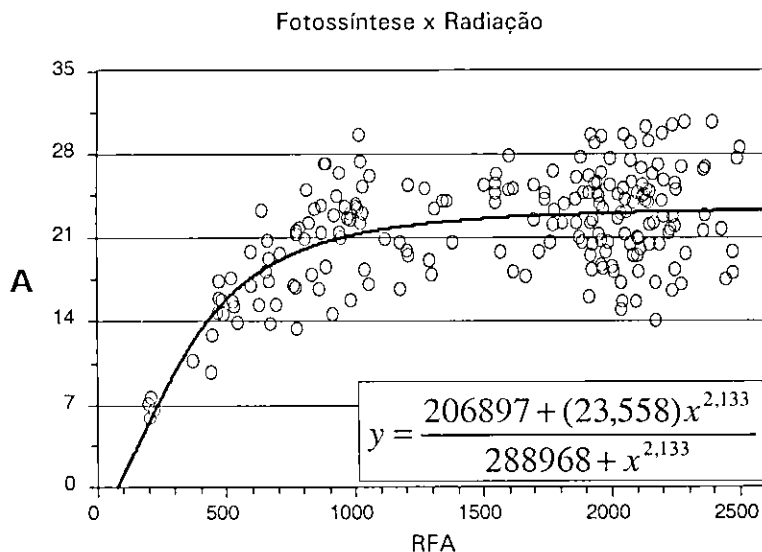


FIG. 2.2. Relação entre a taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ,  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e a radiação fotossinteticamente ativa (RFA,  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), dados da safra 1999/2000. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2003.

Guarapuava (Entre-Rios), local do experimento, as temperaturas noturnas chegam a atingir valores menores que  $15\text{ }^\circ\text{C}$  (informação pessoal, Eng. Agr. Celso Wobeto - FAPA). Assim, os rendimentos menores em Guarapuava podem estar sendo determinados pelas características climáticas citadas, atuando isoladas ou conjuntamente, sobre as cultivares. Os resultados conseguidos até o momento indicam que, muito provavelmente, será possível, através do melhoramento genético, desenvolver cultivares melhor adaptadas às condições específicas da região.

### 2.2.3 Caracterização da(s) causa(s) do tombamento fisiológico em soja

O tombamento fisiológico de plântulas de soja, também conhecido como cancro de calor, tem sido observado na maioria das regiões produtoras,

acontecendo, sempre, após um período de calor intenso. Caracteriza-se por plântulas tombadas com lesão de estrangulamento do hipocótilo e pela ausência de agentes patogênicos. Para a caracterização das suas causas foram executados três experimentos.

### 2.2.3.1 Temperatura e estádios de desenvolvimento

Para a determinação das temperaturas que causam o problema, foi desenvolvida metodologia específica, com a construção de um equipamento que simula a temperatura da superfície do solo através de resistências elétricas controladas por termostatos digitais. A cada 2-3 dias, 60 sementes da cultivar de soja BRS 133 foram colocadas para germinar em rolos de papel Germitest, umedecidos com água destilada, mantidos em câmara BOD, a 25°C, no escuro por 4-5 dias. Plântulas germinadas, sadias e de tamanho uniforme foram transplantadas para suportes sobre bandejas plásticas com solução nutritiva Hoagland completa, em casa-de-vegetação. Tratamentos de temperatura de 35°, 40°, 45°, 50° e 55°C foram aplicados ao colo de plântulas, nos estádios VC e V2, em dois experimentos, respectivamente. Em outro experimento, o colo de plântulas nos estádios VE, VC, V1, V2 e V3 foram submetidos ao tratamento de 50°C. Simulando as temperaturas na superfície do solo, as resistências foram colocadas em contato com o colo das plântulas e o tempo para o aparecimento de lesões (escaldadura) e/ou o tombamento foi anotado, assim como o número de plântulas com lesões no colo e/ou tombadas. Cada experimento constou de quatro repetições e teve a duração de três horas. Para o cálculo das médias de tempo, quando não houve o aparecimento de lesão e/ou tombamento, foi considerado o tempo máximo do experimento, ou seja, 180 minutos.

Tanto nas plântulas em VC como em V2, as lesões e o tombamento apareceram em tempos menores com o aumento das temperaturas e, todas as temperaturas, exceto 35°C, em VC, causaram lesões no colo. Nas plântulas em VC, apenas as temperaturas igual ou superiores a 45°C causaram tombamento e, nas plântulas em V2, o tombamento ocorreu somente nas temperaturas de 50° e 55°C.

Em outro experimento, todos os estádios (VE a V3), a 50°C, apresentaram lesões no colo e tombamento, porém apenas 25% das plântulas em V2 e V3 tombaram.

Os resultados indicam que, para plântulas de soja nos estádios VC e V2, as temperaturas, na superfície do solo, de 45° e de 50°C, respectivamente, ou superiores, causam tombamento fisiológico e plântulas em VC, VE e V1 são mais sensíveis do que em V2 e V3.

#### 2.2.4 Caracterização dos efeitos do excesso de chuva na fotossíntese de folhas de soja

O experimento foi executado, em casa de vegetação, para investigar se a soja responde, como o feijão, à chuva (Ishibashi et al., *Plant Physiol* 111:635-640, 1996). O experimento foi semeado na segunda semana de janeiro, em blocos casualizados com parcelas subdivididas, com os tratamentos (com e sem chuva) na parcela e cultivares na subparcela. Os vasos (subparcelas) continham duas plantas cada e foram irrigados por gotejamento. No início de R5, em 14/03/2001, foi feita leitura da taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> ou fotossíntese (**A**) no folíolo central da segunda folha completamente desenvolvida das duas plantas de cada vaso. No dia seguinte (15/03) os vasos do tratamento Com Chuva receberam 24 horas de chuva artificial (aspersão). No dia seguinte (16/03) à aplicação do tratamento de chuva artificial e aos sete dias após a aplicação deste, foram feitas novas leituras de **A** em todos os vasos. Os resultados indicam que, para uma mesma RFA (Figura 2.3a), houve uma diminuição significativa de **A**, imediatamente após, e, aos sete dias depois da chuva (Figura 2.3b). A taxa **A** diminuiu 29,4% no dia seguinte ao tratamento de 24h de chuva e, mesmo aos sete dias após a chuva, **A** ainda estava 7% menor nas plantas que receberam 24h de chuva (Figura 2.3b). Duas cultivares, BR 16 e Campos Gerais não apresentaram diferenças significativas, em **A** (medidas após 24h de chuva), entre os tratamentos Com e Sem chuva, indicando uma possível melhor adaptação a regiões mais chuvosas.

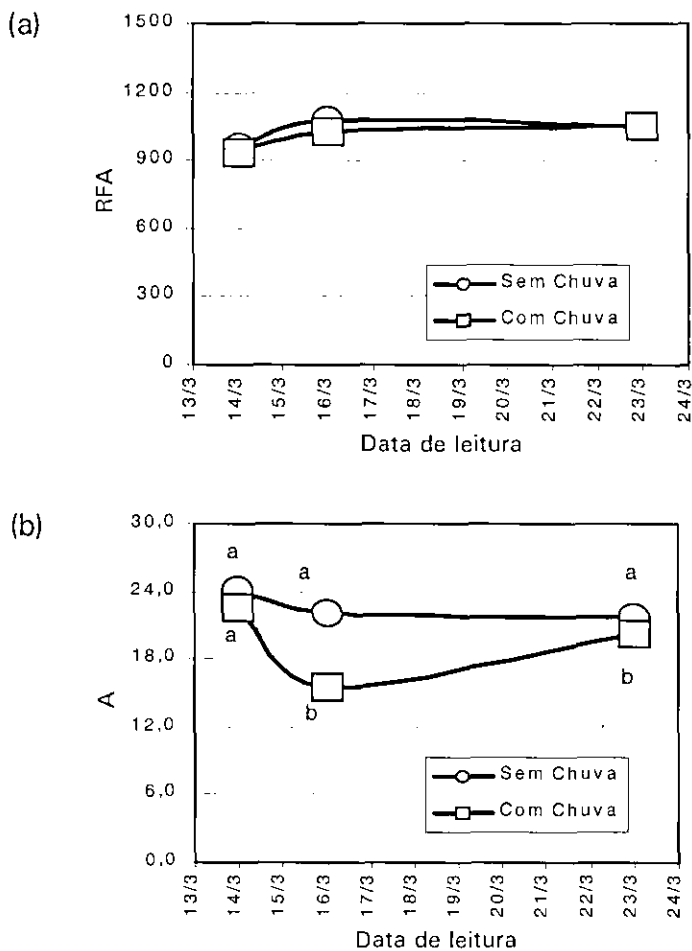


FIG. 2.3. (a) Radiação fotossinteticamente ativa e (b) taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$  ( $A$  média de 8 cultivares), em três datas, uma antes e duas depois de 24h de chuva. Ausência de letras ou letras iguais na vertical denotam diferenças não significativas (Tukey,  $P < 0,05$ ). Embrapa Soja, Londrina, PR, 2003.

## 2.3 Identificação, clonagem e seqüenciamento de genes diferencialmente expressos em resposta às variações climáticas em soja (04.2000.331-03)

Alexandre Lima Nepomuceno; Eliseu Binneck<sup>1</sup>; Norman Neumaier;  
José Renato Bouças Farias; João Flávio Veloso Silva;  
Carlos Alberto Arrabal Arias; Tetsuji Oya<sup>2</sup>; Silvana Regina Rockenbach Marin;  
Noelle Giacomini<sup>3</sup>; Renata Stolf<sup>3</sup>; Juliana Molina<sup>3</sup>; Renata Fuganti<sup>3</sup>;  
Adriane Wendland<sup>4</sup>; Aguida Morales<sup>5</sup>; César Augusto da Silveira

Somente no ano de 2002, o complexo soja contribuiu diretamente com um superávit de mais de U\$ 5 bilhões na balança comercial brasileira. Cada vez mais a tecnologia assume fator de sustentação da competitividade agropecuária, cuja taxa de crescimento, particularmente, na última década, foi sempre superior a do crescimento global do País. Entretanto, isso não permite concluir que o aumento da renda do produtor e da economia brasileira estarão garantidos. Isto somente será possível pelo continuo aumento da produtividade, aliada à redução dos custos de produção e/ou agregação de valor aos produtos. Para conseguir estes resultados, o Brasil deve continuar investindo em biologia e agricultura avançadas como países desenvolvidos tem feito. O subprojeto Identificação, clonagem e seqüenciamento de genes diferencialmente expressos em resposta às variações climáticas em soja tem sido conduzido desde a safra 1999/2000 com recursos do PADCT, CNPq (Plano Sul), IFS (Int. Found. for Science, Suécia), JIRCAS (Japan International Research Center for Agricultural Sciences) e EMBRAPA. Até o final do ano 2000 haviam sido identificados mais de cem genes diferencialmente expressos quando plantas são submetidas a condições de seca. No ano 2001 o subprojeto introduziu a análise de expressão gênica em plantas submetidas a diferentes fotoperíodos e a análise

---

<sup>1</sup> Bolsista de Pós-doutorado pelo CNPq

<sup>2</sup> JIRCAS - Japan International Research Center for Agricultural Sciences

<sup>3</sup> Estagiária - Universidade Estadual de Londrina

<sup>4</sup> Estagiária - Esalq/Piracicaba

<sup>5</sup> Estagiária - UNIFIL

de expressão em raízes de soja sob ataque de nematóides. O subprojeto também passou a integrar o Projeto Genoma Funcional de Raízes da Embrapa (PROGEM/INOVAGEM), recebendo parte dos recursos de custeio e investimento. As análises de *Diferencial Display* para seca, fotoperíodo e nematóides e a construção de bibliotecas de DNA complementar (DNAc) construídas a partir de genes expressos em plantas de soja submetidas a esses fatores bióticos e abióticos, e o subsequente seqüenciamento dessas bibliotecas permitiu a criação de banco de seqüências com mais de 8000 acessos. Cada acesso representa um gene expresso em plantas de soja. O produto final que se espera será uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de defesa a estresses bióticos e abióticos. A disponibilização de genes envolvidos nessas respostas está sendo feita através da criação de banco de genes *in vivo* e *in vitro*. As informações referentes as seqüências dos genes, assim como, as análises funcionais dos mesmos estão sendo disponibilizadas no endereço [www.cnpso.embrapa.br/bioinformatica](http://www.cnpso.embrapa.br/bioinformatica). Essas informações permitem rápido acesso e uso em programas de melhoramento genético por transgenia ou assistido por marcadores moleculares.

O genoma de uma espécie é a informação completa em termos de seqüências de DNA de regiões que codificam para genes, assim como, de regiões não codificadoras. Na maioria dos seres eucariotes, como as plantas e os seres humanos estima-se que aproximadamente 5% ou menos do genoma correspondem a seqüências codificadoras de genes cuja expressão produz proteínas e enzimas com atividade biológica. Ainda não foi estabelecida a função do restante do genoma (95%), conhecido como DNA lixo, (*Junk DNA*). Entretanto, presume-se que estas seqüências teriam papel fundamental em eventos evolutivos, assim como, na regulação da expressão de determinados genes.

O seqüenciamento do genoma completo de uma espécie é conhecido como Genoma Estrutural e é executado a partir da extração do DNA total da espécie em estudo. Este DNA é, em seguida, fragmentado em tamanhos menores (pelo uso de enzimas de restrição, ultra-som, nebulizador, etc), os quais são clonados em vetores (Cromossomo Ar-

tificial de Levedura - YAC; Cromossomo Artificial de Bactéria - BAC; plasmídios; bacteriófagos) para que o seqüenciamento seja feito posteriormente em seqüenciadores automatizados (ABI3100, ABI3700, Mega-Bace). Os fragmentos de seqüências geradas são montados, com o uso de ferramentas computacionais geradas pela Bioinformática. A obtenção e anotação do genoma estrutural de uma espécie gera um mapa físico de toda a seqüência de DNA do genoma. Mapas físicos, em conjunto com mapas de ligação (gerados pelo uso de RFLP, Microsatélites, AFLP, etc), são ferramentas cada vez mais úteis em programas de melhoramento genético assistido por marcadores moleculares.

A análise de genomas estruturais, através de programas de Bioinformática de predição como o *GenScan*, prenunciam a presença de genes baseando-se na presença de seqüências como: TATAA *box*; códons de início; códons de finalização; seqüências sinalizadoras de separação (*splicing*) entre *exons* e *introns*. Entretanto, a presença de uma região codificadora não necessariamente implica que essa seqüência será transcrita e traduzida, na forma de uma proteína, com função bioquímica e biológica. A seqüência promotora de um gene, assim como, a presença de outras seqüências reguladoras (*cis-acting-elements*; *enhancers*; etc), é que irão regular quando, onde e como um gene será transcrito, na forma de uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) e, posteriormente, traduzido em uma proteína.

Estima-se que plantas superiores como a soja tenham entre 80.000 a 100.000 genes, que serão expressos ou não, nas diferentes fases de desenvolvimento e/ou em respostas ao diferentes fatores, bióticos e abióticos, a que estas plantas estarão expostas, durante seu ciclo de vida. Compreender como e quando esses genes serão expressos, quais suas interações com outros genes e como são regulados, são os principais objetivos da Genômica Funcional. Enquanto estudos de Genômica Estrutural utilizam o DNA como matéria prima na construção de bibliotecas genômicas, na Genômica Funcional a matéria prima para construção de bibliotecas de DNA complementar (cDNA) é o mRNA. O mRNA do organismo em estudo é coletado e transformado em cDNA, através

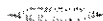
de uma reação de transcrição reversa, *in vitro*. Posteriormente, o cDNA gerado é clonado em vetores apropriados, gerando uma coleção de todos os genes expressos, quando do momento da coleta do tecido do organismo em estudo. Esta coleção de genes clonados é chamada de biblioteca de cDNA. Normalmente, bibliotecas de cDNA são construídas direcionalmente para que a região mais informativa e mais conservada (região 5') seja seqüenciada. Desta forma, obtêm-se, rapidamente, um número elevado de seqüências parciais de genes expressos em determinada situação. Estas seqüências parciais são chamadas de etiquetas de seqüências expressas, ou EST (*Expressed Sequence Tags*).

A estruturação de bancos de EST tem sido de grande valia na identificação da função bioquímica e biológica de muitos genes. Genes expressos codificam proteínas com funções estruturais, enzimáticas, de regulação ou de armazenamento. Entretanto, num contexto mais amplo de desenvolvimento do organismo, e interagindo com outras moléculas, estes genes participam de processos fisiológicos que desencadeiam, ao final, determinadas respostas biológicas. Por exemplo, um gene identificado como similar a uma ciclina nos dá uma idéia da função bioquímica da proteína, uma vez que ciclinas estão envolvidas, diretamente, na regulação do ciclo de divisão celular. Entretanto, se esta proteína específica somente é expressa em raízes de soja de cultivares resistentes, atacadas por nematóides, e não é expressa nas cultivares suscetíveis, este fato pode sugerir que a expressão desta proteína está diretamente relacionada ao mecanismo de defesa contra o ataque de nematóides.

Apesar de simples, esse exemplo dá uma idéia da importância dos bancos de genes onde, por similaridade, pode-se tentar inferir possíveis funções de um determinado gene. Entretanto, a complexidade de respostas e mecanismos, criados em milhões de anos de evolução, são mais difíceis de serem analisadas de uma maneira ampla. Normalmente, não é a expressão de um ou dois genes, mas a co-expressão de dezenas ou centenas de genes, expressos em um determinado momento, interagindo em diferentes níveis, que diferencia uma resposta biológica de outra.



Os recentes avanços, na biologia molecular e na bioinformática, têm permitindo que possamos analisar centenas ou milhares de genes expressos em um mesmo momento, permitindo identificar genes que são ativados, inativados, ou que têm seu nível de expressão regulado para mais ou para menos (*up regulation*; *down regulation*) em função de fatores bióticos ou abióticos. Entre as metodologias que mais se destacam hoje estão a Apresentação Diferenciada em gel (*Differential Display - DD*), Macro arranjos de DNA (*DNA Macroarrays*), Análise Seriada de Expressão Gênica (*SAGE - Serial analysis of gene expression*) e Micro arranjos de DNA (*DNA Microarrays*). Todas técnicas tem seus pontos positivos e negativos, levando-se em conta vários fatores, que incluem os custos de implementação, as dificuldades de otimização e reprodutibilidade dos procedimentos laboratoriais, os volume de dados gerados, etc.



## **2.4 Estratégias para amenizar impactos decorrentes das adversidades climáticas (04.2000.331-05)**

Tetsuji Oya<sup>1</sup>; Alexandre Lima Nepomuceno; José Renato Bouças Farias; Norman Neumaier; Alexandre José Cattelan; Nelson Delattre; Claudinei Toledo

Com o avanço na compreensão dos mecanismos envolvidos nas diversas respostas que as plantas manifestam quando submetidas a períodos de estresse, várias novas alternativas tem sido propostas no sentido de reduzir as perdas causadas por variações extremas do clima. Entre estas alternativas uma série de produtos químicos, biológicos e orgânicos têm sido desenvolvidos, testados e introduzidos no mercado agrícola. Muitos destes produtos baseiam seu modo de ação na alteração de processos fisiológicos e bioquímicos no sentido de ativar os mecanismos de defesa das plantas. Entretanto, existe uma

---

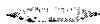
<sup>1</sup> Jircas - Japan International Research Center for Agricultural Sciences

variabilidade muito grande nas respostas induzidas por estes produtos, o que fortalece a necessidade de que sejam estudados, em detalhe, os fatores envolvidos e as condições em que estes produtos devam ou não ser utilizados. No primeiro e segundo ano do subprojeto 04.2000.331-05 foi testado o produto *THIAMETHOXAN* enquanto que no terceiro ano foi testado o produto Acido Acetil Salicílico (ASA) com o objetivo avaliar efeitos sobre as características agrônômicas e fisiológicas da soja, capacidade de favorecer a produtividade durante situações de estresse, e a reprodutibilidade dos efeitos em anos consecutivos.

No primeiro ano de teste os resultados permitiram constatar que o produto *THIAMETHOXAN* atuou no desenvolvimento das plantas. Após o segundo ano de testes foi confirmado a ação do produto atuando no desenvolvimento das plantas, nas condições edafoclimáticas do experimento. Vários parâmetros foram significativamente afetados, ou mostram tendência de sofrer ação do produto *THIAMETHOXAN*. Normalmente, os valores destes parâmetros aumentaram quando da aplicação do produto, favorecendo um desenvolvimento inicial mais vigoroso em termos de potencial para suportar períodos de estresse ambiental. Foi observada também interação entre dosagens do produto e as condições hídricas da cultura. Assim como sob condições de déficit hídrico o produto pode favorecer um aumento de produtividade, sob condições de excesso de água pode favorecer uma redução na produtividade. Neste aspecto, menores doses poderiam favorecer aumentos de produtividade na média das situações edafoclimáticas, enquanto que, dosagens mais elevadas poderiam aumentar o risco de acamamentos, conseqüentemente, acarretando prejuízos na produtividade. A redução desses riscos pode ser testada com o uso de populações menores de plantas e genótipos menos suscetíveis ao acamamento.

No terceiro ano do projeto foi testado o Acido Acetil Salicílico (ASA). A presença do ASA em plantas é conhecida e tem sido demonstrado que o seu acúmulo após estresses bióticos e abióticos estaria relacionado ao aumento das defesas da plantas contra estes estresses. Neste sentido, abriu-se a hipótese de que aplicações artificiais de ASA em plan-

tas poderiam protegê-las contra possíveis estresses do ambiente. Os resultados indicam efeitos não significativos sobre o rendimento e desenvolvimento das plantas que receberam aplicação de ASA. Somente peso fresco e peso seco de vagens e peso seco de 100 sementes foram significativamente diferentes (Tukey 5%). Entretanto, estas diferenças não apresentaram correlação alguma com a aplicação do ASA já que os controles não diferenciaram das doses aplicadas. Um ano, todavia, não foi suficiente para avaliar os efeitos do produto uma vez que não houve problemas sérios de estiagem durante a safra 2001/2002.



## **2.5 Modelos de simulação do desenvolvimento da cultura da soja em resposta às variáveis do ambiente (04.2000.331-06)**

José Renato Bouças Farias; Alexandre Lima Nepomuceno; Norman Neumaier; Thomas R. Sinclair<sup>1</sup>; Lincoln Zotarelli<sup>2</sup>; Tetsuji Oya<sup>3</sup>; Ivan Rodrigues de Almeida

Com o atual cenário agrícola globalizado, incremento nos rendimentos e redução dos custos e dos riscos passaram a ser exigências básicas à competitividade. Aumento de eficiência no uso de recursos e insumos, melhoria qualitativa dos produtos agrícolas e preservação dos recursos naturais são desafios da moderna agricultura. O enfoque sistêmico viabilizado pelo uso de modelos de simulação de desenvolvimento, permite integrar os efeitos de diferentes condições edafoclimáticas sobre o comportamento da cultura. Sistemas de auxílio à tomada de decisão são fundamentais para superar esses desafios e obter produtos competitivos e ambientalmente sustentáveis.

<sup>1</sup> USDA/ARS - University of Florida

<sup>2</sup> Engenheiro Agrônomo, Doutorando pela UFRRJ

<sup>3</sup> JIRCAS

O presente subprojeto teve por objetivo geral disponibilizar modelos de previsão de rendimentos e de simulação do desenvolvimento da cultura da soja, capazes de constituírem-se em ferramentas eficazes para suporte à tomada de decisões e a estudos complementares, auxiliando na definição de atitudes operacionais e estratégicas, desde ao nível de país (governamental) até do produtor rural, contribuindo para o setor agrícola brasileiro tornar-se mais eficiente e competitivo.

Todos os modelos ajustados foram validados comparando-se os resultados das simulações aos valores observados a campo. Para tanto, foi organizado e mantido atualizado um banco de dados com os principais elementos meteorológicos e séries históricas de área cultivada, produção e rendimento de grãos, por município, de diferentes estados produtores. Toda esta base encontra-se informatizada, prontamente disponível aos usuários interessados.

Dando continuidade à parceria estabelecida em 2000 com a Universidade da Florida e com o USDA-ARS, tomando por base um modelo desenvolvido e descrito por Sinclair (1986), em 2002 foram concluídos e definidos os ajustes das novas funções para melhor estimativas do modelo em regiões tropicais. O modelo estima o desenvolvimento da cultura da soja, da emergência à maturação fisiológica, através dos balanços de nitrogênio, carbono e água. O incremento da área foliar é uma função da temperatura. A biomassa é estimada pela radiação solar. E, finalmente, o rendimento de grãos depende do aumento linear do índice de colheita. O modelo também calcula diariamente o balanço de água no solo e, quando o solo torna-se suficientemente seco, há inibição do desenvolvimento foliar, do acúmulo de matéria seca e da fixação do nitrogênio. A fixação biológica do nitrogênio é sensível à ocorrência de déficit hídrico, podendo resultar numa significativa influência nos resultados da simulação. Níveis insuficientes de nitrogênio causam inibição do desenvolvimento da área foliar e, persistindo, acúmulo de massa e encurtamento do ciclo. Procurou-se, então, adaptar para soja a proposta de Jamieson e Semonov (2000) para estimar o acúmulo diário de N em trigo, baseado nas exigências de nitrogênio para o desenvolvimento de nova área foliar e de matéria seca. Porém, o ajuste

do modelo requer a consideração da possibilidade de fixação de N<sub>2</sub> como uma fonte de N. O fato da soja usar a fixação de N<sub>2</sub> como uma fonte de N para compensar níveis inadequados de N no solo, pode inviabilizar ou interferir na simulação do balanço de N no solo.

Para ajustar as estimativas do modelo envolvendo N, foram usados os dados obtidos por Zotarelli (2000), em experimento conduzido na safra 1998/99, sem irrigação, no qual o balanço de nitrogênio na cultura da soja foi monitorado ao longo de todo ciclo, tanto em plantio convencional quanto em semeadura direta. Foram comparadas as estimativas do modelo com os valores efetivamente observados de matéria seca e acúmulo de nitrogênio, ao longo da estação de crescimento, assim como do rendimento de grãos, na colheita. Resultados obtidos em outros experimentos, conduzidos durante nove safras (1991/92 a 1999/2000), envolvendo 10 cultivares de soja submetidas a dois níveis de disponibilidade hídrica no solo em cada ano, foram usados, também, para ajustar e validar o modelo. Para cada safra e nível de disponibilidade de água, foram obtidas as estimativas da fenologia, matéria seca e rendimento de grãos. Considerando que o modelo calcula o rendimento potencial para cada ambiente, os rendimentos simulados foram comparados àquele obtido pela cultivar mais produtiva em cada condição (safra x nível de água). A fenologia desta mesma cultivar foi usada para ajustar as estimativas fenológicas do modelo. Em cada safra, foram coletados dados diários de temperatura do ar, precipitação pluviométrica e de radiação solar, em estações automáticas e convencionais, situadas em local próximo aos experimentos, além das principais características físicas do solo. Selecionaram-se, como melhores ajustes, aqueles cujos valores estimados se mostraram mais próximos dos valores observados em campo e que, também, apresentaram, na análise de regressão em que forçou-se a passagem pela origem, o valor do coeficiente angular mais próximo da unidade.

Como não foram detectadas diferenças significativas entre os diferentes sistemas de preparo do solo (Zotarelli, 2000), as estimativas do modelo foram comparadas aos resultados de ambos sistemas, conjuntamente. O ponto crítico para o novo modelo foi a simulação do acúmulo

de N pela cultura ao longo do ciclo. Após os ajustes, verificou-se uma aproximação entre os valores simulados e observados (Figura 2.4), mostrando a adequação do conceito incorporado ao modelo. Os valores simulados de peso da matéria seca ao longo do ciclo também aproximaram-se bastante aos valores observados (Figura 2.5), verificando-se uma pequena defasagem entre os tempos de ocorrência dos valores máximos. Nesta simulação, os rendimentos de grãos ficaram muito próximos, com um desvio de 3% dos valores observados. Para os dois níveis de disponibilidade hídrica, em cada uma das nove safras, foi estimado o rendimento de grãos. Na Figura 2.6, verifica-se que somente três estimativas apresentaram um desvio superior a 18% dos valores observados. A maioria das estimativas ficou dentro da faixa de 13%. A maior diferença ocorreu na condição irrigada em 1996/97, onde o rendimento estimado ficou 37% menor que observado. Neste caso, a simulação considerou excessiva a irrigação em algumas fases e afetou negativamente a fixação de nitrogênio resultando, conseqüentemente, em baixo rendimento. Experimentalmente, parece que a irrigação excessiva não afetou o rendimento observado. Apesar disto, o modelo ajustado permitiu estimativas satisfatórias do desenvolvimento

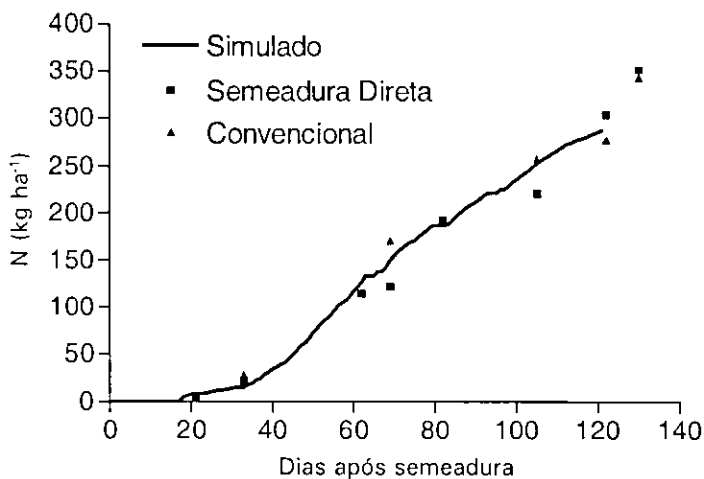


FIG. 2.4. Valores estimados e observados de nitrogênio total (N), ao longo do ciclo. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2003.

da soja, concluindo-se que o mesmo pode ser empregado para estimar o rendimento de grãos da cultura.

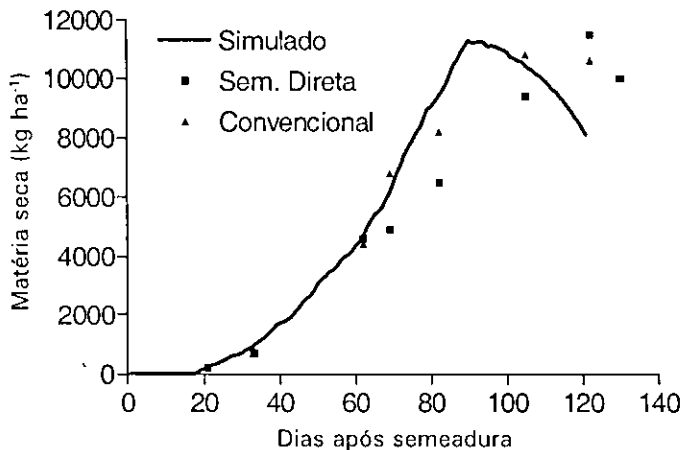


FIG. 2.5. Peso da matéria seca estimada e observada, ao longo do ciclo. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2003.

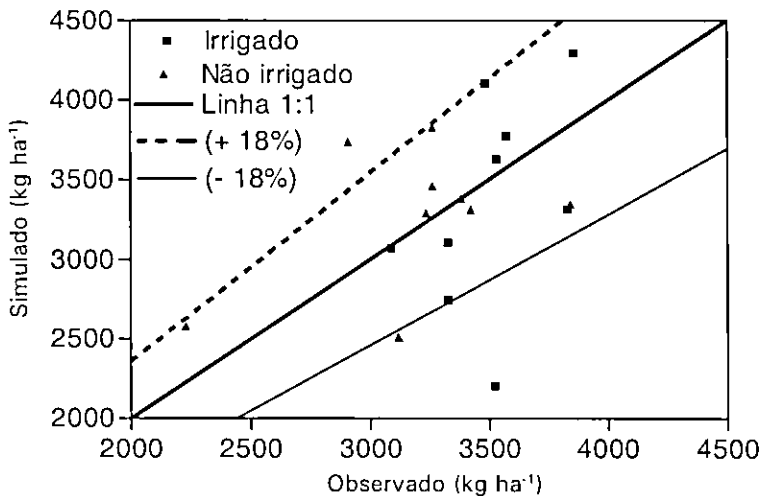


FIG. 2.6. Desvios das observações de rendimento de grãos em relação à linha 1:1 e às retas com desvio de 18%. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2003.







## **ZONEAMENTO DE RISCO CLIMÁTICO NO BRASIL**

**Projeto:** 01.2000.051    **Líder:** Silvando Carlos da Silva

**Nº de subprojetos que compõe o projeto:** 05

**Unidades/Instituições participantes:** Embrapa Arroz e Feijão, Embrapa Soja, Embrapa Milho e Sorgo, Embrapa Cerrados, Embrapa Agropecuária Oeste

O presente projeto teve por objetivo delimitar as áreas de menor risco climático às culturas do arroz, feijão, soja, milho e trigo, a partir da caracterização agroclimática das distintas regiões produtoras, em função das necessidades climáticas das culturas em questão. O projeto foi composto por subprojetos que abrangeram cada uma das culturas em estudo, com as ações sob responsabilidade dos respectivos centros de produto (Embrapa Arroz e Feijão, Embrapa Soja, Embrapa Milho e Sorgo e Embrapa Trigo). Além desses, participaram do projeto a Embrapa Cerrados e a Embrapa Informática Agropecuária (responsáveis pelo subprojeto de caracterização agroclimática das regiões brasileiras). As atividades programadas deram continuidade ao projeto 04.0.94.065 e encerraram-se em dezembro de 2002. Com o objetivo de completar e melhorar o atual zoneamento de riscos climáticos do Brasil, os trabalhos terão continuidade e serão incrementados dentro do projeto em rede "Zoneamento Agrícola do Brasil - Análise de Riscos Climáticos e Atualização", já aprovado dentro da nova programação de pesquisa da Embrapa com o código 01.02.1.05.

### 3.1 Caracterização da aptidão climática de regiões para o cultivo de soja no Brasil (01.2000.051-03)

José Renato Bouças Farias; Ivan Rodrigues de Almeida; Antônio Garcia;  
Norman Neumaier; Alexandre Lima Nepomuceno; Haroldo Virgílio<sup>1</sup>;  
Marcos Valdemir Buche<sup>2</sup>

Na moderna agricultura, incrementos nos rendimentos e redução dos custos e dos riscos de insucesso dependem cada vez mais do uso criterioso dos recursos. Neste processo, o agricultor deve tomar decisões em função dos fatores de produção disponíveis e dos níveis de risco envolvendo sua atividade, visando à obtenção de uma maior rentabilidade. Dentre os fatores de risco, pode-se considerar como principais aqueles referentes às incertezas de mercado e às condições climáticas imprevisíveis. Toda e qualquer ferramenta que venha a ajudar o processo decisório é de grande valia ao setor agrícola. Diante deste contexto, definindo áreas menos sujeitas a riscos de insucessos devido à probabilidade de ocorrência de determinadas condições climáticas, o presente trabalho constitui-se numa ferramenta de fundamental importância para várias atividades do setor agrícola. Isto leva à exploração mais racional da cultura, bem como ao incremento da produção e da produtividade da mesma, trazendo inúmeros reflexos positivos à economia e à sociedade brasileiras. Neste sentido o presente subprojeto teve por objetivo delimitar as áreas com maior aptidão climática para o desenvolvimento da cultura da soja, visando a obtenção de maiores rendimentos e menores riscos. Para isto foram usados modelos de simulação do desenvolvimento da cultura, sistemas geográficos de informação e geoestatística, num trabalho envolvendo várias instituições (MAPA, FINATEC, EMBRAPA, ANEEL, INMET e IAPAR).

Foram realizados os zoneamentos agroclimáticos da cultura da soja para os estados de Goiás, Tocantins, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, região oeste da Bahia, sul do Maranhão,

---

<sup>1</sup> Bolsista AT - CNPq

<sup>2</sup> Bolsista MAPA/FINATEC

sul do Piauí e Distrito Federal, para duas cultivares hipotéticas de soja (precoce e tardia) e três tipos de solo por estado, definindo-se as áreas com maior ou menor probabilidade de ocorrência de déficit hídrico durante a fase mais crítica da cultura, caracterizadas como favoráveis, intermediárias e desfavoráveis, em função das diferentes épocas de semeadura, das disponibilidades hídricas de cada região, do consumo de água nos diferentes estádios de desenvolvimento da cultura, do tipo de solo e do ciclo da cultivar. Em todos os estados, com o emprego dos modelos SARRA, BipZon e CROPGRO, foram feitas simulações do desenvolvimento da cultura para várias datas de semeadura (nove ou doze períodos de dez dias cada), as quais procuraram englobar os períodos recomendados pela pesquisa. Para a espacialização dos resultados, cada valor de  $E_{Tr}/E_{Tm}$  (Evapotranspiração Real/Máxima) observado durante a fase mais crítica ao déficit hídrico (R1-R6), pela escala de Fehr e Caviness (1977), foi associado à localização geográfica da respectiva estação pluviométrica, para posterior elaboração dos mapas, utilizando-se sistemas de informações geográficas (SGIs).

Para definição das áreas de maior ou menor probabilidade de ocorrência de déficit hídrico na fase mais crítica, estabeleceu-se três classes, de acordo com a relação  $E_{Tr}/E_{Tm}$  obtida: favorável ( $E_{Tr}/E_{Tm} \geq 0,65$ ); intermediária ( $0,65 > E_{Tr}/E_{Tm} > 0,55$ ); e desfavorável ( $E_{Tr}/E_{Tm} \leq 0,55$ ). Posteriormente, para cada estado em estudo, elaborou-se 54 ou 72 mapas decorrentes da combinação de nove ou doze períodos de semeadura, três tipos de solo e duas cultivares. Foram rodadas, ao todo, cerca de 80.000 simulações, resultado da interação entre estações pluviométricas, cultivares, tipo de solo e datas de semeadura nos diferentes estados. Definiu-se as áreas com maior ou menor probabilidade de ocorrência de déficit hídrico durante a fase mais crítica da cultura, caracterizadas como favoráveis, intermediárias e desfavoráveis, em função das diferentes épocas de semeadura, das disponibilidades hídricas de cada região, do consumo de água nos diferentes estádios de desenvolvimento da cultura, do tipo de solo e do ciclo da cultivar. Cada um dos mapas gerados contém a classificação das diferentes áreas de um estado para uma dada época de semeadura, em função do tipo de solo e da cultivar. As épocas favoráveis não repre-

sentam, necessariamente, aquelas para obtenção dos maiores rendimentos de grãos, mas sim as de menor probabilidade de perdas por ocorrência de deficiência hídrica. Nem todos os municípios listados com períodos favoráveis de semeadura são aptos ao cultivo da soja. Além da disponibilidade hídrica, outros fatores devem ser considerados para a viabilidade da exploração da cultura com sucesso numa dada região e/ou município.

Procurando aproximar cada vez mais os resultados do trabalho com a realidade observada a campo ao longo dos anos, em 2002, foram revistas, corrigidas e elaboradas novas tabelas com as indicações das épocas de semeadura com menor probabilidade de risco à exploração da cultura soja para os estados de Goiás, Tocantins, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Bahia, Maranhão e Piauí. As bases de dados agrometeorológicos foram revistas e atualizadas, realizando-se novas simulações e gerando informações mais precisas para os locais em que se verificou algum problema. No último ano, além das revisões e atualizações realizadas para cada estado, foram completamente refeitos os zoneamentos para Minas Gerais e Mato Grosso. Na Figura 3.1 são apresentados alguns exemplos dos novos mapas obtidos para o estado de Minas Gerais. Além disto, com o advento da cultura da soja na região do arenito no oeste do Paraná, tornou-se necessário um estudo mais detalhado daquele sistema de produção. Após várias reuniões envolvendo o governo, a assistência técnica, as cooperativas, as instituições estaduais de pesquisa e representantes dos produtores, decidiu-se realizar um trabalho fornecendo subsídios para a indicação específica para esta condição, considerando-se, principalmente, valores diferentes de capacidade de água disponível (CAD) em função das diferentes condições para o desenvolvimento do sistema radicular e da retenção de água do solo, decorrentes do tipo de solo predominante e do sistema de produção, envolvendo integração lavoura-pecuária, recomendados pela pesquisa para a exploração de grãos naquela região. No entanto, os trabalhos preliminares não atenderam à expectativa, necessitando-se de estudos mais detalhados e profundos.

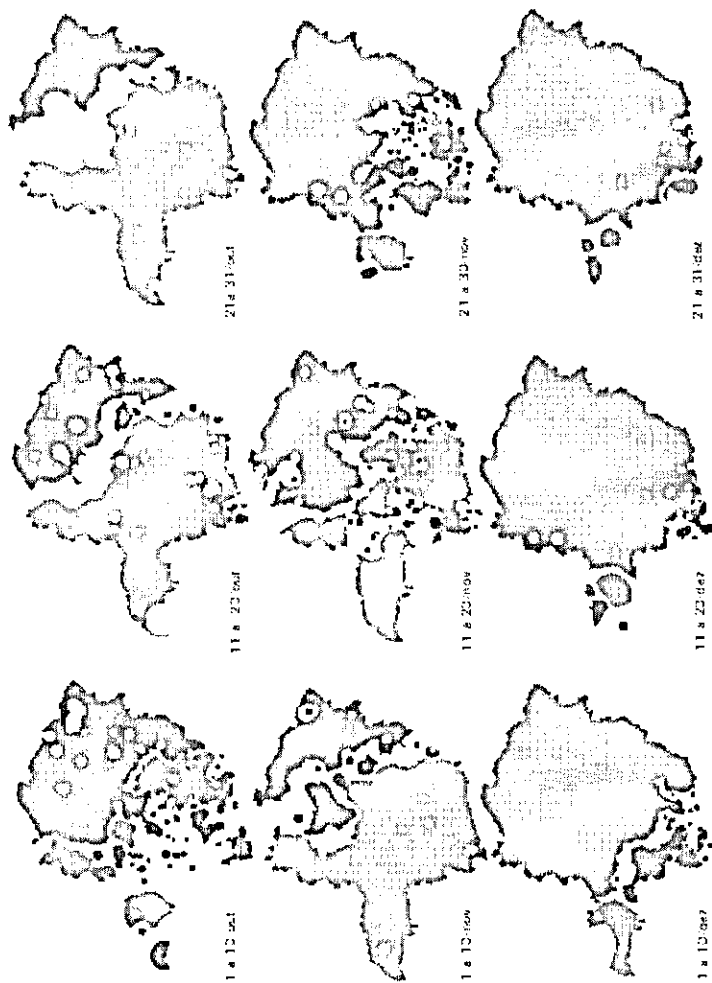


FIG. 3.1. Zoneamento agroclimático da cultura da soja, cultivar de ciclo precoce e solo de alta retenção de água, para nove épocas de semeadura, no estado de Minas Gerais. Embrapa Soja, Londrina-PR, 2003.

Todos os resultados obtidos foram analisados, comparativamente, com os dados observados historicamente a campo, a fim de detectar e corrigir eventuais falhas na metodologia empregada. Esta validação é realizada até atingir-se uma margem mínima de concordância de 80%. Obtido isto, são elaboradas as cartas (mapas) definitivas. Para tanto, foi organizado, mantido e atualizado, anualmente, um banco de dados com área plantada, produção e rendimento de grãos, por município, dos diferentes estados produtores de soja.

A tecnologia gerada veio atender a uma grande demanda existente, contribuindo para reduzir os riscos de insucesso da atividade agrícola decorrentes do clima, através da indicação mais precisa de épocas de semeadura para a cultura da soja no Brasil.



---

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*  
*Centro Nacional de Pesquisa de Soja*  
*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*  
Caixa Postal 231 - CEP 86001-970 - Londrina, PR  
Fone (43) 3371-6000 Fax (43) 3371-6100  
<http://www.cnpso.embrapa.br>  
[sac@cnpso.embrapa.br](mailto:sac@cnpso.embrapa.br)

**Ministério da Agricultura  
Pecuária e Abastecimento**

