

***RESULTADOS DE PESQUISA DA
EMBRAPA SOJA - 2000***

***ECOFISIOLOGIA
E
BIOLOGIA MOLECULAR***

Organização:

Clara Beatriz Hoffmann-Campo

Embrapa Soja

Odilon Ferreira Saraiva

Embrapa Soja



Comitê de Publicações

Presidente	JOSÉ RENATO BOUÇAS FARIAS
Secretária Executiva	CLARA BEATRIZ HOFFMANN-CAMPO
Membros	ALEXANDRE LIMA NEPOMUCENO ANTÔNIO RICARDO PANIZZI CARLOS ALBERTO ARRABAL ARIAS FLÁVIO MOSCARDI JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO LÉO PIRES FERREIRA NORMAN NEUMAIER ODILON FERREIRA SARAIVA
Bibliotecário	ADEMIR BENEDITO ALVES DE LIMA
Coordenador de Editoração	ODILON FERREIRA SARAIVA

Diagramação

NEIDE MAKIKO FURUKAWA SCARPELIN

Tiragem

400 exemplares
Agosto/2001

Resultados de pesquisa da Embrapa Soja - 2000: ecofisiologia e biologia molecular / Clara Beatriz Hoffmann Campo, Odilon Ferreira Saraiva (organizador). - Londrina: Embrapa Soja, 2001.
48p. -- (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 1516-781X; n.164)

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

CDD 633.340981

APRESENTAÇÃO

Neste Resultados de Pesquisa da Embrapa Soja são apresentados os principais trabalhos de pesquisa executados nesta Unidade, durante o ano de 2000. Têm por objetivo, informar aos pesquisadores, aos professores, aos técnicos ligados à extensão rural e à assistência técnica e aos demais interessados as mais recentes pesquisas em soja, girassol e trigo desenvolvidas pela Embrapa Soja. Num elenco de nove volumes, estão contidos trabalhos relativos aos projetos e aos subprojetos inseridos nos programas 01 (Recursos Naturais), 02 (Recursos Genéticos), 04 (Grãos), 12 (Automação), 13 (Desenvolvimento), 14 (Informação) e 18 (Comunicação e Negócios).

No presente volume são apresentados os principais resultados obtidos nas áreas de Ecofisiologia e Biologia Molecular.

José Renato Bouças Farias

*Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Embrapa Soja*

SUMÁRIO

1	MAXIMIZAÇÃO DO APROVEITAMENTO DAS DISPONIBILIDADES CLIMÁTICAS PELA SOJA	7
1.1.	Bases Agronômicas e Fisiológicas das Respostas da Soja à Disponibilidade Hídrica (04.2000.331-01)	8
1.2.	Bases Agronômicas e Fisiológicas das Respostas da Soja às Condições Térmicas e Fotoperiódicas (04.2000.331-02)	12
1.3.	Identificação, Clonagem e Seqüenciamento de Genes Diferencialmente Expressos em Resposta às Variações Climáticas em Soja (04.2000.331-03)	16
1.4.	Manejo dos Recursos Disponíveis do Ambiente para Produção de Soja (04.2000.331-04)	20
1.5.	Estratégias para Amenizar Impactos Decorrentes das Adversidades Climáticas (04.2000.331-05)	20
1.6.	Modelos de Simulação do Desenvolvimento da Cultura da Soja em Resposta às Variáveis do Ambiente (04.2000.331-06)	24
2	GENÉTICA APLICADA AO MELHORAMENTO DA SOJA	27
2.1.	Identificação de Marcadores Moleculares Ligados a Genes de Resistência a Doenças (04.2000.322.01)	28
2.2.	Variabilidade Genética de Patógenos de Soja (04.2000.322.02)	31
2.3.	Caracterização do Germoplasma Ativo de Soja com Marcadores Moleculares Tipo AFLP e Micros-satélites (04.2000.322.03)	36
2.4.	Genética Quantitativa Aplicada ao Melhoramento da Soja: Diversidade Genética e Resistência a Doenças (04.2000.322-04)	39
2.5.	Desenvolvimento de Soja Transgênica com Genes de Interesse ao Melhoramento (04.2000.322-05)	42
3	ZONEAMENTO AGROCLIMÁTICO DAS PRINCIPAIS CULTURAS DE GRÃOS DO BRASIL	45
3.1.	Caracterização da Aptidão Climática de Regiões para o Cultivo de Soja no Brasil (01.2000.051-03)	45

MAXIMIZAÇÃO DO APROVEITAMENTO DAS DISPONIBILIDADES CLIMÁTICAS PELA SOJA

1

Nº do Projeto: 04.0.94.331 **Líder:** Alexandre Lima Nepomuceno

Nº de Subprojetos que compõem o projeto: 06

Unidades/Instituições participantes: Embrapa Soja; Embrapa Trigo; JIRCAS e Instituto Agrônômico do Paraná

Segundo a Associação Brasileira de Indústrias de Óleos Vegetais (ABIOVE), as exportações de grãos, farelo e óleo de soja contribuíram na balança comercial brasileira com U\$ 4.5, U\$ 3.77 e U\$ 4.2 bilhões nos anos de 1998, 1999 e 2000, respectivamente. Não tão facilmente mensurável, a contribuição indireta da cultura da soja na movimentação da economia brasileira, seja pela geração de empregos, ou seja, pela adição de valor à soja industrializada por indústrias brasileiras, é de vital importância para o desenvolvimento do país. Entretanto, como a maioria dos produtos agrícolas a cultura da soja está sujeita às variáveis climáticas e pouco ou quase nada se tem para apresentar como solução ao produtor, sem que haja um aumento do custo de produção. O objetivo principal do projeto 04.2000.331 é o de buscar novas informações no sentido de otimizar o cultivo e de reduzir os riscos de prejuízos aos quais a cultura da soja está sujeita.

Os seis subprojetos componentes do projeto *Maximização do aproveitamento das disponibilidades climáticas pela soja* analisam o problema como um todo. Nos subprojetos 04.2000.331-01 e 02, as respostas de diversos genótipos de soja aos fatores do clima serão avaliados objetivando identificar as diferenças entre estes genótipos e quais os melhores parâmetros a serem utilizados neste tipo de estudo. As informações obtidas nestes dois subprojetos visão 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. Estas informações também serão essenciais na condução dos subprojetos 04.2000.331-03 e 06. No subprojeto 03, os genótipos identificados como sensíveis e tolerantes à seca são analisados ao nível de expressão gênica. Objetiva-se com isso identificar e clonar genes envolvidos em mecanismos fisiológicos de resposta aos fatores ambientais. Estrategicamente é imprescindível que o Brasil se mantenha competitivo nesta área uma vez que genes envolvidos em vários processos fisiológicos estão sendo identificados e patenteados, e serão alvos da cobrança de royalties no futuro. O enfoque sistêmico viabilizado pelo uso de modelos de simulação de crescimento e de desenvolvimento da soja permite integrar os efeitos de diferentes condições edafoclimáticas sobre o comportamento da cultura, criando ferramentas eficazes para suporte à tomada de decisões e a

estudos complementares. Entretanto, modelos de simulação só se tornam viáveis após calibração. Assim sendo, o subprojeto 06 utiliza as variáveis estudadas nos subprojetos 01 e 02 para calibrar modelos de simulação (e.g. CROPGRO, SARRA) objetivando a obtenção de modelos precisos e confiáveis que expressem de forma satisfatória a realidade.

Finalmente, no subprojeto 04.2000.331-04 busca-se maximizar o uso dos recursos do ambiente, através da alteração de práticas de manejo (e.g. densidade, espaçamento), uma vez que muitas destas práticas não foram testadas e desenvolvidas para os genótipos utilizados hoje. Enquanto que, no subprojeto 04.2000.331-05 objetiva-se testar novas estratégias no combate as perdas devido às adversidades climáticas. Uma série de produtos tem sido desenvolvidos, testados e introduzidos no mercado agrícola dizendo basear seu modo de ação na alteração de processos fisiológicos e bioquímicos no sentido de ativar os mecanismos de defesa das plantas. Neste subprojeto, então, são testadas a eficiência e a viabilidade de utilização destes produtos ao nível de lavoura.

A busca de soluções para outras demandas e prioridades de pesquisa também poderão ser beneficiadas pelos conhecimentos e/ou tecnologias a serem geradas pelo presente projeto. Dentre essas pode-se destacar o manejo do solo, da cultura, de pragas e doenças, sistemas de produção e rotação de culturas, assim como, estudos econômicos e estratégicos.

1.1. Bases Agronômicas e Fisiológicas das Respostas da Soja à Disponibilidade Hídrica (04.2000.331-01)

Norman Neumaier¹, Alexandre L. Nepomuceno¹,
José Renato Bouças Farias¹,
Alexandre José Cattelan¹,
Tetsuji Oya¹, Nelson Delattre¹ e
Osmar Rodrigues³

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) são o principal evento sinistrante no PROAGRO, seguido por chuva excessiva (22% dos casos), granizo e geada (dados de 1993).

Além dos eventos exclusivamente climáticos, ocorrem perdas por ataques de pragas e de doenças (0,20% dos casos, nas safras de verão e por 0,05% dos casos, nas de inverno). 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. Tudo isto justifica a busca de novas informações no sentido de otimizar o seu cultivo, possibilitando a obtenção de maiores rendimentos e menores riscos.

A avaliação da tolerância de genótipos ao déficit hídrico tem sido feita, de forma indireta, através da avaliação final do rendimento de grãos ou de outras características agronômicas. A busca de parâmetros que permitam uma avaliação

¹ Embrapa Soja

² Convênio JIRCAS/Embrapa Soja

³ Embrapa Trigo

direta da capacidade da planta em tolerar à seca, tem grande interesse ao processo de seleção, no melhoramento de plantas. A resistência estomática, taxa fotossintética, osmoregulação, capacidade de translocação de fotoassimilados, número de estômatos, teor relativo de água, etc., podem vir a ser ferramentas importantes para a diferenciação de genótipos com condições de tolerar períodos de deficiência hídrica. O objetivo do presente estudo é o de caracterizar as respostas agrônômicas e/ou fisiológicas das cultivares de soja da Embrapa em resposta a diferentes intensidades de défices hídricos, em distintas fases do desenvolvimento. Com isso, busca-se 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 défices hídricos.

No primeiro ano do estudo (2000) foram instalados dois ensaios a campo. Foram avaliadas respostas fenológicas, morfológicas, agrônômicas e fisiológicas de dez cultivares de soja. Num dos ensaios, em delineamento de blocos completos casualizados com parcelas subdivididas, os tratamentos foram (nas parcelas) níveis de disponibilidade hídrica: 1) Irrigado (potencial matricial de água, no solo, mantido entre -0,03 e -0,05MPa, com irrigações manuais); 2) Não Irrigado e (nas subparcelas) as cultivares BR 16 e 37; Embrapa 48 e 59 e BRS 132; 133; 134; 183; 184 e 185. Num outro experi-

mento complementar foram testadas as mesmas dez cultivares sob abrigos móveis automáticos e sem nenhum suprimento de água (Estressado), por 32 dias, a partir do florescimento (R2). Os resultados desse primeiro ano de ensaios mostram que, possivelmente, por 2000 ter sido um ano sem muitos défices hídricos, as diferenças no rendimento, entre os tratamentos Irrigado e Não irrigado, foram pequenas (3,8%). A ausência do suprimento de água após o florescimento (tratamento Estressado) causou uma redução média de 71% nos rendimentos. A cultivar mais produtiva, tanto na condição Irrigada como na Não Irrigada foi a BRS 134, enquanto que a menos produtiva foi a BR 16. Já, no experimento complementar com o tratamento Estressado, as cultivares mais produtivas foram BR 37, BRS 183 e BRS 184 que reduziram seus rendimentos em cerca de 66%, quando comparados aos seus rendimentos obtidos na condição Irrigada. As menos produtivas, sob défice, foram Embrapa 59 e BRS 185 que reduziram seus rendimentos em mais de 75%.

A taxa fotossintética mostrou-se muito sensível ao défice hídrico. Sua redução média no tratamento Estressado foi de cerca de 57%, quando comparado com o tratamento Irrigado. Mesmo o tratamento Não Irrigado, quando comparado ao tratamento Irrigado, apresentou uma redução de 7,7% na taxa fotossintética. Nos tratamentos Irrigado e Não Irrigado as taxas fotossintéticas medidas no decorrer do ciclo da cultura mantiveram-se em torno de suas médias, entretanto para o tratamento Estressado os valores da

taxa fotossintética decresceram à medida que o déficit se prolongava. Apenas duas cultivares apresentaram reduções menores que 50%, e foram a BRS 132 e a BRS 183 (Figura 1.1). A resistência estomática seguiu um padrão inverso ao da taxa fotossintética.

O teor relativo de água na folha (TRAF) foi drasticamente reduzido, no tratamento Estressado, para as cultivares BR 16 e BRS 184, principalmente, nos estágios mais adiantados do déficit. Algumas cultivares, como a Embrapa 48 e BRS 134, mantiveram seus TRAF em níveis altos, mesmo sob déficit hídrico. Isso, não aconteceu com a cultivar BR 16, cujo TRAF decresceu continuamente à medida que o déficit se prolongava (Figura 1.2). O TRAF é uma característica fisiológica importante na avaliação do estado hídrico da planta. Sob condições normais de de-

manda evaporativa da atmosfera (DEA), valores de TRAF próximos de 90-95% indicam que a planta está bem suprida de água. Este bom suprimento pode estar relacionado a um sistema radicular profundo e eficiente ou simplesmente a mecanismos de economia de água na parte aérea da planta.

A área foliar (AFMax) máxima, medida entre 69 e 83 dias após a semeadura (DAS), foi reduzida em 6,8% no trata-

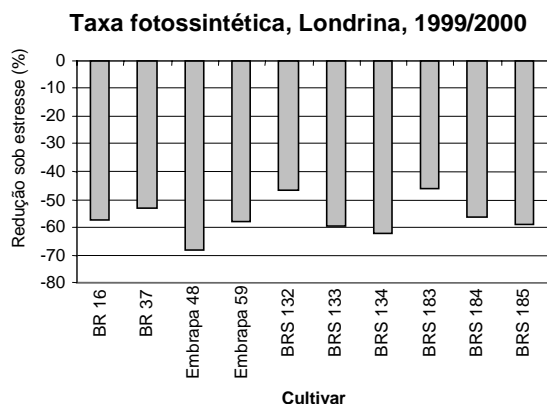


FIG. 1.1. Variação percentual da taxa fotossintética (A) de dez cultivares de soja submetidas a déficit hídrico durante o período reprodutivo (Estressado), em comparação com o tratamento Irrigado, na safra 1999/2000, em Londrina, PR. Embrapa Soja. 2001

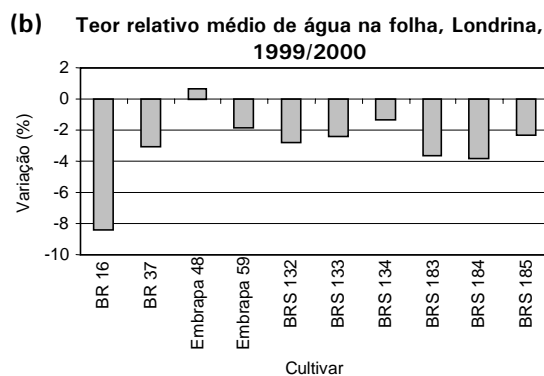
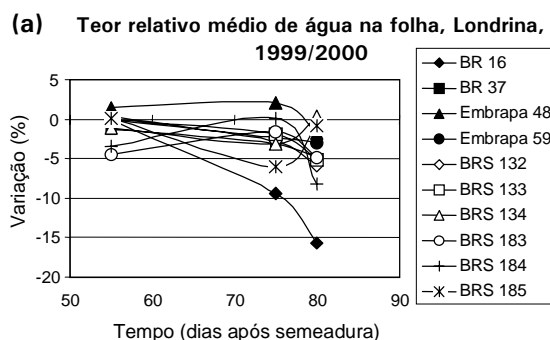


FIG. 1.2. Variação percentual do teor relativo de água na folha (TRAF) em três datas de amostragem (a) e variação percentual média do TRAF (b) de dez cultivares de soja submetidas a déficit hídrico durante o período reprodutivo (Estressado), em comparação com o tratamento Irrigado, na safra 1999/2000, em Londrina, PR. Embrapa Soja. 2001.

mento Não Irrigado e 74,5% no tratamento Estressado, quando comparada a AFMax obtida no tratamento Irrigado. As cultivares que se destacaram com relação a massa seca de plantas em R8, em qualquer das condições hídricas testadas foram a BRS 133 e BRS 134.

O número de legumes por planta também seguiu a mesma tendência, ou seja, o tratamento Estressado reduziu em 78% esse componente do rendimento, quando comparado com o tratamento Irrigado. As cultivares tenderam a apresentar diferentes estratégias para enfrentar a seca. Sob condição de déficit hídrico, as cultivares BR 16, BR 37, Embrapa 59, BRS 133 e BRS 134 emitiram um número bem reduzido de legumes e praticamente não apresentaram abortamento de legumes. As BRS 132 e 183 emitiram um grande número de legumes e, quando submetidas ao déficit hídrico, apresentaram abortamento de cerca de 58% dos mesmos. Sob condições hídricas ótimas, ou próximo destas, a cultivar Embrapa 48 emitiu um grande número de legumes mas apresentou uma alta taxa de abortamento. As cultivares BR 16 e BRS 132, sob condições ótimas, apresentaram níveis médios de abortamento. Os resultados preliminares obtidos indicam que outras cultivares, como BR 37, BRS 133, BRS 184 e BRS 185, sob condições de disponibilidade hídrica ótima, emitiram uma quantidade de legumes muito semelhante àquela que mantiveram até o final do seu ciclo, isto é, sob condições ótimas, apresentaram baixo abortamento de legumes. Essa pode ser uma estratégia interessante do ponto de

vista do uso eficiente de energia na planta, com vistas à produção de altos rendimentos.

O número de sementes por vagem (NSV) no tratamento Estressado foi reduzido, em média, 25,4% quando comparado com o tratamento Irrigado. As cultivares que mais reduziram o NSV, em resposta ao déficit hídrico, foram BRS 185, Embrapa 59 e BR 16, com reduções de 30% ou mais, enquanto que as que menos sofreram redução, nesse componente do rendimento, foram Embrapa 48, BRS 132 e BRS 183.

O tamanho da semente (peso de 100 sementes) não apresentou redução quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico, exceto, uma pequena redução, nesse componente, nas cultivares Embrapa 48 (10%), BRS 134 (6%) e BRS 184 (4%). O restante das cultivares apresentaram um aumento do peso de 100 sementes. Nas cultivares BRS 132, BR 37 e BRS 183 esse aumento esteve pouco acima dos 20%. Estes resultados indicam que o peso de 100 sementes, apesar de ser uma característica genética definida entre limites estreitos em cada cultivar, é um componente do rendimento que ainda apresenta uma razoável flexibilidade para compensar perdas ocorridas nos componentes do rendimento que foram definidos em etapas anteriores, no ciclo da cultura.

Os resultados aqui relatados são oriundos de subprojeto parcialmente financiado pelo CNPq e contaram com o apoio técnico e financeiro do JIRCAS. Os resultados aqui apresentados são de um ano de experimentos apenas e, portan-

to, preliminares. Por esse motivo, recomenda-se cautela na interpretação e no uso desses resultados.



1.2. Bases Agronômicas e Fisiológicas das Respostas da Soja às Condições Térmicas e Fotoperiódicas (04.2000.331-02)

Norman Neumaier¹, Celso Wobeto²,
Alexandre L. Nepomuceno¹,
José Renato B. Farias¹, Tetsuji Oya³,
Nelson Delattre¹ e Osmar Rodrigues⁴

O potencial produtivo das novas cultivares de soja, lançadas a cada ano, é muito superior (5 a 6 Mg/ha) à produtividade conseguida na prática (1,52 a 2,80Mg/ha, na média dos Estados na safra brasileira de 1998/99). As diferenças entre as produtividades reais e as potenciais são devidas, principalmente, à influência do ambiente. Assim, a base para o aumento da produtividade para níveis próximos do potencial, é a maximização do uso das disponibilidades ambientais pela soja. 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 disponi-

bilidades climáticas por genótipos de soja. Deficiência hídrica, a maior responsável pela diminuição das produtividades, está sendo estudada em outro subprojeto (04.2000.331-01). 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 florescimento tardio da soja sob dias curtos; determinar as reais causas do tombamento fisiológico (tombamento e morte da plântula de soja supostamente causado por temperaturas muito elevadas na superfície do solo) 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.

Durante este primeiro ano do subprojeto (2000), os esforços foram concentrados no estudo das respostas da soja à radiação solar. Foram executados dois experimentos a campo, um em Londrina (Embrapa Soja) e outro em Guarapuava (FAPA, Entre-Rios), visando caracterizar a resposta da soja a diferentes níveis de radiação solar, durante o período reprodu-

¹ Embrapa Soja

² FAPA, Entre-Rios, Guarapuava

³ Convênio JIRCAS/Embrapa Soja

⁴ Embrapa Trigo

tivo. Em ambos os experimentos foram usadas coberturas de sombrite sobre as parcelas para a obtenção dos diferentes níveis de radiação solar (radiação fotosinteticamente ativa, RFA).

No experimento de Londrina, foram testados três tratamentos, em blocos ao acaso, com quatro repetições. 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. Durante o desenvolvimento do experimento foram efetuadas avaliações fenológicas, fisiológicas e agrônomicas. 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 (Figura 1.3). 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 (Figura 1.3). Assim, esses resultados preliminares indicam que intensidades subótimas de RFA durante o enchimento dos grãos afetam negativamente o rendimento da soja, indicando que, a disponibilidade de altas intensidades de RFA, nessa fase, é essencial para garantir altos rendimentos. O enchimento dos grãos

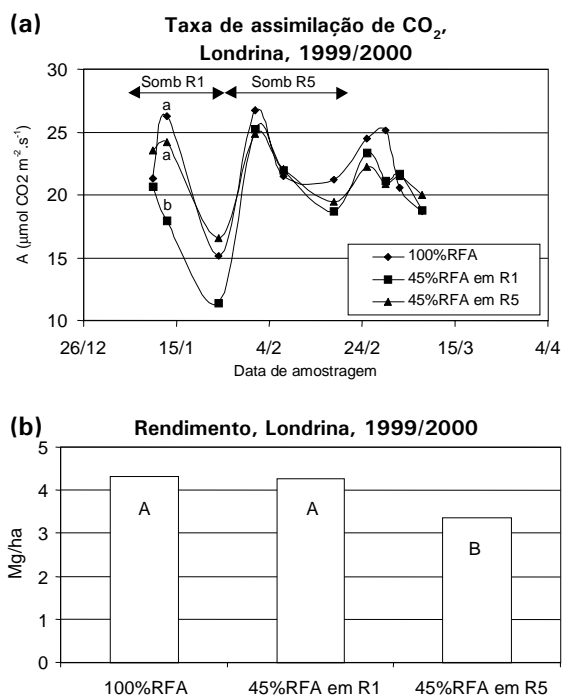


FIG. 1.3. Taxa de assimilação de CO₂ - A (a) e rendimento de grãos (b) da cultivar de soja Embrapa 48 submetida a duas condições de luminosidade (100%RFA e 45%RFA) em dois períodos de desenvolvimento da cultura (R1 e R5), em Londrina. Mesma letra indica diferenças não significativas (Tukey, P < 0,05). Embrapa Soja, Londrina, PR, 2001.

constitui a última etapa da formação do rendimento quando a demanda por produtos da fotossíntese é máxima. Por isso, nesse período, limitações como baixa RFA afetam negativamente a fotossíntese e, conseqüentemente, o rendimento.

No experimento 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). O experimento foi semeado na mesma data de semeadura em Londrina, isto é, em 26/11/1999 e colhido no mês 04/2000. Durante o

desenvolvimento do experimento foram efetuadas avaliações fenológicas, fisiológicas e agrônômicas. A taxa de assimilação de CO₂ (A) mostrou redução significativa nas parcelas submetidas a 45%RFA e a 70%RFA (Tabela 1.1). Na comparação entre genótipos, OC12158 apresentou taxa de assimilação de CO₂ menor que a dos outros genótipos (Tabela 1.1). 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 (Tabela 1.1). 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 genó-

TABELA 1.1. Taxa de assimilação de CO₂ (A) e resistência estomática (RS) de quatro genótipos de soja submetidas a três níveis de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) durante o período reprodutivo, em Entre-Rios, Guarapuava, PR. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2001

Tratamentos	Característica	
	A	RS
Níveis de radiação (RFA)		
100%RFA	24,47A	0,172A
70%RFA	21,41 B	0,113 B
45%RFA	18,96 C	0,113 B
CV%	8,7	17,8
DMS (Tukey 5%)	2,99	0,037
Genótipo.....		
Embrapa 59	23,81AB	0,149A
BRS 132	24,32A	0,112 B
OC12158	17,57 C	0,126AB
OC127837	20,75 BC	0,143AB
CV%	18,43	30,2
DMS (Tukey 5%)	3,55	0,036

Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem significativamente (Tukey, P<0,05).

tipos. O acamamento foi significativamente 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, nas maiores restrições de RFA, foram menos sensíveis às baixas radiações do que os genótipos OC12158 e OC127837 (Tabela 1.2).

Esses resultados preliminares indicam que níveis subótimos de RFA podem es-

TABELA 1.2. Rendimento de grãos e redução percentual do rendimento (em relação ao tratamento 100%RFA), de quatro genótipos de soja submetidos a três níveis de radiação fotossinteticamente ativa (RFA) durante o período reprodutivo, em Entre-Rios, Guarapuava, PR. Embrapa Soja, Londrina, PR, 2001

Tratamentos Níveis radiação - RFA	Rendimento de grãos (Mg/ha)	% Redução
100%RFA	2,680 A	0,0
70%RFA	2,187 B	18,4
45%RFA	1,606 C	40,1
CV%	9,2	
DMS (Tukey 5%)	0,264	

Genótipo	Rendimento de grãos (Mg/ha)	% Redução (45%RFA)
Embrapa 59	2,267 A	25,6
BRS 132	2,342 A	27,6
OC12158	2,429 A	42,8
OC127837	1,592 B	67,3
CV%	4,2	
DMS (Tukey 5%)	0,262	

Interação Gen x RFA Genótipo	Rendimento de grãos (Mg/ha)		
	100%RFA	70%RFA	45%RFA
Embrapa 59	2,574aB	2,311 abA	1,916bA
BRS 132	2,753aAB	2,282 bA	1,993bA
OC12158	3,065aA	2,467 bA	1,754 c A
OC127837	2,327aB	1,690 bB	0,761 c B
CV%	9,2	9,2	9,2
DMS (Tukey 5%)	0,456	0,456	0,456

CV = 4,2; DMS = 0,398 para níveis de RFA dentro de genótipo.

Valores seguidos da mesma letra minúscula na linha ou maiúscula na coluna não diferem significativamente (Tukey, $P < 0,05$).

tar reduzindo os rendimentos de lavouras de soja. A região de Guarapuava apresenta maior precipitação, menor radiação e menor temperatura. Os solos, onde foram instalados os experimentos, tanto de Guarapuava quanto de Londrina, apresentam níveis ótimos de fertilidade. Assim, os menores rendimentos de Guarapuava (média de 2,16 Mg/ha, comparado com média de 3,98 Mg/ha em Londrina) podem estar sendo determinados pelas características climáticas citadas, atuando isoladas ou conjuntamente, sobre as cultivares. Além disso, os resultados desse primeiro ano mostram que existe variabilidade genética, entre os genótipos, para adaptabilidade a regiões com menores níveis de radiação.



1.3. Identificação, Clonagem e Sequenciamento de Genes Diferencialmente Expressos em Resposta às Variações Climáticas em Soja (04.2000.331-03)

Alexandre L. Nepomuceno¹, Norman Neumaier¹,
José Renato B. Farias¹, Tetsuji Oya² e
Osmar Rodrigues

Todas as mudanças fisiológicas, morfológicas e de desenvolvimento em plantas têm uma base molecular/genética. Portanto, genótipos que diferem entre si nas respostas às adversidades climática

devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em expressão gênica. Tentar compreender como alguns destes controles da expressão gênica são ativados/desativados e como interagem entre si é um dos objetivos do subprojeto 04.2000.331-03.

No primeiro ano de execução deste subprojeto dois grupos de experimentos foram conduzidos focalizando respostas moleculares ao fotoperíodo e a seca. Os experimentos de caracterização molecular de cultivares de soja em resposta a fotoperíodo, foram iniciados para coleta de material biológico. As cultivares Biloxi (resposta convencional ao fotoperíodo) e Paranagoiana (período juvenil longo) foram submetidas a dois fotoperíodos (longo/curto) onde folhas foram coletadas em várias fases de desenvolvimento. Foi conduzida a extração do RNA total destes materiais, que agora está sendo utilizado nas reações da técnica "Differential Display - DD".

Nos experimentos para identificar e isolar genes que podem apresentar diferenças de expressão durante períodos de seca foi extraído RNA total de três cultivares de soja (BR-4, BR-16 e MG/BR-46 Conquista) que apresentam respostas contrastantes ao déficit hídrico quando submetidas a condições de seca. BR-4 e MG/BR-46 Conquista foram consideradas como cultivares que toleram períodos maiores de estresse hídrico, enquanto que a cultivar BR-16 mostra-se sensível.

Estresses abióticos como a seca podem reduzir significativamente rendimentos em lavouras e restringir as latitudes e

¹ Embrapa Soja

² Convênio JIRCAS/Embrapa Soja

³ Embrapa Trigo

solos onde espécies comercialmente importantes podem ser cultivadas. As implicações são enormes uma vez que, não somente produtores, mas toda a sociedade é afetada. A identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca são cruciais ao desenvolvimento de novas cultivares comerciais mais tolerantes ao déficit hídrico. A expressão de genes (ainda não caracterizados ou já identificados) em genótipos tolerantes ao déficit hídrico pode ser usada no estudo de mecanismos de tolerância à seca e para identificar outros genótipos com características similares. As seqüências de genes diferencialmente expressas podem ser usadas como sondas para estudar bancos de germoplasma, em busca de genótipos com características similares em relação a respostas ao déficit hídrico, ou na análise de gerações oriundas de cruzamentos contendo estes específicos genes. Estudos de fisiologia de plantas em resposta à seca podem ser melhorados quando os diferentes tratamentos são comparados em termos de expressão gênica. Alguns dos genes identificados podem ter potencial para o uso em transformações gênicas de plantas que visem aumentar a performance destas para tolerar déficits hídricos.

Para a caracterização molecular, os genótipos tolerantes e sensível, depois de submetidos a estresse hídrico moderado, tiveram suas folhas e raízes coletadas para a extração de RNA total. O RNA total foi utilizado em reações de transcrição em reverso (RT), onde foram usados os seguintes primers âncora:

A1:^{5'}T₍₉₎GC^{3'}, A2:^{5'}T₍₉₎CC^{3'}, A3:^{5'}T₍₉₎GG^{3'} e A4:^{5'}T₍₉₎CG^{3'}. O volume final das reações de RT para cada tratamento foi de 50mL, sendo que cada reação foi composta de: 3mL de RNA (2mg/mL); 10mL de tampão (5X); 1.5mL de dNTP (10mM); 2.5mL de primers âncora (50mM), (A1,A2,A3 ou A4) e 31.5mL de água DEPC. A reação foi levada ao termociclador a 65°C por 5min. Quando a temperatura caiu para 37°C acrescentou-se à reação 1.5mL da enzima M-MLV RT (Life Technologies - GIBCO BRL). Incubou-se a 37°C por uma hora e depois a temperatura foi elevada para 99°C, durante 5min. Depois da reação RT, foram feitas reações de PCR radioativo usando-se as combinações dos primers âncora (A1, A2,A3 e A4) com os primers randômicos (10-mer) B1(^{5'}GAGCTTGAAC^{3'}), B2 (^{5'}GTGCGTCCTC^{3'}), e B7(^{5'}CCGTCCTGG^{3'}). O volume final da reação de PCR foi de 25mL com a seguinte composição: 4mL de DNAC; 6.25mL de dNTP (100mM); 2.5mL de tampão (10X); 1.25mL de MgCl₂ (50mM); 1mL de primers âncora (50mM); 0.5mL de Taq DNA polymerase (5U/mL) (Life Technologies - GIBCO BRL); 8.7mL de água DEPC; 0.3mL de [α -³³P]dATP (10mCi/mL, 2500Ci/m mol, Amersham Pharmacia Ltda) e 0.5mL de *primer* randômico (50mM) (B1, B2, ou B7). As temperaturas de amplificação utilizadas foram as seguintes: 2min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s, 42°C por 1min e 72°C por 30s. E uma extensão final a 72°C por 5min. Os produtos de PCR foram separados em poliacrilamida 6%, onde os diferentes tratamentos foram comparadas lado a lado. Bandas diferen-

cialmente expressas foram isoladas, reamplificadas e clonadas com o kit *pGEM-T easy vector* (Promega Corp.). Após clonagem, os fragmentos de cDNAs foram seqüenciados no seqüenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) com o uso do kit *ABI PRISM™ Big Dye Terminator* (Applied Biosystems).

Foram identificados, clonados e seqüenciados 28 fragmentos de DNA diferencialmente expressos. Depois de realizadas buscas em bancos de genes, 15 seqüências apresentaram alta homologia com genes conhecidos, nove apresentaram baixa homologia e quatro seqüências não apresentaram homologia (Tabela 1.3). Das vinte e oito bandas identificadas como diferencialmente expressas, quinze mostraram homologia com genes conhecidos. Duas bandas diferencialmente expressas serão discutidas. A banda A1B2-1 gerou um fragmento de 306 pares de bases e apresentou-se diferencialmente expressa somente em raízes das cultivares BR-16 e MG/BR-46 Conquista, em ambas as situações de água no solo. Um dos quadros de leitura traduzido do fragmento A1B2-1 mostrou alta homologia (89%) com um ativador de transcrição de *A. thaliana* mostrando 47 aminoácidos homólogos. Existem fatores de transcrição que são normalmente proteínas induzidas a serem expressas durante situações específicas de desenvolvimento ou interação com o ambiente, ou que são expressas somente em tecidos específicos no organismo. Estes normalmente são chamados de ativadores

de transcrição e podem funcionar diretamente sobre a RNA polimerase ou sobre a região promotora do gene. A identificação e isolamento da seqüência promotora que flanqueia este ativador de transcrição poderá ser usada em futuras construções gênicas onde se deseja expressão de proteínas somente em determinadas partes do organismo, neste caso a raiz. A banda A1B1-8 representa um fragmento de 497 pares de bases que se apresentou diferencialmente expresso somente na cultivar MG/BR-46 Conquista (tida como tolerante à seca) e somente na condição de estresse hídrico. O quadro de leitura traduzido do fragmento A1B1-8, mostrou alta homologia com uma subunidade de NADH Desidrogenase ND4L de *Spinacia oleracea* com 44 aminoácidos homólogos (64%). NADPH desidrogenases, são enzimas componentes da membrana mitocondrial. Estão diretamente envolvidas no transporte de elétrons na cadeia respiratória (Fosforilação Oxidativa), e conseqüentemente, tem papel chave no fornecimento de energia na célula.

Cada um dos 28 fragmentos identificados pode ser usado como sonda molecular na análise de germoplasma e mapeamento molecular ou em estudos de fisiologia vegetal. Se confirmada a participação nas respostas à seca, transformações gênicas poderão ser feitas objetivando a criação novas variedades mais tolerantes ao déficit hídrico.



TABELA 1.3. Identificação de clones isolados como diferencialmente expressos em soja sob estresse hídrico.

Identificação do Clone ¹	Tamanho da Sequência (pb)	Homologia ²	Nº de Acesso	Homologia P(N)	Identidades Positivas ³
A1B2-12	506	UAP1-ARATH provável UDP-N Acetilglucosamina pirifosforilase do Cromossomo II de <i>A. thaliana</i>	Trembl/AC004238	7.1e-29	81(aa); 59%
A1B2-11	504	Proteína hipotética de <i>Clamidia muridarum</i>	Trembl/AE002279	1.6e-26	64(aa); 76%
A1B2-3	300	Proteína Hipotética de 141.4 KDA pertencente a subfamília global de ativadores de transcrição	Spembl/082366	1.5e-16	61(aa); 85%
A1B2-10	331	Proteína Hipotética de 29,2 KDA do cromossomo 4 de <i>A. thaliana</i>	Trembl/AL022223	1.7e-13	57(aa); 82%
A1B2-1	306	Ativador de transcrição de <i>A. thaliana</i>	Trembl/AC005397	1.0e-12	47(aa); 89%
A1B2-4	309	Oxidase polipeptídica III do citocromo c	Trembl/D89861	0.997	45(aa); 51%
A3B2-1	508	Transportador de aminoácido (AAP3) de <i>Nepenthes alata</i>	Trembl/AF080544	9.6e-32	101(aa); 64,5%
A4B5-4	517	Transportador de aminoácido (AAP2) de <i>Solanum tuberosum</i>	Trembl/Y09826	2.5e-26	101(aa); 64%
A1B1-8	497	Desidrogenase NADH da subunidade ND4L de <i>Spinacia oleracea</i>	Trembl/AJ400848	9.4e-15	44(aa); 64%
A2B2-9	322	Proteína Hipotética de 29,2 KDA pertencente ao DNA cromossômico 4 de <i>A. thaliana</i>	Trembl/AL022223	1.7e-13	57(aa); 82%
A1B1-6	357	Provável Transposase	Sptrembl/Q9RU04	2.2e-11	64(aa); 56%
A2B1-3	356	Provável transposase de <i>Synechocystis</i> sp.Cepa PCC 6803	Trembl/D90909	4.3e-10	57(aa); 51%
A3B5-5	324	Proteína Hipotética de 14,9 KDA de <i>Deinococcus radiodurans</i> R1	Trembl/AE001886	7.0e-10	35(aa); 61%
A3B1-3	523	"F1504.13" seqüência genômica de <i>A. thaliana</i> BAC F1504 do cromossomo I	Trembl/AC007887	1.4e-08	71(aa); 58,5%
A1B1-9	377	GMC oxireductase do cromossomo 2 de <i>D. radiodurans</i> R1	Trembl/AE001862	1.0e-07	52(aa); 53%
A2B7-3	524	Proteína do DNA genômico do cromossomo 1 de <i>Oryza sativa</i>	Tremblnew/AP002483	1.1e-06	29(aa); 56%
A1B1-2	269	"Citocromo P 450", <i>C. roseus</i> P 450 CR12 RNAm do citocromo P 450	Trembl/X69784	0.0020	26(aa); 81%
A1B1-6"	360	Transposase como proteína putativa	Trembl/AE000784	0.0029	16(aa); 66%
A2B2-5	340	Proteína Hipotética de 68,3 KDA de <i>Nicotiana tabacum</i>	Trembl/AJ133502	0.059	54(aa); 55%
A1B1-6'	369	Proteína Hipotética de 14,9 KDA de <i>Deinococcus radiodurans</i> cepa R1	Trembl/AE001886	0.44	15(aa); 68%
A2B1-1	287	Resistência natural associada ao macrofage de proteína	Tremblnew/AF229163	0.79	16(aa); 84%
A2B2-10	354	Envelope de glicoproteína de HIV-1 Cepa DK IBM-9	Trembl/AF095012	0.85	23(aa); 46%
A3B1-2	299	Proteína Hipotética de 8,9 KDA de <i>Metanobactéria</i> Termoautotrófica	Trembl/AE000869	0.993	18(aa); 62%
A2B1-3	286	Fator de transcrição LIM RNAm de <i>Zea mays</i>	Trembl/AF135591	1.0	23(aa); 51%

¹ Primeira letra-número = primer ancorado; Segunda letra+número = primer 10-mer; Terceiro número = posição da banda no gel.

² Resultado da busca (BLASTX2) por homologia com genes conhecidos no "Gen Bank".

³ aa - representa aminoácidos.

1.4. Manejo dos Recursos Disponíveis do Ambiente para Produção de Soja (04.2000.331.04)

Osmar Rodrigues¹, Alexandre L. Nepomuceno²,
José Renato B. Farias², Norman Neumaier² e
Tetsuji Oya³

O estado do Rio Grande do Sul é um dos maiores produtores de soja do Brasil, entretanto, por unidade de área, apresenta uma das menores produtividades do país. O problema indica a necessidade de estudos que avaliem em detalhe as origens da baixa produtividade neste estado. Dentre as possíveis causas do problema são apontados o manejo generalizado da cultura às distintas condições edafoclimáticas do estado e a falta de informações mais detalhadas sobre características diferenciais importantes das cultivares de soja disponíveis hoje no mercado. Entre as práticas de manejo generalizado à cultura, destaca-se a época de semeadura. Essa variável é uma das mais importantes na determinação do rendimento em soja. Seu efeito se expressa através do fotoperíodo e temperatura, os quais variam com diferentes latitudes e, dentro da mesma latitude com as épocas de semeadura diferentes. Na região do planalto do RS, as épocas recomendadas para semeadura de soja são: de 25/10 a 30/11 para cultivares de ciclo precoce; de 20/10 a 5/12, às de ciclo médio; de 15/10 a 10/12, às de ciclo semitardio; e de 10/10 a 10/12, às de ciclo tardio. As definições dessas épocas foram baseadas nas condições climáticas, fenológicas

e de colheita. Nessa recomendação de épocas para genótipos de diferentes grupos de maturação, portanto com características fenológicas diferenciadas no tempo e no espaço, não foram considerados arranjos específicos das plantas no espaço para maximizar a utilização dos recursos disponíveis do ambiente (água, luz, temperatura, N₂ e nutrientes) e/ou minimização de freqüentes estresses (hídrico e temperatura) característicos nos principais sistemas de exploração no RS. Por tanto, com o objetivo de gerar conhecimentos que contribuam para exploração máxima e racional dos recursos disponíveis do ambiente para possibilitar o aumento da produtividade da soja no RS, está sendo conduzido o subprojeto 04.2000.331-04 na Embrapa Trigo, em Passo Fundo/RS.



1.5. Estratégias para Amenizar Impactos Decorrentes das Adversidades Climáticas (04.2000.331-05)

Alexandre L. Nepomuceno¹,
José Renato B. Farias¹, Norman Neumaier¹,
Alexandre José Cattelan¹, Tetsuji Oya²,
Nelson Delattre¹ e Osmar Rodrigues³

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

¹ Embrapa Trigo

² Embrapa Soja

³ Convênio JIRCAS/Embrapa Soja

¹ Embrapa Soja

² Convênio JIRCAS/Embrapa Soja

³ Embrapa Trigo

causadas por variações extremas do clima. Entre estas alternativas uma série de produtos químicos, biológicos e orgânicos tem sido desenvolvidos, testados e introduzidos no mercado agrícola. Muitos destes produtos dizem basear seu modo de ação na alteração de processos fisiológicos e bioquímicos no sentido de ativar os mecanismos de defesa das plantas. Entretanto, existe uma 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. A importância deste trabalho pode ser visualizada basicamente de duas formas. Primeiro como ferramenta importante na identificação de novas alternativas, economicamente viáveis, que possam amenizar perdas devido aos estresses ambientais. E segundo, como ferramenta de teste que assegura ao produtor a análise precisa do efeito de produtos comercializados como sendo promotores de um aumento de tolerância aos estresses ambientais.

No primeiro ano do subprojeto 04.2000.331-05 o produto Thiamethoxan 700 WS foi testado com o objetivo avaliar seus efeitos sobre as características agrônômicas e fisiológicas de plantas de soja, e a capacidade de favorecer a produtividade durante situações de estresse, principalmente estresses hídricos.

Pesquisadores de empresas privadas e produtores rurais tem observado efeitos fisiológicos do produto Thiamethoxan 700 WS sobre a cultura da soja e do feijão. O produto é registrado para o con-

trole de insetos sugadores (Homoptera e Thysanoptera) e mastigadores (Coleoptera e Lepidoptera). Entretanto, além do controle desses insetos, tem se observado empiricamente, um desenvolvimento vegetativo mais intenso em plantas de soja tratadas com o produto o que estaria favorecendo maiores produtividades. Segundo estes pesquisadores e produtores (comunicação pessoal), as folhas das plantas tratadas se apresentam maiores e com coloração verde mais intensa. Entretanto, não são apresentados dados experimentais sobre os efeitos no rendimento. Na descrição do produto, também não são descritos efeitos fisiológicos sobre o desenvolvimento da planta.

O trabalho enquadra-se no subprojeto de busca de alternativas para reduzir perdas na lavoura de soja devido a estresses ambientais. Em teoria, se o produto realmente aumenta o vigor de desenvolvimento da planta, seja por um sistema radicular mais agressivo ou por um aumento da capacidade fotossintética da planta, ou por um outro fator, este maior vigor poderá favorecer uma maior tolerância aos estresses ambientais tais como baixa fertilidade, déficit hídrico, etc. Para testar esta hipótese foram instalados experimentos a campo e em laboratório (cultura de tecidos). Devido a complexidade dos fatores que podem estar envolvidos nestas respostas e ao efeito dos fatores ambientais os resultados apresentados neste relatório devem ser confirmados com mais um ou dois anos de experimentação.

Em experimento com e sem irrigação foram feitas cinco avaliações, espaçadas em aproximadamente 10 dias cada, ini-

ciando a partir do estágio V_8 e finalizando no estágio $R_{5.4}$. Em cada avaliação, 10 plantas, em 1m linear, foram coletadas da área útil da parcela. As raízes destas plantas foram extraídas juntamente com o solo até a profundidade de 20cm. Posteriormente, as raízes foram separadas do solo através de peneiragem e lavagem.

Taxa fotossintética e resistência estomática foram avaliadas em três plantas por repetição. Folíolos centrais de trifólios completamente desenvolvidos, na quarta posição a partir do ápice da planta, foram selecionados para estas avaliações. As medições foram feitas entre 10:00 e 12:00h em dias sem nuvens com a radiação fotossinteticamente ativa oscilando entre 2000 a 2500 $\text{mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A umidade no solo foi monitorada através do uso de tensiômetros. Nos tratamentos irrigados, sempre que a umidade atingia valores ≤ -0.05 MPa iniciava-se a irrigação que era mantida até que a umidade do solo atingisse a capacidade de campo (± -0.02 MPa).

A fertilidade da área onde o experimento foi conduzido foi corrigida de acordo com as recomendações técnicas com base na análise química do solo. Os tratamentos foram mantidos livres de insetos. Desta maneira, eliminou-se o efeito dos insetos no experimento o que poderia causar confundimento entre os efeitos inseticidas e fisiológicos do produto sobre o desenvolvimento das plantas. O controle dos insetos foi feito semanalmente através do uso de inseticidas (Endosulfan, e Monocrotofós) de aplicação foliar, segundo recomendações do fabricante.

Ensaio preliminar havia sido conduzido na safra 1998/99 onde foram observados efeitos significativos do produto sobre a estatura e peso seco de legumes de plantas de soja. A dose mais elevada do produto (105g i.a./saca 100kg semente) aumentou a estatura das plantas, em média 12,5%, em relação a testemunha sem o produto, dependendo da data de amostragem. Entretanto, devido as condições climáticas, em especial a excessiva precipitação pluviométrica, foram observadas plantas acamadas nos tratamentos que receberam aplicação do produto. Este acamamento acentuado, provocou a redução no número de vagens em relação a testemunha. O acamamento provoca uma série de obstáculos para o desenvolvimento normal da planta, entre os quais pode-se citar a redução na interceptação da radiação solar pelas folhas e o aumento da competição entre os legumes de uma mesma planta por carboidratos produzidos durante a fotossíntese. Esta maior competição entre legumes pode ter ocasionado um maior abortamento dos mesmos refletindo, então, no menor número de legumes observado nas plantas que receberam o produto na safra 1998/99.

Na safra 1999/2000 houve períodos de déficit hídrico acentuado no início do ciclo, enquanto que no final do ciclo as chuvas voltaram a ocorrer e a umidade do solo atingiu níveis próximo do ótimo. Os resultados desta primeira safra permitiram constatar que o produto atuou no desenvolvimento das plantas de soja. Rendimento de grãos (Tabela 1.4), estatura (Tabela 1.5), área foliar (Tabela 1.6),

TABELA 1.4. Rendimento de grãos (Kg/ha) de plantas de soja submetidas a diferentes doses do produto Thiamethoxam 700 WS, na safra 1999/2000, em Londrina, PR. Embrapa Soja, 2001

Tratamentos	122 dias após plantio		
	Sem Irrigação	Com Irrigação	Média
17,5g i.a/100kg	4243,75 a b *	4368,25 a *	4306,00 a b *
52,5g i.a/100kg	4518,50a	4650,50a	4584,50a
105g i.a/100kg	3589,50 b	4263,50a	3926,50 b
Testemunha	4015,50a b	4208,00a	4111,75a b

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey 5%.

TABELA 1.5. Estatura (cm) de plantas de soja submetidas a diferentes doses do produto Thiamethoxam 700 WS, em seis datas de amostragem (média dos tratamentos com e sem irrigação), na safra 1999/2000, em Londrina, PR. Embrapa Soja, 2001

Tratamento	Dias após o plantio					
	38	49	61	68	82	122
17,5g i.a/100kg	20,1 ^{n.s.}	32,6 ^{n.s.}	48,1 ^{n.s.}	58,0 ^{n.s.}	58,8 ^{n.s.}	52,8 ^{n.s.}
52,5g i.a/100kg	21,0	32,8	50,0	57,1	56,9	52,2
105g i.a/100kg	19,6	35,3	52,4	60,1	56,6	55,5
Testemunha	19,3	32,3	49,1	54,8	52,9	51,2

^{n.s.} Não significativo, pelo teste Tukey 5%.

TABELA 1.6. Área foliar (cm²) de plantas de soja submetidas a diferentes doses do produto Thiamethoxam 700 WS, em cinco datas de amostragem (média dos tratamentos com e sem irrigação), na safra 1999/2000, em Londrina, PR. Embrapa Soja, 2001

Tratamento	Dias após o plantio				
	38	49	61	68	82
17,5g i.a/100kg	252,1 ^{n.s.}	604,9 ^{n.s.}	778,5 ^{n.s.}	1112,5 ^{n.s.}	1190,9 ^{n.s.}
52,5g i.a/100kg	271,4	551,6	962,9	1388,4	1162,1
105g i.a/100kg	233,0	539,5	833,6	1172,2	904,9
Testemunha	207,5	491,1	804,0	1200,1	975,5

^{n.s.} Não significativo, pelo teste Tukey 5%.

e número de legumes (Tabela 1.7) são alguns dos parâmetros que significativamente foram afetados, ou mostram tendência de sofrer ação do produto Thiamethoxan 700 WS. Normalmente os valores destes parâmetros aumentaram quando da utilização do produto. Entretanto, é necessário que estas informações sejam confirmadas em diferentes condições edafoclimáticas, onde o cultivo da soja é recomendado no Brasil. Nos trabalhos em nível de cultura de tecidos também foi possível observar visualmente maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas tratadas com o produto.



1.6. Modelos de Simulação do Desenvolvimento da Cultura da Soja em Resposta às Variáveis do Ambiente (04.2000.331-06)

José Renato Bouças Farias¹,
Alexandre Lima Nepomuceno¹,
Norman Neumaier, Tetsuji Oya²,
Ivan Rodrigues de Almeida¹ e Osmar Rodrigues³

O acúmulo de conhecimento científico no entendimento dos processos biológicos, aliado ao alto nível tecnológico e ao fácil acesso à informática, confere aos modelos de simulação um papel impor-

TABELA 1.7. Número de legumes de plantas de soja submetidas a diferentes doses do produto Thiamethoxam 700 WS, com irrigação, em três datas de amostragem, na safra 1999/2000, em Londrina, PR. Embrapa Soja, 2001

Tratamento	Dias após o plantio		
	68	82	122
17,5g i.a./100kg	35,9 ^{n.s.}	43,3 ^{n.s.}	41,8a *
52,5g i.a./100kg	35,0	35,2	34,3a b
105g i.a./100kg	30,8	27,0	34,6a b
Testemunha	33,4	28,3	31,1 b

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey 5%.

^{n.s.} Não significativo, pelo teste Tukey 5%.

tante, não só pelo uso acadêmico e científico, como também pela aplicação prática dos mesmos, constituindo-se hoje numa das principais ferramentas do enfoque sistêmico em pesquisa agrícola. Os modelos de simulação das respostas das culturas aos fatores do ambiente constituem-se em ferramenta de grande valia em várias áreas do conhecimento agrônomo, tanto permitindo uma perfeita descrição e entendimento do conjunto, como estimando o desempenho das culturas em diferentes áreas e situações. 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, fornecendo subsídios à tomada de decisões operacionais e estratégicas, em todos os níveis do setor agrícola brasileiro.

Neste sentido, o presente subprojeto tem por objetivo geral disponibilizar modelos de previsão de rendimentos e de

¹ Embrapa Soja

² Convênio JIRCAS/Embrapa Soja

³ Embrapa Trigo

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. A demanda por modelos confiáveis e precisos tende a ser cada vez maior, principalmente, com os avanços da agricultura de precisão, com os trabalhos de riscos climáticos, zoneamento agrícola e monitoramento de safras em tempo real. Paralelamente, está sendo organizado e mantido um banco de dados com os principais elementos meteorológicos, com a descrição e caracterização física de diversos tipos de solos e dados de área plantada, produção e rendimento de grãos, em diferentes anos e locais.

Neste primeiro ano de condução, atendeu-se especificamente a duas demandas: estimativa de quebra de rendimento em função do regime pluviométrico para uso em indenizações de sinistros em seguros agrícolas e ajuste de modelos de simulação de desenvolvimento da cultura da soja e de estimativa do rendimento de grãos para regiões de baixa latitude, mais precisos e de fácil aplicação, para que possam ser usados em estudos estratégicos na região de expansão cultura da soja no Brasil.

Para a quantificação das perdas de grãos em função do regime de chuvas foi empregado o modelo CROPGRO (dentro do sistema DSSAT - Decision Support

System for Agrotechnology Transfer). Foram estimados a evapotranspiração real média para cada condição, definindo-se arquivos climáticos hipotéticos em função das reduções no regime pluviométrico mínimo necessário. As estimativas de rendimento de grãos foram expressos na forma de percentual de perdas em função do máximo potencial. Considerando a metodologia empregada, conclui-se que as perdas de rendimentos de grãos são crescentes a medida em que se diminui a disponibilidade hídrica à cultura da soja, principalmente, durante a fase de enchimento de grãos. Os dados obtidos constituem-se numa estimativa aproximada da realidade, podendo, em algumas situações, não expressar fielmente as interações que ocorrem no complexo meio físico-biológico. O efeito direto exclusivo da precipitação pluviométrica sobre o rendimento de grãos, dificilmente pode ser estimado com extrema precisão, pois vários outros fatores podem afetar a resposta da cultura da soja a um determinado volume de chuvas.

Para o ajuste de um modelo para a região dos Cerrados brasileiros, partiu-se para uma parceria com a Universidade da Florida e com o USDA-ARS, tomando por base um modelo desenvolvido e descrito por Sinclair (1986), o qual estima o desenvolvimento da cultura da soja, da emergência à maturação fisiológica, através dos balanços de carbono, nitrogênio e água. Buscou-se ajustar o referido modelo, a fim de possibilitar estimativas de rendimento de grãos mais próximas aos valores observados em campo. Para tanto, utilizaram-se os dados agronômicos,

relativos a rendimento de grãos e à fenologia, oriundos da rede de ensaio do programa de melhoramento de soja e de outros trabalhos de pesquisa da Embrapa Soja, nos estados de Goiás e do Mato Grosso e do Distrito Federal, durante as safras 98/99 e 99/2000. Além das respostas agrônomicas, foram obtidos, para cada um dos locais, os dados diários de temperatura máxima e mínima, precipitação pluviométrica diária e radiação solar, além das principais características físicas do solo. Selecionaram-se, como melhores ajustes, aqueles cujos valores estimados mais se aproximaram dos valores observados em campo e apresentaram, na análise de regressão linear passando pela origem, valor do coeficiente angular mais próximo de um. Após vários ajustes, inclusão e exclusão de rotinas, o modelo passou a estimar satisfatoriamente os rendimentos de grãos, apre-

Rendimento de grãos (kg/ha)

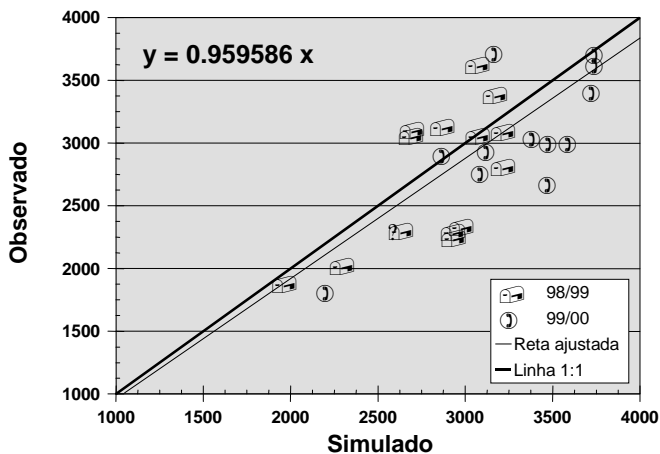


FIG. 1.4. Desvios das observações de rendimento de grãos em relação à linha 1:1 e à reta ajustada pelo modelo passando pela origem. Embrapa Soja, 2001

sentando desvio médio inferior a 10% e um valor de coeficiente angular para a reta ajustada muito próximo a 1 (Figura 1.4), concluindo-se que o mesmo pode ser empregado para estimar o rendimento de grãos da cultura da soja para a região dos cerrados brasileiros.



GENÉTICA APLICADA AO MELHORAMENTO DA SOJA

2

Nº do 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. Isso vem sendo feito pela exploração da diversidade existente entre diferentes espécies e também dentro de cada espécie. As variações intraespecíficas podem ocorrer em função de variações ambientais ou de natureza genética. O melhoramento genético moderno para uma determinada espécie 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 através de cruzamentos dirigidos.

Existe um grande número de características importantes para a soja, que devem ser consideradas no melhoramento genético para se obter variedades superiores. Algumas são fáceis de manejar dentro de um programa de melhoramento e entram na rotina de trabalho durante o desenvolvimento do germoplasma. Outras, podem não estar disponíveis na soja, não havendo variabilidade genética ou, se existe variabilidade, não contam com metodologia de avaliação adequada para que possam ser estudadas e trabalhadas geneticamente. O avanço das técnicas em genética, incluindo introgressão de genes de outras espécies em soja, uso de marcadores moleculares e dos métodos de genética quantitativa, tem tornado possível atender a algumas das demandas do melhoramento que antes seriam impraticáveis.

O principal objetivo deste projeto é dar suporte ao programa de melhoramento utilizando as mais modernas técnicas disponíveis em genética. Para atender à essa demanda, 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 e de galhas; incrementar o conhecimento da diversidade genética de fitopatógenos; identificar e incorporar genes de tolerância a determinadas moléculas de efeito herbicida no germoplasma de soja; dar subsídios genéticos para aumentar a eficiência na escolha de genótipos

que participam de cruzamentos e retrocruzamentos e para armazenar o máximo de variabilidade genética nos Bancos de Germoplasma.

Para atender a esses objetivos propostos, estão sendo desenvolvidos cinco subprojetos. Esses subprojetos tiveram início no ano de 2000 e os resultados referentes ao primeiro ano de atividades serão relatados à seguir:

2.1. Identificação de Marcadores Moleculares Ligados a Genes de Resistência a Doenças (04.2000.322.01)

Carlos Alberto Arrabal Arias¹,
Alvaro Manuel Rodrigues Almeida¹,
Ricardo Vilela Abdelnoor¹,
João Flávio Veloso Silva¹,
Mayra Kassawara Martins²,
Silvana Regina Rockenbach Marin¹,
Renata Jung³, Rodrigo Luis Brogin³,
Waldir Pereira Dias¹ e
Romeu Afonso de Souza Kiihl¹

No cenário mundial, o Brasil é o segundo maior produtor, atrás apenas dos Estados Unidos, e na frente da China, desde o ano de 1976, com produtividade de cerca de 2500kg/ha. Esse bom desempenho deve-se, principalmente, a solos e climas adequados e à disponibilidade de grande quantidade de materiais genéticos melhorados, adaptados a todas as regiões do país. Contudo, com o cultivo contínuo dessa cultura ao longo dos anos, novos problemas surgem a todo momento, exigindo desdobramento extra de pesquisadores, no objetivo de alcançar novas tecnologias que possibilitem que a cultura mantenha seu alto nível de produtividade. Um dos principais problemas que tem se apresentado é o surgimento de novas doenças e o agra-

vamento de outras de menor importância, favorecidas, principalmente, pelo emprego da monocultura da soja especialmente nas regiões de cerrado. Apesar da existência de vários métodos que podem ajudar no controle da maioria das doenças, a maneira mais prática e econômica é por meio do uso de cultivares resistentes. No entanto, para algumas doenças, o desenvolvimento dessas cultivares resistentes é prejudicado pela dificuldade de se fazer, com precisão, a avaliação das plantas. Uma das alternativas para identificação de plantas resistentes é o uso de marcadores moleculares para o mapeamento dos genes de resistência e a utilização das marcas identificadas na seleção indireta, aumentando a eficiência do programa de melhoramento. O objetivo desse subprojeto é mapear os genes da soja que conferem resistência à mancha parda, causada pelo fungo *Septoria glycines*, nematóide de cisto (*Heterodera glycines* - NCS) e nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*). Populações F_{2:3} oriundas de cruzamentos envolvendo genótipos divergentes para cada doença estudada foram semeadas em casa-de-vegetação para coleta de folhas e avaliação da resistência. Estão sendo utilizadas técnicas com marcadores RAPD e microssatélites no estudo sobre a variabilidade existente para essas doenças,

¹ Embrapa Soja

² Bolsista RHAE

³ Mestrado - Universidade Estadual de Londrina

procurando marcadores que auxiliem no processo de seleção para essas características no melhoramento.

2.1.1. Nematóide de cisto

Para o NCS, estão sendo procurados marcadores RAPD e microssatélites para resistência às raças 4+ e 14+. 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, MT, foi identificada uma população de nematóides, classificada como raça 4, mas que foi capaz de se desenvolver na cultivar Hartwig. Esta nova raça foi denominada então, de raça 4+. Na PI 437654, fonte de resistência da cultivar Hartwig, essa nova raça não foi capaz de se desenvolver. Diante disso, este estudo passou a investigar, através de marcadores moleculares, a quebra da resistência da cv. Hartwig ao NCS, raça 4+. Uma população constituída de 121 linhagens, provenientes do cruzamento da cultivar Hartwig x PI 437654 foi utilizada para esta investigação. Devido à complexidade do sistema genético envolvido na resistência ao NCS, a utilização de técnicas de mapeamento de QTLs permite entender melhor o sistema genético envolvido na resistência a este patógeno. Para isto, é necessário primeiramente identificar marcadores moleculares ligados a QTLs de resistência. Neste trabalho, utilizando-se das técnicas de RAPD e microssatélite produzidos à partir do DNA da geração F₂ derivada do cruzamento

Hartwig x PI 437654, foram identificadas 62 marcas que formaram 21 grupos de ligação e mais 32 marcas não ligadas (Tabela 2.1). Foi detectada a presença de pelo menos dois QTLs ligados à resistência ao NCS raça 4+ dentro dessa população. Estes QTLs estão localizados nos grupos de ligação A2 e G do mapa genético da soja, equivalentes aos grupos G1 e G10 da Tabela 2.1, respectivamente. Os marcadores moleculares (2 RAPD e 4 de microssatélites) explicam até 53% da variação observada para a resistência à raça 4+. A eficiência de seleção com estes marcadores chega a até 99,2%, mostrando-se de extrema utilidade na seleção de genótipos resistentes em programas de melhoramento. Para essa finalidade, antes será necessário quebrar a ligação entre uma das principais marcas (Satt 187) e o gene *i* que confere a coloração preta nas sementes.

2.1.2. Mancha parda

Para a mancha parda, está sendo utilizada uma população F_{2:3} oriunda do cruzamento FT-2 x Davis. Em setembro de 1999, um total de 116 plantas F₂ foram semeadas em casa-de-vegetação para coleta do DNA de plantas individuais e também para avaliação da reação à *S. glycines*. As sementes de cada planta F₂ foram colhidas individualmente, produzindo sementes F_{2:3}. Essas sementes foram utilizadas para realizar, em setembro de 2000, um experimento em casa-de-vegetação incluindo 20 repetições de cada parental e cinco repetições de cada uma das 116 progênies F₃. As avaliações para *S. glycines* foram realizadas conforme

TABELA 2.1. Grupos de ligação formados a partir da combinação das marcas de RAPD e microsatélite obtidos com o DNA extraído da geração F₂ do cruzamento Hartwig x PI 437654. Embrapa Soja, Londrina

Grupos de Ligação	
G1	= Satt187, AG20
G2	= Satt516, Satt142
G3	= Satt436, AB04, AL03a
G4	= AQ20, Satt567, Satt590, AX16a
G5	= AX16a, Satt173, AJ12
G6	= Satt357, Satt202, AO19
G7	= Satt182, AL03, AX20a, AT18
G8	= V09, AK06, Satt303, AE09, Satt533, Sat094, AH06, AR10, J06
G9	= Satt329, Satt437
G10	= Satt191, M17, H4a
G11	= Satt456, J13, I04, Satt183, Satt480
G12	= AT15, M11
G13	= AG02, AP06
G14	= AS02, I01, AW11
G15	= K18, AT06
G16	= AM19, I04a
G17	= AN06, B07
G18	= AH18, AH8, AV09
G19	= AR18, P08
G20	= AE09a, R14
G21	= AK05a, Ag05

Marcadores não ligados: Satt135, Satt373, Satt181, Satt511, Satt440, Satt588, Satt108, Satt477, Satt358, Satt228, Satt162, Satt591, Satt192, AT15a, I05, AI05a, AN14, A04, B01, B03, O11, AX20, H4, B09, H11, AX16, AG20, AB04a, AG05a, I13, AB07, AF16

descrito no subprojeto 04.2000.322-04. Marcadores microssatélites estão sendo utilizados nesse estudo. Primeiramente, selecionou-se marcas moleculares com base em sua posição nos mapas de ligação disponíveis para a soja. Procurou-se testar um número equitativo de marcas por grupo de ligação. Aquelas marcas que produziram polimorfismo nos genótipos parentais foram testadas na população segregante. Em posse dos dados fenotípicos e de marcas para cada planta da po-

pulação, estão sendo 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.

2.1.3. Nematóide de galha

Para o nematóide de galhas, foram utilizadas duas populações de 120 plantas F_{2:3} oriundas dos cruzamentos Coodetec 201 (resistente) x BRS 133 (suscetível) e PI 595099 (resistente) x BRS 133. As

avaliações do nível de resistência foram feitas conforme descrito no subprojeto 04.0.98.333-03 (Levantamento, identificação e controle de nematóides formadores de galhas em soja). Foram testados "primers" de microsátélites, localizados em regiões genômicas que contêm genes de resistência escolhidos com base no mapa genético da soja. Foram estudados 20 locos de microsátélites na amplificação do DNA oriundo das 120 plantas, localizados nos grupos de ligação D1b + W e F da soja. Entre os 20 locos analisados, oito foram polimórficos nos parentais BRS133 e Coodetec 201 e apenas três geraram bandas claramente distintas para uso na população. Para o cruzamento PI 595099 x BRS 133 foram encontrados quatro locos polimórficos e todos foram utilizados na população. No cruzamento envolvendo a Coodetec 201, dois locos (Satt 266 e Sat 133) apresentaram associação significativa ($P < 0,01$) com a média para número de galhas nas análises de variância, explicando 7,5% e 6,1% da variação fenotípica, respectivamente. No cruzamento envolvendo a PI 595099, não foi encontrada associação significativa para os locos estudados.



2.2. Variabilidade Genética de Patógenos de Soja (04.2000.322.02)

Álvaro M.R. Almeida¹, Silvana R.R. Marin¹,
Mauro C. Pinto¹, Luis C. Benato¹ e
Nilson Valentin¹

¹ Embrapa Soja

A expansão da cultura da soja no Brasil, ao longo dos anos, foi sempre associada a um aumento na incidência de doenças. Embora, para algumas enfermidades a ocorrência seja variável com o ano, para outras as epidemias são anuais e resultam em severas perdas para os produtores. O controle dessas doenças é normalmente atingido através da incorporação de genes de resistência. No entanto, a liberação de uma nova cultivar, supostamente resistente à raça predominante de um patógeno, não é garantia de que a mesma se manterá resistente quando cultivada numa região distante daquela onde a mesma foi gerada. Isso ocorre devido à variabilidade genética do patógeno.

Técnicas moleculares permitem avaliar a diversidade genética desses patógenos de maneira rápida, baseando-se na análise do DNA total ou DNA ribossomal. Com o uso dessas técnicas pode-se determinar a alteração na população de certas raças, no campo, ao longo dos anos. Isso permitirá acompanhar o efeito da introdução de um novo genótipo na sobrevivência de certas raças e no aparecimento de outras.

Nem sempre, entretanto, os estudos são feitos para determinar a variabilidade genética de isolados de um mesmo fungo. Várias vezes, dentro da fitopatologia, encontra-se dificuldade na identificação de uma espécie fúngica. Essas técnicas também podem auxiliar nos trabalhos de taxonomia.

Este estudo procurou: 1) caracterizar a variabilidade genética dos principais patógenos de soja no Brasil, determinando a similaridade entre isolados da mes-

ma espécie, associando-se características morfológicas e de patogenicidade; 2) identificar marcadores moleculares associados a genes para resistência a vírus, em soja e culturas associadas em rotação e sucessão e, 3) avaliar o efeito da incorporação de genes de resistência sobre a variabilidade genética de patógenos de soja, ao longo dos anos.

2.2.1. Avaliação da diversidade genética e caracterização biológica de isolados de *Cercospora kikuchii*

Cinquenta e oito isolados de *C. kikuchii* foram obtidos a partir de sementes e folhas de soja, infectadas, oriundas das diversas regiões produtoras (Tabela 2.1). Um isolado de *Cercospora sojina* foi utilizado para comparações, em todas as etapas do trabalho. Os isolados foram selecionados a partir da uniformidade do desenvolvimento morfológico, multiplicados em meio líquido e mantidos a 27°C, em regime de 12h de luz, por 2 semanas. O micélio foi precipitado por centrifugação e utilizado com tampão de extração contendo CTAB para obtenção de DNA total. O método de RAPD foi utilizado usando-se "primers" decâmeros.

Fragmentos de DNA amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 2%. Os dados obtidos foram coletados na forma de presença ou ausência de bandas. As distâncias genéticas, entre os isolados, foram calculadas com base no complemento do coeficiente de similaridade (Nei & Li), gerado pela matriz de similaridade. Com base nas distâncias genéticas obtidas, foi elaborada uma análise de agrupamento,

pelo método de ligação da média não ponderada, utilizando o programa NTSYS. Os fragmentos de cada reação foram tratados com enzimas de restrição e a seguir procedeu-se à eletroforese em gel de agarose 3%.

Cento e vinte e oito bandas polimórficas foram obtidas com 12 "primers". O dendograma permitiu separar 2 grandes grupos, baseando-se na distância genética entre os isolados (Fig. 2.1). No grupo 1, há 9 isolados enquanto que o grupo 2, mais numeroso, agrupou 50 isolados. No grupo 1 a distância genética variou de 0,7 a 0,54. No grupo 2 os valores variaram de 1 a 0,6, mostrando que nesse grupo houve menor diversidade genética entre os isolados. Nesse grupo, 37 isolados apresentaram 81% de similaridade. Não se observou relação entre um determinado isolado e uma região geográfica. O isolado 449 aparece fora dos dois agrupamentos, por ser uma espécie diferente (*C. sojina*), utilizada como controle. Um fato interessante foi a presença de isolados geneticamente próximos ocorrendo em regiões geográficas distintas, provavelmente disseminados por sementes, ao longo dos anos.

Uma análise adicional foi feita pelo tratamento de fragmentos de DNA ribossomal com enzimas de restrição (PCR-RFLP). As amplificações foram feitas com "primers" específicos (ITS1 e ITS4). Produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,2%. Apenas um fragmento de 564 pb foi amplificado.

Características biológicas e bioquímicas também foram determinadas, na caracterização dos isolados. Devido à cor-

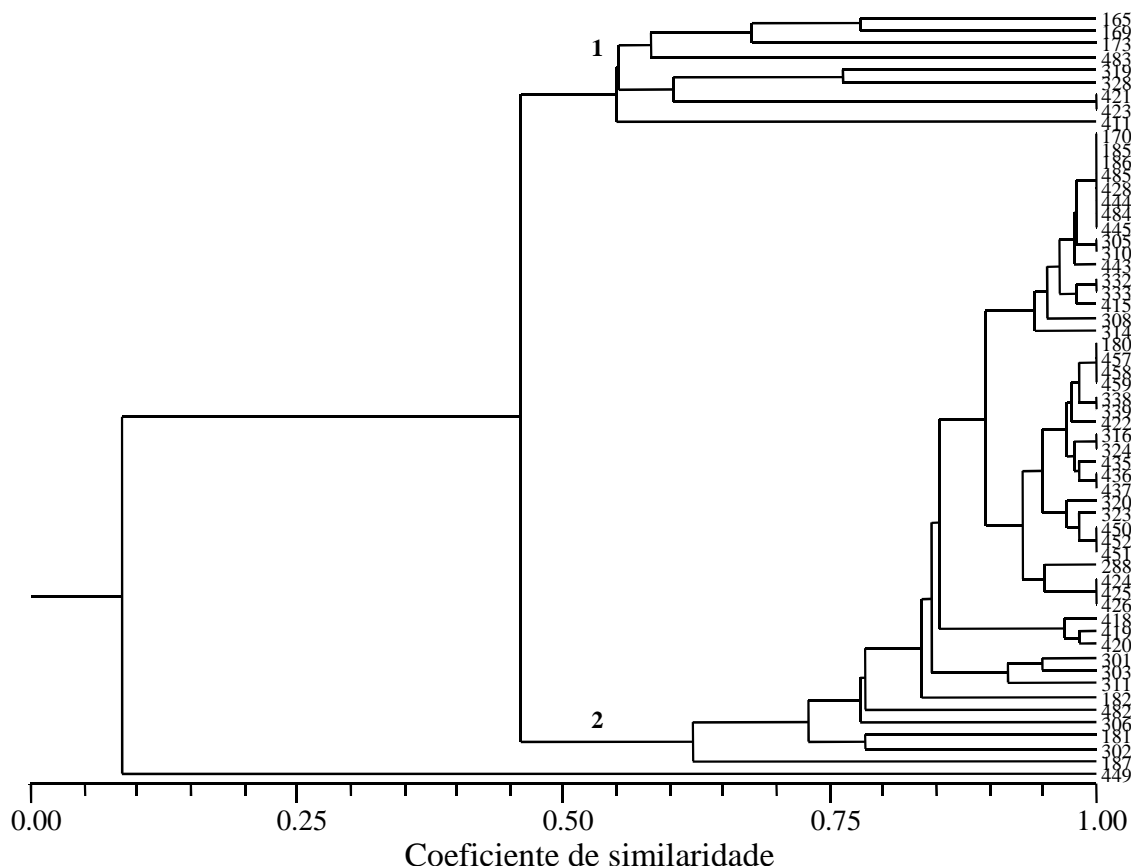


FIG. 2.1. Dendrograma com as distâncias genéticas relativas observadas entre cinquenta e oito isolados de *C. kikuchii*, obtidos através da amplificação ao acaso de DNA polimórficos (RAPD)

relação entre o teor de cercosporina e a severidade, procurou-se avaliar a patogenicidade de tres isolados com alta, média e baixa produção desse composto. A análise do teor de cercosporina foi feita a partir de micélio produzido em meio líquido. O micélio fresco foi lavado e levemente macerado em água destilada. O inóculo foi aplicado com atomizador De Vilbiss com pressão de 4Kgf/cm², até ponto de escorrimento, em plantas da cultivar BR 37 com a primeira folha trifoliolada desenvolvida. As avaliações fo-

ram feitas 2 e 4 semanas após anotando-se a porcentagem de área foliar lesionada (AFL). Com relação à produção de cercosporina os isolados de Imperatriz (MA) e Cruz Alta (RS) apresentaram os maiores valores (83uM/L e 54uM/L), respectivamente. Os dados de patogenicidade foram parecidos para os teores médio e alto (15% e 25% de AFL, respectivamente). Mas o isolado de menor concentração foi também o menos agressivo, na avaliação de severidade (10% de AFL).

Considera-se que os isolados de maior concentração de cercosporina poderão ser utilizados nos testes de seleção de genótipos tolerantes ou resistentes a *C. kikuchii*. Da mesma forma, é necessário considerar a diversidade do patógeno na seleção de genótipos de soja.

2.2.2. Avaliação da diversidade genética de *Macrophomina phaseolina* isolado de soja e culturas associadas

Raízes de plantas de soja coletadas em diferentes regiões produtoras foram utilizadas para isolamento de *M. phaseolina*. De cada raiz foram retirados 5 fragmentos. O fungo, desenvolvido em BDA, foi posteriormente transferido para novas placas, utilizando-se um microesclerócio por isolado. Posteriormente, cada um dos 55 isolados foi desenvolvido em meio líquido de BD por 2 semanas, à temperatura ambiente. O micélio foi coletado e após lavado parcialmente foi seco em papel de filtro. O DNA foi extraído utilizando-se CTAB e quantificado em espectrofotômetro com luz UV. Marcadores moleculares associados à diversidade genética foram obtidos por RAPD e os dados analisados pelo programa NTSYS. No estudo de avaliação de diversidade genética entre isolados de soja, utilizou-se 19 "primers" os quais originaram 74 bandas polimórficas. Em outro estudo, onde se comparou a diversidade genética de isolados de diferentes espécies vegetais em rotação ou sucessão de cultura, utilizou-se 22 "primers" os quais originaram 227 bandas polimórficas.

No dendograma constata-se que as similaridades variaram de 100 a 25%, com a formação de 3 grupos (Fig. 2.2). O grupo 1 é constituído por 19 isolados, o grupo 2 por 33 isolados, e o grupo 3 por 3 isolados. No grupo 1 a similaridade genética variou de 75 a 100%. No grupo 2 a similaridade foi menor, variando de 85 a 100%, enquanto no grupo 3 a amplitude de variação da similaridade foi de 5% (variação de 95 a 100%). Nesse estudo, foi constatado que numa mesma raiz pode existir isolados geneticamente distintos. O isolado da planta nº 5, do fragmento nº 5, do Estado de MS (P5/F5-MS), apresentou baixíssima similaridade (35%) com os outros isolados de fragmentos da mesma raiz. Os outros isolados das plantas da mesma região geográfica ficaram agrupados nos grupos 1 e 2. Também se pode observar que não houve agrupamento por origem geográfica dos isolados.

A comprovação da baixa diversidade genética, entre os isolados analisados, foi confirmada pelas análises de PCR-RFLP do DNA ribossomal, com amplificação de uma única banda com 563 pb. A digestão dessa banda não apresentou nenhum padrão de difereça entre os isolados. Essa baixa diversidade genética deve estar associada à ausência de uma alta pressão de seleção sobre o fungo. É importante destacar que todos os genótipos de soja testados para resistência mostraram-se suscetíveis. Um outro fato é a intrínscua capacidade deste patógeno em sobreviver e se multiplicar saprofiticamente em restos de cultura, fator que deve contribuir para uma reduzida pressão de seleção.

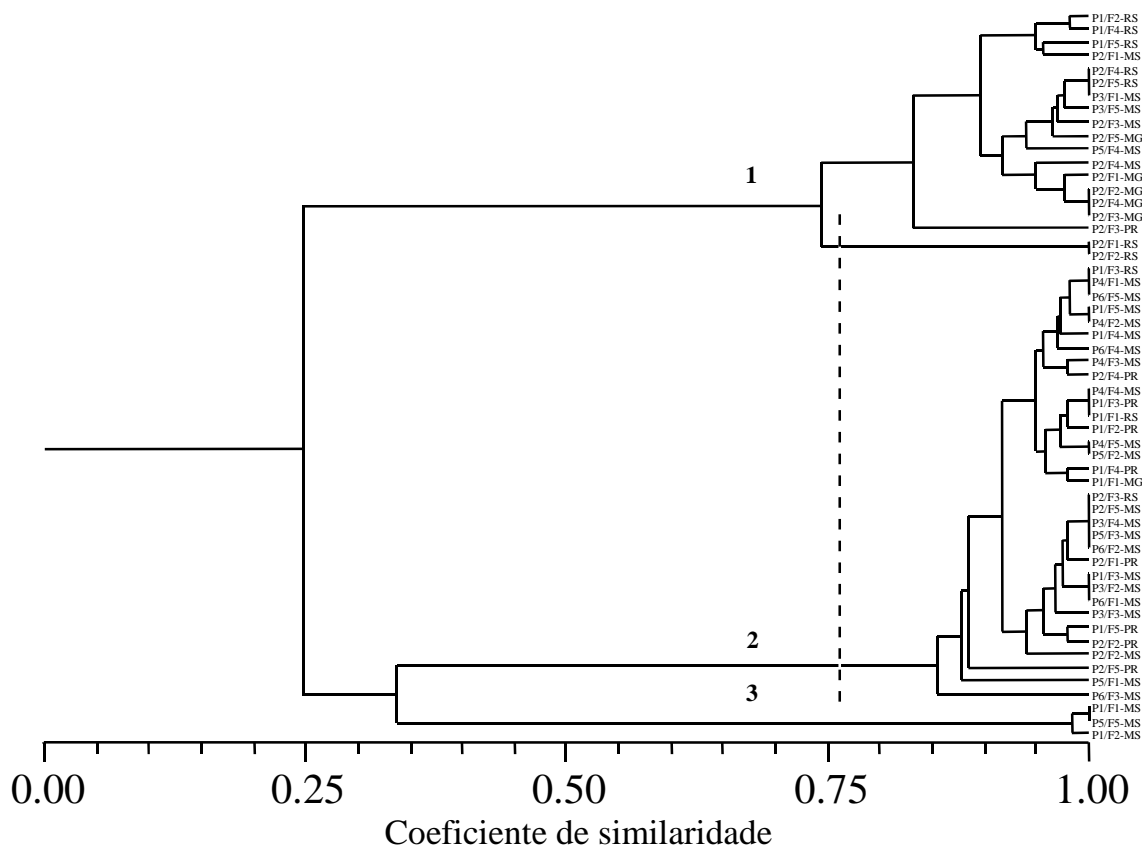


FIG. 2.2. Dendrograma com as distâncias genéticas relativas observadas entre cinquenta e oito isolados de *Macrophomina phaseolina*, obtidos de diferentes espécies hospedeiras, através da amplificação ao acaso de DNA polimórficos (RAPD)

Devido aos resultados obtidos, questionou-se sobre a possibilidade de se encontrar maior diversidade entre isolados de outras culturas, associadas ou não, à soja. Raízes de trigo, milho, girassol, feijão, caupi e sorgo, além de duas amostras de solo foram utilizadas para obtenção desses isolados. Marcadores moleculares foram obtidos por RAPD. Os resultados mostram a separação de dois grandes grupos a nível de 65% de simi-

laridade (Fig. 2.3). À exceção dos isolados de caupi e feijão, os demais isolados vieram de espécies utilizadas em rotação ou sucessão com a soja, na mesma área. Isso pode explicar o agrupamento. No entanto, o método ainda permitiu a visualização de diversidade genética desse fungo, fato que deve ser melhor estudado nas avaliações de genótipos resistentes.

◆◆◆◆◆

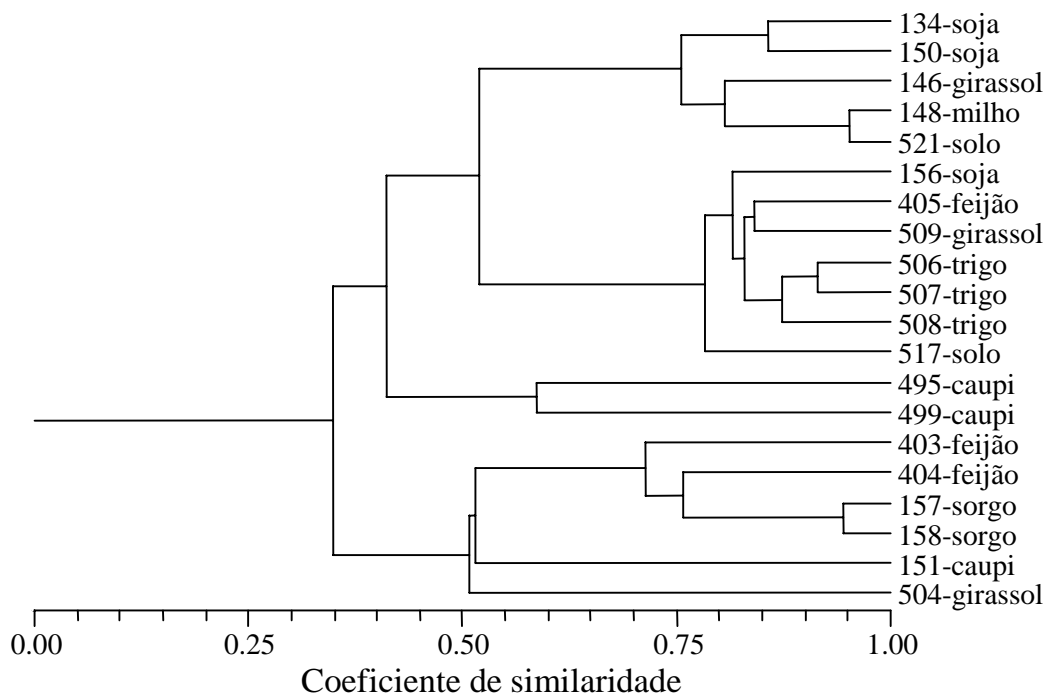


FIG. 2.3. Dendrograma com as distâncias genéticas relativas observadas entre cinquenta e oito isolados de *Macrophomina phaseolina*, obtidos de diferentes espécies hospedeiras, através da amplificação ao acaso de DNA polimórficos (RAPD)

2.3. Caracterização do Germoplasma Ativo de Soja com Marcadores Moleculares Tipo AFLP e Microsatélites (04.2000.322.03)

Carlos Alberto Arrabal Arias¹,
Ricardo Vilela Abdelnoor¹,
Ana Lúcia Variani Bonato²,
Silvana Regina Rockenbach Marin¹,
Isaias Olívio Gerald³, Eberson Sanches Calvo⁴,
Leones Alves de Almeida¹ e
Romeu Afonso de Souza Kiihl¹

O melhoramento genético de plantas vem dando contribuições inestimáveis para a produção de alimentos. Entretanto, o

progresso com melhoramento genético está condicionado à existência de variabilidade genética. Esta, por sua vez é medida principalmente pelas diferenças fenotípicas entre as plantas. Recentemente, as técnicas de marcadores moleculares tem permitido a avaliação da variabilidade genética diretamente ao nível de DNA. Essas medidas tem encontrado aplicações na organização e manutenção de bancos de germoplasma, na escolha de parentais para cruzamentos, e no monitoramento de programas de retrocruzamentos.

Desde a aprovação da Lei de Proteção de Cultivares (LPC) e a possibilidade de proteção das variedades desenvolvidas por seus obtentores, observou-se um

¹ Embrapa Soja

² Doutorado pela ESALQ / USP

³ ESALQ/USP

⁴ Milenia Biotecnologia & Genética Ltda

aumento acelerado do nível de competitividade dos programas de melhoramento, o que foi promovido pela entrada das grandes empresas internacionais no mercado de sementes. Mudanças profundas ocorreram nas relações entre os vários programas de melhoramento de soja desenvolvidos no Brasil e, atualmente, cada obtentor fica responsável pelos testes de valor de cultivo e uso (VCU) e de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE), para fins de registro e proteção, respectivamente. Assim, cada variedade lançada terá de representar alguma novidade para o meio produtivo e terá de ser distinta das demais variedades já recomendadas. Com o aumento do número de variedades lançadas a cada ano e com o elevado nível de parentesco que existe entre variedades de soja, é natural que a distinção de novos genótipos torne-se cada vez mais difícil, exigindo a utilização de marcadores moleculares.

As distâncias genéticas obtidas com base em marcadores, servirão de subsídio aos melhoristas desta espécie para uma manutenção mais racional do banco de germoplasma, através de identificação de coleções núcleo que representem a variabilidade existente na amostra da população analisada. Além disso, será de grande importância para o planejamento de cruzamentos e para a identificação de variedades com base no DNA (DNA fingerprinting).

Este subprojeto tem como objetivo a busca de marcadores moleculares eficientes para caracterizar genótipos de soja e a caracterização molecular, com o auxílio de marcadores tipo microssatélites

e AFLP, de variedades de soja já recomendadas no Brasil e também de acessos do banco de germoplasma de soja mantidos pelo programa de melhoramento genético da Embrapa Soja.

2.3.1. Variedades recomendadas

Para avaliar a similaridade genética entre cultivares de soja brasileiras, 317 cultivares liberadas no período de 1962 a 1998 foram analisadas utilizando a técnica de AFLP, com seis combinações de *primers EcoRI/MseI*. Em seguida foram estimados os coeficientes de similaridade genética de Nei & Li e realizado o agrupamento das cultivares pelo método UPGMA. Foram calculados também os coeficientes de parentesco entre 100 cultivares, liberadas entre 1984 e 1998, os quais foram correlacionados com os coeficientes de similaridade obtidos pelos marcadores. A análise de AFLP revelou a ocorrência de aproximadamente 394 bandas, sendo 78 delas polimórficas, com um número médio de 13 bandas por combinação de *primer*. Os coeficientes de similaridade genética variaram de 0,17 a 0,97, com média de 0,61. Observou-se uma frequência maior (56,8%) de coeficientes acima de 0,60, enquanto que apenas 9,7% foram iguais ou menores que 0,50, refletindo o alto grau de similaridade genética entre as cultivares. Apesar disso, os coeficientes de similaridade permaneceram constantes ao longo de três décadas, indicando que o grau de similaridade genética entre as cultivares não tem aumentado. A análise *bootstrap* indicou que as 78 marcas polimórficas foram suficientes para ava-

liar a similaridade genética entre as 317 cultivares de soja, devido ao coeficiente de variação relativamente baixo (7,74%). A interpretação do dendrograma foi dificultada pelo grande número de cultivares utilizadas. Mesmo assim foi possível detectar agrupamentos de cultivares formados de acordo com o esperado através da genealogia dos mesmos. No entanto, verificou-se em alguns casos que cultivares com altos coeficientes de similaridade genética alocaram-se em diferentes grupos. Um novo dendrograma, composto por apenas 63 cultivares, permitiu uma melhor interpretação dos agrupamentos. A correlação cofenética foi de 0,60 e 0,70, respectivamente, nos dendrogramas compostos por 317 e 63 cultivares. Os coeficientes de parentesco entre 100 cultivares variaram de 0 a 1, com média de 0,21, sendo esta muito próxima de outros dados relatados para cultivares brasileiras e norte-americanas, e considerada alta. Porém, não detectou-se correlação significativa entre os coeficientes de parentesco e de similaridade genética ($r = 0,12$). Os resultados indicaram que apesar da alta similaridade genética entre as cultivares avaliadas os marcadores AFLP foram considerados eficientes para sua estimação.

2.3.2. Acessos do BAG

Com base nas informações sobre os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de soja da Embrapa Soja (BAG soja), fo-

ram selecionados, durante o ano de 2000, 700 acessos para o estudo da diversidade genética. O processo de extração de DNA desses acessos e o início das análises moleculares ainda não pôde ser iniciado em 2000, em função da falta de recursos, incluindo reagentes e pessoal. Em 2001, se procurará realizar essas atividades em parceria com o Bioagro da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e com o auxílio financeiro de Associações de Produtores de Sementes.

2.3.3. Seleção de marcadores

Para promover uma seleção de marcadores multialélicos, foram selecionados, em 2000, 20 linhagens de soja, com diferentes graus de parentesco, definidos com base na análise por AFLP's. Alguns marcadores moleculares, como os microsátélites, apresentam a característica de poderem ser multialélicos, o que facilitaria muito esse tipo de trabalho. Esses genótipos tiveram seus DNAs extraídos e estão sendo submetidos às análises moleculares com marcadores tipo microsátélites para verificar a presença de multialelismo. Esse trabalho também está sendo realizado em parceria com o Bioagro (UFV). Já foram encontradas algumas marcas multialélicas e a expectativa é que, já em 2001, essas marcas sejam utilizadas para caracterizar novos lançamentos da Embrapa Soja.



2.4. Genética Quantitativa Aplicada ao Melhoramento da Soja: Diversidade Genética e Resistência a Doenças (04.2000.322-04)

João Flávio Veloso Silva¹, Carlos A.A. Arias¹, José Tadashi Yorinori¹, José F.F. de Toledo¹, Marcelo F. de Oliveira¹, Rodrigo L. Brogin² e Cláudio C. Portela³

A competitividade na busca de recursos para a pesquisa vem aumentando a cada ano. Metodologias que auxiliem na escolha dos genótipos parentais para novos cruzamentos e na avaliação de plantas na fase inicial do avanço de gerações após o cruzamento deverão trazer grandes benefícios para o programa. Todas essas metodologias visam aumentar o domínio sobre a variabilidade genética existente na soja e que, na grande maioria dos casos, não podem ser trabalhadas facilmente em função do complexo controle genético e da grande influência ambiental sobre o caráter. Dos caracteres de importância para a soja, maior ênfase será dada para rendimento de grãos, resistência a mancha parda (*Septoria glycines*) e resistência a *Meloidogyne javanica*. A mancha parda é uma das principais doenças do complexo "doenças de final de ciclo" e tem se agravado muito nos últimos anos a ponto de estimular o controle químico. *Meloidogyne javanica*, uma das principais espécies de nematóide de galha, ocorre de forma generalizada no Brasil e normalmente só é detectada quando a população de nematóides atin-

giu densidade suficiente para provocar perdas significativas. Assim, para tornar a variabilidade genética desses caracteres mais acessível para uso dentro de programas de melhoramento, este subprojeto tem como objetivos: averiguar a eficiência do uso de marcadores moleculares para medir a diversidade genética entre genótipos elites de soja; aplicar a metodologia para avaliação da reação de linhagens de soja para a mancha parda nas fases iniciais do desenvolvimento da planta; estudar o mecanismo genético envolvido no controle da resistência de cultivares à mancha parda nos estádios iniciais de desenvolvimento da soja; e estudar o mecanismo genético envolvido no controle da tolerância da soja aos nematóides de galha com ênfase para *Meloidogyne javanica*.

2.4.1. Divergência genética

No âmbito do subprojeto 04.2000.322-03, tem-se desenvolvido trabalhos com marcadores moleculares tipo AFLP para caracterizar todas as variedades recomendadas no Brasil e conhecer a distância genética entre elas. Com base nesse trabalho, foram selecionadas 16 variedades classificadas em diferentes grupos de divergência. Essas variedades 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 13/11/2001 segundo um delineamento inteiramente casualizado com 20 plantas de cada parental e 60 plantas F2 de cada combinação híbrida. Foram avaliados peso total de grãos, dias para

¹ Embrapa Soja

² Mestrado em Genética e Melhoramento pela Universidade Estadual de Londrina

³ Bolsista recém-doutor pelo CNPq

o florescimento e para a maturação, altura de planta na floração e maturação e número de nós. Serão obtidas estimativas da variância genética para cada combinação híbrida e realizadas comparações com as distâncias moleculares. Esses resultados darão subsídios para geneticistas e melhoristas que trabalham com soja, sobre como as distâncias moleculares entre genótipos podem ser utilizadas para calcular o potencial genético de cruzamentos, auxiliando na escolha dos parentais.

2.4.2. Resistência à mancha parda

Para estudar o controle genético da resistência da soja à mancha parda (*Septoria glycines*), foram realizados dois experimentos em casa-de-vegetação (semeaduras em 30/11/1999 e 25/01/2000) com avaliações nos estádios iniciais do desenvolvimento da soja. O material genético incluiu duas variedades resistentes à mancha parda (FT-2 e Dourados) e duas suscetíveis (Davis e Paraná), além das gerações F2 e F3 derivadas dos cruzamentos entre elas. Uma suspensão contendo 5×10^6 esporos de *S. glycines* foi utilizada para a inoculação no estádio V3/V4 de desenvolvimento da soja. Após a inoculação, foi avaliado o nível de infecção nos três primeiros trifólios, utilizando-se uma escala de notas de zero a dez. O padrão da distribuição de frequências de indivíduos para as notas foi contínuo, não sendo possível evidenciar a presença de genes maiores. Serão ajustados modelos genéticos às médias e variâncias das gerações procurando identificar quais os efeitos genéticos predominantes, qual

a herdabilidade desse caráter quando avaliado em gerações precoces do melhoramento e qual a melhor estratégia de melhoramento a ser aplicada para o desenvolvimento de novas variedades.

2.4.3. Resistência à *Meloidogyne javanica*

O controle genético da resistência a *Meloidogyne javanica* também foi estudada segundo métodos quantitativos. A metodologia de avaliação utilizada foi desenvolvida e adaptada para avaliações rápidas, realizadas durante os primeiros estádios de desenvolvimento da soja e com vantagens quanto ao aproveitamento de espaço em casa-de-vegetação. Para esse estudo, os genótipos PI 595099 e Coodetec 201, resistentes, foram cruzados com BRS 133 (Embrapa 133), parental suscetível.

A resistência a *M. javanica* nos genótipos estudados foi herdada de maneira quantitativa. A ocorrência de segregação transgressiva no cruzamento entre Coodetec 201 e PI 595099, ambas resistentes ao nematóide, indica que os genes controladores do caráter nesses genótipos parentais não são os mesmos, podendo estar situados em locos diferentes ou em alelos diferentes de um mesmo loco. O número médio de galhas por planta dos genótipos parentais nos cruzamentos BRS 133 x PI 595099 e BRS 133 x Coodetec 201 foram significativamente diferentes ($p < 0,01$). O número médio de galhas das plantas F₂ do cruzamento BRS 133 x Coodetec 201 aproximou-se mais da média do progenitor resistente do que da média aritmética en-

tre os pais, sugerindo que, na resistência a *M. javanica*, proveniente de Coodetec 201, há efeito de dominância. Para os cruzamentos BRS 133 x PI595099 e Coodetec 201 x PI 595099, as médias das gerações F_2 e F_3 foram praticamente iguais, há forte indicação de não existência de efeito de dominância na resistência vinda de PI595099.

De acordo com os testes de média, a herança da resistência no cruzamento BRS 133 x Coodetec 201 foi controlada por efeitos aditivos [d], de dominância [h], no sentido da resistência, e epistáticos [i], do tipo aditivo por aditivo. No cruzamento BRS 133 x PI 595099, a herança foi controlada por efeitos aditivos e epistáticos entre os genes condicionantes do caráter, sendo que efeitos de dominância não estão presentes. Por fim, no cruzamento Coodetec 201 x PI 595099, verificou-se que a herança foi controlada por efeitos aditivos e epistáticos e que também não houve efeito de dominância.

Nos modelos de variância, os efeitos aditivos e interações genótipo x microambiente predominaram em todos os cruzamentos. A presença de efeitos aditivos, nos testes de média e de variância, mostra que há ganho genético quando é feita a seleção de plantas resistentes a *M. javanica* nos cruzamentos estudados. Entretanto, como efeitos de dominância e epistáticos no sentido da resistência também estão presentes no cruzamento BRS 133 x Coodetec 201, a seleção deve ser feita preferencialmente em gerações mais avançadas, já que os genótipos ainda estarão segregando nas gerações precoces. Além disso, o modelo de variância

foi insuficiente para detectar todos os efeitos presentes (c^2 significativo) nos cruzamentos BRS 133 x PI 595099 e Coodetec 201 x PI 595099. Como já foram detectados efeitos genéticos complicadores, como a interação genótipo/microambiente, ficou evidente que os modelos são complexos, com efeitos não aditivos envolvidos.

Embora os modelos genéticos de médias e variâncias tenham mostrado que a herança da resistência a *M. javanica* é complexa, incluindo vários efeitos genéticos não aditivos, como dominância, epistasia e interação genótipo por microambiente, a distribuição de freqüências construída com a média das famílias F_3 apresentou algumas classes distintas de genótipos, os quais sugerem a presença de alguns genes maiores determinando a resistência.

Assim, alguns modelos com número de genes conhecidos e que respeitem as informações obtidas através dos testes de médias e variâncias, foram sugeridos para explicar os padrões de segregação. No cruzamento entre BRS 133 e Coodetec 201, dois genes dominantes e aditivos controlam a resistência, sendo a herança condicionada por efeitos aditivos, de dominância e epistáticos do tipo aditivo por aditivo. Nesse cruzamento, a seleção deve ser feita com base nas médias das famílias, e em gerações mais avançadas. No caso de BRS 133 x PI 595099 e Coodetec 201 x PI 595099, um modelo com dois genes complementares, com ausência de dominância, em que a resistência é determinada por genótipos homozigóticos para os alelos dos dois

genes, foi testado e aceito. Por último, no cruzamento Coodetec 201 x PI 595099, uma das famílias mostrou resistência ainda superior à de PI 595099, com número médio de galhas menor que o limite inferior do intervalo de confiança (95%) do número de galhas apresentado por esse parental, mostrando que os genes de resistência nesses materiais são diferentes.

As estimativas da herdabilidade foram altas para todos os cruzamentos, indicando que uma grande porcentagem da variação no número de galhas entre as progênies F_3 , foi devida a causas genéticas, o que possibilita ganhos com seleção.



2.5. Desenvolvimento de Soja Transgênica com Genes de Interesse ao Melhoramento (04.2000.322-05)

Silvana R. Marin¹, Solange Lügler²,
Júlio Pedroso³, Norman Neumaier¹, Tetsuji Oya⁴,
Carlos Alberto Arrabal Arias¹,
José Renato Bouças Farias¹ e
Alexandre Lima Nepomuceno¹

O advento das técnicas de Biologia Molecular e Engenharia Genética vem proporcionando uma nova realidade em várias áreas da Agronomia e Biologia. O melhoramento genético de plantas é uma das áreas que mais tem sido beneficiada por estas novas metodologias. Além de facilitar a introdução pontual de genes de interesse em um determinado genótipo, a engenharia genética quebra a barreira

entre espécies. Hoje é possível a criação de novas variedades de plantas não somente com características agrônômicas até então inexistentes no germoplasma daquela espécie, mas também é possível introduzir nestas novas cultivares características antes inimagináveis de serem introduzidas por melhoramento clássico. Já existem plantas geneticamente modificadas expressando genes de outras espécies de plantas, de animais e mesmo genes humanos, como é o caso das plantas geneticamente modificadas para produzir insulina humana. A agricultura já esta sendo revolucionada com estas plantas geneticamente modificadas, o exemplo mais conhecido no momento são as variedades de soja com resistência ao herbicida glifosato, que hoje dominam aproximadamente 50% da área plantada de soja no mundo. O potencial desta tecnologia é enorme e num futuro próximo teremos várias plantas geneticamente modificadas sendo comercialmente utilizadas e apresentando desde características agrônômicas melhoradas até plantas que produzem substâncias de importância na medicina, como a insulina humana e o hormônio de crescimento humano, assim como, na industria, como os bioplásticos. O objetivo principal do subprojeto 04.2000.322-05 é o de estabelecer um protocolo eficiente de transformação de soja via biobalística no laboratório de biotecnologia da Embrapa Soja e disponibilizar eventos "elite" para serem utilizados no programa de melhoramento genético em soja. A capacitação em transformação eficiente de soja permitirá o uso de construções gênicas de

¹ Embrapa Soja

² Fapeagro

³ Mestrado - Univesidade Estadual de Londrina

⁴ JIRCAS (acordo JIRCAS/Embrapa Soja)

interesse que estejam sendo disponibilizadas à Embrapa via convênios com parceiros, ou construções que estejam sendo geradas pela Embrapa através da identificação e desenvolvimento de genes de interesse em seus projetos de prospecção de genes.

No primeiro ano do projeto foi possível estabelecer e adaptar o protocolo de biobalística (gás hélio sob alta pressão) desenvolvido por Aragão et al. (2000) no laboratório de biotecnologia da Embrapa Soja. O protocolo é uma patente da Embrapa que aumenta consideravelmente a eficiência de transformação por biobalística. Anteriormente, transformação por biobalística proporcionava entre 1-2% de plantas transformadas. Hoje, com o método desenvolvido e patenteado pela Embrapa é possível a obtenção de uma eficiência de transformação de cinco a 20%.

A transformação por biobalística foi inicialmente proposta por Sanford et al., (1987), objetivando a introdução de material genético no genoma nuclear de plantas superiores. A biobalística utiliza microprojéteis em alta velocidade para introduzir ácidos nucléicos e outras moléculas em células e tecidos *in vivo*. Para a utilização deste método, diferentes sistemas capazes de acelerar micropartículas (0,2 a 4mm de diâmetro) cobertas com seqüências de ácidos nucléicos a velocidades superiores a 1500km/h foram desenvolvidos e construídos. Foi demonstrado que estas partículas (de ouro ou tungstênio), penetram a parede e 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 no genoma nuclear do organismo receptor. Muitos destes 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 possuírem um amplo espectro de utilização, e serem mais eficientes para a obtenção de altas freqüências de transformação em diferentes espécies vegetais.

A construção gênica inicialmente sendo utilizada para otimizar o sistema de transformação na Embrapa Soja possui um mutante do gene *ahas* (que confere resistência a herbicidas da classe das imidazolinonas) e o gene *gus* (que expressa a enzima β -glucoronidase, utilizado como gene marcador). O gene *ahas* que expressa a enzima sintetase ácida hidroxiacética (acetohydroxyacid synthase, E.C. 4.1.3.18) cataliza uma etapa inicial da síntese dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina. Normalmente esta 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 um serina por uma asparagina, conferindo a este mutante resistência aos herbicidas da classe das imidazolinonas.

Em maio de 2001 foram obtidas as primeiras plântulas geneticamente modificadas obtidas por este método na

Embrapa Soja. Atualmente somente o gene *ahas* esta sendo utilizado nas transformações, visando a obtenção de eventos "elite" que possam ser úteis ao programa de melhoramento na criação de cultivares comerciais de soja. Recebem os disparos com as micropartículas 380 embriões por semana, o que em um mês gera aproximadamente 1500 embriões atingidos com as micropartículas contendo o(s) gene(s) de interesse.

A construção contendo o gene *ahas* e o gene *gus*, foi fornecida pelo Dr. Elbio Rech (Embrapa Cenargen) e foi clonada em *E.coli* para multiplicação do plasmídeo. O plasmídeo foi extraído e purificado utilizando-se o Kit *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System*

(Promega corp.) e quantificado em fluorímetro.

Nos meses de novembro, dezembro de 2000 e janeiro, fevereiro e março de 2001 os disparos foram efetuados, em soja, utilizando-se os genes *ahas* e *gus* a fim de implementar e otimizar o sistema de transformação na Embrapa Soja. A partir de abril de 2001, após a constatação que o sistema de transformação esta funcionando (Figura 2.4), iniciaram-se os disparos com apenas o gene *ahas*.

Construções gênicas contendo os genes de insulina humana e hormônio de crescimento foram fornecidas à Embrapa Soja que em parceria com a Embrapa Cenargen, e a Unicamp também estará transformando soja com este genes.

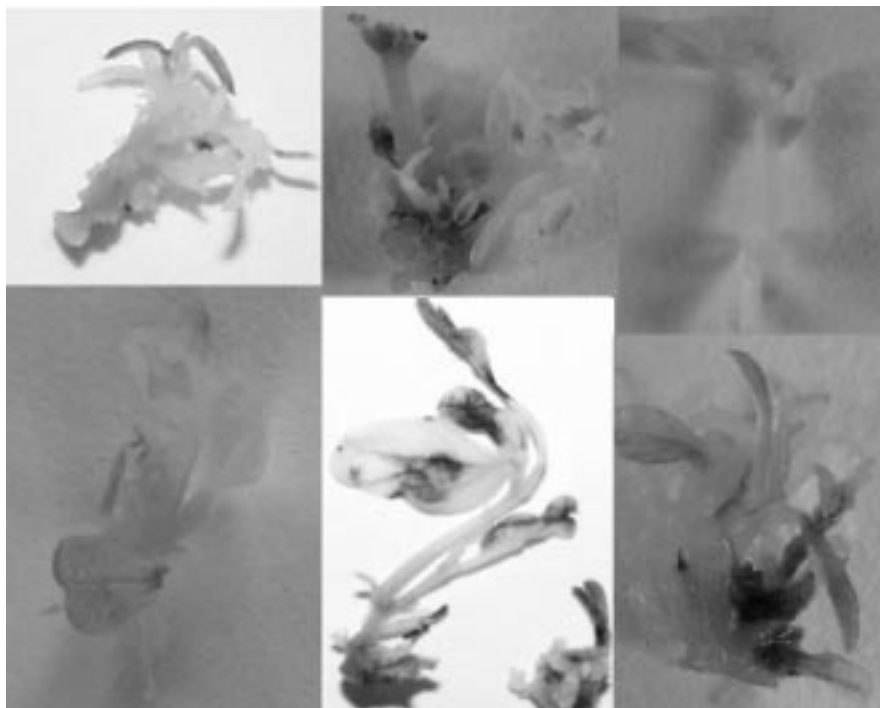


FIG. 2.4. Multibrotos e plântulas de soja transformadas por biobalística expressando o gene *gus*. Laboratório de biotecnologia da Embrapa Soja, Londrina, PR, Maio, 2001

3.1. Caracterização da Aptidão Climática de Regiões para o Cultivo de Soja no Brasil (01.2000.051-03)

José Renato Bouças Farias¹,
Ivan Rodrigues de Almeida¹, Antônio Garcia¹,
Marcos Valdemir Buche²,
Carlos Eduardo Zampar² e Anderson Saquetti²

Este subprojeto é componente do projeto "Zoneamento Agroclimático das Principais Culturas de Grãos no Brasil (01.2000.051)", liderado pelo Dr. Silvano Carlos da Silva, da Embrapa Arroz e Feijão. Tem 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 é composto por subprojetos que abrangem 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, participa do projeto a Embrapa Cerrados (responsável pelo subprojeto de caracterização agroclimática das regiões brasileiras). As atividades programadas dão continuidade ao projeto 04.0.94.065, encerrado em

dezembro de 1999. O término deste novo projeto está previsto para 2002.

O complexo soja contribuiu com um superavit considerável na balança comercial brasileira. Não tão facilmente mensurável, a contribuição indireta da cultura da soja na movimentação da economia brasileira, seja pela geração de empregos ou seja pela adição de valor à soja industrializada, é de vital importância para o desenvolvimento do país. Com o atual cenário agrícola globalizado, incrementos nos rendimentos e redução dos custos e dos riscos de insucesso passaram a ser exigências básicas à competitividade. O aumento de eficiência no uso de recursos e de insumos, a melhora qualitativa dos produtos agrícolas e a preservação dos recursos naturais, são desafios da moderna agricultura. Ferramentas que venham a auxiliar à tomada de decisão são fundamentais para superar estes desafios e obter produtos competitivos e ambientalmente sustentáveis.

Definindo áreas menos sujeitas a riscos de insucessos pela ocorrência de adversidades climáticas, o zoneamento agroclimático constitui-se numa tecnologia de fundamental importância em várias atividades do setor agrícola. Isto leva à exploração mais racional da cultura, bem como ao incremento da produção e da produtividade da soja, trazendo inúmeros reflexos positivos à economia e à

¹ Embrapa Soja

² Bolsista MA/FINATEC

sociedade brasileiras. Neste sentido o presente subprojeto tem 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 tanto, dar-se-á continuidade aos trabalhos desenvolvidos no subprojeto 04.0.94.065-03 - Zoneamento Agroclimático da cultura da soja no Brasil, encerrado em dezembro de 1999, procurando-se definir de forma mais precisa e atual, as zonas inaptas, de alto, de médio ou de baixo risco climático à cultura, em função das exigências bioclimáticas da soja e das disponibilidades térmicas e hídricas das diferentes regiões produtoras brasileiras. Para isto estão sendo usados modelos de simulação do desenvolvimento da cultura, sistemas geográficos de informação e geoestatística, num trabalho envolvendo várias instituições (MA, FINATEC, Embrapa, ANEEL, INMET, IAPAR).

Face à prioridade estabelecida pelo Governo Federal na condução deste trabalho, 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, sul do Piauí e Distrito Federal, para duas cultivares hipotéticas de soja (precoce e tardia) e três tipos de solo por estado. Foram usadas séries pluviométricas de várias estações por estado contendo, no mínimo, 15 anos de dados diários para cada local.

Em todos os estados, com o emprego de modelos, foram feitas simulações do desenvolvimento da cultura para vári-

as datas de semeadura (nove ou doze períodos de dez dias cada), as quais procuram 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 um sistema de informações geográficas (SGI). Para definição das áreas de maior ou menor probabilidade de ocorrência de déficit hídrico na fase mais crítica, foram estabelecidas 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, foram elaborados 54 ou 72 mapas decorrentes da combinação de nove ou doze períodos de semeadura, três tipos de solo e duas cultivares. Ao todo, foram rodadas cerca de 80.000 simulações, resultado da interação entre estações pluviométricas, cultivares, tipo de solo e datas de semeadura nos diferentes estados. Foram definidas 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. Na Figura 3.1 são apresentados



FIG. 3.1. Zoneamento agroclimático da cultura da soja, cultivar de ciclo precoce e solo de média retenção de água, para nove épocas de semeadura, no estado do Mato Grosso. Embrapa Soja, Londrina-PR, 2000

alguns exemplos de mapas obtidos para o estado do Mato Grosso, onde cada mapa apresenta a classificação das diferentes áreas do estado para uma dada época de semeadura, em função do tipo de solo e da cultivar.

Em 2000, foram revisadas, corrigidas e elaboradas novas tabelas do zoneamento agroclimático da cultura da soja para os estados de Goiás, Tocantins, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Bahia, Maranhão e Piauí, procurando fazer com que o trabalho expresse melhor a realidade observada a campo, ao longo dos anos. As bases de dados agrometeorológicos foram revistas e atualizadas, realizando-se novas simulações e gerando informações mais precisas para os locais onde se verificou algum proble-

ma. Ainda em 2000, foi praticamente concluída a versão preliminar de um software, a ser disponibilizado na forma de CD-ROM, sobre o zoneamento agroclimático para a cultura da soja no Brasil, com todas as informações geradas por este trabalho, contendo tabelas e mapas com recomendações de épocas de semeadura e de cultivares. Além disto, esse CD-ROM conterá outras informações técnicas sobre a cultura da soja, úteis aos produtores rurais, aos órgãos financiadores, à assistência técnica, às atividades de planejamento rural, às instituições de pesquisa e de ensino, aos órgãos do governo, etc. Este trabalho necessita anualmente ser revisado e atualizado, para que expresse da forma mais atual possível a realidade verificada ao nível de campo.

