

**DOCUMENTOS**

429

ISSN 2176-2937  
Agosto/2020

## XV Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

Resumos expandidos



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

## **DOCUMENTOS 429**

# XV Jornada Acadêmica da Embrapa Soja

## Resumos expandidos

*Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite  
Kelly Catharin*

Editores Técnicos

**Embrapa Soja**  
Londrina, PR  
2020

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Soja**  
Rod. Carlos João Strass, s/n  
Acesso Orlando Amaral, Distrito da Warta  
CEP 86001-970 ,  
Caixa Postal 231  
Londrina, PR  
Fone: (43) 3371 6000  
www.embrapa.br/soja  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Comitê Local de Publicações  
da Embrapa Soja**

Presidente  
*Ricardo Vilela Abdelnoor*

Secretária-Executiva  
*Regina Maria Villas-Bôas de Campos Leite*

Membros  
*Clara Beatriz Hoffmann-Campo, Claudine Dinali Santos Seixas, Ivani de Oliveira Negrão Lopes, Liliane Márcia Mertz-Henning, Mariangela Hungria da Cunha, Mônica Juliani Zavaglia Pereira, Norman Neumaier e Vera de Toledo Benassi.*

Supervisão editorial  
*Vanessa Fuzinatto Dall' Agnol*

Normalização bibliográfica  
*Valéria de Fátima Cardoso*

Projeto gráfico da coleção  
*Carlos Eduardo Felice Barbeiro*

Edição eletrônica e capa  
*Vanessa Fuzinatto Dall' Agnol*

**1ª edição**  
PDF digitalizado (2020).

**Todos os direitos reservados.**

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

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

Embrapa Soja

---

Jornada Acadêmica da Embrapa Soja (15. : 2020: Londrina, PR).  
Resumos expandidos [da] XV Jornada Acadêmica da Embrapa Soja / Regina Maria Villas Boas de Campos Leite, Kelly Catharin, editoras técnicas – Londrina: Embrapa Soja, 2020.  
243 p. (Documentos / Embrapa Soja, ISSN 2176-2937 ; n. 429).

1. Soja-Pesquisa. 2. Pesquisa agrícola. I. Série.

CDD: 630.2515 (21. ed.)

## Editoras Técnicas

### **Regina Maria Villas Bôas de Campos Leite**

Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Soja, Londrina, PR.

### **Kelly Catharin**

Secretária-executiva, analista da Embrapa Soja, Londrina, PR

## Apresentação

A Jornada Acadêmica da Embrapa Soja tem como objetivo promover o trabalho desenvolvido pelos estudantes que integram o Programa de Estágio de Complementação Educacional da Embrapa, junto às equipes de pesquisa e apoio da Unidade.

Por meio da inscrição de trabalhos nas modalidades escrita e oral, os participantes vivenciam a dinâmica de um evento científico, contando com o suporte de seus orientadores e do Comitê Local de Publicações (CLP) da Embrapa Soja. Além disso, interagem com seus pares e com o público interno da empresa, em um significativo processo de aprendizagem.

Em sua 15ª edição, realizada no dia 15 de julho de 2020, pela primeira vez totalmente no formato online, a Jornada Acadêmica contou com 31 trabalhos inscritos, cujos resumos expandidos encontram-se nesta publicação, que temos a satisfação de apresentar.

Cabe à Embrapa Soja agradecer aos orientadores e estagiários, bem como à banca avaliadora e ao Núcleo de Comunicação Organizacional, que contribuíram para a realização da XV Jornada Acadêmica da Embrapa Soja. Aproveitamos, ainda, para parabenizar a todos pelos resultados alcançados.

*Ricardo Vilela Abdelnoor*  
Chefe de Pesquisa e Desenvolvimento  
Embrapa Soja



## Conteúdo

Estratificação ambiental em ensaios de competição de híbridos de girassol .....	10
Componentes de produção do trigo influenciados pela aplicação de calcário e cobre .....	16
Análise da variação da precipitação pluviométrica na safra 2019/2020 no município de Londrina, PR .....	21
Uso de variável <i>Dummy</i> para medir influência de variáveis socioeconômicas e a importação chinesa de grãos de soja .....	26
Contribuição da polinização entomófila em lavouras de soja com alto ou baixo potencial de produtividade .....	36
Ganho produtivo do sistema de sucessão soja/milho com o consórcio de milho/braquiária e adubação nitrogenada na segunda safra .....	44
Produtividade da soja em função da distância de um pequeno apiário e do cerrado .....	51
<i>Genome-Wide Association Study</i> (GWAS) para resistência a <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> .....	60
Produtividade da soja em função da distância de um apiário médio .....	68
Prospecção de genes ortólogos de fitonematoides visando estratégia de amplo alcance .....	76
Perfil transcricional do gene <i>GmHsp22.4</i> sob infecção pelo nematoide das lesões radiculares <i>Pratylenchus brachyurus</i> .....	83
Análise <i>in silico</i> de genes <i>NAC</i> diferencialmente expressos em cultivares de soja sob déficit hídrico .....	90

Germinação de <i>Metarhizium rileyi</i> em extratos cuticulares de folíolos de soja .....	100
Estudo da quantificação do teor de lignina em diferentes partes da planta de soja utilizando o método brometo de acetila .....	106
Avaliação da resistência do feijão-caupi ( <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp) à um isolado virulento de <i>Phakopsora pachyrhizi</i> .....	113
Análise <i>in silico</i> de transportadores de aminoácidos diferencialmente expressos em sementes de cultivares de soja com variação na coloração do tegumento .....	119
Fitonematoides em diferentes modelos de produção envolvendo a soja no norte e noroeste do Paraná.....	127
Determinação da capacidade máxima de adsorção de fósforo em solos de mata nativa e de cultivo, no município de Londrina, PR .....	135
Caracterização da proteína 14-3-3 nos nematoides que infecta a soja.....	143
Níveis de infestação de <i>Euschistus heros</i> em genótipos com característica de resistência a insetos: parâmetros de produtividade e indicadores de tolerância .....	152
Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da ferrugem-asiática da soja, em Londrina, PR.....	158
Planejamento e avaliação de sistemas de terraceamento utilizando imagens aéreas e ferramentas digitais.....	163
Tempo de cozimento e rendimento de variedades de mandioca de mesa de polpa amarela em diferentes épocas de colheita .....	173
Análise do curso de Produção de Soja como ferramenta de comunicação na Embrapa Soja em 2019.....	180
Parâmetros biológicos de ninfas como indicadores do potencial de oviposição do percevejo <i>Euschistus heros</i> .....	187

Parâmetros para descarte de adultos em criação de <i>Euschistus heros</i> visando a produção de ovos.....	195
Otimização de ensaios de PCR Multiplex para a amplificação de alvos de interesse para o melhoramento genético da Soja .....	202
Processo de criação de identidade visual para eventos da Embrapa Soja.....	211
Variabilidade espacial do índice de vegetação da soja na safra 2018/2019 em propriedades agrícolas no norte e noroeste do Paraná .....	217
Volumes de calda no tratamento industrial sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja armazenadas em diferentes períodos e ambientes .....	225
Otimização de um método de extração de DNA de sementes de soja não destrutivo .....	234

# Estratificação ambiental em ensaios de competição de híbridos de girassol

OLIVEIRA, K.¹; CARVALHO, C. G. P. de²; AMABILE, R. F.³; ANSELMO, J. L.⁴; GODINHO, V. de P. C.⁵; RAMOS, N. P.⁶; ALMEIDA, I. L. de⁷; FAGIOLI, M.⁸; SOUZA, V. A. C.⁹; ZORZO, F.¹⁰

¹Unopar, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, kawoliver23@gmail.com; ²Pesquisador, Embrapa Soja;

³Pesquisador, Embrapa Cerrados; ⁴Pesquisador, Fundação Chapadão; ⁵Pesquisador, Embrapa Rondônia;

⁶Pesquisadora, Embrapa Meio Ambiente; ⁷Analista, Secretaria de Inovações e Negócios; ⁸Professor, UNB;

⁹Pesquisadora, CATI; ¹⁰Pesquisador, Agrícola Wehrmann.

## Introdução

No Brasil, a avaliação e seleção de híbridos de girassol, em regiões de cultivo ou potenciais, vêm sendo feitas por meio da Rede de Ensaios de Avaliação de Genótipos de Girassol, coordenada pela Embrapa e que conta com a participação de empresas públicas e privadas (Dalchiavon et al., 2016). Nesses ensaios é comum a ocorrência de interação genótipos x ambientes (Dalchiavon et al., 2016; Birck et al., 2017; Santos et al., 2020).

A interação genótipos x ambientes ocorre quando há respostas diferenciais dos genótipos em relação à variação do ambiente. Ela pode ser simples ou complexa. A interação simples ocorre quando há variabilidade entre genótipos nos ambientes e a interação complexa ocorre quando há falta de correlação entre os genótipos e, por consequência, ocorre inconsistência da superioridade de genótipos com a variação ambiental (Cruz; Carneiro, 2006). Quando a interação é do tipo complexa, genótipos superiores em um ambiente não necessariamente serão em outro, justificando a sua avaliação ser feita em vários ambientes.

A Rede de Ensaios de Avaliação de Genótipos de Girassol requer tempo e elevada demanda por recursos humanos, físicos e financeiros. Assim, é fundamental identificar se há, entre os ambientes disponíveis, padrões de similaridades de respostas de genótipos, de tal maneira que seja possível avaliar a possibilidade de descartes de ambientes, quando existe problemas técnicos ou escassez de recursos (Cruz; Carneiro, 2006).

O objetivo desse trabalho foi realizar uma estratificação ambiental em ensaios de competição de híbridos de girassol, avaliados em diferentes locais em 2019, de modo a identificar locais (ambientes) com padrões de similari-

dades de respostas de genótipos, ou seja, locais em que não haja interação genótipos x locais ou que ela seja do tipo simples.

## Material e Métodos

Dados de rendimento de grãos obtidos nos ensaios conduzidos pela Rede de Avaliação de Genótipos de Girassol, em 2019, foram avaliados de 14 híbridos em 9 ambientes (8 locais). Os locais de teste foram Planaltina, Recanto da Emas e Vargem Bonita (DF), Espírito Santo do Pinhal e Manduri (SP), Chapadão do Sul (MS), Cristalina (GO) e Vilhena (Ensaio A e Ensaio B, semeados em épocas distintas) e os híbridos foram BRS323, BRSG62, BRSG63, BRSG64, BRSG65, BRSG66, BRSG67, BRSG68, BRSG69, BRSG70, BRSG71, BRSG72, Aguará 06 e Helio 250.

O delineamento experimental foi blocos completos casualizados, com quatro repetições. A parcela experimental consistiu de quatro linhas de 6,0 m de comprimento, espaçadas de 0,7 m. As duas linhas externas e 0,5 m de cada extremidade das linhas centrais de cada parcela foram descartadas na colheita como bordaduras, obtendo-se uma área útil de 7,0 m<sup>2</sup>. Todos os tratos culturais recomendados foram realizados para possibilitar o melhor desenvolvimento das plantas, conforme Castro e Leite (2018).

Análise de variância em esquema fatorial foi realizada para rendimento de grãos, a 1% e 5% de probabilidade. Verificou-se previamente a existência de homogeneidade de variâncias residuais das análises de cada local, quando a razão entre o maior e o menor quadrado médio residual foi inferior a sete (Pimentel-Gomes, 2009).

Para realizar a estratificação ambiental foi utilizado o método de agrupamento de ambientes com base no algoritmo de Lin (1982), que consistiu em estimar a soma de quadrados da interação entre híbridos e pares de locais, obtidas em nível de média de parcelas e agrupar aqueles locais cuja interação foi não significativa a 1%, pelo teste F. Adicionalmente, foi verificada a possibilidade de inclusão a esse grupo de novos locais, cuja interação genótipos x locais foi significativa, mas do tipo simples, conforme Cruz e Castoldi (1991). Para isto, foi feita a decomposição do quadrado médio da interação em partes simples e complexa, sendo a parte complexa (C) expressa em percentagem pela seguinte fórmula:

$$C = \frac{100\sqrt{(1-r)QMH_j QMH_{j'}}}{QMHxL_{jj'}}$$

em que  $r$  é a correlação entre médias de um mesmo híbrido nos locais  $j$  e  $j'$ ,  $QMH_j$  e  $QMH_{j'}$  são os quadrados médios entre híbridos nos locais  $j$  e  $j'$  e  $QMHxL_{jj'}$  é o quadrado médio da interação entre híbridos e os locais  $j$  e  $j'$ . Incluiu-se um novo local no grupo de locais, cuja interação foi não significativa, quando a interação entre híbridos x pares de locais (novo local e cada membro desse grupo) foi predominantemente de natureza simples, mesmo que a interação híbridos x locais tenha sido significativa nesse novo agrupamento.

## Resultados e Discussão

Interação genótipos x locais significativa ( $p < 0,01$ ) foi observada pelo teste F (Tabela 1), indicando que a diferença no comportamento entre genótipos variou em função do local avaliado, o que justifica a realização de uma análise de estratificação ambiental, para detectar possíveis locais que não haja interação ou que ela seja do tipo simples.

A menor soma de quadrados entre genótipos e pares de locais foi estimada para os locais Vilhena (Ensaio A) e Vilhena (ensaio B) (Tabela 2), sendo constatada interação não-significativa pelo teste F ( $p < 0,05$ ). Isto mostra a pouca contribuição da avaliação em Vilhena (RO), em duas épocas de semeadura, para seleção de híbridos de girassol. Não foi possível inserir nenhum outro local neste grupo, que mantivesse a interação não significativa.

**Tabela 1.** Análise de variância para rendimento de grãos de híbridos de girassol avaliados em diferentes locais do Brasil, em 2019.

Fonte de variação	g.l.	Quadrado médio
Blocos/locais	27	55870,46
Genótipos	13	801245,7**
Locais	8	22092783,9**
Genótipos x Locais	104	387869,5**
Resíduo	351	50428,9
C.V.		10,5
Média		2131,9

**Tabela 2.** Estimativas das somas de quadrados, obtidas em nível de média de parcelas, entre híbridos e pares de locais.

Locais <sup>1</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9
1	799.244,1	410.116,3	605.779,5	832.592,9	3.444.971,5	774.358,1	884.447,0	464.524,1
2		777.822,9	397.590,5	489.227,2	2.390.856,2	1.268.433,6	646.641,8	940.004,3
3			666.972,3	1.049.552,8	4.502.215,2	738.565,8	1.422.811,8	1.030.438,4
4				746.564,4	3.338.320,6	828.675,0	1.057.898,7	1.075.907,9
5					2.182.812,7	784.759,7	312.920,1	426.112,3
6						3.869.290,6	1.749.862,3	2.327.760,9
7							1.149.023,0	710.249,2
8								283.409,4

<sup>1</sup> Local: (1) Planaltina (DF), (2) Espírito Santo do Pinhal (SP), (3) Chapadão do Sul (MS), (4) Cristalina (GO), (5) Manduri (SP), (6) Recanto da Emas (DF), (7) Varigem Bonita (DF), (8) Vilhena (Ensaião A), (9) Vilhena (Ensaião B).

Foi verificado ainda a possibilidade de incluir outros locais no grupo (Vilhena – ensaio A e Vilhena – ensaio B), cuja interação fosse significativa, mas do tipo simples. A Tabela 3 mostra a parte complexa da interação genótipos x pares de locais, estimada pela decomposição do seu quadrado médio (Cruz; Castoldi, 1991). Recanto da Emas (DF) foi o único local que apresentou estimativa inferior a 50% da parte complexa da interação com o local Vilhena – Ensaio A. Contudo, todos os locais apresentaram estimativas superior a 50% da parte complexa da interação com o local Vilhena – Ensaio B. Assim, não foi possível incluir outros locais no grupo (Vilhena A e Vilhena B), cuja interação fosse significativa do tipo simples.

**Tabela 3.** Valores percentuais da parte complexa resultantes da decomposição da interação entre híbridos e pares de locais.

Locais	2	3	4	5	6	7	8	9
1	106,2	54,2	87,4	99,6	89,6	61,1	98,6	65,0
2		64,8	86,6	82,7	38,0	73,1	88,2	96,5
3			69,5	93,6	111,4	63,2	108,8	88,7
4				103,8	83,9	57,5	116,5	105,3
5					51,7	59,2	60,0	61,6
6						100,0	40,4	64,2
7							80,4	60,8
8								49,8

<sup>1</sup> Local: (1) Planaltina (DF), (2) Espírito Santo do Pinhal (SP), (3) Chapadão do Sul (MS), (4) Cristalina (GO), (5) Manduri (SP), (6) Recanto da Emas (DF), (7) Vargem Bonita (DF), (8) Vilhena (Ensaio A), (9) Vilhena (Ensaio B).

A estratificação ambiental indicou que os híbridos avaliados em 2019 na Rede de Ensaios de Genótipos de Girassol, coordenada pela Embrapa Soja, mostraram comportamentos diferenciados em todos os locais de teste, com mudança no ranqueamento dos mesmos. Mas, quando avaliados em distintas épocas de semeadura em Vilhena, os híbridos mostraram comportamento similares. Assim, para reduzir os custos da Rede, pode-se conduzir o ensaio em Vilhena em apenas uma época de semeadura.

## Conclusão

Os locais de teste da Rede de Ensaios de Genótipos de Girassol, coordenada pela Embrapa Soja, apresentaram poucos padrões de similaridades de respostas de genótipos, não havendo a necessidade de descartes de locais. A estratificação ambiental indicou, também, haver a necessidade de condução de uma única época de semeadura em Vilhena, Rondônia.

## Referências

- BIRCK, M.; DALCHIAVON, F. C.; STASIAK, D.; IOCCA, A. F. S.; HIOLANDA, R.; CARVALHO, C. G. P. Performance of sunflower cultivars at different seeding periods in central Brazil. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 41, p. 42-51, 2017.
- CASTRO, C.; LEITE, R. M. V. B. de C. Main aspects of sunflower production in Brazil. **Oilseeds & fats Crops and Lipids (OCL)**, v. 25, p. 2-11, 2018.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 585 p.
- CRUZ, C. D.; CASTOLDI, F. Decomposição da interação genótipo x ambientes em partes simples e complexa. **Revista Ceres**, v. 38, p. 422-430, 1991.
- DALCHIAVON, F. C.; CARVALHO, C. G. P. de; AMABILE, R. F.; GODINHO, V. de P. C.; RAMOS, N. P.; ANSELMO, J. L. Características agronômicas e suas correlações em híbridos de girassol adaptados à segunda safra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, p. 1806-1812, 2016.
- LIN, C. S. Grouping genotypes by a cluster method directly related to genotype-environment interaction mean-square. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 62, p. 277-280, 1982.
- PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15th ed. Piracicaba: Fealq, 2009. 451p.
- SANTOS, I. G. dos; CARNEIRO, V. Q.; SANT'ANNA, I. de C.; CRUZ, C. D.; CARVALHO, C. G. P. de; BORBA FILHO, A. B.; ALVES, A. D. Factor analysis and GGE biplot for environmental and genotypic evaluation in sunflower trials. **Functional Plant Breeding Journal**, v. 1, p. 29-40, 2020.

# Componentes de produção do trigo influenciados pela aplicação de calcário e cobre

FONTES, M. B.<sup>1</sup>; MOREIRA, A.<sup>2,3</sup>; MORAES, L.A.C.<sup>2</sup>; PETINELI, R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UNIFIL, Bolsista PIBIC/CNPq, marcelo-fontes@hotmail.com; <sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Soja; <sup>3</sup>Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq; <sup>4</sup>Pós-Graduando, Universidade Estadual de Londrina (UEL)

## Introdução

O cobre (Cu) desempenha importantes funções nas plantas, destacando-se a participação no fluxo de elétrons na fase luminosa da fotossíntese e na fase escura auxiliando a entrada do CO<sub>2</sub> em compostos orgânicos (Malavolta, 2006). No metabolismo vegetal, as plantas apresentam mais de 100 diferentes tipos de proteínas que contém Cu, dentre essas destacam-se a plastocianina, superóxido desmutase, citocromo oxidase, diamina oxidase e polifenol oxidase (Yruela, 2005; Marschner, 2012).

Nas condições tropicais e subtropicais, a acidez do solo é um dos fatores mais limitantes para a obtenção de bons rendimentos em lavouras de trigo (*Triticum aestivum* L.), no entanto, com aplicação contínua de calcário pode diminuir a disponibilidade dos micronutrientes metálicos (Cu, Fe, Mn e Zn). A baixa disponibilidade desses nutrientes prejudica o desenvolvimento das plantas, reduz o sistema radicular e a parte aérea e diminui a absorção de nutrientes e água (Moreira; Fageria, 2010).

Nas áreas de cultivo, com a aplicação de calcário ocorre um acúmulo de cálcio (Ca) e magnésio (Mg), e conseqüente redução da acidez do solo devido a reação dos carbonatos de Ca e Mg gerando OH induzindo deficiência de alguns nutrientes, como o Cu (Moreira et al., 2017; Moreira et al., 2019a). A elevação do pH do solo reduz a solubilidade do Cu e de todos os metais pesados, tornando-o menos disponível às plantas cultivadas (Wu et al., 1999) aliado a isso, a exportação para os grãos o teor do Cu disponível no solo vem diminuindo gradativamente (Moreira; Moraes, 2019), sendo os sintomas de deficiência do nutriente reportado em diferentes culturas e locais (Fageria et al., 2015; Moreira et al., 2019b). Para agravar este problema, também existem os efeitos interiônicos antagonicos, entre os quais, por exemplo, quando há aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> na solução do solo decorrente de doses

elevadas de calcário pode haver diminuição da absorção do íon Cu pelas plantas (Marschner, 2012).

O objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento da cultura do trigo (produção de grãos, produção da matéria seca total e teor de clorofila) em dois tipos de solo (Neossolo Quartzarênico, NQ e Latossolo Vermelho distrófico, LVd) com diferentes níveis de acidez (sem e com calagem) e doses de Cu aplicado no solo.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação localizada no município de Londrina (23°19'08" LS e 51°11'37" LO), Estado do Paraná, Brasil. Os solos utilizados foram um Latossolo Vermelho distrófico (LVd) coletado em área de mata nativa na camada de 0-20 cm no município de Mauá da Serra, Estado do Paraná e um Neossolo Quartzarênico (NQ) coletado em área de pastagem no município de Osvaldo Cruz, Estado de São Paulo com os seguintes atributos químicos e físicos (Embrapa 1997): a) LVd - pH em  $\text{CaCl}_2 = 4,6$ , matéria orgânica do solo (MOS) =  $45,6 \text{ g kg}^{-1}$ , fósforo (P - Mehlich 1) =  $2,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , potássio ( $\text{K}^+$ ) =  $0,4 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) =  $3,0 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) =  $1,5 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , enxofre ( $\text{S-SO}_4^{2-}$ ) =  $15,8 \text{ mg kg}^{-1}$ , alumínio ( $\text{Al}^{3+}$ ) =  $0,2 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , acidez potencial (H+Al) =  $8,1 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , capacidade de troca de cátions (CTC) =  $13,0 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , boro (B) =  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , Cu =  $2,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , ferro (Fe) =  $65,7 \text{ mg kg}^{-1}$ , manganês (Mn) =  $48,7 \text{ mg kg}^{-1}$ , zinco (Zn) =  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , argila  $630 \text{ g kg}^{-1}$  e areia  $210 \text{ g kg}^{-1}$  e b) NQ - pH em  $\text{CaCl}_2 = 4,6$ , MOS =  $9,5 \text{ g kg}^{-1}$ , P =  $1,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $\text{K}^+ = 0,1 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ,  $\text{Ca}^{2+} = 1,1 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+} = 0,3 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ ,  $\text{S-SO}_4^{2-} = 2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $\text{Al}^{3+} = 0,0 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , H+Al =  $2,0 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , CTC =  $3,4 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ , B =  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ , Cu =  $1,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , Fe =  $12,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , Mn =  $25,9 \text{ mg kg}^{-1}$ , zinco (Zn) =  $0,7 \text{ mg kg}^{-1}$ , argila  $59 \text{ g kg}^{-1}$  e areia  $915 \text{ g kg}^{-1}$ .

Os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial: nas parcelas cinco doses de Cu e duas doses de calcário e nas subparcelas os dois tipos de solos (LVd e NQ), com quatro repetições. Os tratamentos consistiram de duas doses de calcário equivalente a 0 e  $5,0 \text{ Mg ha}^{-1}$  (0 e  $7,5 \text{ g por vaso}$ , 28% de CaO e 18% de MgO, p:p)] e cinco doses de Cu (0, 2, 4, 8 e  $16 \text{ mg kg}^{-1}$ ). O experimento foi conduzido em vasos de barro de  $3,0 \text{ dm}^3$  de solo seco ao ar (TFSA) passado em peneira de 2,0 mm.

O calcário foi homogeneizado nos vasos e as adubações com P, K, B, S, Co, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn foram feitas de acordo com Moreira e Fageria (2010) para experimentos conduzidos em condições de casa de vegetação. Os vasos foram irrigados diariamente para compensar as perdas por evapotranspiração e para manter o solo próximo de 70% do valor total de poros (Cassel; Nielsen, 1986). A cultivar de trigo utilizada foi a BRS Sabiá e foram semeadas dez sementes, e após o desbaste deixadas três plantas uniformes por vaso.

Durante todo ciclo vegetativo foram coletadas as folhas senescentes para obtenção da produção de matéria seca total da parte aérea da planta (MSPA). No final do ciclo também foram quantificadas a produção de grãos (PG).

Os resultados dos componentes de produção e fisiológicos, atributos químicos do solo e estado nutricional das plantas foram submetidos aos testes de normalidade, e posteriormente realizadas análises de variância (ANOVA), teste F, regressão polinomial, coeficientes de determinação  $R^2$  ( $p \leq 0,05$ ) e comparação de contraste entre médias pelo teste de Tukey a 5% de significância.

## Resultados e Discussão

A produção de grãos (PG), teor de clorofila e produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) não apresentaram interação significativa para aplicação de calcário e doses de Cu, independentemente do tipo de solo, indicando respostas distintas para cada nível de calcário e Cu aplicado (Tabela 1). A PG variou de 6,9 a 9,6 g por vaso no LVd, com a produção máxima estimada (PME) obtida com a dose 9,5 mg kg<sup>-1</sup> de Cu ( $\hat{y} = 16,217 + 1,462x - 0,077x^2$ ,  $R^2 = 0,62$ ,  $p \leq 0,05$ ) e de 8,0 a 9,3 g por vaso com PME na dose 14,7 mg kg<sup>-1</sup> de Cu ( $\hat{y} = 2,038 + 0,666x - 0,023x^2$ ,  $R^2 = 0,69$ ,  $p \leq 0,05$ ) no NQ no solo sem aplicação de calcário, enquanto nos tratamentos com calcário variou de 5,6 a 10,1 g por vaso no LVd com PME na dose 9,1 mg kg<sup>-1</sup> de Cu ( $\hat{y} = 19,842 + 1,526x - 0,084x^2$ ,  $R^2 = 0,56$ ,  $p \leq 0,05$ ) e de 8,5 a 9,9 g por vaso no NQ e PME na dose 10,3 mg kg<sup>-1</sup> de Cu ( $\hat{y} = 14,637 + 2,026x - 0,098x^2$ ,  $R^2 = 0,71$ ,  $p \leq 0,05$ ) (Tabela 1). No caso da MSPA e teor de clorofila, essas variações foram de 10,0 a 14,5 g por vaso e 341,0 a 380,0 mg m<sup>-2</sup> no solo sem calcário e 8,5 a 15,2 g por vaso e 318,1 a 371,7 mg m<sup>-2</sup>, respectivamente. Na média dos solos, a ausência de calcário resultou em produções inferiores ao tratamento com calcário, tendo efeito significativo somente no NQ (Tabela1),

além disso, apresentaram correlação positiva e significativa da MSPA com a PG nos dois solos estudados e corroboram os resultados de Fageria (2001) e Moreira et al. (2017), ao reportarem respostas distintas da PG no cultivo da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) em solos com diferentes níveis de acidez, sendo o mesmo observado por Moreira et al. (2019b) com o Cu no cultivo da soja e trigo em sucessão.

**Tabela 1.** Teor de clorofila, material seca da parte aérea (MSPA), produção de grãos (PG) em dois solos sem (A) e com (B) aplicação de calcário e doses de cobre e produção relativa do trigo em função da aplicação de calcário ( $\Delta$ ).

	Cu mg kg <sup>-1</sup>	Clorofila		MSPA		PG		$\Delta$
		g cm <sup>2</sup>		(g por vaso)		(g por vaso)		(%)
		A	B	A	B	A	B	
Latossolo (LVd)	0	341,2	325,3	10,4	8,5	6,9	5,6	123,2
	2	358,0	339,3	11,1	11,7	7,4	7,8	94,9
	4	380,0	432,4	11,9	13,2	7,9	8,8	89,8
	8	353,8	362,2	14,5	15,2	9,6	10,1	95,0
	16	388,3	371,7	11,9	12,9	7,9	8,6	91,7
	Média	364,2a	366,2a	11,9a	12,3a	8,0a	8,2a	97,6
Neossolo (NQ)	0	260,3	356,5	12,0	13,5	8,0	8,5	94,1
	2	373,3	371,5	13,3	14,0	8,9	9,3	95,7
	4	329,9	358,9	13,9	14,4	9,3	9,6	96,9
	8	303,2	318,1	12,9	14,9	8,6	9,9	86,9
	16	287,3	318,2	11,9	12,7	7,9	9,0	87,8
	Média	310,8b	344,6a	12,8b	13,9a	8,5b	9,3a	91,4
Teste F								
Solo		*		*		*		
Calcário (a)		*		*		*		
Cobre (b)		*		*		*		
a × b		ns		ns		ns		
CV%		12,14		9,32		11,64		

\*, NS Significativo a 5% probabilidade e não significativo, respectivamente. Médias seguidas por letras distintas dentro da mesma linha e variável diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. CV – Coeficiente de variação.

## Conclusão

Mesmo com adubação semelhante e manutenção da umidade próxima a capacidade de campo, o plantio do trigo em solo argiloso (Latossolo Vermelho distrófico, LVd) foi superior ao cultivo em Neossolo Quartzarênico (NQ). A aplicação de calcário aumentou a produção de grãos (PG), matéria seca da parte aérea (MSPA) e o teor de clorofila em NQ, com incremento médio na PG de 7,8% e também respondeu positivamente as doses de Cu com a maior PG obtida na aplicação estimada (DME) de 9,5 e 9,1 no LVd e de 14,7 e 10,3 mg kg<sup>-1</sup> no NQ sem e com aplicação de calcário.

## Referências

- CASSEL, D. K.; NIELSEN, D. R. Field capacity and available water capacity. In: KLUTE, A. (Ed.) **Methods of soil analysis: physical and mineralogical methods**. Madison: American Society of Agronomy, 1986. p. 901-926.
- FAGERIA, N. K. Efeito da calagem na produção de arroz, feijão, milho e soja em solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1419-1424, 2001.
- FAGERIA, N. K.; STONE, L. F.; MELO, L. C. Copper-use efficiency in dry bean genotypes. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, p. 979-990, 2015.
- MALAVOLTA, E. **Manual of mineral nutrition of plants**. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631 p.
- MARSCHNER, P. **Mineral nutrition for higher plants**. London: Academic Press, 2012. 649 p.
- MOREIRA, A.; FAGERIA, N. K. Liming influence on soil chemical properties, nutritional status and yield of alfalfa grown in acid soil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1231-1239, 2010.
- MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C. Soybean response to copper applied to two soils with different level of organic matter and clay. **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, p. 2247-2258, 2019.
- MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C.; LARA, I. C. V.; NOGUEIRA, T. A. R. Differential response of soybean genotypes to lime rates. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 63, p. 1281-1291, 2017.
- MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C.; NOGUEIRA, T. A. R.; CANIZELLA, B. T. Copper use efficiency in soybean cultivars. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, e01140, 2019a.
- MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C.; SCHROTH, G. Copper fertilization in soybean-wheat intercropping under no-till management. **Soil & Tillage Research**, v. 193, p.133-141, 2019b.
- WU, J.; LAIRD, D. A.; THOMPSON, M. L. Sorption and desorption of copper on soil clay components. **Journal of Environmental Quality**, v. 28, p. 334-338, 1999.
- YRUELA, E. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 145-156, 2005.

# Análise da variação da precipitação pluviométrica na safra 2019/2020 no município de Londrina, PR

ALVES FILHO, L. F.<sup>1</sup>; SIBALDELLI, R. N. R.<sup>2</sup>; GONÇALVES, S. L.<sup>3</sup>; FARIAS, J. R. B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UniFil, Graduando em Agronomia, Bolsista CNPq/PIBIC, Londrina, PR, <sup>2</sup>Matemático, Especialista em Estatística, Londrina, PR, <sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, PR.

## Introdução

O estado do Paraná é conhecido por ser um grande produtor de grãos nas safras agrícolas de verão e inverno, com grande participação de pequenos produtores sendo a maioria praticantes da agricultura familiar. Na safra agrícola 2019/2020, o Paraná foi responsável pela produção de 20,7 milhões de toneladas de soja, produzidos em 5,5 milhões de hectares, com uma produtividade média de 3.774 kg/ha. Com relação à safra anterior (2018/2019), o estado teve um aumento significativo na produção do grão em 27,8% em consequência do maior volume e melhor distribuição de chuvas no estado, tornando-se um dos estados com uma das maiores produtividade e produção do grão na safra 2019/2020 (Conab, 2020).

O Paraná tem um regime histórico de chuvas que variam entre 1.000 a 2.600 mm ao ano, com temperaturas anuais médias de 13°C a 24°C, tornando o estado propício a produção de soja durante a safra de verão (Nitsche et al., 2019).

A soja, principal cultura das lavouras de verão, tem seu melhor desenvolvimento com um regime hídrico de no mínimo 550 mm durante o ciclo da cultura, tendo dois momentos críticos quanto à falta de água: da sementeira a germinação e o enchimento de grão. A falta de água durante a germinação pode ocasionar falhas no estabelecimento da lavoura, comprometendo o número final de plantas por metro linear. Já no período de floração e enchimento de grãos, momento em que a cultura pode necessitar de 7 a 8 mm de água por dia, a falta de água pode ocasionar grandes perdas de produtividade de grãos.

Diversos fatores podem afetar o regime pluviométrico de uma região, muitas vezes dentro de um mesmo município. Face ao exposto, este trabalho teve como objetivo analisar e identificar períodos de déficits e excedentes hídricos, comparando duas localidades situadas em diferentes regiões, dentro do município de Londrina, PR.

## **Material e Métodos**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Agrometeorologia da Embrapa Soja, no município de Londrina, PR. Os dados utilizados para a realização deste trabalho são referentes ao período de outubro de 2019 a março de 2020, período no qual corresponde à safra de soja. Os dados foram coletados na estação meteorológica instalada na fazenda experimental da Embrapa Soja, localizada a 23°11' S, 51°11' W e 630 m de altitude (Sibaldelli et al., 2020) e na estação meteorológica do IAPAR, localizada a 23°22' S, 51°00' W e 585 m de altitude (IAPAR, 2020), ambas localidades dentro do município de Londrina.

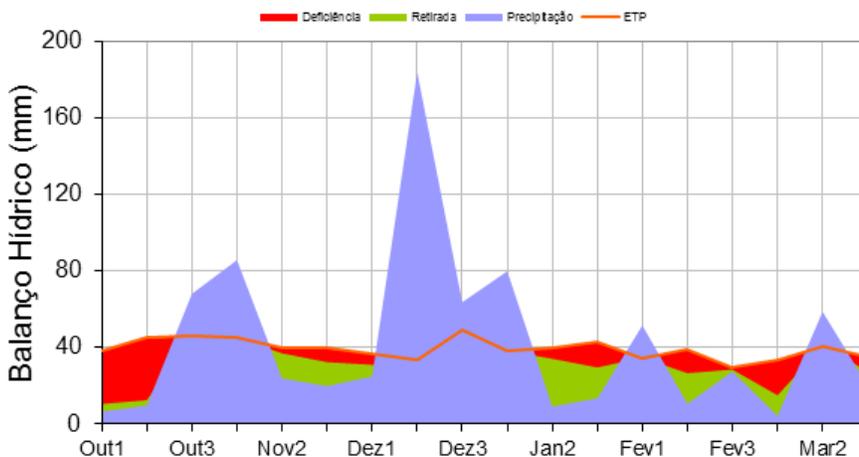
O balanço hídrico climatológico sequencial foi calculado através de planilhas eletrônicas, utilizando-se o método de Thornthwaite e Mather (1955). O valor considerado para a capacidade de água disponível (CAD) foi de 75 mm.

## **Resultados e Discussão**

Durante a safra de 2019/2020 o balanço hídrico climatológico da estação meteorológica do IAPAR (Figura 1) teve bom volume pluviométrico entre meados de outubro a meados de novembro e em todo mês de dezembro, porém apresentou alguns momentos com deficiência hídrica no início de outubro e entre os meses de janeiro e fevereiro, com grandes retiradas hídricas em tais períodos. Já na estação meteorológica localizada na Embrapa Soja (Figura 2), a precipitação se mostrou mais uniforme durante a safra de 2019/2020, tendo chuvas bem distribuídas, com o maior volume precipitado no mês de dezembro, apresentando deficiência hídrica mais significativa no início da safra (primeiros decêndios de outubro e de novembro) e depois somente bem no final (no último decêndio de março).

A estação meteorológica do IAPAR fica localizada a 18,5 km de distância da estação meteorológica da Embrapa Soja, onde pode-se inferir a interferência do relevo e de outros fatores, na variação do volume de precipitação pluviométrica em diferentes locais de uma mesma cidade. Comparando-se os momentos de deficiência apresentados no IAPAR (Figura 1) e na Embrapa Soja (Figura 2), pode-se notar que a deficiência hídrica ocorreu, ao longo de todo o período, com maior frequência no IAPAR, sendo presente em quase todo o período da safra.

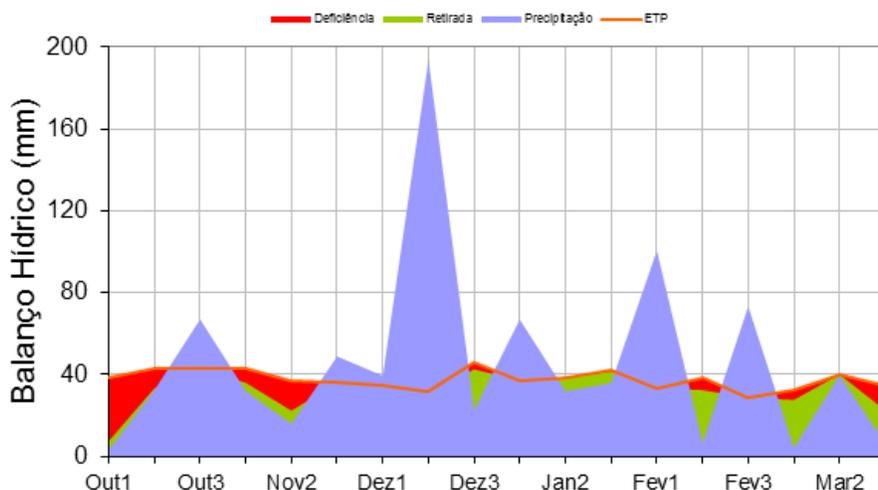
Pode-se observar na Figura 2, que foi pouco frequente a ocorrência de deficiências hídricas na estação meteorológica da Embrapa Soja, onde teve-se precipitações de forma mais distribuídas durante o período analisado, pro-



porcionando uma safra com menores deficiências hídricas, ocasionados por maiores entradas do que saídas no sistema hídrico.

**Figura 1.** Balanço hídrico decenal de outubro/2019 a março/2020. IAPAR. Londrina, PR.

Sabendo-se que ocorrem variações sobre o volume precipitado em duas localidades distintas, mas próximas, dentro de um mesmo município. Por meio dos dados obtidos neste estudo (Figuras 1 e 2), as diferenças observadas entre as estações próximas deixam claro que o Brasil necessita de mais estações meteorológicas, mais bem distribuídas e em pleno funcionamento em todo seu território. Hoje em dia, estações meteorológicas compactas estão disponíveis para a instalação em propriedades agrícolas, a um custo rela-



tivamente acessível, o que muito pode contribuir para o monitoramento das chuvas e auxiliar ao produtor na tomada de decisões estratégicas.

**Figura 2.** Balanço hídrico decendial de outubro/2019 a março/2020. Embrapa Soja – Londrina, PR.

## Conclusão

Na safra de 2019/2020 o balanço hídrico climatológico da estação meteorológica do IAPAR teve bom volume pluviométrico durante o ciclo da cultura da soja, porém, apresentou alguns momentos com deficiência hídrica, enquanto que, na estação meteorológica da Embrapa Soja, a precipitação se mostrou mais uniforme no mesmo período.

Essas diferenças observadas entre estações meteorológicas próximas mostram que é urgente a necessidade de maior cobertura por equipamentos instalados e cobrindo a diversidade do território nacional.

## Referências

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos: safra 2019/20: oitavo levantamento, v. 7, n. 8, maio 2020. Brasília, DF, 2020. 66 p. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31816\\_8205b9f47c0cc1c35be2d0a2cc5c7322](https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31816_8205b9f47c0cc1c35be2d0a2cc5c7322). Acesso em: 3 jun. 2020

IAPAR - Instituto Agronômico do Paraná. **Dados diários de Londrina:** Maio de 2020. Disponível em: <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2612>. Acesso em: 3 jun. 2020.

NITSCHKE, P. R.; CARAMORI, P. H.; RICCE, W. da S.; PINTO, L. F. D. **Atlas climático do Estado do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2019. 210 p. Disponível em: [http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/AtlasClimaticoPR.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/AtlasClimaticoPR.pdf). Acesso em: 3 jun. 2020.

SIBALDELLI, R. N. R.; GONÇALVES, S. L.; FARIAS, J. R. B. **Boletim agrometeorológico da Embrapa Soja, Londrina, PR - 2019**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. 28 p. (Embrapa Soja. Documentos, 427).

THORNTHWAITE, C. W.; MATHER, J. R. **The water balance**. Centerton: Drexel Institute of Technology, 1955. 104 p. Publications in Climatology.

# Uso de variável *Dummy* para medir influência de variáveis socioeconômicas e a importação chinesa de grãos de soja

SAITO, E. M. L.; OLIVEIRA, M. C. N. de

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, bolsista da FAPED; Pesquisadora, Embrapa Soja.

## Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das culturas que melhor se adapta ao sistema plantio direto, sendo a principal para compor os sistemas de rotação lavoura-pastagem, não só por aspectos econômicos, mas, também, por ser eficiente fixadora de nitrogênio atmosférico (Kluthcouski et al., 2003). Nas últimas décadas sua cadeia produtiva tem apresentado um crescimento contínuo devido a aspectos como tecnologia e mercado. Em 2020, pode chegar a 36,437 milhões de hectares, alcançando um valor próximo de 122,13 milhões de toneladas, com exportação estimada em 72 milhões de toneladas e produtividade média, nos últimos três anos, de 3.352kg/ha (Conab, 2020). É a cultura mais importante da economia mundial e a principal no agronegócio brasileiro, que permite ao país ter a capacidade de influenciar o mercado mundial de commodities agrícolas e pretensões geopolíticas e geoeconômicas.

A produção de soja apresenta, ao mercado internacional nítidos crescimentos atribuídos a fatores diversos. Seus derivados, como grão, farelo e óleo são exemplos de segmentos concentrados em que Argentina, Brasil e Estados Unidos apresentam poder de mercado, ou seja, são capazes de aumentar lucrativamente o preço de seu produto por meio da redução da quantidade produzida (Landes; Posner, 1981). A China vem ocupando um papel fundamental nas relações comerciais com o Brasil. Segundo a Organização Mundial do Comércio (OMC), o comércio brasileiro com o Mundo dobrou entre 1995 e 2005 e com a China aumentou cinco vezes no mesmo período, refletindo um forte crescimento comercial entre os dois países, tanto das exportações quanto das importações (Costa, 2015). Estimativas da safra mundial de soja em grãos para 2019/2020, divulgadas pela USDA, em seu quadro de oferta e demanda mundial referente ao mês de julho de 2019, mostram que o Brasil (35,44%), EUA (30,15%) e Argentina (15,27%) juntos seriam responsáveis por 80,87% de toda a produção mundial de soja em grão, enquanto a China

responderia por 57,68% de todas as importações mundiais (Estados Unidos, 2019).

Em teoria, qualquer país que desenvolva atividades agrícolas, não só o desenvolvimento tecnológico, como também as variáveis macroeconômicas são capazes de influenciar na produção agrícola. Constantemente atualizam-se dados macroeconômicos dos países, a quantidade produzida em cada safra e o estudo imersivo ao cenário externo de uma empresa. Entretanto, não se encontram muitas publicações sobre a relação entre a produção agrícola brasileira, como da soja, e o conjunto de variáveis de ordem econômica, monetária e principalmente a demanda de outros países com o produto. Ao considerar essas inferências iniciais, Kich et al. (2012) verificaram as influências das variáveis macroeconômicas no saldo da balança comercial do agronegócio brasileiro, no período de 1997 a 2009, e notaram, que as variáveis renda e taxa de câmbio foram as mais significativas no saldo da balança. Em análise de regressão, as variáveis podem ser influenciadas não apenas pelas variáveis proporcionais, mas também pelas que são de natureza essencialmente qualitativas (Gujarati; Porter, 2011). Uma variável *Dummy* (binária) em geral indica a presença ou ausência de uma “qualidade” ou atributo, podendo “qualificar” tais atributos formulando variáveis artificiais que assumem valores de 1 (presença do atributo) ou 0 (ausência do atributo), portanto são essencialmente um dispositivo para classificar dados em categorias mutuamente exclusivas (Gujarati; Porter, 2011). Sua inserção é uma estratégia útil no ajuste de fenômenos que sofrem uma ruptura de padrão, o que no presente trabalho representou a estiagem ocorrida no período da safra em 2012, decorrente do fenômeno *La Niña*. Naquele ano, o aumento da área plantada de soja, principalmente no estado de Rio Grande do Sul. Segundo a Farsul (2012), houve uma queda de 34% na produção de grãos no estado de Rio Grande do Sul. Portanto, houve o acréscimo no modelo proposto da variável indicando por meio de uso binário, o valor um para a ocorrência do evento no ano de 2012 e zero para os outros períodos. Segundo Matos (2000), em geral na teoria econômica, há pouca informação sobre a forma funcional mais adequada a ser utilizada na especificação de um modelo econométrico. Ocorre que, cada pesquisador escolhe o método que julgar conveniente.

Este estudo foi elaborado com o objetivo de verificar a influência das variáveis propostas de ordem econômica, monetária, da importação de grãos de

soja do país asiático China e o uso da variável *Dummy* nas variações da produção dos grãos de soja do Brasil, no período de 1996 a 2017.

## Material e Métodos

Na Tabela 1 são caracterizadas as variáveis propostas utilizando dados anuais no período de 1996 a 2017 de valores acumulados no ano para a estimação.

**Tabela 1.** Caracterização de variáveis independentes (SELIC, TDC, TDE, IGPM, IMPCH, PTD) e a dependente (PRODS).

Taxa básica de juros (SELIC)	Taxa média ajustada (TMA) dos financiamentos diários acumulado no ano apurados no Sistema Especial de Liquidação e de Custódia (SELIC) lastreadas em títulos federais (Banco Central do Brasil, 2020).
Taxa de câmbio (TDC)	Preço da moeda estrangeira medido na moeda nacional (R\$/US\$) (Banco Central do Brasil, 2020).
Taxa de desemprego (TDE)	% pessoas na força de trabalho que estão desocupadas (IBGE, 2020).
Índice Geral de Preços do Mercado (IGPM)	Medido pela Fundação Getúlio Vargas (FGV), indicador que registra a inflação de preços (Banco Central do Brasil, 2020).
Importação de grãos de soja da China (IMPCH)	Volume total de importação de grãos de soja da China medida em milhares de toneladas (Estados Unidos, 2019).
Produtividade (PTD)	Relação entre a produção do volume total de grãos de soja e o fator de produção área medida em hectares (Produção..., 2005).
Produção de Soja (PRODS)	Volume total da produção de grãos de soja no país em milhares de toneladas (Estados Unidos, 2020).

O modelo proposto foi o modelo geral de regressão linear múltipla com base na análise do comportamento gráfico da variável dependente. Foram também avaliados os pressupostos de normalidade dos resíduos e uniformidade das variâncias (Shapiro; Wilk, 1965; Breusch; Pagan, 1979). As estatísticas utilizadas para avaliar a presença desses pontos foram: distância de Cook (DC), DFBetas (DFB), DFFits (DFF). Importante ressaltar que os erros foram minimizados com a inserção da variável categórica *Dummy* para indicar a ocorrência do evento de estiagem. As estatísticas e fórmulas matemáticas associadas são apresentadas com detalhes em livros que tratam de análise de regressão aplicada em estatística e análise econométrica (Draper; Smith, 1998; Gujarati; Porter, 2011).

Para verificar a existência de multicolinearidade, na presente pesquisa foi utilizado o fator inflacionário de variância (Montgomery et al., 2006).

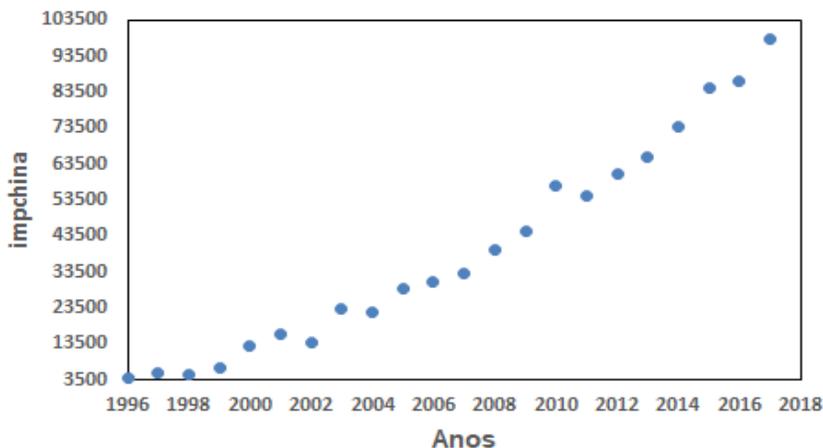
$$VIF_j = \frac{1}{1 - R_j^2} \quad j = 1, 2, \dots, p$$

Quando este indicador apresenta o valor acima de cinco, é possível a existência de multicolinearidade (Marôco, 2014).

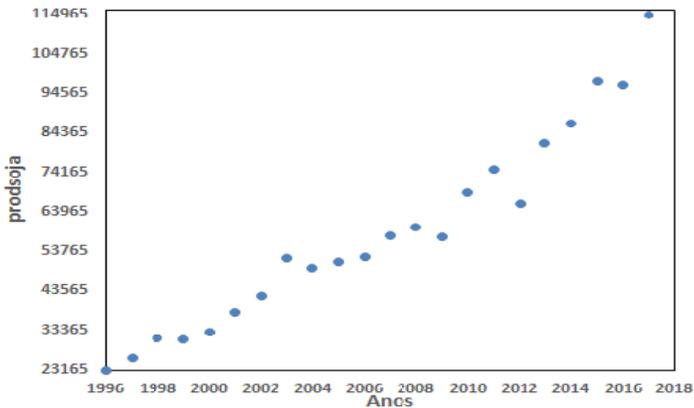
Nesta pesquisa, optou-se por coletar dados anuais entre 1996 e 2017, levando-se em consideração a disponibilidade dos dados com fechamento ou periodicidade anual. Todas as estatísticas foram analisadas usando a linguagem e ambiente computacional de análises estatísticas R (R Core Team, 2019).

## Resultados e Discussão

Os diagramas de dispersão nas Figuras 1 e 2 mostram as evoluções temporais do volume total de grãos de soja no Brasil e do volume de importações de soja pela China, no período de 1996 a 2017. A quantidade total de grãos de soja importada pela China apresentou crescimento constante até 1999 (Figura 1), seguido de um período de instabilidade entre 2000 e 2002. A partir desse período, a produção de grãos de soja no Brasil apresentou um crescimento constante com a possibilidade de haver *outliers* nos anos de 2003, 2009, 2012 e 2015 (Figura 2).



**Figura 1.** Quantidade total de grãos de soja importada pela China, em milhares de toneladas.



**Figura 2.** Produção total de grãos de soja no Brasil, em milhares de toneladas.

Entre 1996-2001, houve a implantação do Plano Real e a exportação da cultura da soja foi impulsionada pela Lei Kandir, de 1996, que tornou isenta a cobrança do ICMS sobre os produtos primários exportados, medida que barateou o produto e estimulou os mercados estrangeiros, acarretando um incremento tecnológico em decorrência da liberalização do mercado nacional e dobrando sua produção de grãos. Mesmo com a abertura do mercado chinês para grãos, que aumentou em 400% as exportações de soja brasileira entre 1996-2003 (Carvalho et al., 2015), a China passou por instabilidades ocasionadas por externalidades como a crise financeira na Ásia e a recessão no mercado agrícola da Rússia no fim da década de 1990 que refletiu por anos seguintes. Durante o mandato do ex-presidente Bill Clinton (1993-2001) nos Estados Unidos, foram celebrados acordos comerciais entre a China e Estados Unidos, os quais incentivaram a transferência de grande parte das fábricas americanas para o país asiático. Em seguida, ocorreu a inserção da China na Organização Mundial do Comércio (OMC) em 2001. Outro fato importante no período 1996-2001, é que o comércio Brasileiro com o mundo, dobrou, enquanto as relações comerciais entre Brasil e China quintuplicaram entre 1995-2005, segundo a OMC. Em bens comercializados, entre 2001-2010, as exportações brasileiras para o país asiático representaram mais de 70% em commodities agrícolas e minerais (Costa, 2015).

Dentre os demais indicadores econômicos, o IGPM obteve a maior taxa em 2002 (25,3%), com deflação em 2009 (1,71%) e 2017 (0,53%). A menor taxa média anual da SELIC foi de 6,90% em 2017 e a maior foi de 40,84%, em

1997. Já a TDE obteve seu menor valor em 2014 (6,66%) e o maior 2017 (12,82%). Para a variável produtividade (PTD), foi medida como fator de produção apenas sua área, no qual foi calculada a razão do volume total de produção de grãos de soja e a área colhida. Em 2004, houve uma queda na produtividade inerente ao declive na produção de volume de grãos, visto que, no período a produção nacional de soja teve uma baixa de 4,56% em relação a 2003 por consequência de condições climáticas desfavoráveis no final do ano e ainda sim sendo o segundo maior produtor de soja (IBGE, 2005). Segundo a Nepomuceno et al. (2007), somente na safra 2004/2005 as perdas de rendimentos de grãos nos estados do Rio Grande do Sul e do Paraná atingiram mais de 78% e 23% respectivamente, quando comparadas à safra 2002/2003.

Por último, foi também verificada a relação entre a produção de grãos de soja no Brasil e o valor de venda do dólar americano pelo Banco Central do Brasil, uma vez que essa é a principal moeda estrangeira usada em transações financeiras no Brasil. Em 2016 sua taxa média atingiu R\$ 3,46 por US\$ 1,00. Em 1999 o câmbio passou a ser flutuante no país, em 1996 foi o mais baixo dos períodos em estudo com R\$ 1,00 por US\$ 1,00 (Banco Central do Brasil, 2020).

As correlações lineares de Pearson positivas, entre as variáveis macroeconômicas e o volume total de soja produzida, foram: IMPCH 98,4%, PTD 85,1%, TDC 62,5% e TDE 13,4%. Os valores negativos foram a taxa SELIC -69,0% e IGPM -35,1%. Entre as variáveis exógenas foram significativas as correlações entre: PTD e taxa SELIC (-63,2%), IMPCH e TDC (82,1%), PTD e TDC (45,0), TDC e IMPCH (55,1%) e TDC e TDE (53,2%).

Diante da variável *Dummy*, foi proposta sua inclusão pela ocorrência do fenômeno *La Niña* e que pela análise de resíduos ao modelo ausente da variável binária, apresentaram por meio do DC, valores acima do valor crítico 0,182 o ano de 2001 (0,210) e 2012 (0,222) (Bollen; Jackman, 1985). Da mesma forma, os mesmos anos apresentaram valores de DFBETAS e DFFITS acima do crítico, com DFF 0,996 e 1,039, respectivamente, acima de 0,852 (Bollen; Jackman, 1985). Foi selecionado o modelo (Tabelas 2 e 3), dentre nove modelos, que obteve o menor valor do Critério de Informação Akaike (AIC). Além de AIC, foram avaliados os resultados dos testes de normalidade, a autocorrelação e uniformidade de variâncias e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ).

O modelo final obteve  $R^2$  ajustado igual a 98,5%. Foram selecionadas para manter no modelo, com base nos critérios mencionados, as variáveis TDC, PTD, IMPCH e a variável *Dummy*.

Para as variáveis TDC e IMPCH, o aumento de uma unidade na taxa de câmbio e milhares de toneladas de soja importadas pela China, ocorre um acréscimo de  $3,691e+3$  e  $7,325e-1$  de milhares de toneladas produzidas de grãos de soja no país respectivamente. Para a variável explanatória PTD, com p-valor de 0,053, o aumento de uma unidade irá acrescentar em  $8,105e+3$  de milhares de toneladas na produção de soja. Embora a produtividade esteja com esta contribuição, ela é resultante de outros fatores, como por exemplo, capital e mão-de-obra. O que sugere propor um aprofundamento e inserção dos demais fatores de produção na variável PTD. Todavia, como esperado, a variável *Dummy* explicou um efeito negativo significativo ( $p=0,042$ ) de  $-7,585e+3$  milhares de toneladas.

**Tabela 2.** Testes estatísticos dos modelos.

Modelos	W	Pr(W)	DW	Pr (DW)	BP	Pr (BP)
Modelo inicial	0,924	0,091	1,659	0,037	6,158	0,5214
Modelo final	0,935	0,157	1,453	0,029	1,358	0,851

**Tabela 3.** Modelos de regressão selecionados.

	Modelos	$R^2$	$R^2_{aj}$	AIC
1	$\hat{Y}_1 = -1,66e + 8 + 21,8 * SELIC + 4710 * TDC + 9610 * PTD + 0,697 * IMPCH - 0,0228 * TDE - 0,0153 * IGPM - 6700 * Dummy$	0,988	0,982	427,173
2	$\hat{Y}_2 = -10600 + 86,6 * SELIC + 5410 * TDC + 12500 * PTD + 0,661 * IMPCH - 197 * TDE - 219 * IGPM$	0,986	0,980	429,297
3	$\hat{Y}_3 = 887 + -6,72 * SELIC + 3750 * TDC + 8060 * PTD + 0,731 * IMPCH - 45,7 * TDE - 7680 * Dummy$	0,987	0,983	426,656
4	$\hat{Y}_4 = -797 + 4640 * TDC + 9410 * PTD + 0,696 * IMPCH - 14800 * TDE - 219 * IGPM - 6870 * Dummy$	0,989	0,984	425,213
5	$\hat{Y}_5 = -2360 + 12,5 * SELIC + 42,8 * TDC + 9370 * PTD + 0,703 * IMPCH - 136 * IGPM - 6660 * Dummy$	0,988	0,983	425,386
6	$\hat{Y}_6 = -670 - 8,08 * SELIC + (3680 * TDC + 8050 * PTD + 0,732 * IMPCH - 7,64 * Dummy$	0,987	0,984	424,664
7	$\hat{Y}_7 = -1820 + 4260 * TDC + 9270 * PTD + 0,703 * IMPCH - 134 * IGPM - 676 * Dummy$	0,988	0,984	423,399
8	$\hat{Y}_8 = 638,25 + 3764,83 * TDC + 8109,12 * PTD - 0,732 * IMPCH - 49,57 * TDE - 7631,92 * Dummy$	0,987	0,984	425,213
9	$\hat{Y}_9 = 342 + 3690 * TDC + 8100 * PTD + 0,732 * IMPCH - 7580 * Dummy$	0,987	0,985	422,670

(PRODS) Produção de volume total de grãos de soja, (IMPCH) volume total de importação de grãos de soja pela China, (TDC) taxa de câmbio, (SELIC) taxa básica de juros SELIC, (TDE) taxa de desemprego, (PTD), produtividade calculada pela razão do volume total da produção de soja e área colhida de soja em hectares, (IGPM) Índice Geral de Preços do Mercado; (AIC) Critério de Informação Akaike; ( $R^2$  e  $R^2_{aj}$  ajustado) coeficientes de determinação. A variável TDC foi significativo em todos os modelos, a variável PTD foi significativo somente nos modelos 1, 4, 5 e 7, a variável IMPCH foi significativo em todos os modelos e variável *Dummy* foi significativo somente nos modelos 8 e 9.

Os resultados da pesquisa corroboram Rosolen et al. (2013) e Oliveira et al. (2018) que verificaram a ocorrência de relação causal entre o preço da soja e a taxa de câmbio, afetando conseqüentemente o volume da produção de soja no Brasil. Porém, em Oliveira et al. (2018) foi mantida a taxa SELIC em seu modelo.

Pelo fator inflacionário de variância (VIF), após selecionar o melhor modelo que explica o volume total de produção de grãos de soja no Brasil (PRODS), a Equação 1 avalia o quanto a variância de um coeficiente de regressão estimado aumenta, se suas variáveis preditoras estiverem correlacionadas. As variáveis que foram analisadas foram TDC (1,503), PTD (3,336), IMPCH (4,064) e *Dummy* (1,249). Como todas as variáveis explanatórias apresentaram valores menores que cinco, foi verificado que não se apresenta multicolinearidade (Tabela 4).

**Tabela 4.** Fator Inflacionário de variância (VIF).

Taxa de câmbio (TDC)	Produtividade (PTD)	Importação de grãos de soja pela China (IMPCH)	Dummy
1,503	3,336	4,064	1,249

O melhor modelo para explicar o aumento no volume de produção de grãos de soja no Brasil no período de 1996 a 2017 foi obtido com as variáveis TDC, PTD, IMPCH e a variável binária *Dummy*. Pela análise de resíduos, o ano de 2001 e 2012 foram consideradas *outliers*. Visto que em 2012 ocorreu o fenômeno *La Niña*, acréscimo da variável categórica *Dummy* trouxe melhores resultados ao modelo e apresentando um efeito negativo na variável dependente PRODS.

## Conclusão

Com os resultados da pesquisa, concluiu-se também que para a produção de grãos de soja, é importante a relação comercial externa, principalmente com a China e sua demanda pelo produto. Como proposta para novas pesquisas, o aprofundamento e possível acréscimo de mais fatores de produção na variável PTD do modelo, como por exemplo, capital e mão-de-obra, assim como a análise política e climática são fundamentais no setor agrícola.

## Referências

BANCO CENTRAL DO BRASIL. **Cotações e boletins**. 2020. Disponível em: <https://www4.bcb.gov.br/pec/taxas/port/ptaxnpeq.asp?frame=1>. Acesso em: 5 mar. 2020.

BOLLEN, K. A.; JACKMAN, R. W. Regression diagnostics: an expository treatment of outliers and influential cases. **Sociological Methods & Research**, v. 13, n. 4, p. 510-542, 1985.

BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. **Econometrica**, v. 47, p. 1287-1294, 1979.

CARVALHO, A. X. Y. de; LAURETO, C. R.; PENA, M. G. **Crescimento da produtividade agrícola nas microrregiões brasileiras**. Rio de Janeiro: IPEA, 2015. (IPEA. Texto para discussão, 2099). Disponível em: [https://ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td\\_%202099.pdf](https://ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/TDs/td_%202099.pdf). Acesso em: 26 abr. 2020.

CONAB. **Perspectivas para a agropecuária**: volume 7: safra 2019/2020. Brasília, DF, 2019. 102 p. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria/item/download/28825\\_2ed3fc3b5b25a350206d276620cf1c85](https://www.conab.gov.br/perspectivas-para-a-agropecuaria/item/download/28825_2ed3fc3b5b25a350206d276620cf1c85). Acesso em: 30 jun. 2020.

COSTA, G. O. M. **A evolução do comércio entre Brasil e China: uma análise das relações comerciais bilaterais sino-brasileiras**. 2015. 32 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Econômicas) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências e Letras, Araraquara.

DRAPER, N. R.; SMITH, H. **Applied regression analysis**. New York: John Wiley & Sons, 1998. 716 p.

ESTADOS UNIDOS. United States Department of Agriculture. Foreign Agricultural Services. **Oilseeds: world market and trade**. USDA-FAS, dez. 2019. 38 p. Disponível em: <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tx31qh68h/n296xd515/w0892s45d/oilseeds.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2020.

FARSUL - Federação da Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul. Farsul projeta recuperação em 2013. **Notícias**, 12 dez. 2012. Disponível em: <https://www.farsul.org.br/geral/farsul-projeta-recuperacao-em-2013,314898.jhtml>. Acesso em: 30 mar. 2020.

GUJARATI, D. N.; PORTER, D. C. **Econometria básica**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2011. 924 p.

IBGE. **Painel de indicadores**. 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/indicadores>. Acesso em: 22 mar. 2020.

KICH, T. G. F.; CORONEL, D. A.; VIEIRA, K. M. Determinantes da balança comercial do agronegócio brasileiro: análise da influência das variáveis macroeconômicas no período de 1997 a 2009. **Informações Econômicas**, v. 42, n. 4, p. 55-67, 2012.

KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. (Eds.). **Integração lavoura-pecuária**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 570 p.

LANDES, W. M.; POSNER, R. A. Market power in antitrust cases. **Harvard Law Review**, v. 94, n. 5, p. 937-996, 1981. DOI: 10.2307/1340687.

MARÔCO, J. **Análise estatística com o SPSS Statistics**. 6. ed. Lisboa: ReportNumber, 2014. 1013 p.

MATOS, O. C. de. **Econometria básica: teoria e aplicações**. 3. ed. São Paulo: Atlas, 2000. 300 p.

MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A.; VINING, G. G. **Introduction to linear regression analysis**. New York: John Wiley & Sons, 2006. 612 p.

NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B. Perdas por seca. In: LEITE, R. M. V. B. de C.; SARAIVA, O. F. (Eds.). **Árvore do conhecimento: Soja**. Brasília, DF: Embrapa, 2007. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONT000fzr67crj02wx5ok0cpoo6awmgu8s1.html>. Acesso em: 30 mar. 2020.

OLIVEIRA, T. A. S.; OLIVEIRA NETO, O. J. de O.; SILVA, E. A. Influência de variáveis socioeconômicas na produção brasileira de grãos. **Desafio Online**, v. 6, n. 3, p. 570-597, 2018.

PRODUÇÃO de soja cai 4,56% em 2004, mas Brasil ainda é segundo maior produtor mundial. **Agência IBGE notícia**, 6 dez. 2005. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/13037-asi-producao-de-soja-cai-456-em-2004-mas-brasil-ainda-e-segundo-maior-produtor-mundial>. Acesso em: 30 mar. 2020.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**, versão 3.6.1. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2019. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 30 mar. 2020.

ROSOLEN, D.; ARAÚJO, M. V.; LYRIO, M. Previsão dos preços de commodities por meio das taxas de câmbio. **Revista de Estudos Econômicos**, v. 43, n. 4, p. 813-830, 2013.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test of normality. **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

# Contribuição da polinização entomófila em lavouras de soja com alto ou baixo potencial de produtividade

BARATEIRO, J. V. G. R. P.<sup>1</sup>; GAZZONI, D. L.<sup>2</sup>; GIEHL, A. M.<sup>3</sup>; OLIVEIRA, C. H.<sup>3</sup>; LOT, F. D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Agronômico do Paraná, Mestrando em Produção e Proteção Vegetal, Londrina, PR, joaovitorgrpb@gmail.com; <sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Soja; <sup>3</sup>Graduando de Agronomia, Londrina, PR.

## Introdução

Os efeitos da polinização entomófila da soja (*Glycine max* (L.) Merrill.), em especial por abelhas da espécie *Apis mellifera*, envolvem controvérsias entre autores, variando desde rendimentos mais elevados até a ausência de efeitos benéficos, o que justifica o investimento em estudos para clarificar a questão, nas condições brasileiras de cultivo da soja. Estudos conduzidos no exterior ou no Brasil, normalmente mostram aumentos de produtividade quando polinizadores bióticos visitam as flores de soja: 31,7% a 58,6% no número de vagens; 40,13% no peso da vagem; 29,4% a 82,3% no número de sementes; 95,5% na viabilidade de sementes e 9% a 81% no peso das sementes (Juliano, 1977; Issa et al., 1984; Villa et al., 1992; Nogueira-Couto, 1994; Fávero; Couto, 2000; Ribeiro, 2000; Ribeiro; Couto, 2002).

O aumento progressivo da área de cultivo de soja no Brasil, que ultrapassa 36 milhões de hectares, e que continuará crescendo em torno de 2% ao ano nos próximos anos (Gazzoni; Dall’Agnol, 2018), faz com que o cultivo de soja ocorra cada vez mais próximo de apiários. De outra parte, os apicultores estão progressivamente descobrindo que a soja se constitui em um bom pasto apícola, com grande oferta de néctar. Como tal, um estudo mais aprofundado, embasado em pesquisas e dados científicos, com comprovação prática, se faz necessário para o entendimento das oportunidades para o apicultor e para o sojicultor. Essas oportunidades podem configurar um processo de ganha-ganha, possibilitando a preservação do meio ambiente e dos serviços ecossistêmicos através de técnicas e conhecimentos da agricultura conservacionista, aliado ao aumento na produtividade e qualidade de grãos de soja.

Assim, o presente estudo buscou elucidar questões atualmente controversas e contribuir positivamente para a obtenção de novos dados, para estabelecer os efeitos da polinização apícola sobre o rendimento da soja e seus componentes.

## Material e Métodos

Foram conduzidos dois experimentos, cada qual com três tratamentos, denominados: 1) Gaiolas com abelhas; 2) Gaiolas sem abelhas; 3) Campo aberto (parcelas descobertas). Cada tratamento foi repetido 10 (dez) vezes, em um delineamento de blocos ao acaso. Para conduzir o estudo, foram semeadas duas áreas de soja, no campo experimental da Embrapa Soja em Londrina, PR, seguindo as tecnologias de produção de soja (Tecnologias..., 2013). Para o primeiro experimento, foi utilizada a cultivar BRS 388 RR, de hábito indeterminado, semeada em 22/10/19. A área está localizada a uma distância média de 200 m de uma mata nativa, que serve de abrigo para diversas abelhas nativas, e onde já estavam alocadas colônias de *A. mellifera*, além de dez colmeias desta espécie colocadas a cerca de 20m da borda do experimento, o que permitiu a visitação de polinizadores no tratamento de parcelas descobertas (campo aberto). O segundo experimento foi instalado em área sabidamente com compactação subsuperficial, com o objetivo de limitar o potencial de produtividade da soja, a fim de verificar a ocorrência da contribuição da polinização entomófila nestas condições. Foi utilizada a cultivar BRS433RR, semeada em 22/11/2019.

Em ambos os experimentos, durante a semana anterior à data prevista para o florescimento da soja, foram colocadas vinte gaiolas sobre as parcelas de soja, medindo 8m de comprimento x 4,2m de largura x 2m de altura, com o objetivo de evitar a entrada ou saída de insetos, em especial polinizadores. As gaiolas possuíam armação de PVC, recobertas por uma tela de poliamida (náilon) branca, com abertura de, aproximadamente, 1 mm. A parte inferior do telado das gaiolas foi recoberta com terra para impedir que insetos pudessem adentrá-la. Frequentemente a integridade de todos os telados era verificada, para impedir a entrada ou saída de insetos. Dez gaiolas constituíram o tratamento “com abelhas”, colocando-se uma colmeia de abelhas no interior de cada gaiola, um dia antes do início do florescimento. Para tanto, foram utilizadas colmeias tipo núcleo, de cinco quadros, preparadas com base na

população de abelhas necessárias (aproximadamente 10.000-15.000) para a polinização da área de soja no período do florescimento. Após a colocação da colmeia de abelhas no interior da gaiola, foi efetuado o monitoramento duas vezes por semana, para comprovação da atividade da colônia e fornecimento de alimentação suplementar conforme necessidade. As gaiolas do tratamento “sem abelhas” também foram vistoriadas, para confirmar a ausência de abelhas.

A abundância populacional de polinizadores nos tratamentos (1) e (3) foram monitoradas por um observador, por meio de três avaliações separadas por uma hora entre elas, entre as 9h e 12h. Para a avaliação, o monitor permanecia 5 min parado no interior da parcela, registrando o número de abelhas observadas em 1m das duas filas à sua frente, sendo este procedimento repetido duas vezes por parcela, a cada hora. No experimento 1, foram realizados 20 monitoramentos durante o período de florescimento da soja, que ocorreu entre 6/12/2019 e 2/01/2020. No experimento 2 foram realizados 12 levantamentos entre 15 e 26/01/2020, observando-se a mesma metodologia. Nos mesmos dias em que ocorreram os monitoramentos nas parcelas, foram realizadas três coletas com rede entomológica na bordadura do experimento, para avaliação da presença de pragas e de *Apis mellifera*.

Durante o período em que as gaiolas foram mantidas sobre as parcelas, monitorou-se, diariamente, a temperatura e a umidade do ar, com o auxílio de *data loggers*, setados para computar estes parâmetros a cada 5 minutos. A radiação fotossinteticamente ativa (PAR) também foi medida, no interior de uma gaiola e em uma parcela descoberta, simultaneamente. A insolação diária foi obtida no Laboratório de Meteorologia do Iapar e a precipitação pluviométrica na Embrapa Soja. As telas das gaiolas foram retiradas imediatamente após final do florescimento da soja. Tanto antes, quanto após o florescimento, o manejo da soja foi o mesmo para todos os tratamentos. Para evitar interferência do controle de pragas sobre os tratamentos, quando houve a necessidade de alguma aplicação, foram utilizados inseticidas fisiológicos para o controle de lagartas, respeitando o período de ação residual.

Em cada uma das parcelas foi colhida uma área útil de 12 m<sup>2</sup> de soja, para avaliação da produtividade. Adicionalmente, foi colhido 1 m linear de fila de soja de cada parcela, para determinação dos componentes da produção. Os

dados foram submetidos à análise da variância e as diferenças entre médias discriminadas com o auxílio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

### Experimento 1: Área com alto potencial produtivo

As parcelas com abelhas tiveram rendimento 8,5% superior em relação às parcelas sem abelhas. O rendimento da soja cultivada em parcelas abertas, que representa uma condição usual do produtor, não diferiu dos outros dois tratamentos (Tabela 1). Houve maior número de grãos por vagem nas gaiolas com abelhas, sendo 5,1% maior que a soja cultivada em gaiolas sem abelhas e 4,2% maior que as parcelas abertas, sendo a principal explicação para o aumento no rendimento da soja nas gaiolas com abelhas. O restante do acréscimo da produtividade ficou diluído entre os demais componentes da produção, sem que houvesse diferença estatística entre os tratamentos.

O peso de 100 grãos foi 2,2% maior para a soja das gaiolas com abelhas, em comparação com o mesmo tratamento sem abelhas, embora não seja estatisticamente significativa, mas a diferença para a soja de parcela aberta (10,5%) foi significativa.

Como esperado, não foram observadas diferenças para a altura das plantas de soja.

**Tabela 1.** Rendimento, altura de planta, número de grãos por vagem e peso de 100 grãos de soja submetidos a três populações diferentes de abelhas e diversidade de espécies.

Tratamentos	Produção (kg/ha)	Altura de plantas (cm)	Grãos/vagem (n)	Peso de 100 grãos (g)
A: Gaiolas com abelhas	4768 a	100,46	2,49 a	17,15 a
B: Gaiolas sem abelhas	4395 b	103,65	2,37 b	16,78 ab
C: Campo aberto	4568 ab	96,09	2,39 b	15,52 b
CV (%)	6,55	8,91	4,60	9,55

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Não foram observadas diferenças significativas para o número de vagens ou grãos por planta entre os tratamentos, bem como para o número de vagens contendo 0 a 2 grãos e para as vagens contendo 3 e 4 grãos, como mostra a Tabela 2.

**Tabela 2.** Número de vagens / planta, grãos / planta, vagens com 0 e 1 grãos e vagens com 3 e 4 grãos de soja submetidos a três diferentes populações de abelhas e diversidade de espécies.

Tratamentos	Vagens/planta (n)	Grãos/planta (n)	Vagens 0+1+2 grãos/planta (n)	Vagens 3+4 grãos/planta (n)
A: Gaiolas com abelhas	39,29	97,20	16,89	22,40
B: Gaiolas sem abelhas	40,62	97,58	18,28	21,77
C: Campo aberto	41,40	99,41	19,87	21,53
CV (%)	14,12	15,43	15,69	19,57

As vagens foram separadas de acordo com o número de grãos, e apenas as vagens contendo 2 grãos apresentaram diferenças entre os tratamentos, com as parcelas abertas produzindo 15,9% a mais de vagens de 2 grãos que as parcelas enjauladas com abelhas e 15,4% a mais que as enjauladas sem abelhas, como mostra a Tabela 3. Houve menos vagens com zero ou um grão nas parcelas provenientes de gaiolas com abelhas, porém não houve diferença estatística para os demais tratamentos.

**Tabela 3.** Número de vagens contendo diferentes números de grãos de soja, submetidos a três diferentes populações de abelhas e diversidade de espécies.

Tratamentos	Número de vagens por planta				
	0 grãos	1 grão	2 grãos	3 grãos	4 grãos
A: Gaiolas com abelhas	0,53	4,12	12,23 b	20,99	1,41
B: Gaiolas sem abelhas	0,65	5,35	12,29 b	20,50	1,27
C: Campo aberto	0,67	5,01	14,18 a	20,10	1,43
CV (%)	69,98	33,27	12,74	18,43	45,82

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Experimento 2: Área com baixo potencial produtivo

Como esperado pelo histórico da área, uma camada compactada foi detectada entre 10 e 25 cm, com 73% das amostras mostrando resistência à penetração acima de 3 MPa e 40% acima de 3,5 MPa. O perfil remanescente do solo abaixo de 5 cm apresentou resistência à penetração entre 2 - 2,5 MPa. O diagnóstico é que, com essa intensa compactação do solo, as raízes da soja enfrentam dificuldades para penetrar profundamente no perfil do solo, com acesso restrito à água e aos nutrientes e com menos benefícios da biodiversidade benéfica do solo. Nesta condição, espera-se baixo rendimento de soja, como demonstrado pelos resultados do rendimento e de seus componentes. De acordo com o exposto, a média geral do rendimento da soja do experimento 2 foi de 2.744 kg / ha e não foram encontradas diferenças para o rendimento dos diferentes tratamentos e para o número de grãos / vagem, peso de 100 grãos ou altura das plantas de soja, como mostra a Tabela 4.

**Tabela 4.** Rendimento, altura da planta, número de grãos por vagem e peso de 100 grãos de soja, submetidos a três populações diferentes de abelhas e diversidade de espécies.

Tratamentos	Produção (kg/ha)	Altura de plantas (cm)	Grãos/vagem (n)	Peso de 100 grãos (g)
A: Gaiolas com abelhas	2758	57,02	2,28	12,92
B: Gaiolas sem abelhas	2749	57,70	2,29	12,44
C: Campo aberto	2727	55,51	2,32	12,45
CV (%)	12,70	12,30	3,25	6,90

Conseqüentemente, não foram encontradas diferenças para outros componentes do rendimento como o número de vagens ou grãos por planta e as vagens com número diferente de grãos (Tabelas 5 e 6).

**Tabela 5.** Número de vagens / planta, grãos / planta, vagens com 0 e 1 grãos e vagens com 3 e 4 grãos de soja, submetidos a três diferentes populações de abelhas e diversidade de espécies.

Tratamentos	Vagens/planta (n)	Grãos/planta (n)	Vagens 0+1+2 grãos/planta (n)	Vagens 3+4 grãos/planta (n)
A: Gaiolas com abelhas	34,02	77,78	19,15	14,87
B: Gaiolas sem abelhas	30,39	69,81	17,32	13,06
C: Campo aberto	32,45	75,38	17,84	14,52
CV (%)	17,48	18,87	16,68	24,28

**Tabela 6.** Número de vagens contendo diferentes números de grãos de soja submetidos a três diferentes populações de abelhas e diversidade de espécies.

Tratamentos	Número de vagens/planta				
	0 grãos	1 grão	2 grãos	3 grãos	4 grãos
A	0,52	4,30	14,33	14,67	0,20
B	0,39	3,45	13,48	12,87	0,20
C	0,35	3,61	13,87	14,25	0,26
CV (%)	42,66	23,85	16,53	24,09	67,51

## Conclusão

Em áreas com alto potencial produtivo, o aumento da produtividade da soja foi demonstrado quando uma população ideal de *A. mellifera* está presente, permitindo o aumento da polinização entomofílica, associada ao alto potencial de produtividade proporcionado pelas condições ambientais, genéticas e agrônomicas. O aumento da produtividade esteve intimamente associado ao maior número de grãos de soja / vagem e ao peso de 100 grãos.

Os resultados da área com baixo potencial produtivo demonstram que a visita de abelhas às flores de soja, em condição natural (campo aberto) e nas parcelas com abelhas, não aumenta a produtividade da soja, quando existem restrições que resultem em rendimentos abaixo de seu potencial produtivo.

## Referências

- FÁVERO, A. C.; COUTO, R. H. N. Polinização entomófila em soja (*Glycine max* L. var. FT2000). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 13., 2000, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: CBA, 2000. 1 CD-ROM.
- GAZZONI, D. L.; DALL'AGNOL, A. **A saga da soja**: de 1050 a.C. a 2050 d.C. Brasília, DF: Embrapa, 2018. 199 p.
- ISSA, M. R. C.; VELOCCI, M. E. P.; GONÇALVES, L. S.; SOARES, A. E. E. Ensaio de polinização em soja (*Glycine max*) por abelhas *Apis mellifera* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 5., 1980, Viçosa. **Anais...** Viçosa: CBA, 1984.
- JULIANO, J. C. Polinização entomófila na soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 4., 1976, Curitiba. **Anais...** Curitiba: CETERPAR, 1977. p. 235-239.
- NOGUEIRA-COUTO, R. H. Polinização com abelhas africanizadas. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 1., 1994, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FFCLRP-USP, 1994. p. 101-117.
- RIBEIRO, A. de M. F. **Polinização e uso de atrativos e repelentes para *Apis mellifera* (L.) em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), girassol (*Helianthus annuus* L.), maracujá (*Passiflora edulis* Sims) e soja (*Glycine max* Merrill)**. 2000. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- RIBEIRO, A. de M. F.; COUTO, R. H. N. Polinização entomófila de soja (*Glycine max*), cultivar Conquista. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande, MS. **Qualidade nutritiva dos produtos das abelhas**: anais. Campo Grande: CBA: UFMS: FAAMS, 2002. 1 CD-ROM.
- TECNOLOGIAS de produção de soja - Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 16).
- VILLA, V. P. V.; MARTINHO, M. R.; SATHIYAMA, T.; FREIRE, J. A. H. Effect of africanized bees, *Apis mellifera* L. in the hybridization and productivity of soybean *Glycine max* (L.) Merrill. In: INTERNATIONAL APICULTURAL CONGRESS APIMONDIA, 32., Rio de Janeiro, 1989. **Proceedings...** Bucharest: Apimondia Publishing House, 1992. p. 414-415.

# Ganho produtivo do sistema de sucessão soja/milho com o consórcio de milho/braquiária e adubação nitrogenada na segunda safra

FRANCO, A.<sup>1</sup>; BALBINOT JUNIOR, A. A.<sup>2</sup>; COELHO, A. E.<sup>3</sup>; SANGOI, L.<sup>3</sup>; LOCATELLI, J. L.<sup>4</sup>; BRATTI, F.<sup>5</sup>; ANDRADE, R.<sup>6</sup>; DEBIASI, H.<sup>2</sup>, FRANCHINI, J. C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FPL, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, alexandre2019agronomia@gmail.com, <sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Soja, <sup>3</sup>UDESC, Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal, <sup>4</sup>ESALQ/USP, Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas <sup>5</sup>UFPR, Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, <sup>6</sup>UNIFIL, Centro Universitário Filadélfia.

## Introdução

A inclusão de espécies forrageiras em consórcio com o milho, cultivado em segunda safra, é uma opção para diversificar a sucessão soja/milho. O consórcio propicia cobertura uniforme do solo, eleva a ciclagem de nutrientes, minimiza a compactação do solo, reduz a erosão hídrica, suprime plantas daninhas e reduz a amplitude térmica no solo (Balbinot Junior et al., 2008; Carvalho et al., 2013). Além disso, pode melhorar o desempenho agrônômico da soja em sucessão, em Sistema Plantio Direto (Franchini et al., 2015; Balbinot Junior et al., 2017).

O incremento no rendimento das espécies cultivadas, bem como a ciclagem de nutrientes para os cultivos sucessores é dependente da adubação nitrogenada (Bernardon et al., 2020). Nesse sentido, a adubação no outono/inverno, visando a adubação do sistema produtivo, aumenta a eficiência de uso do nitrogênio (N) pelas plantas e a capacidade de ciclar nutrientes, disponibilizando-os às culturas subseqüentes (Assmann et al., 2017; Momesso et al., 2019). Provavelmente o fornecimento de N ao milho cultivado em consórcio com a braquiária pode promover incrementos significativos no rendimento da soja (Franchini et al., 2015; Balbinot Junior et al., 2017). De acordo com Câmara (2014), a aplicação de N mineral em culturas de entressafra da soja influencia positivamente na produtividade da oleaginosa, em função da redução da relação C/N da palhada e a conseqüente disponibilização de nutrientes à soja semeada em sucessão, além de potencializar a ciclagem de outros nutrientes.

O aumento da densidade de plantas de milho pode promover um maior acúmulo de biomassa (Shao et al., 2018) e nutrientes na parte aérea (Ciampitti; Vyn, 2013), o que pode ser intensificado com a adubação nitrogenada de cobertura (Ciampitti; Vyn, 2013). O incremento na densidade de plantas de milho também pode mitigar a competição interespecífica exercida pelas plantas que eventualmente são inseridas em consórcio, principalmente espécies de braquiária.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do consórcio de milho segunda safra com braquiária, da adubação nitrogenada em cobertura e da densidade de plantas de milho sobre o desempenho agrônomo do milho e da soja em sucessão.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido nas safras 2018/2019 e 2019/2020 em Londrina, PR (23°12' sul, 51°11' oeste e altitude de 585 m), em um Latossolo Vermelho distroférico de textura muito argilosa. O delineamento experimental utilizado foi de blocos completos casualizados, em esquema de parcelas sub-subdivididas, com quatro repetições. Nas parcelas foram alocadas duas modalidades de cultivo, milho solteiro e consorciado com *Urochloa ruziziensis*. Nas subparcelas foram avaliadas duas doses de N em cobertura, 0 e 80 kg ha<sup>-1</sup> de N. Nas sub-subparcelas, foram avaliadas quatro densidades de plantas de milho, 40, 60, 80 e 100 mil plantas ha<sup>-1</sup>. O tamanho das sub-subparcelas foi de 5 x 8 m (40m<sup>2</sup>) e área útil de 3,2 x 6 m (19,2 m<sup>2</sup>).

Na safra em avaliação (2019/2020) o milho segunda safra foi semeado sobre os resíduos da cultura da soja no dia 1 de março de 2019. Utilizou-se uma semeadora-adubadora para demarcar as linhas e efetuar a deposição da adubação na base, de acordo com as recomendações do Manual de Adubação e Calagem para o estado do Paraná, para uma expectativa de produtividade de 10 Mg ha<sup>-1</sup>. As sementes foram dispostas manualmente nas linhas demarcadas pelo equipamento na densidade de 80 kg ha<sup>-1</sup>. Simultaneamente foi realizada a semeadura da braquiária na densidade de 8 kg ha<sup>-1</sup> de sementes puras e viáveis, na entrelinha da cultura do milho, sem o uso de fertilizantes. O milho foi implantado por meio do uso de semeadoras manuais, deposi-

tando-se três sementes por cova, com a finalidade de garantir a adequada disposição espacial das plantas e a densidade de plantas almejada. Em V2 foi realizado o raleio das plantas de milho, deixando-se apenas uma planta por cova. A aplicação do N em cobertura foi realizada no estágio V5, na forma de nitrato de amônio. Para o controle de plantas daninhas e supressão do crescimento da braquiária foi utilizada 3,5 l p.c. ha<sup>-1</sup> de Atrazina.

No final de setembro, a braquiária foi dessecada com glifosato (1.080 g e.a. ha<sup>-1</sup>). A cultura da soja foi semeada em 25 de outubro de 2019. Para tal, utilizou-se uma semeadora-adubadora ajustada para o espaçamento de 45 cm e 350 mil sementes viáveis de soja ha<sup>-1</sup>. A cultivar utilizada foi a BRS 1003 IPRO e a adubação realizada conforme as recomendações técnicas da cultura. As sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* no dia da semeadura e as práticas culturais realizadas de acordo com as recomendações para as culturas.

A produtividade de grãos foi estimada pela colheita de duas linhas de sete metros de comprimento para o milho e de três linhas para a soja por sub-sub-parcela, sendo os valores corrigidos para 13% de umidade e expressos em kg ha<sup>-1</sup>.

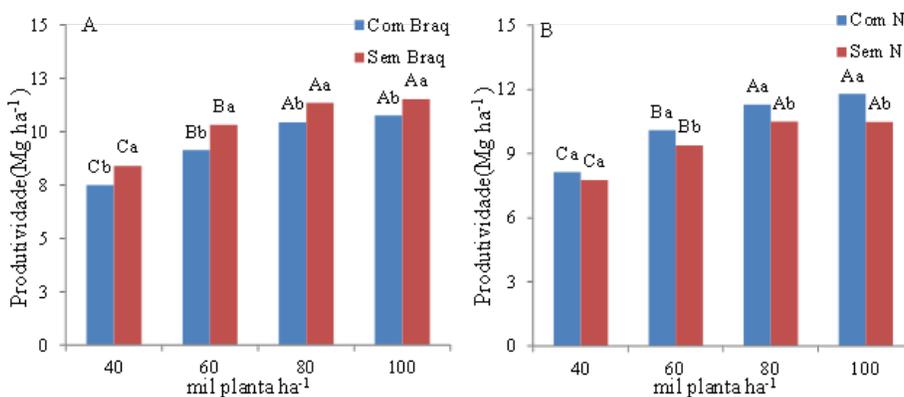
Os dados foram submetidos à análise da variância e teste F ( $p \leq 0,05$ ). Quando houve efeito significativo dos fatores experimentais, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

A produtividade do milho foi impactada pela interação entre o consórcio com braquiária e a densidade de plantas de milho (Figura 1 A). A medida em que houve o aumento da densidade de plantas de milho ocorreu uma elevação quadrática da produtividade de grãos do cereal. Independentemente da densidade de plantas, o milho cultivado solteiro apresentou maior rendimento de grãos que o milho consorciado com a braquiária. Com o aumento da densidade de plantas de milho, houve uma tendência de redução da diferença no rendimento do milho consorciado e o não consorciado. A presença da forrageira reduziu a produtividade de grãos de milho em função da competição por recursos do ambiente (água, luz e nutrientes). Nesse caso, constatou-se

a necessidade de haver maior supressão do crescimento da braquiária com herbicidas, a fim de reduzir a competitividade da forrageira com a cultura do milho.

Observou-se, também, o efeito da interação entre a adubação nitrogenada de cobertura e a densidade de plantas de milho, em que o rendimento de grãos de milho apresentou resposta quadrática positiva à medida que se elevou a densidade de plantas (Figura 1 B). A aplicação de N aumentou a produtividade do milho quando ele foi cultivado com densidades de 60 a 100 mil pl ha<sup>-1</sup>. O aumento da população de plantas de milho provocou um aumento na resposta do rendimento de grãos da cultura à adubação nitrogenada.



**Figura 1.** Produtividade do milho em função da densidade de plantas de milho e consórcio de milho com braquiária (A) e em função da densidade de plantas de milho, com e sem adubação nitrogenada no milho (B). Médias seguidas por letras iguais, maiúscula para densidade e minúscula para consórcio com braquiária e nitrogênio, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Londrina, PR.

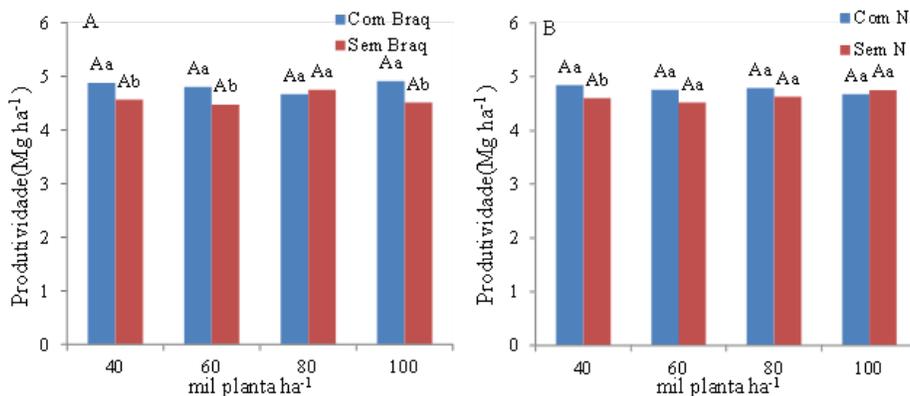
A produtividade da soja foi impactada pela interação entre o consórcio e a densidade de plantas de milho (Figura 2 A). A produtividade da soja não variou em função da densidade de plantas de milho, porém apresentou magnitude de resposta ao consórcio distinta, em função da densidade de milho. A soja cultivada após o milho consorciado com braquiária apresentou maior produtividade em comparação à soja cultivada após milho solteiro, com exceção da densidade de plantas de milho de 80 mil plantas ha<sup>-1</sup>, em que a produtividade da soja não diferiu quando cultivada após o milho consorciado

ou solteiro. Em média, a soja produziu 240 kg ha<sup>-1</sup> mais grãos quando cultivada após o consórcio de milho com braquiária. O aumento do rendimento da cultura da soja é explicado pela contribuição da braquiária no sistema de produção. A maior adição de biomassa promovida pela cultura em relação ao cultivo do milho solteiro contribui para a melhoria dos atributos físicos do solo (e.g. resistência à penetração e porosidade), além de elevar a ciclagem de nutrientes (Dabney et al., 2001).

A interação entre a adubação nitrogenada em cobertura e a população de plantas de milho afetou a produtividade da soja cultivada em sucessão (Figura 2 B). Embora a produtividade de soja não tenha variado em função da densidade de plantas de milho, o aumento da população de plantas de milho reduziu o benefício da adubação nitrogenada sobre a produtividade da soja. Na população de 40 mil plantas ha<sup>-1</sup> de milho, a soja produziu 245 kg ha<sup>-1</sup> a mais de grãos quando cultivada após o milho que recebeu nitrogênio em cobertura. Porém, a maior produtividade da soja, cultivada após o milho que recebeu nitrogênio em cobertura, foi reduzido de forma gradativa à medida em que a população de plantas de milho aumentou.

A adubação nitrogenada no milho segunda safra, que nos últimos anos têm sido reduzida pelos produtores, em função do risco de perdas por fatores agrometeorológico e da baixa resposta agronômica, pode ser um fator depreciativo no contexto de rendimento do “sistema de produção”. Diferentemente da adubação nitrogenada na soja (Mourtzinis et al., 2018), a adubação nitrogenada no milho proporcionou aumento na produtividade da soja e do milho, em relação ao tratamento sem adição de N.

Embora reduza o rendimento de grãos de milho, o consórcio do milho com a braquiária promove uma maior produção de biomassa (parte aérea e raízes) e aumenta a ciclagem de nutrientes (dados não apresentados), trazendo benefícios ao sistema produtivo, o que pode ser visualizado no rendimento da soja já no segundo ano de estudo.



**Figura 2.** Produtividade da soja em função da densidade de plantas de milho e consórcio do milho com braquiária (A) e em função da densidade de plantas de milho e à presença e ausência de adubação nitrogenada no milho (B). Médias seguidas por letras iguais, maiúscula para densidade e minúscula para consórcio com braquiária e nitrogênio, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Londrina, PR.

## Conclusão

O consórcio do milho segunda safra com a braquiária *ruziziensis* reduziu a produtividade do cereal. Porém, com o aumento da densidade das plantas de milho, tal diferença no rendimento mostrou tendência de queda.

O aumento da densidade de plantas de milho segunda safra proporcionou um incremento quadrático da produtividade do cereal, além do aumento da resposta da cultura à adubação nitrogenada.

O consórcio do milho segunda safra com a braquiária *ruziziensis* e a adubação nitrogenada do cereal elevaram a produtividade da soja cultivada em sucessão.

## Referências

ASSMANN, J. M.; MARTINS, A. P.; ANGHINONI, I.; DENARDIN, L. G. de O.; NICHEL, G. de H.; COSTA, S. E. V. G. de A.; SILVA, R. A. P. e; BALERINI, F.; CARVALHO, P. C. de F.; FRANZLUEBBERS, A. J. Phosphorus and potassium cycling in a long-term no-till integrated soybean-beef cattle production system under different grazing intensities insubtropics. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 108, n. 1, p. 21-33, 2017.

BALBINOT JUNIOR, A. A.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; YOKOYAMA, A. H. Contribution of roots and shoots of *Brachiaria* species to soybean performance in succession. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 8, p. 592-598, 2017.

BALBINOT JUNIOR, A. A.; MORAES, A.; PELISSARI, A.; DIECKOW, J.; VEIGA, M. Formas de uso do solo no inverno e sua relação com a infestação de plantas daninhas em milho (*Zea mays*) cultivado em sucessão. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 569-576, 2008.

BERNARDON, A.; ASSMANN, T. S.; SOARES, A. B.; FRANZLUEBBERS, A. J.; MACCARI, M.; BORTOLLI, M. A. de. Carryover of N-fertilization from corn to pasture in an integrated crop-livestock system. **Archives of Agronomy and Soil Science**, p. 1-16, 2020.

CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica do nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, v. 147, p. 1-9, 2014.

CARVALHO, W. P. de; CARVALHO, G. J. de; ABBADE NETO, D. de O.; TEIXEIRA, L. G. V. Desempenho agrônomico de plantas de cobertura usadas na proteção do solo no período de pousio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 2, p. 157-166, 2013.

CIAMPITTI, I. A.; VYN, T. J. Maize nutrient accumulation and partitioning in response to plant density and nitrogen rate: II. Calcium, magnesium, and micronutrients. **Agronomy Journal**, v. 105, n. 6, p. 1645-1657, 2013.

DABNEY, S. M.; DELGADO, J. A.; REEVES, D. W. Using winter cover crops to improve soil and water quality. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 32, p. 1221-1250, 2001.

FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; DEBIASI, H.; CONTE, O. Desempenho da soja em consequência de manejo da pastagem, épocas de dessecação e adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 1131-1138, 2015.

MOMESSO, L.; CRUSCIOL, C. A.; SORATTO, R. P.; VYN, T. J.; TANAKA, K. S.; COSTA, C. H.; FERRARI NETO J.; CANTARELLA, H. Impacts of nitrogen management on no-till maize production following forage cover crops. **Agronomy Journal**, v. 111, n. 2, p. 639-649, 2019.

MOURTZINIS, S.; KAUR, G.; ORLOWSKI, J. M.; SHAPIRO, C. A.; LEE, C. D.; WORTMANN, C.; HOLSHOUSE, D.; NAFZIGER, E. D.; KANDEL, H.; NIEKAMPF, J.; ROSSH, W. J.; LOFTONI, J.; VONKF, J.; ROOZEBOOMJ, K. L.; THELENK, K. D.; LINDSEYL, L. E.; STATONM, M.; NAEVEN, S. L.; CASTEELLO, S. N.; WIEBOLDP, W. J.; CONLEY, S. P. Soybean response to nitrogen application across the United States: A synthesis-analysis. **Field Crops Research**, v. 215, p. 74-82, 2018.

SHAO, H.; XIA, T.; WU, D.; CHEN, F.; MI, G. Root growth and root system architecture of field-grown maize in response to high planting density. **Plant and Soil**, v. 430, n. 1-2, p. 395-411, 2018.

# Produtividade da soja em função da distância de um pequeno apiário e do cerrado

GIEHL, A. M.<sup>1</sup>; GAZZONI, D. L.<sup>2</sup>; OLIVEIRA, C. H.<sup>3</sup>; LOT, F. D.<sup>3</sup>; BARATEIRO, J. V. G. R. P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia, Graduando em Agronomia, Londrina, PR, giehl09@me.com; <sup>2</sup> Pesquisador, Embrapa Soja; <sup>3</sup> Graduando de Agronomia; <sup>4</sup> Mestrando em Produção e Proteção Vegetal, Londrina, PR.

## Introdução

As abelhas, principalmente as nativas, são consideradas indispensáveis para o aumento na produtividade de diversas culturas. Estima-se que a maioria das espécies vegetais cultivadas no mundo (73%), seja polinizada por abelhas (FAO, 2004). Dentre os insetos conhecidos como polinizadores, destaca-se a *Apis mellifera*, responsável por 80% da polinização entomófila (McGregor, 1976).

A soja é uma planta de autofecundação (Ahrent; Caviness, 1994). A polinização ocorre quando o estigma está receptivo e as anteras deiscem liberam o pólen, antes da abertura das flores (Erickson et al., 1978), o que torna muito difícil para o pólen exógeno alcançá-lo. A polinização cruzada é mencionada na literatura ocorrendo em taxas baixas, próximo a 2%. Apesar da baixa taxa de polinização cruzada, alguns autores afirmam que a polinização assistida pelas abelhas aumenta a produtividade da soja, principalmente devido ao maior número de vagens e de grãos por vagem. A visita das abelhas também reduz a taxa de abortos das flores. Quando impedidas de visita a taxa de abortos observada foi de 82,91%. Com a livre visita a taxa cai para 52,66% (Chiari et al., 2005).

Com a constante expansão da área da cultura da soja, e com o interesse crescente dos apicultores em utilizar a soja como planta forrageira para seus apiários, surgiu a necessidade do presente estudo para o entendimento da visita de abelhas em lavouras de soja, em função da presença de um apiário e de um repositório de abelhas nativas nas bordas da lavoura.

## Material e Métodos

Os experimentos foram instalados na fazenda Girassol do Prata (Jaciará, MT). O experimento 1 foi localizado ao lado de um fragmento de cerrado,

que poderia, potencialmente, constituir um repositório de abelhas silvestres, onde dez colmeias de abelhas, com uma população estimada em 50-60.000 abelhas por colmeia, também foram colocadas. Esse número de colmeias foi escolhido porque é representativo de pequenos apiários na região. O experimento 2 foi localizado a 2 km do experimento 1, porém sem a colocação de colmeias na sua borda.

O sistema de produção de soja foi de responsabilidade da administração da fazenda, sem qualquer interferência de nossa parte. A área foi semeada com a cultivar de soja Don Mario 81i84 IPRO em 12/10/2019. Sempre que uma aplicação de inseticida era necessária, o administrador da fazenda nos comunicava com 24 h de antecedência, permitindo o fechamento das colmeias, a fim de evitar qualquer impacto deletério de pesticidas nas colônias.

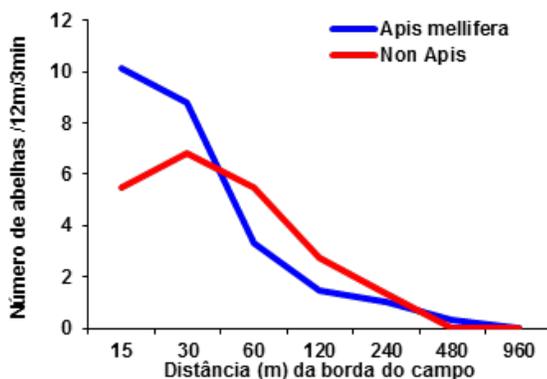
Seis transectos (repetições) separados por 25 m foram utilizados para localizar parcelas nas distâncias de 15, 30, 60, 90, 120, 480 e 960 m da borda do campo de soja próximo ao fragmento de cerrado, onde as colmeias foram colocadas. A visitação das abelhas foi monitorada através da contagem visual das abelhas que se aproximavam das flores de soja, durante 3 minutos ao longo de 2 m de linha de soja, em cada um dos pontos mencionados acima. As abelhas observadas foram separadas por indivíduos *A. mellifera* e não Apis. Esse processo foi repetido em 12 datas durante o florescimento da soja. Na época da colheita, 6 m de linhas de soja foram colhidas em cada um dos pontos de amostragem para mensuração da produtividade, e outro 1 m de linha foi colhido para avaliar os componentes da produção. Os dados foram submetidos à análise da variância e as diferenças entre médias discriminadas com o auxílio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

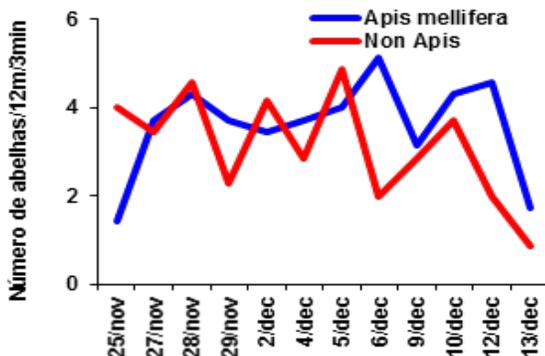
### Experimento 1

Em média 3,59 indivíduos de *A. mellifera* e 3,13 não Apis foram observados em 12 m, durante 3 min, durante o florescimento da soja (Figura 1). Observou-se uma clara tendência de diminuição do número de indivíduos de *A. mellifera* ou de abelhas nativas, à medida que a distância para o fragmento de cerrado aumentou de 15 para 960 m e nenhum indivíduo foi observado à distância de 960 m. Na maioria das datas de amostragem durante o flores-

cimento da soja, o número de indivíduos de *A. mellifera* observado por data, desconsiderando distâncias do fragmento de cerrado, flutuou entre 3,5 e 5 / 12 m / 3 min, sendo menor em 25 de novembro e 13 de dezembro (Figura 2).



**Figura 1.** Número de abelhas observadas em diferentes distâncias da fronteira do campo de soja, considerando todas as datas de amostragem



**Figura 2.** Número médio de abelhas observadas em diferentes datas de amostragem, considerando todas as distâncias de um fragmento de cerrado e de um apiário com dez colmeias de *A. mellifera*.

Observou-se uma tendência para reduzir o rendimento da soja à medida que a a distância do fragmento de cerrado e as colmeias posicionadas na borda da cultura aumentavam (Tabela 1).

**Tabela 1.** Rendimento, altura da planta, número de grãos por vagem e peso de 100 grãos de soja de acordo com a distância de um fragmento de cerrado com dez colmeias de *A. mellifera*.

Distância (m)	Rendimento (kg/ha)	Altura da planta (cm)	No. Grãos/vagem	Peso de 100 grãos (g)
15	3.483 a	65,49	2,42	17,15
30	3.282 ab	59,77	2,40	16,48
60	3.161 ab	61,03	2,36	16,79
120	3.181 ab	62,60	2,36	17,00
240	3.215 ab	61,19	2,34	17,00
480	3.130 b	65,24	2,36	16,20
960	3.071 b	67,37	2,36	17,32
CV (%)	7,50	7,79	4,34	5,57

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Diferenças significativas na produtividade de soja foram detectadas entre as distâncias de 15 m do fragmento e as parcelas localizadas a 480 m e 960 m. A maior diferença de rendimento foi observada entre as distâncias de 15 m e 960 m (13,4%), mas essa diferença é reduzida para 5,3% se considerada a média do grupo 15-240 m em relação à média do grupo 480-960 m, que não foram diferentes entre eles. O número de grãos por vagem tende a diminuir com distâncias mais altas, devido ao maior número de vagens com 3 e 4 grãos e de grãos por planta (Tabelas 2 e 3). Nenhuma tendência clara foi observada para o peso de 100 grãos ou para o número de vagens por planta.

**Tabela 2.** Número de vagens por planta, grãos por planta, vagens com grãos 0 e 1 e 3 e 4 grãos de soja de acordo com distância de fragmento de cerrado com dez colmeias de *A. mellifera*.

Distância (m)	N. Vagens/planta	N. Grãos/planta	N. Vagens 0+1 grãos/planta	N. Vagens 3+4 grãos/planta
15	39,97	97,42	2,39 b	18,58
30	38,75	92,53	3,54 ab	17,81
60	38,52	91,42	4,63 a	17,61
120	34,36	81,12	3,14 b	14,18
240	39,70	93,20	3,66 ab	16,42
480	37,97	89,06	4,63 a	16,70
960	38,52	91,46	2,80 b	16,15
CV (%)	16,95	18,67	30,33	29,88

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram constatadas diferenças significativas para o número de vagens por planta contendo 1 grão (Tabela 3) e para a soma de vagens contendo 0 e 1 grão, mas em ambos os casos, não foi encontrada nenhuma tendência clara que pudesse estar associada às distâncias da borda do campo.

**Tabela 3.** Número de vagens por planta, de acordo com o número de grãos, de soja cultivada próxima a um fragmento de cerrado com dez colmeias de *A. mellifera*.

Distância (m)	Número de vagens por planta que contém				
	0 grão	1 grão	2 grãos	3 grãos	4 grãos
15	0,23	2,17 b	19,00	17,07	1,51
30	0,57	2,97 b	17,39	16,48	1,34
60	0,14	4,49 a	16,28	16,08	1,53
120	0,11	3,04 b	17,03	12,72	1,47
240	0,28	3,38 ab	19,62	15,08	1,33
480	0,40	4,24 ab	16,64	15,26	1,45
960	0,39	2,41 b	19,57	14,67	1,48
CV (%)	103,93	32,13	22,93	30,92	39,49

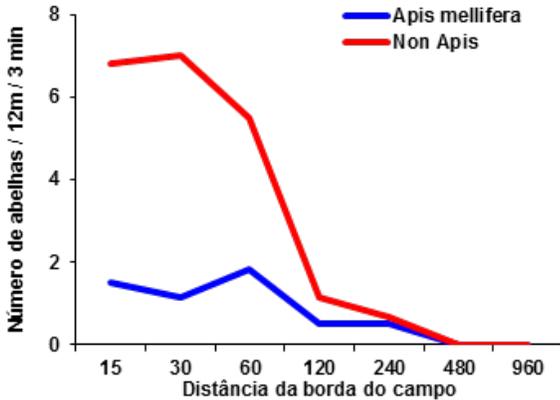
Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Experimento 2

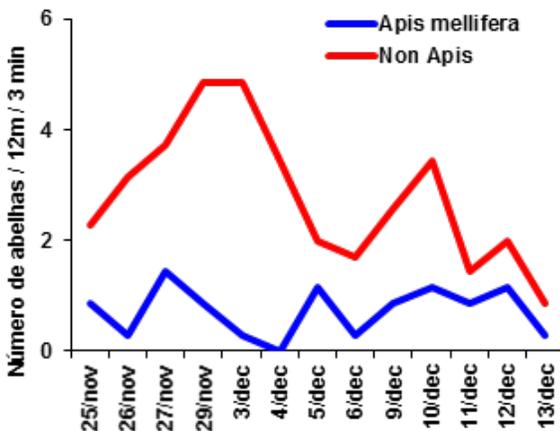
O experimento 2 seguiu a mesma metodologia descrita no experimento 1, sendo a única diferença a ausência de colmeias; uma de suas bordas foi posicionada a uma distância de aproximadamente 2 km do experimento 1. O fragmento de cerrado foi considerado como de baixo potencial de repositório de abelhas, devido à escassez de recursos em função da baixa densidade de plantas e da estreita faixa de vegetação nativa (90 m).

Em média foram registrados 0,79 indivíduos de *A. mellifera* observados em 12 m de linha de soja, durante o tempo de amostragem de 3 min. Este número muito baixo de indivíduos deve-se à ausência de colmeias em uma faixa de aproximadamente 2 km da área do experimento e, provavelmente, nenhuma ou muito poucas colônias selvagens da espécie estavam presentes no fragmento de cerrado próximo ao campo. Observou-se uma tendência geral de menos indivíduos nas maiores distâncias do fragmento de cerrado (Figura 3). O número médio de abelhas nativas, não *Apis*, foi de 3,02 indivíduos observados ao longo de 12 m de linha de soja, durante 3 min. Nesse

caso, a redução de abelhas de acordo com a distância do fragmento de cerrado foi mais evidente, especialmente até 120 m, como pode ser percebido na Figura 4.



**Figura 3.** Número de abelhas observadas em diferentes distâncias da fronteira do campo de soja perto de um fragmento de cerrado, considerando todas as datas de amostragem.



**Figura 4.** Número médio de abelhas observadas em diferentes datas de amostragem, considerando todas as distâncias de um fragmento de cerrado.

O número de indivíduos de *A. mellifera* foi baixo e bastante semelhante ao longo do período de floração da soja, variando de 0 a 1,14 indivíduos observados em 12 m de linha de soja, durante 3 min (Figura 4). As abelhas nativas (não Apis) também apresentaram baixa população, porém com maior amplitude, variando entre 0,85 e 4,86 indivíduos registrados em 12 m de linha de soja, durante 3 min. A população de abelhas atingiu o pico em 29 de novembro e 3 de dezembro e mostrou a menor população na última data de amostragem (13 de dezembro).

A maioria dos indivíduos de *A. mellifera* (81,8%) concentrou-se até 60 m da borda do campo, próximo ao fragmento de cerrado. Nenhum indivíduo desta espécie foi encontrado a 480 ou 960 m da borda do campo. As abelhas nativas concentram-se ainda mais que *A. mellifera*, pois 91,3% dos indivíduos foram encontrados a até 60 m da borda do campo. Não foram registrados indivíduos nas distâncias de 480 e 960 m da borda do campo.

Não foram observadas diferenças significativas de rendimento para tratamentos, apesar de uma clara tendência de rendimentos reduzidos de acordo com a distância do fragmento de cerrado (Tabela 4).

**Tabela 4.** Rendimento, altura de planta, número de grãos por vagem e peso de 100 grãos de soja colhidos perto de um fragmento de cerrado.

Distância (m)	Rendimento (kg/ha)	Altura de Planta (cm)	N. Grãos/vagem	Peso de 100 grãos (g)
15	4.217	74,04	2,55	15,32
30	4.233	75,74	2,42	15,44
60	4.151	78,75	2,51	15,78
120	3.907	78,94	2,54	15,56
240	3.902	76,62	2,56	15,91
480	3.905	78,01	2,44	16,18
960	3.933	81,78	2,43	16,15
CV (%)	9,57	8,28	5,61	5,18

Quase todos os componentes de produção não apresentam diferenças significativas entre os tratamentos (Tabelas 4, 5 e 6), com exceção do número de vagens com 2 grãos (Tabela 6), com valores mais altos para o tratamento localizado a 15 m do fragmento de cerrado, em comparação com os demais. A explicação mais provável para a falta de diferenças significativas foi o baixo número de abelhas encontradas na área, devido à escassa densidade de plantas.

**Tabela 5.** Rendimento, altura de planta, número de grãos por vagem e peso de 100 grãos de soja colhidos perto de um fragmento de cerrado.

Distância (m)	N. vagens/planta	No grãos/planta	No Vagens 0+1 grão/planta	No Vagens 3+4 grãos/planta
15	45,75	116,45	4,27	24,97
30	39,70	95,57	4,77	20,60
60	37,82	95,01	4,00	21,91
120	39,68	100,96	3,63	22,29
240	39,95	102,40	3,23	23,23
480	32,37	79,88	3,79	17,90
960	34,20	82,35	4,73	18,07
CV (%)	23,63	24,98	47,74	27,72

**Tabela 6.** Número de vagens por planta, de acordo com o número de grãos de soja, cultivada próxima a um fragmento de cerrado com dez colmeias de *A. mellifera*.

Distancia (m)	Número de vagens por planta contendo				
	0 grãos	1 grão	2 grãos	3 grãos	4 grãos
15	1,04	3,23	16,14 a	22,19	2,78
30	1,90	2,86	14,34 b	18,37	2,23
60	1,04	2,96	11,92 c	19,42	2,49
120	0,32	3,31	13,76 b	19,03	3,26
240	0,16	3,07	13,48 b	20,57	2,66
480	1,14	2,65	10,69 c	15,73	2,17
960	1,68	3,05	11,40 c	15,77	2,30
CV (%)	172,38	24,39	24,63	27,97	35,48

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Conclusão

No experimento 1, as abelhas (*A. mellifera* e espécies não Apis) concentraram-se a até 60 m da borda do campo, onde também a produtividade de soja foi maior. O tratamento localizado mais próximo ao campo de soja próximo ao fragmento de cerrado (15 m) apresentou o maior rendimento significativamente diferente dos obtidos nas distâncias de 480 e 960 m. Quando

a soja é cultivada em habitats pobres para abelhas (Experimento 2), o número de indivíduos que visitam as flores não é o suficiente para fornecer polinização suplementar, reduzindo assim sua contribuição para o aumento da produtividade.

## Referências

AHRENT, D. K.; CAVINESS, C. E. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. **Crop Science**, v. 34, n. 2, p. 376-378, 1994.

CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. de A. A. de; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; ATTENCIA, V. M.; COSTA, F. M.; KOTAKA, C. S.; SAKAGUTI, E. S.; MAGALHÃES, H. R. Floral biology and behavior of Africanized honeybees *Apis mellifera* in soybean (*Glycine max* L. Merrill). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 367-378, 2005.

ERICKSON, E. H.; BERGER, G. A.; SHANNON, J. G.; ROBBINS, J. M. Honeybee pollination increases soybean yields in the Mississippi Delta region of Arkansas and Missouri. **Journal of Economic Entomology**, v. 71, n. 4, p. 601-603, 1978.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture: the international response. In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. (Ed.) **Solitary bees**: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. p. 19-25.

McGREGOR, S. E. **Insect pollination of cultivated crop plants**. Washington: USDA, 1976. 411 p.

## Genome-Wide Association Study (GWAS) para resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

CARDOSO, R. <sup>1</sup>; SILVA, A. C. da. <sup>2</sup>; SOUZA JUNIOR, H. de. <sup>3</sup>; FRESTRAS, L. A. <sup>1</sup>; KUWAHARA, M. K. <sup>4</sup>; SILVA, D. C. G. da <sup>4</sup>; ABDELNOOR, R. V. <sup>5</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. <sup>5</sup>

<sup>1</sup> UEL, Bolsista CAPES, Londrina, PR, rafaellacardoso\_@hotmail.com; <sup>2</sup> UFV; <sup>3</sup> UNOPAR; <sup>4</sup> Analista, Embrapa Soja, Laboratório de Genética Molecular e Seleção Assistida; <sup>5</sup> Pesquisador, Embrapa Soja.

### Introdução

A pústula bacteriana (PB), causada pela fitobactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, é uma doença grave que acomete a soja. Os sintomas da doença incluem lesões amareladas e amarronzadas, com a formação de pústulas na parte inferior das folhas, evoluindo para grandes áreas necróticas e resultando em um desfolhamento prematuro da planta, o que pode levar a perdas significativas na produção (Jones; Fett, 1987). No Brasil, a PB pode causar surtos epidêmicos nas principais regiões produtoras, quando em presença de condições favoráveis como alta umidade, temperaturas acima de 28 °C e uso de cultivares suscetíveis (Lanna Fiho, 2015).

Estudos anteriores identificaram que a resistência à PB é controlada por um único gene recessivo, identificado na variedade de soja CNS (PI 548445) (Hartwig; Lehman, 1951). Posteriormente, esse gene de resistência foi denominado *rxp* (Bernard; Weiss, 1973) e foi mapeado no cromossomo 17 (grupo de ligação D2) a 3,9 cM do marcador Satt372 e 12,4 cM de Satt014 (Palmer et al., 1992; Narvel et al., 2001). Estudos de mapeamento mais recentes realizados por Kim et al. (2010), utilizando uma população biparental de acessos coreanos (Taekwangkong e Danbaekkong), estreitou ainda mais o locus *rxp* para uma região de 33 kb, entre dois marcadores SNPs (SNUSNP17\_12 e SNUSSR17\_9), também no cromossomo 17. Além disso, QTLs menos expressivos também foram identificados para alguns isolados de *X. axonopodis*, sugerindo que a resistência a PB é controlada por um gene principal (*rxp*) e vários outros genes de efeito menor (Kim et al., 2004; Van et al., 2004). Adicionalmente, outros estudos também descreveram outros potenciais genes de resistência principais, além do *rxp* (Sharma et al., 1993; Manjaya;

Pawar et al., 1999; Kim et al., 2010). No entanto, esses estudos limitaram-se ao mapeamento de QTL em cruzamentos biparentais, o que pode limitar a resolução do mapeamento pelo pequeno número de eventos de recombinação capturados no desenvolvimento dessas populações e as fontes disponíveis (Bastien et al., 2014). Nesse contexto, o mapeamento associativo (*Genome-Wide Association Study* - GWAS) é uma interessante abordagem de mapeamento. Nessa técnica, um painel de indivíduos não relacionados é utilizado, permitindo capturar o histórico de eventos de recombinação ocorridos durante a evolução de uma espécie, levando assim, ao mapeamento mais preciso (Bastien et al., 2014). O uso da técnica de GWAS está bem elucidado na cultura da soja, a partir de uma variedade de estudos, que identificaram marcadores associados à resistência a doenças e produtividade (Hwang et al., 2014; Bastien et al., 2014).

Embora tenham sido realizados mapeamentos para identificar regiões associadas a resistência a doenças, apenas um estudo utilizou a técnica de GWAS para PB. Chang et al. (2016) realizaram um GWAS com um painel de 3.179 acessos de soja, associando os dados fenotípicos para essa doença obtidos no USDA-ARS GRIN Soybean Germplasm Collection (<https://www.ars-grin.gov>), com marcadores SNPs derivados do chip SoySNP50K adquiridos do banco de dados Soybase (<https://soybase.org>). O mapeamento levou à identificação de três SNPs significativos localizados nos cromossomos 1, 11 e 17. No entanto, esses resultados foram baseados em dados de fenotipagem previamente estabelecidos e o mapeamento identificou uma ampla região, possibilitando a ocorrência de eventos de recombinação entre marcadores e genes. Além disso, esses marcadores não são úteis na seleção assistida por marcadores em um programa de melhoramento genético (PMG) específico, que utiliza diferentes fontes de resistência, como por exemplo, cultivares brasileiras, as quais tiveram baixa contribuição no painel do referido trabalho. Portanto, análises adicionais são necessárias, buscando identificar mais SNPs que estão significativamente associados à resistência a pústula bacteriana.

Assim, o objetivo deste estudo foi conduzir um GWAS em um painel de genótipos composto por cultivares brasileiras de soja e plantas introduzidas (PIs), visando identificar marcadores SNPs associados à resistência a pústula bacteriana, para serem aplicados na seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento genético.

## Material e Métodos

### Material Vegetal

O material para a análise compreendeu um painel de 189 acessos de soja composto por 85 plantas introduzidas (PIs) e 104 cultivares brasileiras. O painel incluiu genótipos descritos anteriormente com diferentes padrões de resistência / suscetibilidade à pústula bacteriana. As sementes dos materiais foram obtidas no Banco de Germoplasma da Embrapa Soja. Os acessos Williams82 (PI 518671) e PI 416937 foram utilizados como controle resistente e suscetível, respectivamente.

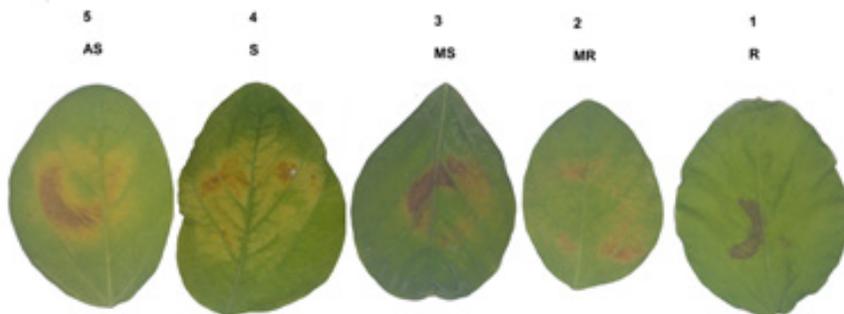
### Preparação do Isolado e avaliação fenotípica

O estudo foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Soja, Londrina-PR, Brasil. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições, incluindo três plantas em cada vaso. Para avaliar a reação a fitobactéria *X. axonopodis* pv. *glycines*, os acessos de soja foram infectados com um isolado da bactéria (IBS 333), obtido da coleção de microrganismos do Instituto Biológico de Campinas. Colônias individuais desse isolado foram armazenadas em glicerol e mantidas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para as preparações subsequentes.

Para a produção do inóculo, o isolado foi removido do freezer e foi mantido a temperatura ambiente por uma hora. Após esse período, 50  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foi transferida para tubos falcon (50 mL) contendo 10 mL de meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubados a  $28^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. Posteriormente, transferiu-se 200  $\mu\text{L}$  dessa suspensão para placas de Petri com meio NA (Nutrient Agar), com subsequente incubação a  $28^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas. A suspensão para inoculação foi produzida raspando as placas de Petri contendo o microrganismo cultivado, água destilada e NaCl (0,05%), obtendo-se uma concentração de  $10^8$  UFC / mL.

Quando os materiais atingiram o estágio de desenvolvimento V3 (quatro semanas após a semeadura), a suspensão bacteriana foi pulverizada em ambos os lados das folhas, com auxílio de um borrifador com espaçador, com o objetivo de manter a distância de inoculação padronizada. As condições da casa de vegetação incluíram alta umidade (100%) e temperaturas médias de  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ . A fenotipagem qualitativa de cada genótipo foi realizada sete dias

após a inoculação, utilizando a escala proposta por Kim et al. (2004), com modificações (Figura 1).



**Figura 1.** Resposta fenotípica à infecção por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em soja para o isolado IBS 333. O fenótipo foi classificado em uma escala variando de 1-5: (1) Resistente; (2) Moderadamente resistente; (3) Moderadamente suscetível; (4) Suscetível; (5) Altamente suscetível.

### Extração de DNA e preparação das bibliotecas de GBS

A genotipagem via GBS foi realizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Molecular e Seleção Assistida da Embrapa Soja, seguindo as etapas descritas a seguir. O DNA foi extraído a partir de 100 mg de folha jovem de uma única planta de cada genótipo de soja utilizando-se o kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen - Cat No. / ID: 69106), seguindo o protocolo do fabricante. Posteriormente, as amostras foram quantificadas usando um espectrofotômetro Nanodrop 8000 (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e diluídas para 10 ng /  $\mu$ l. As bibliotecas GBS (*Genotyping by Sequencing*) foram construídas de acordo com o método proposto por Elshire et al. (2011), com modificações descritas por Sonah et al. (2013). As etapas de preparação da biblioteca e o sequenciamento de GBS foram realizadas pelo Laboratório IBIS (*Institut de Biologie Intégrative et des Systemes*), da Universidade de Laval, Quebec, Canadá.

### Identificação de SNPs, GWAS e análise de haplótipos

O processamento dos dados obtidos pelo sequenciamento, a desmultiplexação de amostras, o mapeamento no genoma de referência, a chamada de SNP / indel e a genotipagem foram realizados pelo pipeline Fast-GBS, usando como referência o genoma da cultivar Williams82 (Wm82.a2) (Sonah, et

al., 2013). Todos os genótipos heterozigotos foram removidos e substituídos como dados perdidos e apenas SNPs com menos de 80% de dados perdidos foram mantidos. Os dados perdidos restantes foram imputados no software Beagle v.4.1 e apenas loci com frequência alélica mínima (MAF) > 0,01 foram reservados para análises posteriores.

O mapeamento associativo (GWAS) foi realizado utilizando-se o modelo linear misto comprimido (cMLM – *Compressed Mixed Linear Model*), por meio do software GAPIT (*Genomic Association and Prediction Integrated Tool*), implementado no programa R que leva em consideração a análise de estrutura populacional e a matriz parentesco (PCA + K). Para as análises de estrutura de população, foram utilizados os três primeiros componentes (PCs) obtidos da análise de componentes principais (PCA). Os valores críticos para avaliar a significância das associações entre o marcador e a característica, com o objetivo de eliminar falsos-positivos, foram calculados pelo p-value ajustado (FDR – False Discovery Rate), considerados significativos apenas os SNPs com valores abaixo de 0,001.

Para a análise de haplótipos formados pelas variações alélicas presentes nas regiões encontradas, foi realizada uma análise dos dados de genotipagem, por meio da inspeção manual da região.

## Resultados e Discussão

### *Avaliação da resistência a Xanthomonas axonopodis pv. glycines*

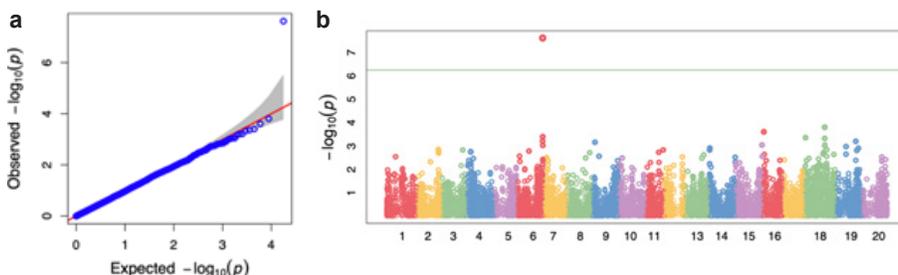
Nos 189 materiais avaliados neste trabalho, foram observadas as cinco classes fenotípicas (1, 2, 3, 4 e 5). A classe prevalecente foi a resistente, correspondendo a 64 genótipos, seguida pela suscetível (61), moderadamente resistente (28), altamente suscetível (19) e moderadamente suscetível (17), respectivamente. Dentre o total de materiais, para 153 foram encontradas informações prévias de fenotipagem na literatura, entretanto, muitas dessas não informaram o isolado utilizado. Alguns desses materiais apresentaram o resultado de fenotipagem compatível com o da literatura, entretanto, alguns não apresentaram o mesmo fenótipo quando avaliados com o isolado IBS 333. Os controles resistente (Williams82) e suscetível (PI 416937) apresentaram o fenótipo esperado. De acordo com Hwang e Lim (1998), dependendo

do isolado utilizado, a resistência a PB pode ser suplantada, sugerindo-se que essa possa ser controlada por um complexo de genes (Kim et al., 2004; Van et al., 2004). Esses resultados evidenciam a importância da fenotipagem para a identificação de novas fontes de resistência que possam ser utilizadas em PMG.

### Identificação, distribuição dos SNPs e mapeamento associativo para resistência a PB

Após a filtragem dos dados obtidos pelo sequenciamento GBS, foram observados 51.476 SNPs distribuídos ao longo dos 20 cromossomos. Foi observada distribuição uniforme entre todos os cromossomos, com uma média de 2.574 SNPs por cromossomo. De acordo com Bastien et al. (2014), a técnica de GBS é uma importante estratégia para identificação de SNPs, visto que consegue identificar marcadores distribuídos uniformemente ao longo do genoma a um menor custo.

Para o mapeamento associativo, utilizando-se o modelo cMLM, o gráfico QQ (*quantile-quantile plots*) apresentou *P-values* com crescimento linear (Figura 2a). Ainda na análise de associação, foi encontrado um SNP (T/C) associado significativamente com a característica de resistência a pústula bacteriana (P-value com FDR = 0,0004), no cromossomo 6 (Figura 2b). Embora algumas regiões associadas a resistência a PB já tenham sido descritas na literatura, a região encontrada no presente trabalho expõe uma nova região associada a resistência, podendo ser explorada na seleção assistida por marcadores.



**Figura 2.** (a). Gráfico QQ (*quantile-quantile plot*) de distribuição cumulativa de *P-value* do modelo cMLM utilizando a matriz PCA+K, no software GAPIT, para resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em soja. (b) *Manhattan plot* do GWAS para resistência a *X. axonopodis* pv. *glycines* utilizando-se o modelo cMLM. Um SNP (T/C) localizado no cromossomo 6 obteve valores significativos (FDR = 0.0004).

## Caracterização de Haplótipos

Analisando-se a distribuição do SNP significativamente associado à resistência nos 189 materiais utilizados no estudo e seus respectivos fenótipos, observou-se a prevalência do alelo “T” para os genótipos agrupados como resistentes (classes 1 e 2 – 64,136%) e “C” para os agrupados como suscetíveis (classes 3, 4 e 5 – 83,50%), conforme demonstrado pela Tabela 1. Sendo assim, a análise de haplótipo foi eficiente para a separação dos materiais de acordo com seu fenótipo.

**Tabela 1.** Distribuição do SNP (T/C) significativo, localizado no cromossomo 6, nas plantas com fenótipo resistente e suscetível. O “Het” corresponde a materiais cuja genotipagem indicou heterozigidade (T/C).

Fenótipo	Genotipagem		
	Resistente (T)	Suscetível (C)	Het (T/C)
Resistente	59/92 (64,136%)	25/92 (27,17%)	8/92 (8,69%)
Suscetível	10/97 (10,30%)	81/97 (83,50%)	6/97 (6,18%)
Total	189 materiais		

## Conclusão

Esse estudo permitiu a identificação de uma nova região associada a resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, compartilhada por cultivares brasileiras, que uma vez validada, poderá ser aplicada na seleção assistida por marcadores em programas de melhoramento genético. Isso possibilitará a dinamização das avaliações fenotípicas, com redução de tempo e custo para o desenvolvimento de cultivares resistentes, permitindo assim, o lançamento de novas cultivares no mercado em menor tempo.

## Referências

BASTIEN, M.; SONAH, H.; BELZILE, F. Genome wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean with a genotyping-by-sequencing approach. **The Plant Genome**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2014.

BERNARD, R. L.; WEISS, M. G. Qualitative genetics. In: CALDWELL, B. E. (Ed.). **Soybeans: improvement, production, and uses**. Madison: American Society of Agronomy, 1973. p. 117-154.

CHANG, H. X.; LIPKA, A. E.; DOMIER, L. L.; HARTMAN, G. L. Characterization of disease resistance loci in the USDA soybean germplasm collection using genome-wide association studies. **Phytopathology**, v. 106, n. 10, p. 1139-1151, 2016.

ELSHIRE, J.; GLAUBITZ, J. C.; SUN, Q.; POLAND, J. A.; KAWAMOTO, K.; MITCHELL, S. E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **Plos One**, v. 6, n. 5, e19379, 2011.

HARTWIG, E. E.; LEHMAN, S. G. Inheritance of resistance to the bacterial pustule disease in soybeans. **Agronomy Journal**, v. 43, p. 226-229, 1951.

HWANG, E. Y.; SONG, Q.; JIA, G.; SPECHT, J. E.; HYTEN, D. L.; COSTA, J.; CREGAN, P. B. A genome-wide association study of seed protein and oil content in soybean. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1-15, 2014.

HWANG, I.; LIM, S. M. Pathogenic variability in isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. **Korean Journal of Plant Pathology**, v. 14, p. 19-22, 1998.

JONES, S. B.; FETT, W. F. Bacterial pustule disease of soybean: microscopy of pustule development in a susceptible cultivar. **Phytopathology**, v. 77, n. 2, p. 266-274, 1987.

KIM, D. H.; KIM, K. H.; VAN, K.; KIM, M. Y.; LEE, S. H. Fine mapping of a resistance gene to bacterial leaf pustule in soybean. **Theoretical Applied Genetics**, v. 120, p. 1443-1450, 2010.

KIM, K. S.; VAN, K. J.; KIM, M. Y.; LEE, S. H. Development of molecular markers for *Xanthomonas axonopodis* resistance in soybean. **Korean Journal Crop Science**, v. 49, p. 429-433, 2004.

LANNA-FILHO, R. Fitobactérias da cultura da soja. In: LEMES, E.; CASTRO, L.; ASSIS, R. (Eds.). **Doenças da soja: melhoramento genético e técnicas de manejo**. Campinas: Millennium, 2015. p. 81-92.

MANJAYA, J. G.; PAWAR, S. E. New genes for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and their inheritance. **Euphytica**, v. 106, p. 205-208, 1999.

NARVEL, J. M.; JAKKULA, D. V.; PHILLIPS, T.; WANG, S. H.; LEE, S. H.; BOERMA, H. R. Molecular mapping of *Rxp* conditioning reaction to bacterial pustule in soybean. **Journal of Heredity**, v. 92, p. 267-270, 2001.

PALMER, R. G.; LIM, S. M.; HEDGES, B. R. Testing for linkage between the *Rxp* locus and nine isozyme loci in soybean. **Crop Science**, v. 32, p. 681-683, 1992.

SHARMA, A.; NAIR, P. M.; PAWAR, S. E. Identification of soybean strains resistant to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. **Euphytica**, v. 67, p. 95-99, 1993.

SONAH, H.; BASTIEN, M.; IQUIRA, E.; TARDIVEL, A.; LÉGARÉ, G.; BOYLE, B.; NORMANDEAU, E.; LAROCHE, J.; LAROSE, S.; JEAN, M.; BELZILE, F. An improved genotyping by sequencing (GBS) approach offering increased versatility and efficiency of SNP discovery and genotyping. **Plos One**, v. 8, e54603, 2013.

VAN, K.; HA, B. K.; KIM, M. Y.; MOON, K. J.; LEE, S. H. SSR mapping of genes conditioning soybean resistance to six isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. **Korean Journal of Genetics**, v. 26, p. 47-54, 2004.

# Produtividade da soja em função da distância de um apiário médio

LOT, F. D.<sup>1</sup>; GAZZONI, D. L.<sup>2</sup>; OLIVEIRA, C. H.<sup>3</sup>; GIEHL, A. M.<sup>3</sup>; BARATEIRO, J. V. G. R. P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia, Graduação em Agronomia, Londrina, PR, felipedutralot@gmail.com; <sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Soja; <sup>3</sup>Graduando de Agronomia; <sup>4</sup> Mestrando em Produção e Proteção Vegetal, Londrina, PR.

## Introdução

A soja é considerada uma planta autógama, cleistogâmica e autopolinizável. Na maioria das flores de soja, quando sobrevém a antese, já ocorreu a autofecundação. Após a abertura, o estigma do pistilo é coberto pelas anteras dos estames, o que torna muito difícil para o pólen proveniente de outras flores atingi-lo, sendo a taxa de polinização cruzada estimada em torno de 2% (Gazzoni, 2017).

Dentre os vários agentes polinizadores, destacam-se os insetos, por serem abundantes na natureza e ajustarem-se perfeitamente às diferentes estruturas florais (Free, 1993). Estima-se que, aproximadamente, 73% das espécies vegetais cultivadas no mundo sejam polinizadas por alguma espécie de abelhas (FAO, 2004).

A interação entre as abelhas e plantas garantiu aos vegetais o sucesso na polinização cruzada, que constitui uma importante adaptação evolutiva das plantas, aumentando o vigor das espécies, possibilitando novas combinações de fatores hereditários e aumentando a produção de frutos e sementes (Couto; Couto, 2002).

A espécie *Apis mellifera*, tem sido utilizada como polinizadora em diversas culturas agrícolas com sucesso, em função, principalmente, da diversidade de espécies de plantas que visita (Free, 1993; Freitas, 1998). Em um estudo realizado por Monasterolo et al. (2015) em uma lavoura de soja ao lado de uma floresta, a espécie *A. mellifera* foi mais abundante encontrada em flores de soja, em todas as distâncias do ponto de amostragem até a floresta.

De acordo com dados da Conab (2020), na safra 2019/2020 o Brasil produziu 124 Mt de soja, em cerca de 36 Mha de área plantada. A expansão da área

da soja acentua a proximidade cada vez maior das lavouras do grão com os apiários. Ao mesmo tempo, cada vez mais agricultores estão colocando seus apiários nas proximidades das lavouras de soja, o que demanda estudos sobre a relação entre soja e abelhas. Este trabalho objetivou investigar o rendimento da soja e seus componentes, em função da presença de um apiário médio nas bordas da lavoura.

## Material e Métodos

O experimento foi instalado na Fazenda Girassol do Prata, localizada em Jaciara, MT. A área foi selecionada dentro de um talhão de uma lavoura comercial de, aproximadamente, 5.000 ha, onde não havia a presença de áreas nativas nas proximidades, para reduzir a um mínimo a visitação de espécies de abelhas nativas nas parcelas experimentais, uma vez que o objetivo principal era o estudo da relação da soja com *A. mellifera*. Para tanto foram colocadas 110 colmeias dessa espécie na borda da lavoura (16° 13' 08"S; 55° 15' 06"W), sendo que a borda distal do campo experimental se localizava a 960 m do apiário (16° 12' 59" S; 55° 14' 40" W) (Figura 1).



**Figura 1.** Imagem de satélite com a localização do experimento.

Os tratamentos consistiram em distâncias de 15, 30, 60, 120, 240, 480 e 960 m da borda da lavoura próxima ao apiário, com 6 repetições distribuídas em

transectos paralelos entre si e perpendiculares a esta borda, separadas por 25 m de distância. Em cada ponto acima referido foram colocadas estacas encimadas por uma bandeirola branca e identificadas com uma etiqueta contendo a distância do apiário e o número da repetição.

O sistema de produção de soja foi de responsabilidade da administração da fazenda, sem qualquer interferência de nossa parte. A área foi semeada com a cultivar de soja BMX 75i77, em 11/10/2019, em filas separadas por 50 cm, com densidade média de 16 plantas por metro. Sempre que uma aplicação de inseticida era necessária, o administrador da fazenda nos comunicava com 24 h de antecedência, permitindo o fechamento das colmeias, a fim de evitar qualquer impacto deletério de pesticidas nas colônias.

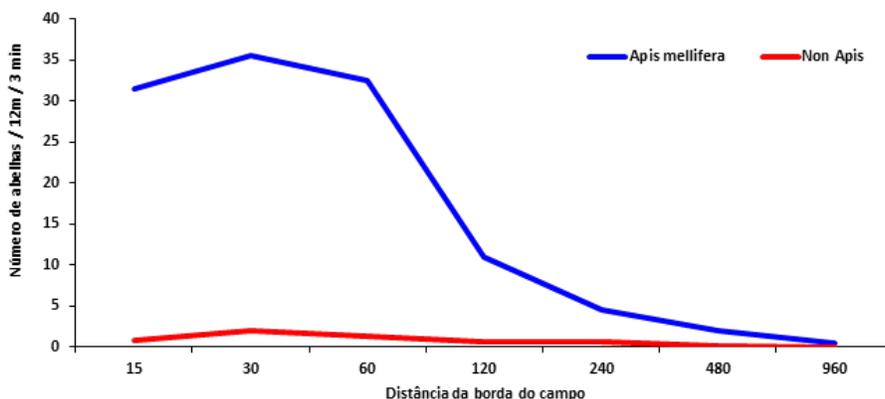
Entre 22/11/2019 e 16/12/2019 foram realizadas 11 amostragens nas proximidades de cada uma das estacas que demarcava os pontos correspondentes às distâncias do apiário. Para tanto, um observador se posicionava entre duas filas de soja, permanecendo imóvel por um minuto, após o que anotava os espécimes de *A. mellifera* ou de outra abelha que sobrevoasse ou pousasse em plantas de soja localizadas em 1m das duas linhas de soja à sua frente, durante 3 minutos.

Na época da colheita, 3 m de duas linhas de soja foram colhidas em cada um dos pontos de amostragem para mensuração da produtividade, além de 1m linha que foi colhido para avaliar os componentes da produção. Os dados foram submetidos à análise da variância e as diferenças entre médias discriminadas com o auxílio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Do total de abelhas observadas nas amostragens realizada, 95,3% pertenciam à espécie *A. mellifera*, com baixa coleta de outras espécies. Os resultados correspondem à expectativa, posto que não existiam formações de vegetação nativa nas proximidades da área experimental, que pudessem servir como repositório dessas espécies.

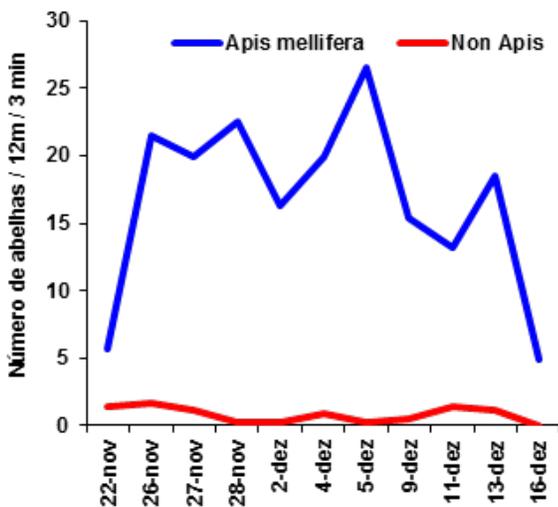
A Figura 2 mostra a diferença de coleta entre *A. mellifera* e outras espécies, bem como o forte declínio da população a partir de 120 m da borda do campo.



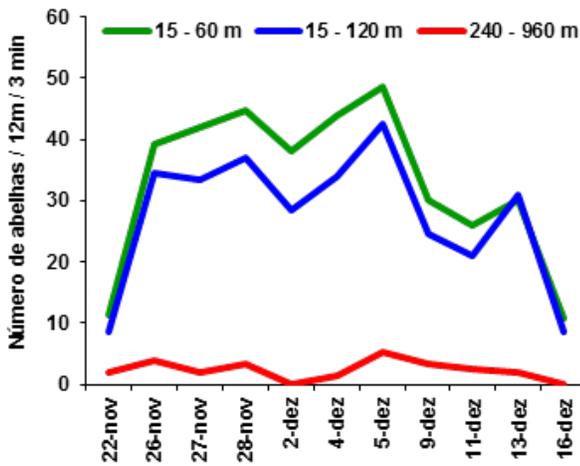
**Figura 2.** Número de indivíduos de *Apis mellifera* e de outras espécies de abelhas, em função da distância da borda do campo de soja.

As amostragens, iniciadas no estágio R1 da soja, mostraram que a visitação de abelhas se concentrou no período compreendido entre 26/11 e 14/12/2019, que apresentou média de 19,3 abelhas / 12m / 3min, enquanto a média da primeira e última amostragem foi de 5,29 (Figura 3).

A distribuição das abelhas no campo, em função da distância da borda, mostrou que a maior concentração ocorreu nas distâncias até 60 m (57%) ou 120 m (84,7%) da borda do campo (Figura 4). Poucas abelhas foram encontradas nas distâncias de 480 m (3,9%) e 960 m (1,7%) da borda, considerando a média de todas as datas de amostragens.



**Figura 3.** Número de indivíduos de *Apis mellifera* e de outras abelhas, em função da data de coleta das amostras.



**Figura 4.** Número de indivíduos de *Apis mellifera* até 120m entre 240 e 960 m de distância da borda do campo de soja.

A produtividade média da área experimental foi de 4.112 kg/ha. Observou-se uma tendência de redução da produtividade da soja à medida em que aumentava a distância em relação às colmeias posicionadas na borda da cultura (Tabela 1). O tratamento mais próximo das colmeias (15 m da borda) não diferiu da distância seguinte (30 m), porém foi estatisticamente diferente dos demais.

**Tabela 1.** Rendimento, altura da planta, número de grãos por vagem e peso de 100 grãos de soja de acordo com a distância de um fragmento cento e dez colmeias de *A. mellifera*.

Distância (m)	Altura da planta (cm)	Nº. Grãos/Vagens	Peso de 100 grãos (g)	Produtividade (kg/ha)
15	65,49	2,49 a	16,81	4.613 a
30	59,77	2,38 b	16,62	4.404 ab
60	61,03	2,36 b	16,48	4.047 b
120	62,60	2,33 b	16,37	3.880 b
240	61,19	2,28 b	16,48	3.877 b
480	65,24	2,30 b	16,42	3.934 b
960	67,37	2,28 b	16,43	4.025 b
CV (%)	7,79	3,92	2,93	11,02

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A média de produtividade de soja até 30 m das colmeias foi de 4.509 kg/ha, sendo 12% superior à média das distâncias iguais ou superiores a 60 m, que

foi de 4.028 kg/ha. A maior diferença de produção foi observada entre os tratamentos de 15 m e 960 m, de 588 kg/ha, equivalendo a 12,7% de diferença.

O número de grãos por vagem aos 15 m de distância foi significativamente superior aos demais tratamentos, devido ao maior número de vagens e de grãos por planta e, em especial, de vagens com 2, 3 e 4 grãos por planta (Tabelas 2 e 3) na distância de 15 m, os quais tenderam a diminuir nas maiores distâncias. Nenhuma tendência clara foi observada para o peso de 100 grãos ou para o número de vagens por planta, não havendo diferença significativa entre os tratamentos.

**Tabela 2.** Número de vagens por planta, grãos por planta, vagens com grãos 0 e 1 e 3 e 4 grãos de soja de acordo com distância de um fragmento de cento e dez colmeias de *A. mellifera*.

Distância (m)	Nº Vagens/planta	Nº Grãos/planta	Nº Vagens 0+1 Grãos/planta	Nº. Vagens 3+4 Grãos/planta
15	50,13 a	123,09 a	3,26 bc	26,02 a
30	32,47 b	77,15 b	3,00 bc	15,03 b
60	29,95 b	70,84 b	2,84 c	13,58 bc
120	31,79 b	73,94 b	3,73 ab	14,06 bc
240	24,92 b	56,70 b	3,40 ab	10,30 c
480	29,71 b	68,08 b	4,36 a	12,72 bc
960	30,01 b	68,64 b	3,99 ab	12,53 bc
CV(%)	28,11	31,12	25,63	37,64

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foram constatadas diferenças significativas para o número de vagens por planta contendo 1 grão (Tabela 3) e para a soma de vagens contendo 0 e 1 grão, mas em ambos os casos, não foi encontrada nenhuma tendência clara que pudesse estar associada às distâncias da borda do campo.

**Tabela 3.** Número de vagens por planta, de acordo com o número de grãos, de soja cultivada próxima a um fragmento de cento e dez colmeias de *A. mellifera*.

Distância (m)	Número de vagens por planta contendo				
	0 grãos	1 grão	2 grãos	3 grãos	4 grãos
15	0,41	2,84 ab	20,85 a	25,55 a	0,48 a
30	0,09	2,91 ab	14,43 b	14,75 b	0,28 b
60	0,11	2,73 b	13,53 bc	13,27 b	0,31 ab
120	0,15	3,58 ab	14,00 b	13,88 b	0,18 bc
240	0,19	3,21 ab	11,22 d	10,15 b	0,15 c
480	0,09	4,27 a	12,86 cd	12,43 b	0,29 b
960	0,17	3,81 ab	13,50 bcd	12,29 b	0,24 bc
CV (%)	126,68	26,99	26,37	37,58	61,31

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## Conclusão

Observou-se que a visitação das abelhas se concentrou até a distância de 60 m das colmeias colocadas na borda do campo de soja. Verificou-se maior produtividade da soja cultivada até 30 m da borda da lavoura próxima às colmeias de abelhas, em decorrência do aumento do número de grãos por vagem, do número de vagens e de sementes por planta, e de maior número de vagens com 2, 3 e 4 grãos. As produtividades de soja mais elevadas estavam associadas com as distâncias em que foram observadas maior número de indivíduos de *A. mellifera* visitando a soja.

## Referências

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos: safra 2019/20: oitavo levantamento, v. 7, n. 8, maio 2020. Brasília, DF, 2020. 66 p. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31816\\_8205b9f47c0cc1c35be2d0a2cc5c7322](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31816_8205b9f47c0cc1c35be2d0a2cc5c7322). Acesso em: 15 jun. 2020.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura:** manejo e produtos. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2002. 191 p.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture: the international response. In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. (Eds.) **Solitary bees:** conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2004. p. 19-25.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. London: Academic Press, 1993. 684 p.

FREITAS, B. M. A importância relativa de *Apis mellifera* e outras espécies de abelhas na polinização de culturas agrícolas. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 3., 1998, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: USP/FFCLRP, 1998. p. 10-19.

GAZZONI, D. L. **Soja e abelhas**. Brasília, DF: Embrapa, 2017. 151 p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1068703/1/livroSOJAEABELHASonline.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2020.

MONASTEROLO, M.; MUSICANTE, M. L.; VALLADARES, G. R.; SALVO, A. Soybean crops may benefit from forest pollinators. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 202, p. 217- 222, 2015.

# Prospecção de genes ortólogos de fitonematoides visando estratégias de amplo alcance

NOMURA, R. B. G.<sup>1</sup>; HISHINUMA-SILVA, S. M.<sup>1</sup>; LOPES-CAITAR, V. S.<sup>2</sup>; NASCIMENTO, L. C.<sup>3</sup>; DIAS, W. P.<sup>4</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UEL, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Londrina, PR, rafaelguayato@gmail.com; <sup>2</sup>Department of Plant Sciences, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, USA; <sup>3</sup>UNICAMP, Laboratório de Genômica e Expressão (LGE), Instituto de Biologia, Campinas, SP. <sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

## Introdução

Apesar da elevada produtividade da cultura da soja mundialmente, a produção dessa *commoditie* é constantemente afetada por diversos fatores, tanto abióticos quanto bióticos. Pragas e patógenos atacam essa cultura em diferentes estágios de desenvolvimento, ocasionando grandes prejuízos. Dentre os patógenos, a ocorrência de fitonematoides é frequente nas áreas produtoras. Esses patógenos parasitam o sistema radicular das plantas, reduzindo a absorção de água e nutrientes, e, conseqüentemente, a produtividade (Lopes, 2012). Somente no Brasil, é estimado um prejuízo anual na cerca de R\$ 16 bilhões somente para a sojicultura (Machado, 2015).

Diversas são as estratégias para o controle dos fitonematoides. A rotação de culturas utilizando variedades que apresentem tolerância/resistência, os nematicidas e o controle biológico são bastante empregados, porém apresentam limitações frente à presença de diferentes espécies desses parasitas. A resistência genética também é explorada (Zhang et al., 2016; Passianotto et al., 2017; Hada et al., 2020), entretanto, são poucas as fontes com ampla resistência para introgressão nos programas de melhoramento. Ainda, cultivares geneticamente modificados (GM) baseados em estratégias de superexpressão ou silenciamento gênico vêm sendo testadas em muitas culturas (Atkinson et al., 2012; Fosu-Nyarko; Jones, 2015), mas apresentam elevado custo e um longo tempo para seu desenvolvimento.

Dessa forma, estratégias de controle de amplo alcance, com possibilidade de afetar diferentes organismos fitopatogênicos, apresentam um grande potencial. Nesse contexto, este trabalho buscou identificar famílias gênicas “compartilhadas” por diferentes espécies (ortólogos) de fitonematoides, com base

na disponibilidade de genomas e transcriptomas das diferentes espécies, visando a prospecção de alvos que possam ser empregados em estratégias biotecnológicas com alcance para um maior número de espécies.

## Material e Métodos

Para identificar famílias multigênicas conservadas entre proteínas preditas de fitonematóides e do nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, foi realizada uma análise de clusterização utilizando o software OrthoMCL (Li et al., 2003). Os dados utilizados para a construção das famílias multigênicas estão descritos na Tabela 1.

Esse painel de sequências proteicas foi compilado em um único arquivo FASTA, que foi utilizado no software OrthoMCL versão 1.4 (<http://orthomcl.org/common/downloads/software/unsupported/v1.4/>) utilizando os parâmetros “MCL padrão” e “inflation parameter” de 1.5. Assim, baseado na similaridade das sequências proteicas, foi realizado o agrupamento das famílias multigênicas OrthoMCL. A análise comparativa foi realizada utilizando como parâmetro a identificação de sequências compartilhadas por todas as espécies de fitonematóides e ausentes no nematoide de vida livre *C. elegans*, de modo a gerar um conjunto de famílias específica a nematoides parasitas de plantas.

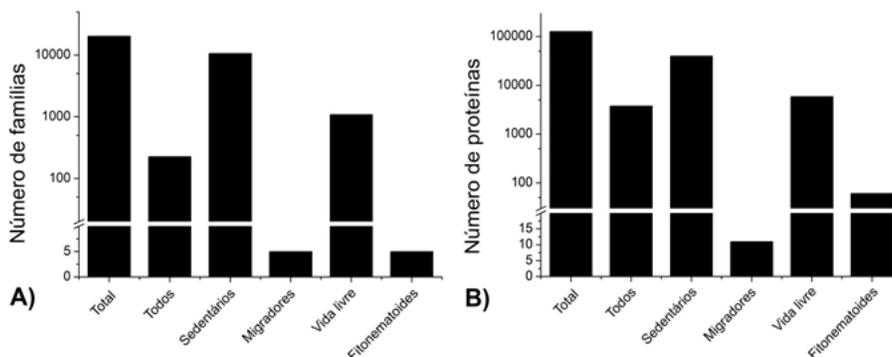
Tabela 1. Painel de sequências utilizadas na análise de clusterização.

Organismo	Formato	Proteínas preditas	Banco de dados	Estilo de vida	Principais hospedeiros
<i>Pratylenchus brachyurus</i>	Transcriptoma	8,331	Laboratório (dados não publicados)	Migrador	Soja, milho, feijão, amendoim, cana-de-açúcar, algodão, café, batata, entre outros (Ferraz, 1999).
<i>Meloidogyne javanica</i>	Genoma	25,623	WormBase Parasite	Sedentário	Soja, arroz, feijão, girassol, cana-de-açúcar, entre outros (Goodey et al., 1965).
<i>Meloidogyne incognita</i>	Genoma	22,862	WormBase Parasite	Sedentário	Soja, algodão, milho, girassol, feijão, arroz, entre outros (Sasser; Sasser, 1979).
<i>Meloidogyne arenária</i>	Genoma	30,223	WormBase Parasite	Sedentário	Amendoim, soja, milho, feijão, café, cana-de-açúcar, tomate, entre outros (Taylor et al., 1982).
<i>Meloidogyne graminicola</i>	Genoma	10,895	WormBase Parasite	Sedentário	Arroz e gramíneas (Siciliano et al., 1990).
<i>Heterodera glycines</i>	Genoma	32,253	WormBase Parasite	Sedentário	Soja, feijão, tomate, tabaco, entre outros (Riggs, 1992).
<i>Globodera pallida</i>	Genoma	16,403	WormBase Parasite	Sedentário	Batata, tomate, berinjela, entre outros (Sullivan et al., 2007).
<i>Ditylenchus destructor</i>	Genoma	13,938	WormBase Parasite	Migrador	Batata, batata doce, soja, cana-de-açúcar, trigo, girassol, cevada, tomate, entre outros (Gonzaga; Oliveira, 2018).
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Genoma	61,541	WormBase Parasite	Vida livre	
<b>Total</b>	-	222,069	-		

## Resultados e Discussão

### OrthoMCL: Visão geral

As proteínas preditas do painel contendo 8 fitonematoides e o nematoide de vida livre *C. elegans* foram agrupadas com base na similaridade das sequências, resultando nas famílias gênicas através de OrthoMCL. Foi possível identificar 20.322 famílias multigênicas com ao menos duas sequências. Essas famílias compreendem 126.741 sequências proteicas únicas. O maior número de famílias foi observado entre aquelas comuns aos nematoides sedentários, com 10.619 famílias OrthoMCL compreendendo 39.946 proteínas distribuídas entre as espécies, seguida pelas proteínas exclusivas do nematoide de vida livre *C. elegans*, com 1.084 famílias e 5.880 proteínas. Famílias comuns somente aos nematoides migradores foram apenas 5, assim como aos compartilhados por todos os fitonematoides (Figura 1).



**Figura 1.** (A) Famílias multigênicas identificadas. (B) Proteínas preditas compreendendo essas famílias.

### Proteínas exclusivas de fitonematoides

Em relação às famílias compartilhadas por todos os fitonematoides utilizados na análise e ausentes no nematoide de vida livre *C. elegans*, foram identificadas 5 famílias multigênicas, conforme Tabela 2. A família que compreende o maior número de proteínas preditas é a família ORTHOMCL684, com 18 sequências únicas. Essa família possui anotação de “chaperone, HSP20”, uma pequena proteína de choque térmico. Essas proteínas atuam na remodelação de proteínas desnaturadas tanto por fatores bióticos como abióticos (Sarkar et al., 2009).

A segunda família em número de proteínas foi a ORTHOMCL1437, com anotação funcional de “Superfamily, MFS, Transporter”, com 14 sequências únicas. Essas proteínas podem transportar seletivamente uma ampla gama de substratos através de membranas, exercendo importante papel em múltiplos processos fisiológicos (Yan, 2013). Já a família ORTHOMCL2362, anotada como “Chromo domain” apresentou 12 proteínas compartilhadas. Estão potencialmente envolvidas no metabolismo de cromatina. Podem estar localizadas em sítios de heterocromatina e podem mediar silenciamento gênico, sendo necessárias para o endereçamento e repressão transcricional (Bannister et al., 2001). Finalmente, a família ORTHOMCL4836, anotada como “NAD(P)-binding”, uma catalase que atua como antioxidante frente a estresse oxidativo (Vicente et al., 2015).

**Tabela 2.** Famílias compartilhadas por todos os fitonematóides utilizados para análise de OrthoMCL.

Família	Anotação	Nº de proteínas
ORTHOMCL684	Chaperone, HSP20	18
ORTHOMCL1437	Superfamily, MFS, Transporter	14
ORTHOMCL2362	Chromo domain	12
ORTHOMCL4836	NAD(P)-binding	9
ORTHOMCL5625	Carboxypeptidase	8
Total	-	61

Finalmente, foi identificada a família ORTHOMCL5625, anotada como “Carboxypeptidase”. Essa classe de proteínas atua hidrolisando peptídeos e proteínas. Exercem importante função no desenvolvimento, invasão e patogenicidade de nematóides. Recentemente, uma carboxypeptidase do fitonematóide *Radopholus similis* foi caracterizada como importante no processo de infecção desse nematóide. Seu silenciamento interferiu significativamente no estabelecimento desse nematóide em plantas de antúrio (Huang et al., 2017).

## Conclusão

A análise de clusterização permitiu a identificação de pelo menos 5 famílias gênicas compartilhadas por uma ampla gama de espécies de fitonematoides parasitas. Tais genes podem constituir importantes alvos para o desenvolvimento de estratégias de controle, por exemplo, através da utilização de RNAi.

## Referências

- ATKINSON, H. J.; LILLEY, C. J.; URWIN, P. E. Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 251-256, 2012.
- BANNISTER, A. J.; ZEGERMAN, P.; PARTRIDGE, J. F.; MISHA, E. A.; THOMAS, J. O.; ALLSHIRE, R. C.; KOUZARIDES, T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 120-124, 2001.
- FERRAZ, L. C. C. B. Gênero *Pratylenchus* - os nematoides das lesões radiculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 7, n. 1, p. 157-195, 1999.
- FOSU-NYARKO, J.; JONES, M. G. K. Application of biotechnology for nematode control in crop plants. **Advances in Botanical Research**, v. 73, p. 339-376, 2015.
- GONZAGA, V.; OLIVEIRA, C. M. G. *Ditylenchus destructor* Thorne (Tylenchida: Anguinidae). In: FIDELIS, E. G.; LOHMANN, T. R.; SILVA, M. L. da; PARIZZI, P.; BARBOSA, F. F. L. (Ed.). **Priorização de pragas quarentenárias ausentes no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 277-291.
- GOODEY, J. B.; FRANKLIN, M. T.; HOOPER, D. J. T. **Goodey's The nematode parasites of plants catalogued under their hosts**. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1965. 214 p.
- HADA, A.; DUTTA, T. K.; SINGH, N.; RAI, V.; SINGH, N. K.; RAO, U. A genome-wide association study in Indian wild rice accessions for resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne graminicola*. **Research Square**, 11 mar. 2020. (Preprint123250). DOI: 10.21203/rs.3.rs-17007/v1.
- HUANG, X.; XU, C. L.; CHEN, W. Z.; CHEN, C.; XIE, H. Cloning and characterization of the first serine carboxypeptidase from a plant parasitic nematode, *Radopholus similis*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.
- LI, L.; STOECKERT, C. J.; ROOS, D. S. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Research**, v. 13, n. 9, p. 2178-2189, 2003.
- LOPES, V. S. **Caracterização da família de genes HSP20 em *Glycine max***. 2012. 169 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Londrina.

MACHADO, A. C. Z. Praga custa R\$ 35 bilhões ao agronegócio brasileiro. **Revista Agrícola**, v. 24, 16 nov. 2015. Disponível em: <http://www.ragricola.com.br/destaque/ataques-de-nematoides-custam-r-35-bilhoes-ao-agronegocio-brasileiro/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

PASSIANOTTO, A. L. de L.; SONAH, H.; DIAS, W. P.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; BELZILE, F.; ABDELNOOR, R. V. Genome-wide association study for resistance to the southern root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in soybean. **Molecular Breeding**, v. 37, n. 12, p. 148, 2017.

RIGGS, R. D. Host range. In: RIGGS, R. D.; WRATHER, J. A. (Eds.). **Biology and management of the soybean cyst nematode**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992. p. 107-114.

SARKAR, N.; KIM, Y.; GROVER, A. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. **BMC Genomics**, v. 10, p. 393, 2009. DOI:10.1186/1471-2164-10-393.

SASSER, J. N. Economic importance of *Meloidogyne* in tropical countries. In: LAMBERT, F.; TAYLOR, C. E. (Eds.). **Root-knot nematodes (*Meloidogyne* species): sistematias, biology and control**. London: Academic, 1979. p. 359-374.

SICILIANO, S. R.; FERRAZ, L. C. C. B.; MONTEIRO, A. R. Host range of *Meloidogyne graminicola* in Brazil: primary study. **Nematologia Brasileira**, v. 14, p. 121-130, 1990.

SULLIVAN, M. J.; INSERRA, R. N.; FRANCO, J.; MORENO-LEHEUDE, I.; GRECO, N. Potato cyst nematodes: plant host status and their regulatory impact. **Nematropica**, v. 37, p. 193-201, 2007.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N.; NELSON, L. A. **Relationship of climate and soil characteristics to geographical distribution of *Meloidogyne* species in agricultural soils**. Raleigh: Department of Plant Pathology, North Carolina State University & US Agency for International Development, 1982. 65 p. (International Meloidogyne Project, Contract No. AID/ta-c-1234).

VICENTE, C. S. L.; IKUYO, Y.; SHINYA, R.; MOTA, M.; HASEGAWA, K. Catalases induction in high virulence pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* under hydrogen peroxide-induced stress. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0123839.

YAN, N. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 38, n. 3, p. 151-159, 2013.

ZHANG, H.; LI, C.; DAVIS, E. L.; WANG, J.; GRIFFIN, J. D.; KOFISKY, J.; SONG, B. H. Genome-wide association study of resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) HG Type 2.5.7 in wild soybean (*Glycine soja*). **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1214, 2016.

## Perfil transcricional do gene *GmHsp22.4* sob infecção pelo nematoide das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*

PINTO, R. A. S.<sup>1</sup>; NOMURA, R. B. G.<sup>2</sup>; LOPES-CAITAR, V. S.<sup>3</sup>; HISHINUMA-SILVA, S. M.<sup>2</sup>; DIAS, W. P.<sup>4</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>UENP, reennan.augusto@outlook.com, <sup>2</sup>UEL, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Londrina, PR; <sup>3</sup>Department of Plant Sciences, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee, USA; <sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

### Introdução

No âmbito mundial, o Brasil é um dos maiores produtores de *commodities* agrícolas. Dentre estas, a soja (*Glycine max*) ocupa um patamar de destaque. Na safra atual, o Brasil alcançou o status de maior produtor mundial, superando os Estados Unidos, com a produção de mais de 126 milhões de toneladas. Adicionalmente, o país é considerado o maior exportador mundial. Dessa forma, a produção brasileira dessa leguminosa enquadra-se como a maior cultura, no Brasil, em extensão de área e volume, representando, dessa maneira, 48% do total de grãos produzidos em 2019 no país (Conab, 2020).

Sendo assim, a obtenção de grande produtividade está atrelada à utilização da rotação de culturas, pois auxilia na recuperação do solo devido à maior produção de fitomassa, assim como, o fornecimento adicional de nitrogênio no solo (Franchini et al., 2011). Um problema recorrente e de altos impactos negativos para a agricultura são os problemas ocasionados por nematoides, os quais podem levar a danos entre 15 e 21% da produtividade em média, já sendo observadas perdas de até 60% da produtividade, a qual inviabiliza a produção de determinada cultura (Steffen; Steffen, 2018). Dessa forma, os nematoides causam anualmente prejuízos na casa dos R\$ 35 bilhões no agronegócio brasileiro, sendo que somente para a cultura da soja são estimadas perdas superiores a R\$ 16 bilhões anuais (Machado, 2015). Dentre as principais espécies que infectam a soja no Brasil, merecem destaque os formadores de galha do gênero *Meloidogyne* (*M. javanica* e *M. incognita*), o nematoide formador de cistos *Heterodera glycines*, o reniforme *Rotylechus reniformis* e o nematoide causador das lesões radiculares *Pratylenchus brachyurus*.

Atualmente, no Brasil, *P. brachyurus* tem sido considerado como o segundo fitonematoide de maior importância para a agricultura, ficando atrás apenas dos formadores de galha (Gabia, 2019). Trata-se de uma espécie com elevada polifagia, sendo capaz de parasitar a grande maioria das espécies vegetais, o que inabilita a rotação de culturas como uma estratégia para o seu controle. Essa polifagia é favorecida pelo fato de que para o estabelecimento do parasitismo desse nematoide, não há a necessidade da formação de nenhuma célula especializada de alimentação, como ocorre com os formadores de galha e de cisto. Além disso, diferente de outras espécies, todas as formas larvais de *P. brachyurus* são infectivas, o que eleva ainda mais o seu potencial de infecção, que ocorre pela penetração e movimentação nas células do parênquima cortical do hospedeiro, ocasionando assim as “lesões radiculares”, comprometendo a absorção de água e nutrientes e consequentemente reduzindo a produtividade, podendo inclusive resultar na morte da planta (Goulart, 2008).

Dadas as dificuldades no manejo de *P. brachyurus*, visto que, as medidas tradicionais apresentam limitação frente a esse nematoide, principalmente pela sua elevada polifagia, ausência de fontes resistentes, ineficácia e problemas decorrentes do uso excessivo de nematicidas, há a necessidade de se recorrer a novas estratégias. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta de resistência a esse nematoide é importante para auxiliar no desenvolvimento de estratégias biotecnológicas para o seu controle.

Trabalhos prévios têm demonstrado o envolvimento das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein* – HSPs), em especial as de baixo peso molecular (HSP20), na resposta aos estresses bióticos e abióticos, incluindo a infecção por nematoides, segundo Lopes-Caitar et al. (2013). As HSP20 funcionam como chaperonas moleculares independentes de ATP, que agem em resposta à desnaturação das proteínas tanto em eucariotos quanto em procariotos. Além disso, auxiliam outras chaperonas na remodelação de cadeias polipeptídicas desnaturadas. Lopes-Caitar et al. (2013), ao caracterizar a família de HSP20 da soja, identificaram um perfil diferencial para o gene *GmHsp22.4*, sendo altamente induzida pela presença do nematoide *Meloidogyne javanica*, no genótipo resistente, enquanto foi reprimido no suscetível. Recentemente, Hishinuma-Silva et al. (2019), ao caracterizar funcio-

nalmente a mesma proteína, observou que a superexpressão de *GmHsp22.4* em *A. thaliana* tornou as plantas mais suscetíveis a infecção por *M. javanica*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de expressão do gene *GmHsp22.4*, frente a infecção a outro nematoide também importante na cultura da soja, *Pratylenchus brachyurus*.

## Material e Métodos

### Material vegetal

Para este trabalho, foram utilizados dois genótipos de soja que apresentam respostas antagônicas ao parasitismo do nematoide *P. brachyurus*: o genótipo suscetível (TMG115RR) e outro moderadamente resistente (BRSGO Chapadões) (Rios et al., 2016), ambos cedidos pelo Banco ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja.

### Preparo do inóculo

Para a obtenção do inóculo utilizado nos experimentos, populações de *P. brachyurus* foram multiplicadas em casa de vegetação do setor de Nematologia da Embrapa Soja, em plantas de amendoim por aproximadamente 90 dias. A extração dos nematoides foi realizada conforme Coolen e D'Herde (1972). As raízes foram lavadas, cortadas em pedaços e trituradas em liquidificador. Posteriormente, as amostras foram passadas em peneiras de 200 e 500 mesh e, após enxágue com água corrente, o conteúdo retido na peneira de 500 meshes foi recuperado em béqueres. A suspensão obtida foi quantificada em câmara de Peters, utilizando 1mL da suspensão para a projeção do número total de indivíduos. A concentração final do inóculo foi ajustada para aproximadamente 250 nematoides/ mL.

### Bioensaio com nematoides

Para se avaliar o perfil transcricional do gene *GmHsp22.4* frente à infecção pelo nematoide *P. brachyurus*, plantas dos genótipos TMG115RR e BRSGO Chapadões foram germinadas em sementeira contendo areia autoclavada. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados com três repetições biológicas contendo três plantas cada, para cada tempo/ ge-

nótipo, submetidos a dois tratamentos (inoculação e controle). Cinco dias após emergirem, as plântulas foram transferidas para tubetes contendo o mesmo substrato e, após 24 horas, foram inoculadas com aproximadamente 500 indivíduos de *P. brachyurus* (2 mL da suspensão). As coletas do tecido radicular foram conduzidas nos tempos de: 12 horas após inoculação (hai), 1, 2, 4, 8, 17 e 35 dias após inoculação (dai). Como controle, foram utilizadas plantas não inoculadas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do setor de Nematologia da Embrapa Soja. As raízes coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, maceradas e armazenadas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR**

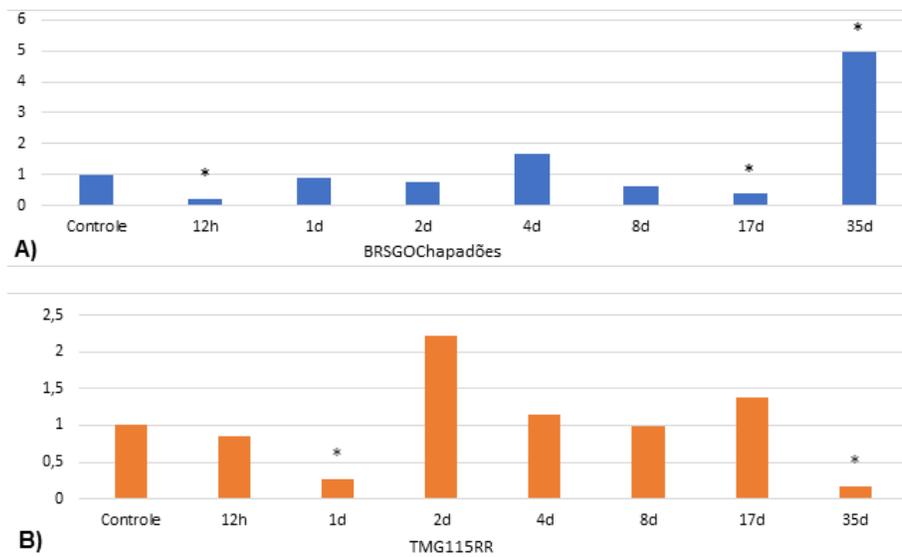
O RNA total de cada amostra foi extraído a partir de, aproximadamente, 100 mg de tecido, utilizando o método Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen). Em seguida as amostras foram tratadas com DNaseI, (Invitrogen) para se eliminar qualquer vestígio de DNA genômico residual que possa vir a interferir na análise. O cDNA foi então sintetizado a partir de aproximadamente 500 ng de RNA total utilizando o kit Superscript III (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante e utilizando OligoDT como iniciador.

As análises do perfil transcricional do gene *GmHsp22.4*, ao longo do ciclo infeccioso, foram realizadas por RT-qPCR em termociclador 7900 Real Time System (Applied Biosystem), utilizando o kit SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Invitrogen). Foram utilizados *primers* específicos para a região codificadora do gene, desenhados utilizando o Programa Primer3Plus. Para minimizar erros experimentais, a quantificação relativa para cada gene foi realizada utilizando triplicatas técnicas para cada repetição biológica. Como normalizador, foram utilizados os genes *ElfB* e *TUAe* como calibrador as amostras do tratamento falso inoculado. A quantificação relativa do alvo em relação ao calibrador foi realizada através do software Rest 2009.

## **Resultados e Discussão**

A resposta transcricional do gene *GmHsp22.4* sob infecção pelo nematoide das lesões radiculares *P. brachyurus* revela diferenças entre os genótipos suscetível e moderadamente resistente sob diferentes estágios de infecção.

As análises de expressão do gene *GmHsp22.4*, durante o ciclo do nematoide, revelou um padrão de resposta transcricional contrastante entre as cultivares BRSGO Chapadões (Figura 1A) e TMG115RR (Figura 1B), que oscilaram entre repressão e indução.



**Figura 1.** Perfil transcricional do gene *GmHsp22.4* nas cultivares BRSGO Chapadões (A) e TMG115RR (B), ao longo do ciclo infeccioso, sob infecção pelo nematoide *P. brachyurus*. Asteriscos indicam significância a 5% ( $p < 0,05$ ).

No primeiro tempo avaliado (12 h), foi possível observar uma repressão no genótipo BRS, superior a 70%. No tempo de 1 dia, essa repressão, também superior a 70%, foi observada no genótipo TMG. Nos tempos de 2 e 4 dias, apesar de se observar um aumento na expressão nos genótipos TMG e BRS, respectivamente, não foi observada significância. Da mesma forma, no tempo de 8 dias, apesar de se observar uma redução na expressão no genótipo BRS, ela também não foi significativa.

Já no tempo de 17 dias, foi observada uma repressão significativa, superior a 60%, no genótipo BRS. No tempo de 35 dias, foi observado o maior contraste entre os genótipos BRS e TMG. Enquanto no genótipo suscetível foi observada uma repressão superior a 80%, no moderadamente resistente houve uma indução de cerca de cinco vezes em relação às plantas não inoculadas.

Só foi possível identificar uma resposta positiva, onde houve uma indução significativa na expressão do gene *GmHsp22.4*, no tempo de 35 dias no genótipo BRSGOChapadões. Um resultado diferente foi observado por Lopes-Caitar et al. (2013), que caracterizaram essa proteína como induzida no genótipo resistente nos estágios iniciais da infecção (8 dai) pelo nematoide formador de galhas *M. javanica*, com uma indução bastante superior ao observado em *P. brachyurus*, cerca de 60 vezes maior.

Considerando que se trata de uma chaperona molecular, que tem como função auxiliar na remodelação de proteínas desnaturadas, tanto por fatores abióticos como bióticos, essa proteína apresentou uma resposta tardia mediante a infecção pelo nematoide *P. brachyurus*, o que indica que ela pode não participar da primeira linha de defesa frente à presença desse patógeno. Além disso, a repressão dessa proteína nos tempos de 1, 2 e 17 dias pode indicar que a mesma possa estar sofrendo alguma interferência pelo nematoide. Uma hipótese é que a *GmHsp22.4* possa ser alvo de um ou mais efetores secretados por *P. brachyurus*, assim como observado por Hewezi et al. (2010) e Pogorelko et al. (2016) para as proteínas SPDS2 (*At1g70310*) e Elf-2 $\beta$ , respectivamente.

## Conclusão

O perfil transcricional do gene *GmHsp22.4* apresentou diferenças entre os genótipos suscetível e moderadamente resistente a *P. brachyurus*. *GmHsp22.4* apresentou uma resposta tardia frente a presença do nematoide em ambos os genótipos avaliados, indicando que este gene não parece ter um papel na primeira linha de defesa à infecção.

## Referências

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: safra 2019/20: oitavo levantamento**, v. 7, n. 8, maio 2020. Brasília, DF, 2020. 66 p. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31816\\_8205b9f47c0cc1c35be2d0a2cc5c7322](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31816_8205b9f47c0cc1c35be2d0a2cc5c7322). Acesso em: 30 jun. 2020.

COOLEN, W.; D'HERDE, C. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agricultural Research Centre, 1972. 77 p.

FRANCHINI, J. C.; COSTA, J. M. da; DEBIASI, H.; TORRES, E. **Importância da rotação de culturas para a produção agrícola sustentável no Paraná**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 50 p. (Embrapa Soja. Documentos, 327).

GABIA, A. A. Nematoides de importância econômica na cultura da soja. **PROMIP**, 4 out. 2019. Disponível em: <https://www.promip.agr.br/nematoides-de-importancia-economica-na-cultura-da-soja/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

GOULART, A. M. C. **Aspectos gerais sobre nematóides das lesões radiculares (gênero *Pratylenchus*)**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008. (Embrapa Cerrados. Documentos, 219).

HEWEZI, T.; HOWE, P. J.; MAIER, T. R.; HUSSEY, R. S.; MITCHUM, M. G.; DAVIS, E. L.; BAUM, T. J. Arabidopsis spermidine synthase is targeted by an effector protein of the cyst nematode *Heterodera schachtii*. **Plant Physiology**, v. 152, n. 2, p. 968-984, 2010. DOI: 10.1104/pp.109.150557.

HISHINUMA-SILVA, S. M.; LOPES-CAITAR, V. S.; NOMURA, R. B. G.; SERCERO, B. C.; SILVA, A. G. D.; CARVALHO, M. C. C. G. de; LOPES, I. de O. N.; DIAS, W. P.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Functional characterization of a soybean small heat shock protein involved in the resistance response to *Meloidogyne javanica*. **Research Square**, preprint, 2019. DOI:10.21203/rs.2.18298/v1.

LOPES-CAITAR, V. S.; CARVALHO, M. C. C. G. de; DARBEN, L. M.; KUWAHARA, M. K.; NEPOMUCENO, A. L.; DIAS, W. P.; ABDELNOOR, R. V.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. Genome-wide analysis of the Hsp20 gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses. **BMC Genomics**, v. 14, n. 577, 2013.

MACHADO, A. C. Z. Praga custa R\$ 35 bilhões ao agronegócio brasileiro. **Revista Agrícola**, v. 24, 16 nov. 2015. Disponível em: <http://www.ragricola.com.br/destaque/ataques-de-nematoides-custam-r-35-bilhoes-ao-agronegocio-brasileiro/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

POGORELKO, G.; JUVALE, P. S.; RUTTER, W. B.; HEWEZI, T.; HUSSEY, R.; DAVIS, E. L.; MITCHUM, M. G.; BAUM, T. J. A cyst nematode effector binds to diverse plant proteins, increases nematode susceptibility and affects root morphology. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 6, p. 832-844, 2016. DOI: 10.1111/mpp.12330.

RIOS, A. D. F.; ROCHA, M. R. da; MACHADO, A. S.; ÁVILA, K. A. G. B.; TEIXEIRA, R. A.; SANTOS, L. de C.; RABELO, L. R. S. Host suitability of soybean and corn genotypes to the root lesion caused by nematode under natural infestation conditions. **Ciência Rural**, v. 46, n. 4, p. 580-584, 2016.

STEFFEN, R. B.; STEFFEN, G. P. K. Fitonematoides na cultura da soja: danos e identificação. **Portal Mais Soja**, 21 jun. 2018. Disponível em: <https://maissoja.com.br/fitonematoides-na-cultura-da-soja-danos-e-identificacao/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

# Análise *in silico* de genes *NAC* diferencialmente expressos em cultivares de soja sob déficit hídrico

SOUZA, E. M. G.<sup>1</sup>; MARIN, D. R.<sup>1</sup>; MOLINARI, M. D. C.<sup>2</sup>; MARIN, S. R. R.<sup>3</sup>; MERTZ-HENNING, L. M.<sup>4</sup>; NEPOMUCENO, A. L.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Unifil, Centro Universitário Filadelfia, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina-PR, enya.souza07@gmail.com; <sup>2</sup>Pós-doutoranda, Embrapa Soja; <sup>3</sup>Analista, Embrapa Soja; <sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Soja

## Introdução

A soja é uma *commodity* de grande importância mundial. No Brasil, estima-se que sejam cultivados cerca de 36,6 milhões de hectares. Na safra 2019/2020, o Brasil alcançou a primeira posição na produção mundial deste grão com 120,3 milhões de toneladas (Conab, 2020). Na maioria das regiões onde houve o cultivo de soja nesta última safra (2019/2020), as condições climáticas foram favoráveis à produção. Entretanto, no Rio Grande do Sul, a falta de chuva prejudicou o rendimento, resultando em uma produção 8,8% menor que na última safra na região Sul, apesar da área plantada ter sido 1,7% superior (Conab, 2020). Em geral, a produtividade das culturas agrícolas é dependente das condições climáticas e uma das maiores causas na queda da produção são os estresses abióticos, especialmente a falta de água (Madadgar et al., 2017). Estima-se que o Brasil tenha deixado de ganhar US\$ 79,62 bilhões por perdas de produção da cultura de soja entre as safras de 1976/77 a 2013/14, em especial devido às secas (Ferreira, 2016).

Em condição de déficit hídrico são desencadeadas respostas a nível fisiológico e bioquímico, caracterizadas pela combinação de eventos moleculares que ocorrem por meio da ativação ou inativação de genes após a percepção desse estresse pela planta, provocando alterações em suas expressões gênicas. As vias moleculares mais conhecidas de resposta à seca são divididas em dependentes do ácido abscísico (ABA) e independentes de ABA. Em ambas as rotas, a transdução do sinal de percepção do estresse culmina na ativação de fatores de transcrição, que induzem a expressão de diversos genes de resposta (Shinozaki; Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Nas últimas décadas, foram realizadas pesquisas importantes para a identificação e caracterização de diferentes fatores de transcrição (FT) que contribuem para a resposta ao estresse por seca (Joshi et al., 2016). Esses fatores de transcrição são categorizados dentro de diferentes famílias gênicas e classificados de acordo com seu domínio de ligação ao DNA (Jin et al., 2014).

Inúmeros FT atuam nos estresses abióticos, entre eles os genes da família NAC (*Petunia NAM Arabidopsis ATAF1 / 2 e CUC2*). Os FTs da família NAC são específicos de plantas, onde são muito abundantes, e estão envolvidos em diversos processos, incluindo desenvolvimento da planta, defesa e resposta a estresses abióticos (Olsen et al., 2005).

Esse trabalho tem como objetivo a análise *in silico* dos fatores de transcrição NAC visando identificar genes candidatos a melhorar a tolerância à seca em soja via edição gênica.

## Material e Métodos

Foram utilizadas as cultivares de soja BR-16, considerada sensível à seca, e a Embrapa 48, considerada tolerante à seca (Oya et al., 2004; Mesquita et al., 2020), sob diferentes níveis de déficit hídrico, definidos com base nas análises fisiológicas realizadas por Rodrigues et al. (2012) e Martins et al. (2008), que mostraram que, durante exposição prolongada à falta de água, a fotossíntese das cultivares de soja era máxima no tempo zero, mas fortemente inibida após 100 minutos de exposição ao déficit hídrico.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com nove repetições biológicas. As plantas de soja foram cultivadas em casa-de-vegetação em sistema hidropônico, seguindo o protocolo estabelecido por Martins et al. (2008). Os diferentes níveis de déficit hídrico foram impostos às plantas no estágio de desenvolvimento V3 (Fehr et al., 1971), removendo as plantas da solução hidropônica e expondo-as ao ar durante os períodos de privação de água 0 min (T0 - controle), 25 min (T25), 50 min (T50), 75 min (T75), 100 min (T100), 125 min (T125) e 150 min (T150), em cada tempo foi coletado raízes e folhas de ambas as cultivares de soja. Os tratamentos foram agrupados em quatro categorias, a seguir: T0 - condição de controle; T25-T50 min, conside-

rado déficit hídrico leve, T75-T100 min, déficit hídrico moderado e T125-T150 min, déficit hídrico severo.

Dezesseis bibliotecas foram sintetizadas e sequenciadas pela empresa Fasteris (Suíça). As bibliotecas foram preparadas usando o *kit Illumina TruSeq™ SBS v5*, com extremidade única de 100 pb e sequenciadas na plataforma *Illumina HiSeq 2000*.

A qualidade das leituras foi avaliada usando o *software FastQC* versão 0.11.5 (Andrews, c2020). A remoção de adaptadores, sequências de baixa qualidade (*Phred Quality score*  $\geq 30$ ) e sequências menores que 40 pb foi realizada usando o *software Trimmomatic* versão 0.36. O genoma de referência da soja usado foi a versão *Gmax\_275\_Wm82.a2.V1*. A indexação do genoma e o alinhamento das leituras no genoma de referência foram realizados usando o *software HISAT2* versão 2.1.0, recuperando apenas alinhamentos exclusivos com maior qualidade. Os artefatos de PCR (duplicação de leituras não naturais) foram removidos pelo *software Samtools rmdup* versão 1.5. A montagem das transcrições foi realizada pelo *software Stringtie* versão 1.3.3 usando o arquivo de anotação *GFF3* do *Phytozome* como guia. A saída *Stringtie* foi usada no *software GFOLD* versão 1.1.4 para obter os genes diferencialmente expressos (DEGs). Para cada cultivar e tecido, os genes diferencialmente expressos foram obtidos comparando-se os níveis de controle e déficit hídrico. Somente os genes que apresentaram alteração  $\log_2$  em mudança de dobra ( $\log_2 FC$ )  $\leq -1$  (regulados negativamente) e  $\geq 1$  (regulados positivamente) foram considerados expressos diferencialmente.

A região promotora de DEGs de cada nível de déficit e tecido vegetal foi recuperada separadamente usando *RSAT* ([http://rsat.eead.csic.es/plants/retrieve-seq\\_form.cgi](http://rsat.eead.csic.es/plants/retrieve-seq_form.cgi)). Apenas genes com pelo menos duas sequências centrais de ACGT foram selecionados e considerados como responsivos a ABA. A anotação biológica dos DEGs responsivos ao ABA foi realizada usando a ferramenta *Phytomine*, disponível no *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.go>).

A partir destes dados foram gerados grupamentos gênicos. Dentre genes presentes no grupo contendo genes superexpressos em ambas as cultivares (BR-16 e Embrapa 48) em todos os níveis de estresse (Leve, Moderado e Severo) e em ambos os tecidos (Raiz e Folha) foram selecionados seis genes

da família gênica NAC para análise de número de cópias, parálogos em soja e ortólogos em *Arabidopsis thaliana*.

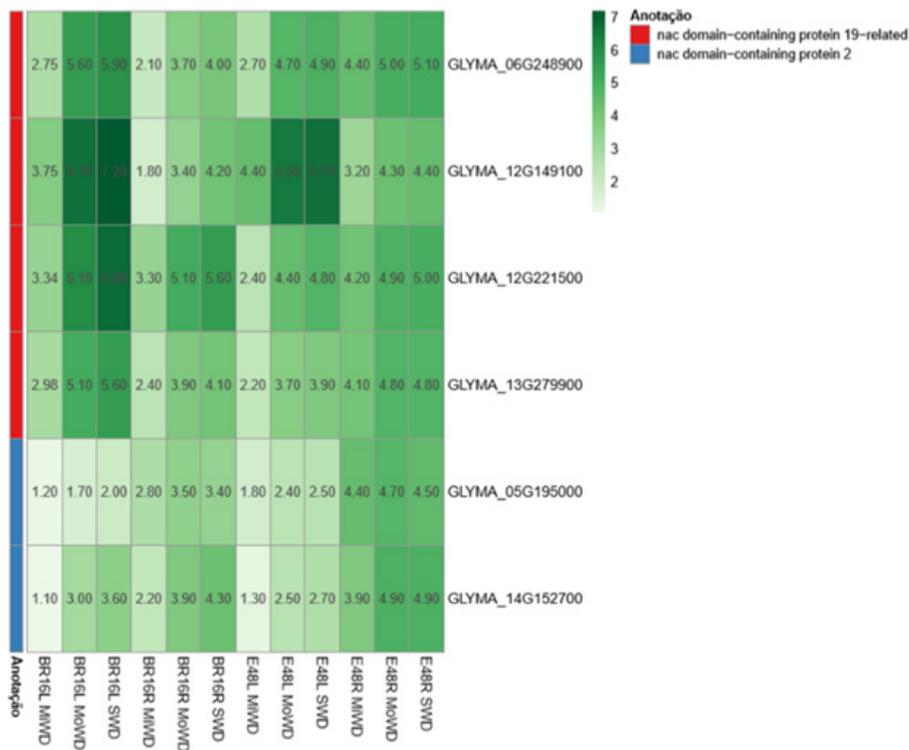
As etapas para análise *in silico* dos seis genes foram:

- 1) Resgate das sequências proteicas pelo site Phytozome.
- 2) A sequência da proteína de cada gene foi individualmente alinhadas com a sequência de proteínas (blastp) nas duas versões mais recentes do genoma de soja *Wm82.a2.v1*, *Wm82.a4.v2* e ao genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10 pelo software *Persephone*. Resgatando somente as proteínas com mais de 50% de identidade com a sequência alvo.
- 3) Montagem das árvores filogenéticas com as sequências proteicas pelos softwares *Muscle* e *ItoI*.
- 4) Somente os genes agrupados em um mesmo clado foram resgatados para análises de domínios proteicos pelos softwares *Phytozome* e *MotifScan* e quantificação de motivos NAC na região promotora pelo software *RSAT plant* e *script* desenvolvido pela equipe.

## Resultados e Discussão

Foram encontrados seis genes classificados como fatores de transcrição pertencentes à família NAC que apresentam dois ou mais elementos ABRE (*ABA Responsive Element*) em seu promotor indicando que são responsivos a ácido abscísico (ABA) e que apresentam expressão diferencial nos dois tecidos (folha e raiz) e em todos os níveis de déficit hídrico estudados leve (MiWD - T25-50min), moderado (MoWD - T75-100min) e severo (SWD - T125-150min) (Figura 1).

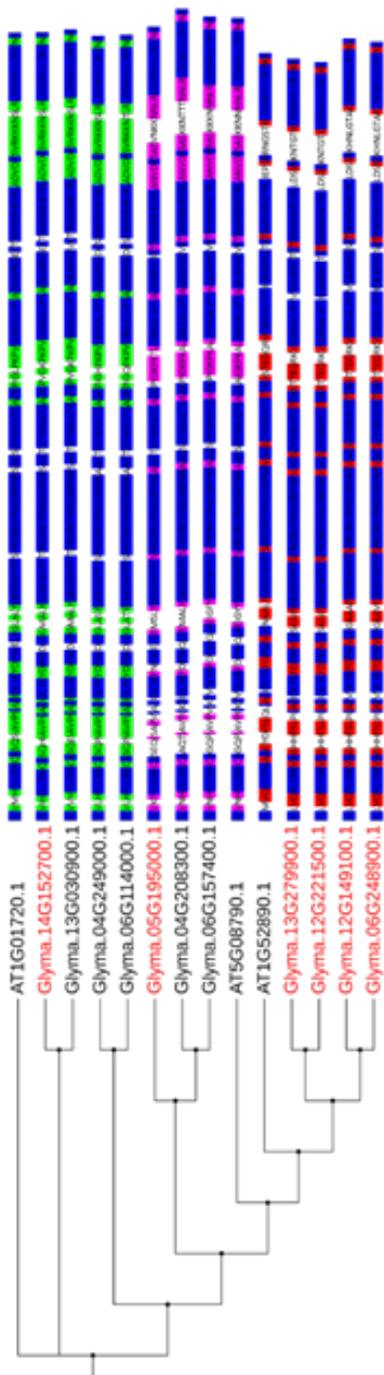
A expressão em todos os tecidos e tempos nas duas cultivares reforça a importância desses fatores de transcrição na resposta da soja a condição de déficit hídrico.



**Figura 1.** *Heatmap* da expressão diferencial em log<sub>2</sub>FC dos genes da família NAC expressos em folhas e raízes de soja sob diferentes níveis de déficit hídrico. A intensidade da cor representa relação direta com o nível de expressão do gene.

Em soja foram identificados 180 membros da superfamília NAC (Melo et al., 2018). A análise da expressão de alguns genes NAC de soja, em raízes, flores, folhas e vagens, de cultivares de soja tolerantes e sensíveis à seca sob estresse hídrico indicou o envolvimento desses genes nas respostas à tolerância à seca (Hussain et al., 2017). Entretanto, poucos membros dessa superfamília foram estudados até o momento, e as funções de mais genes NAC de soja devem ser investigadas para compreender seus papéis específicos e redundantes na tolerância ao estresse.

Foi realizada análise filogenética de cada gene com seus parálogos de soja e ortólogos de *Arabidopsis thaliana* e identificado os domínios proteicos conservados entre os genes. A fim de identificar variações exclusivas dos sub-clados foram identificados em cores diferentes (verde, rosa e vermelho) regiões do domínio compartilhadas apenas entre os sub-clados (Figura 2).



**Figura 2.** Dendrograma obtido a partir dos clados principais de cada gene individual. Em frente a cada gene encontra-se a região do domínio proteico conservado em azul escuro e em verde, rosa e vermelho as regiões conservadas apenas entre os subclados.

A caracterização dos seis genes *NAC* a nível proteico, bem como as cópias, ortólogos e parálogos pode ser observada na Tabela 1. Dos seis genes abordados neste estudo, dois foram classificados como *NAC2* e quatro como *NAC19*.

**Tabela 1.** Caracterização a nível proteico de todos os seis genes diferencialmente expressos nas bibliotecas de RNA-Seq (cinza) e seus ortólogos, cópias e parálogos próximos.

GENE ID	Anotação (Phytozome)	Ortólogo (% identidade)	Ortólogo (Similaridade)	Cópia	Parálogo	Tamanho da Proteína (n. de aa)	Famílias	Domínios	Posição
AT1G01720.1	ATAF1	GLYMA.14G152700 (72%)	GLYMA.14G152700	Não tem		289	PSS105 PF02365	9	159
<b>GLYMA.14G152700.1</b>	<b>NAC2</b>	<b>AT1G1720.1 (73%)</b>	<b>AT1G1720.1</b>	<b>GLYMA.13G030900 (89%)</b>	<b>GLYMA.04G249000 (74%)</b>	<b>280</b>	<b>PSS105 PF02365</b>	<b>7</b>	<b>158</b>
GLYMA.13G030900.1	NAC2	AT1G1720.1 (71%)	AT1G1720.1	GLYMA.14G152700 (88%)	GLYMA.12G149100 (71%)	286	PSS105 PF02365	7	158
GLYMA.04G249000.1	GRAB1	<b>AT4G27410.2 (69%)</b>	AT1G1720.1	GLYMA.06G114000 (90%)	GLYMA.14G152700 (73%)	300	PSS105 PF02365	14	162
GLYMA.06G114000.1	GRAB1	AT1G1720.1	AT1G1720.1	GLYMA.04G249000 (90%)	GLYMA.14G152700 (73%)	299	PSS105 PF02365	7	150
<b>GLYMA.05G195000.1</b>	<b>NAC2</b>	<b>AT1G52890.1(66%)</b>	AT1SG08790.1	Não tem	<b>GLYMA.04G208300 (75%)</b>	<b>286</b>	<b>PSS105 PF02365</b>	<b>14</b>	<b>162</b>
GLYMA.04G208300.1	GRAB1	AT1SG08790.1 (68%)	AT1SG08790.1	GLYMA.06G157400 (93%)	GLYMA.05G195000 (75%)	291	PSS105 PF02365	7	150
GLYMA.06G157400.1	GRAB1	<b>AT3G15510.1 (67%)</b>	AT1SG08790.1	GLYMA.04G208300 (93%)	GLYMA.05G195000 (73%)	295	PSS105 PF02365	7	161
AT1SG08790.1	ATAF2	GLYMA.13G30900 (81%)	GLYMA.04G208300	Não tem		283	PSS105 PF02365	9	159
AT1G52890.1	NAC19	GLYMA.06G248900 (72%)	GLYMA.13G27990	Não tem		317	PSS105 PF02365	14	164
<b>GLYMA.13G279900.1</b>	<b>NAC19</b>	<b>AT1G1720.1 (70%)</b>	AT1SG08790.1	<b>GLYMA.12G221500 (93%)</b>	<b>GLYMA.14G152700 (70%)</b>	<b>343</b>	<b>PSS105 PF02365</b>	<b>7</b>	<b>158</b>
<b>GLYMA.12G221500.1</b>	<b>NAC19</b>	AT1SG08790.1 (67%)	AT1SG08790.1	GLYMA.13G279900 (93%)	GLYMA.14G152700 (70%)	345	PSS105 PF02365	14	162
<b>GLYMA.12G149100.1</b>	<b>NAC19</b>	AT1G1720.1 (70%)	AT1SG08790.1	GLYMA.06G248900 (89%)	GLYMA.14G152700 (70%)	340	PSS105 PF02365	7	158
<b>GLYMA.06G248900.1</b>	<b>NAC19</b>	AT1G1720.1 (70%)	AT1SG08790.1	GLYMA.12G149100 (89%)	GLYMA.13G030900 (71%)	340	PSS105 PF02365	7	158

O gene Glyma.14G152700.1 é um NAC2 e tem como possível ortólogo em *A. thaliana* o AT1G01720.1 tanto em % de identidade (72%) quanto em similaridade. Apresenta uma cópia no cromossomo 14 e uma no 13 (Glyma.13G030900.1) com 93% de identidade. Os principais parálogos são os genes Glyma.04G249000 (73%) e o Glyma.06G114000 (73%). O gene Glyma.05G195000.1 é um NAC2 e tem como possíveis ortólogos em *A. thaliana* os AT1G52890 a nível de identidade (66%) e a nível de similaridade o AT5G08790. Apresenta apenas uma cópia no genoma. Os principais parálogos são os genes Glyma.04G208300 (75%) e Glyma.06G157400 (73%). O gene Glyma.13G279900 é um NAC19 e tem como possíveis ortólogos em *A. thaliana* os genes AT1G01720.1 a nível de identidade (70%) e o AT1G52890 a nível de similaridade. Apresenta uma cópia no cromossomo 13 e uma no 12 (Glyma.12G221500, também diferencialmente expresso no heatmap) com 93% de identidade. Os principais parálogos são os genes Glyma.12G149100 e Glyma.06G248900 (também diferencialmente expressos no heatmap e são cópias genicas com 89% de identidade).

Estudos mostram que genes NAC2 e NAC19, são *up*-regulados em seca a fim de atuar na transcrição e regulamentação da transcrição, fazendo várias ligações com o DNA (Liu et al., 2011; Phukan et al., 2016).

## Conclusão

Os seis genes avaliados são necessários a nível de espécie em condição de seca por apresentarem *up*-regulação em todos os tecidos e tempos nas duas cultivares avaliadas. Embora todos os genes tenham apresentado os mesmos domínios proteicos variações nestes domínios podem estar relacionados aos seus locais de ação dentro da célula, podendo estes apresentarem funções sinérgicas em resposta à seca, mas de formas e em vias diferentes.

## Referências

ANDREWS, S. **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. Cambridge: Babraham Institute, c2020. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 30 jun. 2020.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira:** grãos: safra 2019/20: oitavo levantamento, v. 7, n. 8, maio 2020. Brasília, DF, 2020. 66 p. Disponível em: [https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31816\\_8205b9f47c0cc1c35be2d0a2cc5c7322](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos/item/download/31816_8205b9f47c0cc1c35be2d0a2cc5c7322). Acesso em: 30 jun. 2020.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PENNINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill 1. **Crop Science**, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

FERREIRA, R. C. **Quantificação das perdas por seca na cultura da soja no Brasil**. 2016. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

HUSSAIN, R. M.; ALI, M.; FENG, X.; LI, X. The essence of NAC gene family to the cultivation of drought-resistant soybean (*Glycine max* L. Merr.) cultivars. **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 55, 2017.

JIN, J.; ZHANG, H.; KONG, L.; LUO, J. PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 1182-1187, 2014. DOI: 10.1093/nar/gkt1016.

JOSHI, R.; WANI, S. B.; SINGH, B.; BOHRA, A.; DAR, Z. A.; LONE, A. A.; PAREEK, A.; SINGLA-PAREEK, S. Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1029, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.01029.

LIU, X.; HONG, L.; LI, X. Y.; YAO, Y.; HU, B.; LI, L. Improved drought and salt tolerance in transgenic Arabidopsis overexpressing a NAC transcriptional factor from *Arachis hypogaea*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 443-450, 2011. DOI: 10.1271/bbb.100614.

MADADGAR, S.; AGHAKOUCHAK, A.; FARAHMAND, A.; DAVIS, S. J. Probabilistic estimates of drought impacts on agricultural production. **Geophysical Research Letters**, v. 44, n. 15, p. 7799-7807, 2017.

MARTINS, P. K.; JORDÃO, B. Q.; YAMANAKA, N.; FARIAS, J. R. B.; BENEVENTI, M. A.; BINNECK, E.; FUGANTI, R.; STOLF, R.; NEPOMUCENO, A. L. Differential gene expression and mitotic cell analysis of the drought tolerant soybean (*Glycine max* L. Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar MG/BR46 (Conquista) under two water deficit induction systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 512-521, 2008.

MELO, B. P.; FRAGA, O. T.; SILVA, J. C. F.; FERREIRA, D. O.; BRUSTOLINI, O. J. B.; CARPINETTI, P. A.; MACHADO, J. P. B.; REIS, P. A. B.; FONTES, E. P. B. Revisiting the soybean GmNAC superfamily. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1864, 2018.

MESQUITA, R. O.; COUTINHO, F. S.; VITAL, C. E.; NEPOMUCENO, A. L.; WILLIAMS, T. C. R.; RAMOS, H. J. de O.; LOUREIRO, M. E. Physiological approach to decipher the drought tolerance of a soybean genotype from Brazilian savana. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 151, p. 132-143, 2020.

OLSEN, A. N.; ERNST, H. E.; LEGGIO, L. L.; SKRIVER, K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 2, p. 79-87, 2005. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.12.010.

OYA, T.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; TOBITA, S.; ITO, O. Drought tolerance characteristics of Brazilian soybean cultivars - evaluation and characterization of drought tolerance of various Brazilian soybean cultivars in the field. **Plant Production Science**, v. 7, n. 2, p. 129-137, 2004.

PHUKAN, D.; SINGH P. B.; RAVI, I.; MITHRA, A. S. V.; YADAVA, D. K.; CHINNUSAMY, V.; MOHAPATRA, T. Cloning and characterization of drought stress-induced NAC transcription factors from *Brassica juncea* and *Sinapis alba*. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 76, n. 3, p. 233-245, 2016.

RODRIGUES, F. A.; MARCOLINO-GOMES, J.; CARVALHO, J. de F. C.; NASCIMENTO, L. C. do; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; CARAZZOLLE, M. F.; MARCELINO, F. C.; NEPOMUCENO, A. L. Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, suppl., p. 304-314, 2012.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

# Germinação de *Metarhizium rileyi* em extratos cuticulares de folíolos de soja

GONÇALVES, A. C. S.<sup>1</sup>; SOSA-GÓMEZ, D. R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNOPAR, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, andrea.sg125@hotmail.com; <sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

## Introdução

As interações entre plantas e micro-organismos entomopatogênicos podem apresentar uma profunda influência no processo de doença de insetos praga (Sosa-Gómez, 2012). Essas interações podem ocorrer antes da infecção pelo fungo, quando a partícula infectiva, neste caso o conídio, encontra-se depositado sobre o substrato foliar ou quando o conídio está aderido a cutícula do inseto. Na fase inicial dessas interações, a cutícula das plantas pode produzir exsudatos, glico-alcaloides, ceras que afetam a persistência das unidades infectivas dos fungos entomopatogênicos ou podem interferir na fixação sobre a superfície da planta. Por outro lado, estudos realizados sobre a microtopografia vegetal também pode influenciar a retenção do inóculo sobre a planta hospedeira (Inyang et al., 1998). Por exemplo, a atividade do vírus de poliedrose nuclear de *Helicoverpa armigera* (Hübner) persiste maior tempo em sorgo que algodão (Roome; Daoust, 1976). De maneira semelhante, voláteis induzidos por pulgões alimentando-se de plantas de fumo impactaram negativamente a germinação do fungo entomopatogênico *Pandora neoaphidis* (Brown et al., 1995). Além disso, pulgões da ervilha, *Acyrtosiphum pisum* (Harris) são mortos em maior proporção por *P. neoaphidis* em variedades de ervilha que apresentam, menor produção de cera (Duetting et al., 2003).

O efeito das plantas sobre os micro-organismos entomopatogênicos tem importantes implicações sobre eficiência de controle e sobre as doses a serem utilizadas quando se usa estes patógenos como agentes de controle microbiano. Assim, as doses de produtos comerciais do vírus de poliedrose nuclear de *H. armigera* deve ser maior quando se aplica sobre culturas de algodão que a doses recomendada quando se destina ao controle da mesma praga na cultura do sorgo (Sosa-Gómez et al., 2020). Portanto, a investigação dos fatores físicos e químicos que interferem nestes micro-organismos pode contribuir para melhorar formulações e aprimorar o controle microbiano das pragas em diferentes culturas. Por isso, esse trabalho objetivou determinar o

efeito dos compostos cuticulares de folíolos de soja sobre a capacidade de germinação do fungo *Metarhizium rileyi*.

## Material e Métodos

**Fungo entomopatogênico.** O isolado CNPSo-Nr147 foi obtido de lagartas da espécie *Anticarsia gemmatalis* Hübner, coletadas no dia 15/06/1993 na cultura da soja, em Patos de Minas, MG (Sosa-Gómez; Silva, 2002). Atualmente este isolado está preservado na coleção de trabalho pertencente a Embrapa Soja, Londrina, PR. Os conídios para os bioensaios eram provenientes de colônias de 12-14 dias cultivadas em meio SMAY (2,5g de neopeptona micológica, 10g de maltose, 2,5g de extrato de levedura, 3,75g de ágar e 250 ml de água).

**Extratos cuticulares.** Para esclarecer o efeito de diferentes compostos que fazem parte da composição do filoplano de planta de soja, frações separadas por sua polaridade foram testadas quanto a seu efeito sobre a germinação de *M. rileyi*. Compostos cuticulares foram extraídos de 10 folíolos de soja da cultivar de soja convencional BRS 511, em estágio fenológico V5-V6 (Fehr; Caviness, 1977), utilizando solventes de diferentes polaridades, lavando por 3 a 4 minutos em 25 mL de hexano, ou 25 mL de clorofórmio, ou 25 mL de etanol ou 25 mL de água. Foi realizada a imersão de cada folíolo com exceção do pecíolo. Após a imersão todos os extratos extraídos das folhas nos solventes foram transferidos para um frasco de 60 mL com batoque e tampa, previamente aferidos em cada frasco o volume de 25 mL. Todos os extratos foram armazenados em freezer a -20°C. O método de extração utilizado foi modificado de Bourgault et al. (2020).

**Ensaio de germinação.** Os ensaios de germinação com os conídios do isolado CNPSo-147 de *M. rileyi* foram realizados sobre lâminas de microscópio esterilizadas, sobre as quais foi distribuída uma cada de meio de cultura SMAY e outras lâminas foram cobertas parcialmente com agarose ultrapura ao 1,5%. Sobre a camada de meio de cultura ou agarose foi aplicado 5 µl de cada extrato e posteriormente foi distribuída por meio de nebulização conídios do isolado CNPSo-Nr147 em quantidade suficiente para que a densidade de conídios permita contagem a microscópio. Posteriormente as lâminas foram mantidas em caixas plásticas de poliestireno tipo Gerbox (11 x 11 x 3,5 cm),

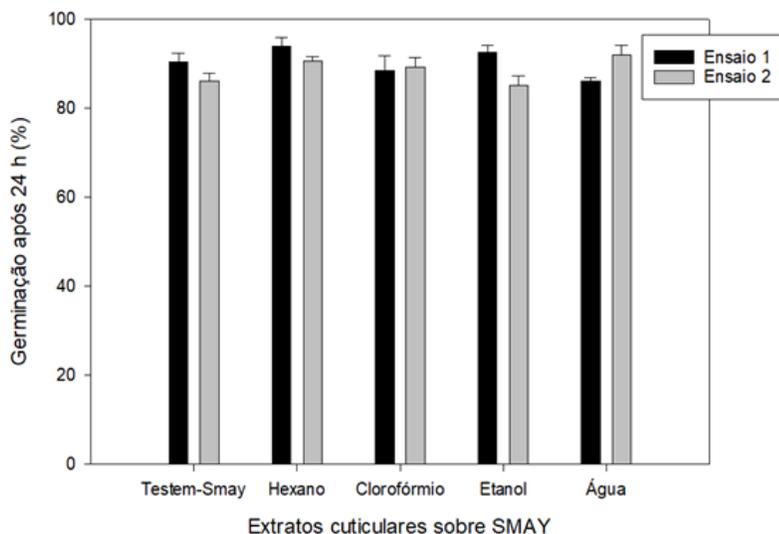
revestindo seu fundo com papel filtro umedecido com água e acondicionadas na B.O.D a  $26\pm 1,5^{\circ}\text{C}$  no escuro por um período de 24 a 48h para quantificar os conídios germinados e não em microscópio com 400 aumentos. Os conídios foram considerados germinados quando apresentaram o tubo germinativo igual o maior ao comprimento do conídio.

O meio de cultura SMAY proporciona todos os nutrientes para a germinação do fungo *M. rileyi*, portanto a germinação na presença dos extratos cuticulares sobre o SMAY é indicadora da possibilidade de ocorrência de compostos que inibem a germinação. Por outro lado, a agarose é um substrato que carece de nutrientes, portanto a germinação sobre os extratos cuticulares é indicadora da presença de nutrientes ou compostos que favorecem a germinação.

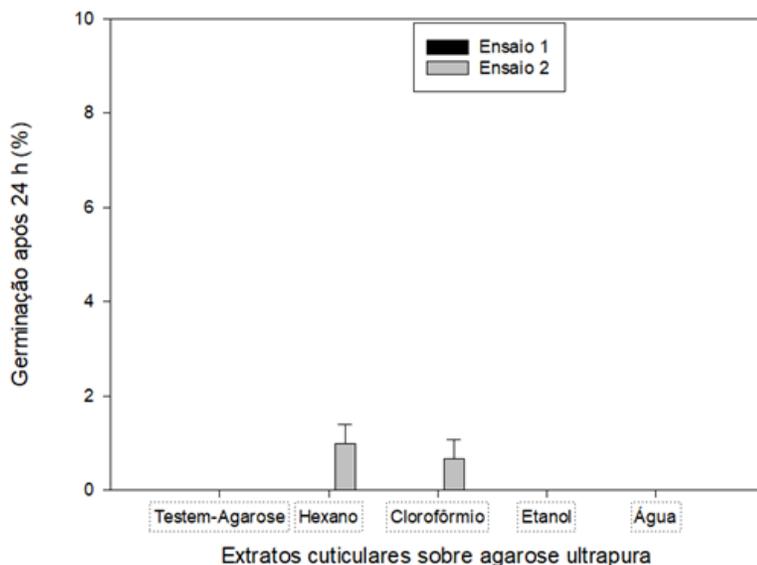
**Análise estatística.** O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com os tratamentos (extratos cuticulares) em arranjo inteiramente casualizado, com um isolado de *M. rileyi* vs. quatro extratos cuticulares e uma testemunha, que foram replicados quatro vezes. Foram verificadas todas as pressuposições de normalidade (Shapiro; Wilk, 1965) e homogeneidade das variâncias dos tratamentos (Brown-Forsythe, 1974) e realizadas as análises de variâncias (ANOVA) utilizando o software Sigmaplot para Windows versão 14.0 (Systat, 2017) para verificar o efeito das concentrações dos extratos sobre o crescimento do isolado do fungo. Os experimentos foram replicados duas vezes em diferentes oportunidades. Os resultados de ensaios em agarose não foram analisados estatisticamente devido a predominância de zero nos valores de germinação.

## Resultados e Discussão

As médias de germinação do isolado CNPSo-Nr147 sobre os extratos cuticulares e a respectiva testemunha estão sumarizadas nas Figuras 1 e 2.



**Figura 1.** Germinação ( $\pm$  EPM) de conídios do isolado CNPSo-Nr147 de *M. rileyi* sobre extratos cuticulares de folíolos de soja extraídos com solventes de polaridades diferentes e distribuídos sobre uma camada de meio de cultura SMAY.



**Figura 2.** Germinação ( $\pm$  EPM) de conídios do isolado CNPSo-Nr147 de *M. rileyi* sobre extratos cuticulares de folíolos de soja extraídos com solventes de polaridades diferentes e distribuídos sobre uma camada de agarose ultrapura.

A partir dos resultados obtidos sobre meio de cultura SMAY infere-se que os extratos com diferentes polaridades não interferiram significativamente sobre a germinação do isolado CNPSo-Nr147 de *M. rileyi* em nenhum dos experimentos (F não significativos, 1º Ensaio:  $P = 0,333$ ; 2º Ensaio:  $P = 0,390$ ) (Figura 1). Pelo contrário, nos ensaios de germinação sobre os extratos com agarose ultrapura foi observado um pequeno estímulo para a germinação dos conídios, menor que 1 % de germinação, nos extratos obtidos com os solventes hexano e clorofórmio (Figura 2).

As porcentagens de germinação observadas após 48 h sobre o meio SMAY em ambos ensaios foram superiores a 98% em todos os extratos, inclusive na testemunha indicando que nas observações realizadas neste período não é possível observar diferenças entre os extratos. Entretanto, nas observações realizadas após 48 h, em um dos ensaios com agarose não foi observada germinação e no segundo ensaio foram observados valores reduzidos e semelhantes aos que constam na Figura 2, germinação de  $0,6 \% \pm 0,2$  (EPM) no extrato obtido com hexano e  $0,2 \% \pm 0,2$  no extrato obtido com clorofórmio. Neste último caso o comprimento do tubo germinativo era próximo do comprimento do conídio, isto é, de aproximadamente 3 a 4 micrômetros. Futuramente serão realizados estudos semelhantes com folhas de diferentes culturas para verificar seus efeitos sobre a capacidade germinativa de *M. rileyi*.

## Conclusão

Compostos cuticulares presentes sobre os folíolos de soja da cultivar BRS 511 não limitam o processo de germinação; pelo contrário, estimulam a germinação, entretanto de forma limitada.

## Referências

- BOURGAULT, R.; MATSCHI, S.; VASQUEZ, M.; QIAO, P.; SONNTAG, A.; CHARLEBOIS, C.; MOHAMMADI, M.; SCANLON, M. J.; SMITH, L. G.; MOLINA, I. Constructing functional cuticles: analysis of relationships between cuticle lipid composition, ultrastructure and water barrier function in developing adult maize leaves. **Annals of Botany**, v. 125, p. 79-91, 2020.
- BROWN, G. C.; PROCHASKA, G. L.; HILDEBRAND, D. F.; NORDIN, G. L.; JACKSON, D. M. Green leaf volatiles inhibit conidial germination of the entomopathogen *Pandora neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae). **Environmental Entomology**, v. 24, p. 1637-1643, 1995.

BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for the equality of variances. **Journal of the American Statistical Association**, v. 69, p. 364-367, 1974.

DUETTING, P. S.; DING, H.; NEUFELD, J.; EIGENBRODE, D. S. D. Plant waxy bloom on peas affects infection of pea aphids by *Pandora neoaphidis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 84, p. 149-158, 2003.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 11 p. (Iowa Cooperative Extensive Service. Special Report, 80).

INYANG, E. N.; BUTT, T. M.; IBRAHIM, L.; CLARK, S. J.; PYE, B. J.; BECKETT, A.; ARCHER, S. The effect of plant growth and topography on the acquisition of conidia of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* by larvae of *Phaedon cochlearia*. **Mycological Research**, v. 102, n. 11, p. 1365-1374, 1998.

ROOME, R.E.; DAOUST, R. A. Survival of the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis armigera* on crops and soil in Botswana. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 27, p. 7-12, 1976.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Implications of plant hosts and insect nutrition on entomopathogenic diseases. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Eds.). **Insect bioecology and nutrition for integrated pest management**. Boca Raton: CRC Press; Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 195-209.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; MORGADO, F. S.; CORRÊA, R. F. T.; SILVA, L. A.; ARDISSON-ARAÚJO, D. M. P.; RODRIGUES, B. M. P.; OLIVEIRA, E. E.; AGUIAR, R. W. S.; RIBEIRO, B. M. Entomopathogenic viruses in the Neotropics: current status and recently discovered species. **Neotropical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 315-331, 2020.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. da (Org.). **Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados**. Londrina: Embrapa Soja, 2002. 32 p. (Embrapa Soja. Documentos, 188).

SYSTAT. **SigmaStat 14 user's guide**. San Jose, CA: Systat Software Inc., 2017.

# Estudo da quantificação do teor de lignina em diferentes partes da planta de soja utilizando o método brometo de acetila

CHAVES, H. F.<sup>1</sup>; KRZYŻANOWSKI, F. C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UEL, Bolsista CEINEE, Londrina, PR, higorchaves@hotmail.com; <sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Soja

## Introdução

A lignina é uma complexa macromolécula polifenólica. É o terceiro maior componente da parede celular (Butler; Bailey, 1973) e o segundo polímero mais abundante na natureza, atrás somente da celulose (Polle et al., 1994). É um componente não-carboidrato formado pela ligação covalente entre monolignóis (álcoois fenilpropanílicos), sendo os principais denominados resíduos guaiacil (G), siringil (S) e p-hidroxifenil (H) monolignóis.

Considerada indigestível e inibidora da digestibilidade da parede celular das plantas forrageiras, a lignina é sintetizada pelas plantas através da polimerização de álcool p-hidróxicianamil substituído através da catálise de peroxidases (Van Soest et al., 1991).

A lignina, como componente estrutural da parede celular, proporciona integridade às células vegetais, o que possibilita a sustentação do corpo da planta, hidrofobicidade às células condutoras do xilema e, conseqüentemente, permite que haja um transporte de água eficiente e impermeabilidade (Boerjan et al., 2003). Além disso, após a completa deposição na parede celular secundária, a lignina promove um revestimento para as microfibrilas de celulose e hemicelulose, o que garante maior rigidez e resistência para os tecidos legnificados.

Sendo o principal responsável pela manutenção da integridade e coesão estrutural das fibras vegetais (Butler; Bailey, 1973), a lignina é bastante estudada como forma de se combater o dano mecânico na semente de soja, o qual é o um dos principais fatores que afeta a qualidade física e fisiológica do mesmo (Alvarez et al., 1997).

Os métodos mais comumente utilizados para determinação de lignina são os de análise gravimétrica, utilizando ácido sulfúrico e o método espectrofo-

tométrico UV. O método brometo de acetila vem sendo mais utilizado e com mais frequência na quantificação da lignina, no tegumento de soja, por ser um método rápido, simples e por apresentar melhor recuperação da lignina e se baseia no fato de a lignina ser solúvel e sua determinação no comprimento de onda a 280 nm.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o conteúdo de lignina da semente com hilo e sem hilo, da vagem e da folha (nervuras e pecíolo) de duas cultivares de soja, utilizando o método brometo de acetila devido a sua precisão na determinação deste componente estrutural da célula.

## **Material e Métodos**

Inicialmente foram selecionadas sementes, folhas, vagens e pecíolos das cultivares Doko e Savana.

Para a análise do tegumento as sementes foram imersas em água por aproximadamente 12 horas, em um copo becker de 500 mL, para posterior separação dos tegumentos (com e sem hilo). Para análise da nervura e da folha sem nervura foram retiradas as nervuras primárias e secundárias de parte das folhas. Para quantificação de lignina na vagem, foram retiradas todas as sementes. Todos os materiais foram secos em estufa por 16 horas a 60°C.

Os tecidos analisados foram submetidos a um tratamento para excluir as proteínas e outros materiais absorventes de UV. Esta remoção é essencial para evitar a medição destes constituintes em conjunto com a lignina a 280 nm. Amostras secas (0,3 g) foram homogeneizadas em tampão de fosfato de potássio 50 mM (7 ml, pH 7,0) utilizando um almofariz e um pilão e, em seguida, transferida para um tubo de centrifugação. O sedimento foi centrifugado (1400 x g, 5 min) e lavado por agitação e centrifugação sucessiva como se segue: duas vezes com tampão de fosfato (pH 7,0; 7 ml), três vezes com 1% (v / v) de Triton X-100 em tampão a pH 7,0 (7 ml), duas vezes com 1 Molar de NaCl em tampão de pH 7,0 (7 ml), duas vezes com água destilada (7 ml), e duas vezes com acetona (5 ml). O sedimento foi seco em uma estufa (60 °C, 24 h) e vácuo. A matéria seca foi definida como a fração da parede celular livre de proteínas.

Da parede celular livre de proteínas uma amostra (20 mg) foi colocada num tubo de centrífuga com tampa de rosca contendo 0,5 ml de brometo de acetila de 25% (v / v em ácido acético glacial) e incubadas a 70 °C durante 30 min. Depois de completa a digestão, a amostra foi colocada rapidamente num banho de gelo, e, em seguida, misturada com 0,9 ml de NaOH 2 M, 0,1 ml de 7,5M de hidroxilamina-HCl, e com um volume de ácido acético glacial suficiente para a solubilização completo extrato de lignina. Após centrifugação (1400 x g, 5 min), a absorvência do sobrenadante foi medida a 280 nm. Os resultados foram expressos em dois índices mg g<sup>-1</sup> da parede celular e porcentagem de lignina.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ao nível de significância de 1% e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

## Resultados e Discussão

A partir dos valores obtidos, contidos na Tabela 1, observa-se que a cultivar Doko (hilo escuro) apresenta maior porcentagem de lignina no tegumento, quando comparada com a cultivar Savana (hilo claro), o que está de acordo com Krzyzanowski et. al (2008) e com os estudos de França Neto et al. (2000) e Mertz (2007).

**Tabela 1.** Teor de lignina no tegumento com e sem hilo para as cultivares Doko e Savana.

CULTIVAR	TEOR DE LIGNINA %		
	TEGUMENTO COM HILO	TEGUMENTO SEM HILO	CV %
DOKO	5,43a1	4,96b	1,37
SAVANA	3,65a	3,47b	2,65

<sup>1</sup>Médias seguidas de distinta letra minúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pode-se observar também que os valores indicaram uma diferença significativa no teor de lignina obtido para o tegumento com e sem hilo em ambas cultivares. A cultivar Doko por ter hilo preto apresentou maior variação numérica para o teor de lignina, o que é corroborado pelos resultados de França-Neto

et. al. (1999) que observaram maior conteúdo percentual de lignina nos tecidos escuros dos tegumentos; linhagens com sementes de coloração escura apresentaram 12,18% de lignina em contraste com linhagens de tegumento amarelo com apenas 4,75%.

A Tabela 2 apresenta a percentagem de lignina obtida nas análises das folhas com e sem nervura, podendo observar que para a cultivar Doko não houve efeito significativo, ao contrário da cultivar Savana, a qual apresentou valores maiores para a folha com nervura, indicando efeito significativo da nervura nas análises.

**Tabela 2.** Teor de lignina na folha com e sem nervura entre as cultivares Doko e Savana.

CULTIVAR	TEOR DE LIGNINA %		
	FOLHA COM NERVURA CENTRAL	FOLHA SEM NERVURA CENTRAL	CV %
DOKO	9,39a1	9,39a	5,61
SAVANA	10,53a	9,43b	5,45

<sup>1</sup>Médias seguidas de distinta letra minúscula na linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Varição no conteúdo de lignina em folhas inteiras de plantas de cultivares de soja também foi observado por Casula e Krzyzanowski (2015). A lignina, juntamente com a celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à penetração fúngica (Vance et.al., 1980).

Quando se isolou as nervuras das cultivares e determinou-se o teor de lignina, os dados da Tabela 3 indicam que existe diferença significativa entre as cultivares Doko e Savana para esse parâmetro avaliado.

**Tabela 3.** Teor de lignina na nervura para as cultivares Doko e Savana.

CULTIVAR	TEOR DE LIGNINA %	
	NERVURA CENTRAL	CV %
DOKO	10,77a1	3,78
SAVANA	9,71b	

<sup>1</sup>Médias seguidas de distinta letra minúscula na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os tecidos condutores presentes na folha encontram-se agrupados em feixes libero-lenhosos, nos quais o xilema está voltado para a epiderme superior e o floema, para a epiderme inferior. Os feixes condutores mais grossos formam as nervuras foliares. A nervura é uma estrutura de sustentação da folha formada pelos tecidos colênquima e esclerênquima. As células do esclerênquima possuem um espessamento secundário nas paredes devido à impregnação de lignina.

A variação nos teores de lignina nas nervuras de ambas cultivares pode estar relacionada a variabilidade genética entre as mesmas. Cultivares da *mesma espécie* e *espécies* de *mesmo* gênero podem apresentar incrementos de *lignina* diferenciados (Silva et.al. 2005).

Os dados da Tabela 4 indicam que o teor de lignina no pecíolo não apresenta efeito significativo entre as cultivares Doko e Savana.

**Tabela 4.** Teor de lignina no pecíolo para as cultivares Doko e Savana.

CULTIVAR	TEOR DE LIGNINA %	
	PECÍOLO	CV %
DOKO	11,24a <sup>1</sup>	4,39
SAVANA	11,28a	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados da Tabela 5 indicam que no teor de lignina na vagem existe diferença significativa entre as cultivares Doko e Savana.

**Tabela 5.** Teor de lignina na vagem para as cultivares Doko e Savana.

CULTIVAR	TEOR DE LIGNINA %	
	VAGEM	CV %
DOKO	13,68a1	6,10
SAVANA	11,77b	

<sup>1</sup>Médias seguidas de distinta letra minúscula na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Brzezinski et.al. (2017) também observaram variação de lignina na vagem entre cultivares de soja e concluíram que cultivares com maior teor de lignina na vagem apresentam melhor qualidade de sementes e maior resistência à deterioração por umidade em pré-colheita.

## Conclusão

O método utilizado se mostrou eficaz, apresentando resultados satisfatórios e condizentes com a literatura.

Na determinação de lignina nos tegumentos de soja para comparação de cultivares sugere-se a remoção do hilo.

Na determinação de lignina no limbo foliar sugere-se a remoção da nervura central.

## Agradecimentos

Agradecemos aos profissionais Waldemar Oliveira Neto e Antonio Rocha Melchades do Núcleo de Tecnologia de Sementes e Grãos Dr. Nilton Pereira da Costa, Laboratório de Química de Sementes, pelo apoio nas análises de lignina realizadas.

## Referências

ALVAREZ, P. J. C.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; MANDARINO, J. M. G.; FRANÇA NETO, J. de B. Relationship between soybean seed coat lignin content and resistance to mechanical damage. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 2, p. 209-214, 1997.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, p. 519-546, 2003.

BRZEZINSKI, C. R.; ABATI, J.; ZUCARELI, C.; KRZYŻANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; FRANÇA-NETO, J. B.; HENNING, F. A. Deterioração em pré-colheita: teor de lignina e qualidade fisiológica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 20., 2017, Foz do Iguaçu. **Informativo ABRATES**, v. 27, n. 2, ago. 2017. p. 354. número especial.

BUTLER, G. W.; BAILEY, R. W. **Chemistry and biochemistry of herbage**. London: Academic Press, 1973. 416 p.

- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS-FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.
- CASULA, D. K.; KRZYZANOWSKI, F. C. Análise de lignina em diferentes partes da soja utilizando o método do brometo de acetila. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 10., 2015, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2015. p. 94-100.
- FRANÇA NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. da. Tecnologia de produção de sementes. In: A CULTURA da soja no Brasil. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 1 CD-ROM.
- FRANÇA NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; WEST, S. H.; HENNING, A. A.; COSTA, N. P. da. Determinação do conteúdo de lignina nos tegumentos de sementes de soja com tegumento preto e amarelo. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO CENTRAL DO BRASIL, 21., 1999, Dourados. **Resumos...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Londrina: Embrapa Soja, 1999. p. 235. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 7; Embrapa Soja, Documentos, 134).
- KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. de B.; MANDARINO, J. M. G. Evaluation of lignin content of soybean seed coat stored in a controlled environment. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 220-223, 2008.
- MERTZ, L. M. **Caracterização morfo-fisiológica e identificação de fragmentos de cDNA diferencialmente expressos em tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante**. 2007. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Sementes, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- POLLE, A.; OTTER, T.; SEIFERT, F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). **Plant Physiology**, v. 106, p. 53-60, 1994.
- SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- VANCE, C. P.; KIRK, T. K.; SHERWOOD, R. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 18, p. 259-288, 1980.

## Avaliação da resistência do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) à um isolado virulento de *Phakopsora pachyrhizi*

SOUZA JUNIOR, H. de<sup>1</sup>; SILVA, A. C.<sup>2</sup>; AVELINO, B. B.<sup>3</sup>; FERREIRA, E. G. C<sup>3</sup>; CASTANHO, F. M.<sup>3</sup>; ISEPON, A. M. B.<sup>4</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Unopar, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, helioszjr@gmail.com; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação, Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina; <sup>4</sup>Professora, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife; <sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

### Introdução

Atualmente, a ferrugem-asiática da soja (FAS), causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é a doença que mais preocupa os sojicultores nacionais. Desde a sua primeira ocorrência no país, a doença tem causado perdas de produtividades de até 80% (Soares et al., 2004).

Para o manejo adequado desta doença, existem várias ferramentas de controle que devem ser aplicadas de forma integrada, como o vazio sanitário, aplicação de fungicidas e utilização de cultivares precoces, assim como a resistência genética ocasionada pela presença dos genes *Rpp*. A resistência genética a FAS é diferenciada principalmente pelo tipo de lesão, em que a reação de suscetibilidade é caracterizada por lesões marrons claras (TAN) e reações de resistência são caracterizadas por lesões marrons avermelhadas (RB - *reddish-brown*). As lesões TAN apresentam, em geral, de duas a cinco urédias por lesão, e as lesões RB apresentam, em geral, de zero a duas urédias por lesão. Existe, também, a reação de imunidade, em que não se observam lesões macroscópicas como resultado das inoculações com o patógeno (Goellner et al., 2010). Com a evolução da doença, ocorre o amarelecimento das folhas e posteriormente sua queda precoce, afetando significativamente a formação dos grãos e, conseqüentemente, reduzindo a produtividade (Yorinori et al., 2002; Zambenedetti et al., 2007).

Além da FAS ocorrer na soja, ela também pode infectar pelo menos 60 espécies de plantas pertencentes a 26 gêneros de leguminosas, tais como o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Segundo Jaccoud Filho e Dabul (2006), os sintomas da *P. pachyrhizi* em lavouras de feijão-caupi, apresentam-se inicialmente nas folhas do terço médio e terço superior. As lesões são marrom claras e com a evolução da doença passam a uma coloração mar-

rom escura. Em outras palavras, as pústulas são identificadas por meio de pequenas manchas necróticas, amareladas e levemente salientes nas folhas do feijão-caupi.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a resistência genética do feijão-caupi a um isolado virulento de *P. pachyrhizi*.

## Material e Métodos

As atividades experimentais foram realizadas em casa de vegetação, nos Laboratórios de Genética Molecular e Seleção Assistida (LGMSA) e de Biotecnologia Vegetal na Embrapa Soja, Londrina, PR.

Para a avaliação de resistência a FAS no feijão-caupi, foram utilizados 10 acessos: Vigna 704 (FJ. Mungo), Canapu, Pitiuba, BR14 Mulato, Vigna Dekindteana 200, Pingo de Ouro, JT85F2687, Santo Inácio, Vigna Sesquipedalis e Vigna Cylindrinca 1579. Tais acessos foram cedidos pela Universidade Federal de Pernambuco. Para os testes, foi utilizado o isolado monospórico virulento RV14.1M, obtido a partir de uma amostra de campo de Rio Verde, GO, na safra de 2014, pertencente à Coleção de Microrganismos da Embrapa Soja.

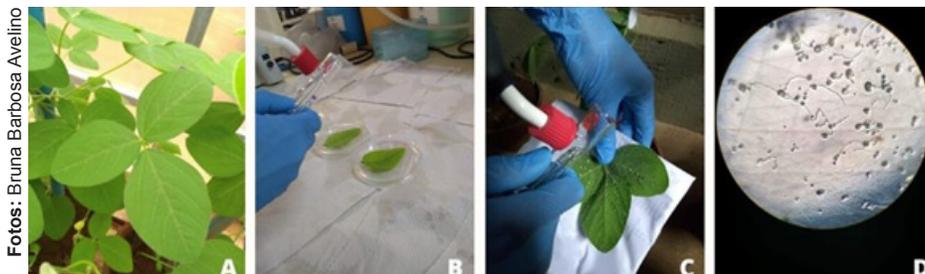
### Desenho experimental e inoculação com *P. pachyrhizi*

A fenotipagem foi realizada em folhas destacadas. Para a obtenção de folhas de feijão-caupi, seis sementes por acesso foram semeadas em vasos de oito litros preenchidos com solo em casa de vegetação. Após 14 dias da semeadura, selecionou-se ao acaso, três plantas de cada acesso e de cada uma, retirou-se um trifólio que foi levado para o laboratório. As folhas foram lavadas com água e então colocadas em placas de Petri de plástico de 9 cm de diâmetro, contendo ágar-ágar com a superfície abaxial para cima.

Para a inoculação, foi preparada uma suspensão contendo  $4 \times 10^4$  esporos por ml. Após feita a preparação, foi deixado por 30 minutos na suspensão, sendo a contagem dos esporos conduzida em câmara de Neubauer. As folhas foram inoculadas borrifando-se a suspensão na face abaxial com o auxílio de aerógrafo. Detalhes da inoculação podem ser observados na Figura 1.

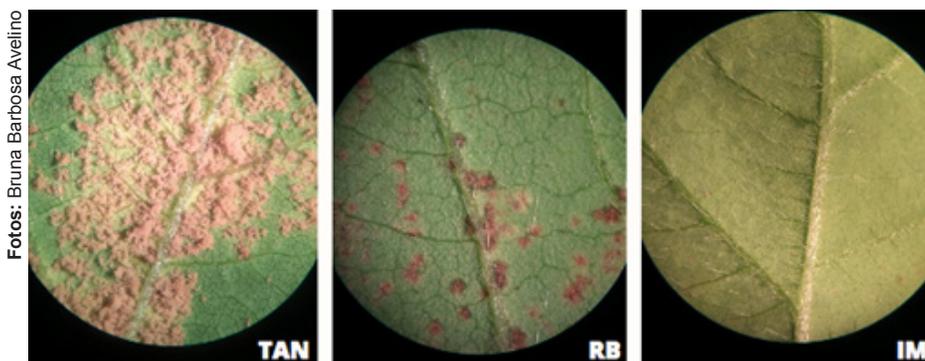
Para confirmação da eficiência da inoculação, como testemunha de suscetibilidade à FAS, foi utilizada a cultivar de soja BRS 184. Após a inoculação, as

placas de Petri contendo as folhas inoculadas foram fechadas e mantidas em uma câmara de crescimento por um período de 15 dias para a fenotipagem, sob condições ideais de 50-55% de umidade, 24°C de temperatura e 12h/12h (luz/escuro).



**Figura 1.** A) Trifólio para inoculação de ferrugem; B) Inoculação feito no laboratório em folhas destacadas; C) Inoculação na parte abaxial e central do trifólio; D) Contagem dos esporos em câmara de Neubauer.

Na Figura 2, são apresentadas as reações de suscetibilidade e resistência dos acessos de soja utilizados como testemunhas neste experimento.



**Figura 2.** Reações à ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) apresentadas pelos -acessos de soja testados em casa de vegetação (TAN- BRS 184: reação de suscetibilidade; RB- PI 594756: reação de resistência parcial; IM- PI 587886: imune, reação indicativa de resistência completa).

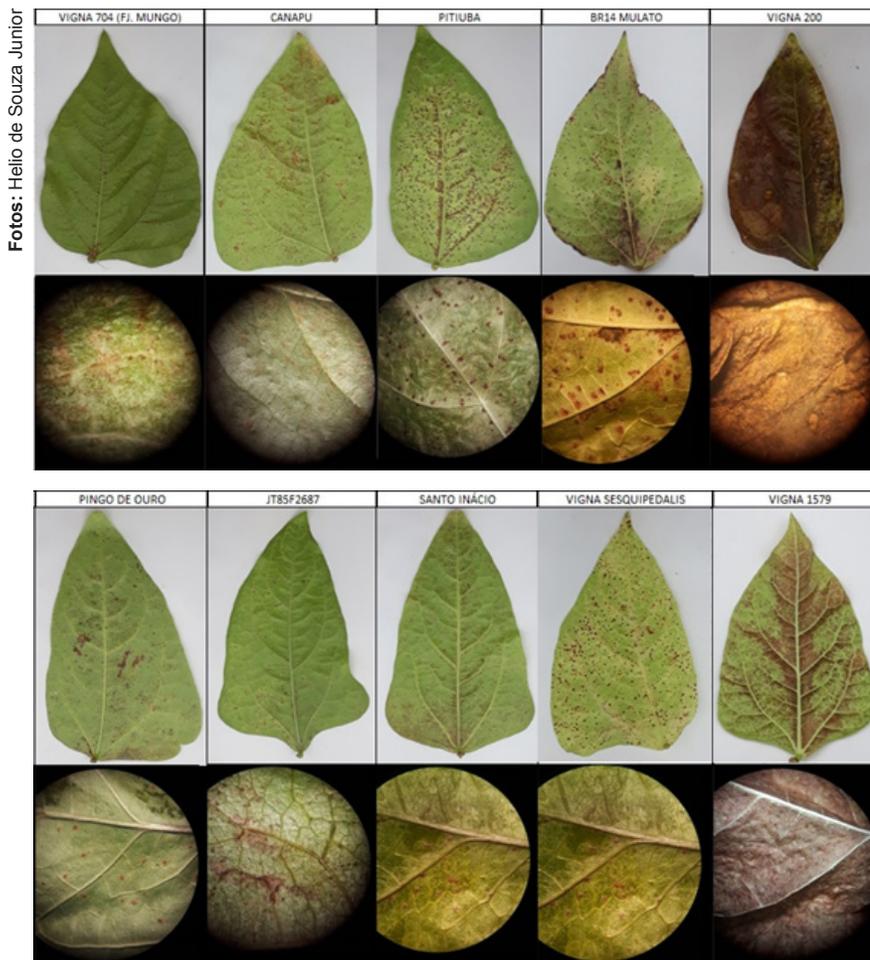
## Fenotipagem

A avaliação dos acessos quanto a resistência ao isolado RV14.1M foi inicialmente realizada de forma visual, observando-se a presença ou ausência de lesões características, bem como quantitativa, avaliando os parâmetros: Nível de esporulação (NE), nível de esporulação com desvio padrão (DP), número de urédias abertas por lesão (NUA), frequência das lesões com ure-

dinia (% LU) e frequência de urédias abertas (% UA), conforme Manual do JIRCAS, num total de 90 lesões (Yamanaka et al., 2019).

## Resultados e Discussão

Com base nos resultados, 9 dos 10 acessos testados apresentaram ausência de lesão TAN, sem esporulação em todas as repetições avaliadas. A imagem de cada acesso e sua resposta fenotípica frente a inoculação com o isolado pode ser observada na Figura 3.



**Figura 3.** Resposta fenotípica dos 10 acessos de feijão-caupi inoculados com o isolado RV14.1M de *P. pachyrhizi*.

Apenas o acesso BR14 Mulato apresentou lesões com coloração e níveis elevados de esporulação em uma das 3 repetições biológicas. As médias dos resultados da fenotipagem deste acesso para cada um dos parâmetros avaliados pode ser observada na tabela 1.

**Tabela 1.** Avaliação fenotípica do feijão-caupi BR 14 Mulato, quanto ao nível de esporulação (NE), nível de esporulação com desvio padrão (DP), número de urédias abertas por lesão (NUA), frequência das lesões com uredinia (% LU) e frequência de urédias abertas (% UA).

GENÓTIPO	ISOLADO RV14. 1M								AVALIAÇÕES		
	Nº de Lesões	NE1	DP	NUA	DP	Open NUA	DP	%LU	%UA	VISUAL	JIRCAS
BR14 MULATO											
PLANTA 1	90	2,000	0,830	3,633	1,169	3,067	1,413	100%	84%	S	Suscetível
PLANTA 2	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0%	0%	MR	Moderadamente Resistente
PLANTA 3	90	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0%	0%	MR	Moderadamente Resistente

<sup>1</sup>Critério de classificação: Nível de esporulação (NE), nível de esporulação com desvio padrão (DP), número de urédias abertas por lesão (NUA), frequência das lesões com uredinia (% LU) e frequência de urédias abertas (% UA) (Yamanaka et al. 2019).

## Conclusão

A inoculação de esporos de *P. pachyrhizi* em folhas destacadas nos acessos de feijão-caupi foi eficiente para a avaliação da fenotipagem da doença.

Foi possível observar lesões do fungo em todos os acessos avaliados, no entanto com elevados níveis de resistência para o isolado RV14.1M.

O acesso BR14 Mulato apresentou lesões com urédias e esporulação, sendo classificado como moderadamente resistente.

Os acessos de feijão-caupi serão avaliados quanto à resistência à FAS com outros isolados do fungo *P. pachyrhizi*, a fim de explorar a abrangência da resistência observada.

## Referências

- GOELLNER, K.; LOEHRER, M.; LANGENBACH, C.; CONRATH, U.; KOCH, E.; SCHAFFRATH, U. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 169-177, 2010.
- JACCOUD FILHO, D. S.; DABUL, A. N. G. Rapid method to detect *Phakopsora pachyrhizi* and *Phakopsora meibomia* in Fabaceae plants. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 39., 2006, Salvador, BA. Salvador: SBF, 2006. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, S247, 2006. suplemento.
- SOARES, R. M.; RUBIN, S. A. L.; WIELEWICKI, A. P.; OZELAME, J. G. Fungicidas no controle da ferrugem-asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**, v. 34, p. 1245-1247, 2004.
- YAMANAKA, N.; KATO, M.; AKAMATSU, H.; YAMAOKA, Y. **Laboratory manual for the studies on soybean rust resistance**: version 24. Tsukuba: JIRCAS, 2019. 50 p. Disponível em: [www.jircas.go.jp/en/publication/manual\\_gudeline/30](http://www.jircas.go.jp/en/publication/manual_gudeline/30). Acesso em: 30 jun. 2020.
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; FERNANDEZ P. F. T. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/01 e 2001/02. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 2.; MERCOSOJA 2002, 2002, Foz do Iguaçu. **Perspectivas do agronegócio da soja**: resumos. Londrina: Embrapa Soja, 2002. p. 94. (Embrapa Soja. Documentos, 181).
- ZAMBENEDETTI, E. B.; ALVES, E.; POZZA, E. A.; ARAUJO, D. V. Germinação de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi* em diferentes métodos de armazenamento. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 83-85, 2007.

## Análise *in silico* de transportadores de aminoácidos diferencialmente expressos em sementes de cultivares de soja com variação na coloração do tegumento

MARIN, D. R.<sup>1</sup>; SOUZA, E. M. G.<sup>1</sup>; MOLINARI, M. D. C.<sup>2</sup>; MARIN, S. R. R.<sup>3</sup>; JOAQUIM, P. I. L.<sup>4</sup>; NEPOMUCENO, A. L.<sup>5</sup>; MERTZ-HENNING, L. M.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Unifil, Centro Universitário Filadelfia, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina-PR, dani.rockenbachmarin@gmail.com;

<sup>2</sup>Pós-doutoranda, Embrapa Soja; <sup>3</sup>Analista, Embrapa Soja; <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia UEL; <sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Soja

### Introdução

O teor de proteína é um fator determinante no valor nutricional e econômico da soja, pois a soja representa um grande recurso para alimentação animal e humana. O farelo de soja é uma das principais fontes de proteína para alimentação animal (Warrington et al., 2015), e a proteína de soja possui uma proporção adequada dos aminoácidos essenciais para alimentação humana, com exceção dos aminoácidos sulfurados (metionina e cisteína), e o grão apresenta também outros nutrientes benéficos (Zhang et al., 2018).

A composição química dos grãos de soja apresenta características diferenciadas de acordo com a cor do tegumento, que pode ser amarelo, verde, marrom ou preto (Kumar et al., 2010). O teor de proteína nas cultivares de soja brasileira é de aproximadamente 37% (Lorini, 2019) e os grãos pretos apresentam antocianinas que são moléculas orgânicas responsáveis pela coloração escura do tegumento e que confere propriedades antioxidantes (Carrão-Panizzi et al., 2019).

Dentre as cultivares de soja disponíveis no mercado brasileiro, a cultivar BRSMG 715A, que possui o tegumento de coloração preta, se destaca por apresentar alto teor de proteína, sabor mais agradável e maior facilidade de cozimento do que a soja comum, podendo ser usada para substituir ou complementar o feijão, e por isso tem grande potencial de uso para alimentação humana (Landgraf, 2019). Assim, o cultivo da soja preta pode representar um nicho de mercado do grão e seus derivados como opção de uma dieta diversificada com qualidade nutricional e benefícios à saúde humana.

Devido à importância econômica e nutricional, é cada vez mais desejável a obtenção de cultivares de soja com alto teor proteico, entretanto, o aprimoramento genético do teor de proteína na soja é complexo, pois existe uma correlação negativa entre o teor de proteína e outros parâmetros importantes, como o rendimento dos grãos (Kim et al., 2016), o teor de óleo e sacarose (Chaudhary et al., 2015; Yu et al., 2016), e também interação negativa com fatores ambientais como a baixa temperatura (Bellaloui et al., 2015) e o déficit hídrico (Nakagawa et al., 2018). Para equacionar essa questão, é fundamental conhecer os genes envolvidos na formação de proteínas nas semente de soja, e uma estratégia para isso, é identificar *in silico* os genes expressos nas sementes que possam estar relacionados com a formação de proteína no grão, como por exemplo, os genes envolvidos no transporte de compostos nitrogenados, como os transportadores de aminoácidos.

Os aminoácidos são moléculas formadas à partir do nitrogênio inorgânico que é absorvido pelas raízes, e então são transportados através do sistema vascular para desempenhar funções essenciais em toda planta, entre elas a formação de proteínas nas sementes. Os transportadores de aminoácidos são necessários para distribuição do nitrogênio orgânico presente nos aminoácidos por toda planta, esses transportadores possuem especificidade e afinidade com os diferentes tecidos das plantas e com os diferentes aminoácidos (Dinkeloo et al., 2018).

Alguns transportadores de aminoácidos pertencentes a família dos AAP (*Amino Acid Permease*) foram relatados como reguladores do transporte de nitrogênio para a semente através da transferência de aminoácidos do xilema para floema, como observado em ervilhas (Tegeder et al., 2007), em feijão (Tan et al., 2008) e em soja (Liu et al., 2020).

Esse trabalho tem como objetivo identificar os transportadores de aminoácidos diferencialmente expressos em sementes da cultivar BRSMG 715A para contribuir na elucidação dos fatores que determinam maior teor proteico.

## Material e Métodos

Foram analisados dados provenientes de bibliotecas de RNASeq de sementes maduras da cultivar de soja BRSMG 715A de tegumento preto, e das

cultivares de tegumento amarelo DM 6563 iPRO e BRS 413RR. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com duas repetições biológicas. Foram sintetizadas seis bibliotecas *paired-end* de 75pb usando o *kit Illumina TruSeq™ SBS v5*, e sequenciadas na plataforma *Illumina NextSeq* pela Universidade da Georgia (EUA).

Foi avaliada a qualidade das leituras com o *software FastQC* versão 0.11.5. Os adaptadores e sequências menores que 40 pb e de baixa qualidade (*Phred Quality score*  $\geq 30$ ) foram removidos usando o *software Trimmomatic* versão 0.36. Foi utilizada como referência para a indexação do genoma e o alinhamento das leituras a versão 2 do genoma da soja (*Gmax\_275\_Wm82.a2.V1*) usando o *software HISAT2* versão 2.1.0, e foram recuperados apenas os alinhamentos exclusivos com maior qualidade. Para melhorar a qualidade do mapeamento foram removidos os artefatos de PCR (duplicação de leituras não naturais) pelo *software Samtools* versão 1.5. A montagem dos transcritos foi realizada pelo *software Stringtie* versão 1.3.3 usando o arquivo de anotação *GFF3* do *Phytozome* como guia. A contagem dos transcritos realizada no *software EdgeR* versão 3.22.3 em *RStudio* versão 3.5.1. Os genes diferencialmente expressos foram obtidos comparando a cultivar BRSMG 715A (tegumento preto) com as cultivares de tegumento amarelo DM 6563 iPRO e BRS 413RR. Somente os genes que apresentaram alteração  $\log_2$  em mudança de dobra ( $\log_2 FC$ )  $\leq -1$  (regulado para baixo) e  $\geq 1$  (regulado para cima) com FDR (Taxa de falso positivo)  $\leq 0,05$  foram considerados diferencialmente expressos. A anotação biológica foi realizada pelo *software Phytozome*.

À partir destes dados, foram selecionados 11 genes diferencialmente expressos *up* e *down* regulados que codificam para transportadores de aminoácidos em soja para análise de número de cópias, parálogos em soja e ortólogos em *Arabidopsis thaliana*. Foram resgatadas as sequências peptídicas de cada gene através do *software Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Em seguida foi realizada a análise do número de cópias de sequências parálogas nas duas versões mais recentes do genoma de soja *Wm82.a2.v1*, *Wm82.a4.v2* e de sequências ortólogas no genoma de *Arabidopsis thaliana* TAIR10 por meio do *software Persephone* (<https://persephonesoft.com/>). Nesta busca foram selecionadas apenas as sequências peptídicas que apresentavam identidade  $\geq 50\%$ , e que estavam presentes nas duas versões do genoma da soja, com a finalidade de dar maior confiabilidade nas

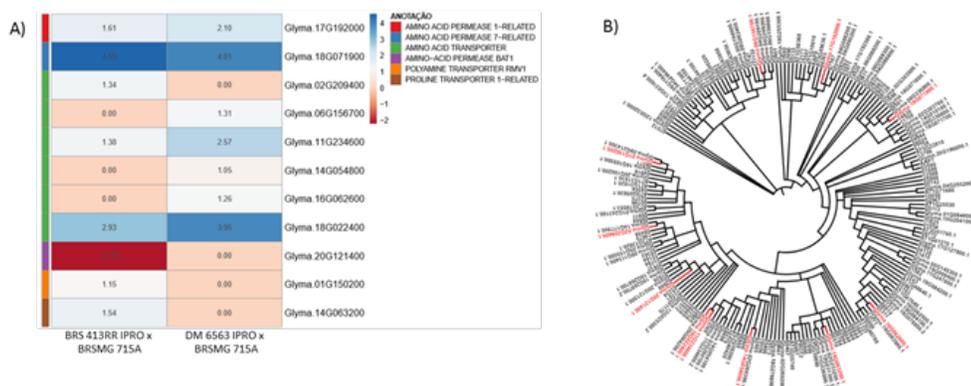
sequências resgatadas. Em seguida foi realizado o alinhamento de todas as sequências utilizando o *software Muscle* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), e gerado a árvore filogenética das sequências utilizando o *software ItoI* (<https://itol.embl.de/>).

Com o resultado da árvore filogenética foi identificado o clado que continha o gene alvo e os genes que integravam esse clado. Foi definida a família de cada gene no *software Phytozome* para confirmação da classificação do gene, e os genes pertencentes a mesma família foram empregados para análise de motivos presentes nas proteínas utilizando o *software Motif Scan* ([https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif\\_scan](https://myhits.sib.swiss/cgi-bin/motif_scan)).

## Resultados e Discussão

Nesse estudo foram identificados 11 genes transportadores de aminoácidos que foram diferencialmente expressos nas sementes da cultivar de tegumento preto BRSMG 715A em relação às cultivares de tegumento amarelo BRS 413RR e DM 6563 iPRO (Figura 1).

Todos os genes foram regulados positivamente na cultivar com tegumento preto em comparação com as cultivares de tegumento amarelo, com exceção do Glyma.20G121400, caracterizado como Aminoácido Permease BAT1, que foi regulado negativamente na cultivar BRSMG 715A em relação a cultivar BRS 413RR e não apresentou expressão diferencial em relação a cultivar DM 6563 iPRO (Figura 1A). Em *A. thaliana*, BAT1 foi denominado como transportador de aminoácidos bidirecional, que facilita a difusão de alanina, arginina, glutamato e lisina, e sugerido que funciona como exportador de aminoácidos do floema para os tecidos drenos (Dundar et al., 2009).



**Figura 1.** Genes de transportadores de aminoácidos diferencialmente expressos (Log<sub>2</sub> fold change) na cultivar BRSMG 715A (tegumento preto) em comparação as cultivares BRS 413RR e DM 6563 iPRO (tegumento amarelo). A) *Heatmap* de expressão dos 11 genes avaliados via RNA-Seq em log<sub>2</sub>FC (números positivos representam *up*-regulação e negativos *down*-regulação). B) Árvore filogenética dos 11 genes transportadores de aminoácidos diferencialmente expressos na cultivar BRSMG 715A (destacados em vermelho) à nível de porcentagem de identidade de seqüências proteicas (≥50%) com *A. thaliana* e soja (Gmax.Wm82.a2.v1).

Não foi encontrada anotação completa para seis genes, sendo relatados genericamente como transportadores de aminoácidos, 3 genes foram relatados como pertencentes a família de Aminoácido Permease (AAP), um gene classificado como transportador de prolina e outro como transportador de poliamina RMV1 (Figura 1A). Os transportadores de aminoácidos são divididos em duas superfamílias principais os transportadores de aminoácidos Poliamina e Colina (APC) e os transportadores de aminoácidos (ATF). As famílias das AAP e dos transportadores de prolina pertencem a superfamília ATF (Zhao et al., 2017).

Em soja, foram identificados 189 genes transportadores de aminoácidos, classificados em 12 subfamílias distintas (Cheng et al., 2016). Em *A. thaliana* AAP1 foi descrito como regulador da captação de aminoácidos importante para a síntese proteica e rendimento das sementes (Sanders et al., 2009). Em feijão AAP1 foi localizado no floema e nas células-tronco do parênquima do xilema, também foi detectado nas células epidérmicas externas dos cotilédones em desenvolvimento (Tan et al., 2008). Os autores sugerem que AAP1 tem papel na transferência de aminoácidos entre xilema-floema e no carregamento de floema para o transporte aos drenos, bem como na importação

para os cotilédones para o desenvolvimento de sementes e armazenamento (Tan et al., 2008). Ainda, em ervilha a expressão de AAP1 aumentou o teor de proteína na semente (Rolletschek et al., 2005). Essas evidências indicam o importante papel de AAP1 na formação de proteína no grão e possível envolvimento no maior teor de proteína encontrado nos grãos da cultivar BRSMG 715A.

A classificação dos genes e a relação filogenética são importantes para a análise funcional de uma família de genes. A árvore filogenética gerada com os genes é apresentada na figura 1B. Os transportadores de aminoácidos Glyma.18G022400 e Glyma.11G234600 se agruparam no mesmo clado (Figura 1B) e apresentaram o mesmo padrão de regulação, embora tenham variado em magnitude (Figura 1A), uma análise criteriosa identificou esses genes como cópias, e portanto, devem exercer uma função importante no transporte de aminoácidos, pois ambas as cópias foram expressas diferencialmente na cultivar BRSMG 715A (Tabela 1). As informações referentes ao número de cópias, ortólogos em *A. thaliana* e parálogos em soja dos genes avaliados neste estudo são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Caracterização a nível proteico dos genes transportadores de aminoácidos diferencialmente expressos nas bibliotecas de RNA-Seq e seus ortólogos, cópias e parálogos próximos.

Gene ID	Cópias	Ortólogo	Parálogo	Anotação	Família
Glyma.20G121400.1	NA	NA	Glyma.20G121500.1/Glyma.10G269700.1	AA pemease BAT1	PF00324 - PS50285
Glyma.01G150200.1	Glyma.09G214300.1	AT1G31830.1	Glyma.16G105500.1	Polyamine transporter RWV1	PF00324 - PS50285
Glyma.02G209400.1	Glyma.14G177500.1	AT3G13620.1	Glyma.08G113400.1/Glyma.05G155500.1	AA transporter	PF00324 - PS50285
Glyma.14G054800.1	Glyma.02G260300.1	NA	Glyma.02G260200.1	AA transporter	PF03222 - PS50286 - PF01490
Glyma.11G234600.1	Glyma.18G022400.1	AT3G56200.1	Glyma.14G054100.1/Glyma.02G260100.1	AA transporter	PF03222 - PS50286 - PF01490
Glyma.14G063200.1	Glyma.02G253200.1	AT2G39890.1	Glyma.18G031300.1/Glyma.11G226000.1	Proline Transporter 1	PF01490 - PS50286
Glyma.16G062600.1	Glyma.19G083900.1	AT5G40780.1	NA	AA transporter	PF01490 - PS50286
Glyma.18G071900.1	Glyma.08G336600.1	NA	Glyma.18G071800.1/Glyma.02G303500.1/Glyma.14G010300.1	AAP7	PF01490 - PS50286
Glyma.17G192000.1	NA	NA	Glyma.06G090200.1/Glyma.04G088200.1	AAP1	PF01490 - PS50286
Glyma.06G156700.1	Glyma.04G209100.1	NA	Glyma.06G156700.1/Glyma.04G209100.1/Glyma.04G209200.1/Glyma.06G156600.1	AA transporter	PF1490- PS50286-PS51257

Os 11 genes de transportadores de aminoácidos foram agrupados em 3 famílias de proteínas PF01490, PF03222 e PF03424. Os Glyma.17G192000 e Glyma.20G121400 se diferenciaram dos demais, pois não apresentaram cópias no genoma da soja, e portanto não sofreram duplicação, e também não apresentaram ortólogos em *A. thaliana*. Os glyma.01G150200, Glyma.02G209400, Glyma.11G234600, Glyma.14G063200 e Glyma.16G062600 apresentaram ortólogos em *A. thaliana*. Em relação aos parálogos, apenas o glyma.16G062600 não apresentou parálogo na soja (Tabela 1).

## Conclusão

Os transportadores de aminoácidos são de particular importância para o carregamento de nitrogênio orgânico para as sementes. Nesse estudo foram identificados 11 genes expressos em sementes de soja que codificam para proteínas com função no transporte de aminoácidos e que podem estar associados ao acúmulo de proteína no grãos. Os transportadores da família das aminoácido permeases (AAP) atuam de forma ampla no transporte de nitrogênio orgânico presente nos aminoácidos e potencialmente na formação de proteínas nos grãos, particularmente o AAP1. A maioria desses genes foi diferentemente regulada entre a cultivar de soja com tegumento preto em relação as cultivares com tegumento amarelo. Esses resultados são promissores porém ainda parciais, estudos adicionais são necessários para comprovar o papel desses genes no acúmulo de proteína no grão de soja.

## Referências

- BELLALLOUI, N.; BRUNS, H. A.; ABBAS, H. K.; MENGISTU, A.; FISHER, D. K.; REDDY, K. N. Agricultural practices altered soybean seed protein, oil, fatty acids, sugars, and minerals in the midsouth USA. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 31, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00031.
- CARRÃO-PANIZZI, M. C.; SILVA, B. dos S.; LEITE, R. S.; GODOY, R. L. de O.; SANTIAGO, M. C. P. de A.; FELBERG, I.; OLIVEIRA, M. C. N. de. Isoflavone, anthocyanin, and fatty acid contents of vegetable-type soybean grains at different maturity stages. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, e00032, 2019.
- CHAUDHARY, J.; PATIL, G. B.; SONAH, H.; DESHMUKH, R. K.; VUONG, T. D.; VALLIYODAN, B.; NGUYEN, T. H. Expanding omics resources for improvement of soybean seed composition traits. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1021, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.01021.
- CHENG, L.; YUAN, H. Y.; REN, R.; ZHAO, S. Q.; HAN, Y. P.; ZHOU, Q. Y.; KE, D. X.; WANG, Y. X.; WANG, L. Genome-wide identification, classification, and expression analysis of amino acid transporter gene family in *Glycine max*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 515, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00515.
- DINKELLOO, K.; BOYD, S.; PILOT, G. Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 74, p. 105-113, 2018. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.07.010.
- DUNDAR, E.; BUSH, D. R. BAT1, a bidirectional amino acid transporter in Arabidopsis. **Planta**, v. 229, n. 5, p. 1047-1056, 2009.
- KIM, M.; SCHULTZ, S.; NELSON, R. L.; DIERS, B. W. Identification and fine mapping of a soybean seed protein QTL from PI 407788A on chromosome 15. **Crop Science**, v. 56, n. 1, p. 219-225, 2016. DOI: 10.2135/cropsci2015.06.0340.
- KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A. K.; PRATAP, D.; BHATNAGAR, D. A comparative assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with varying seed coat colour. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 323-328, 2010. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.10.019.

- LANDGRAF, L. **Nova soja preta tem mais proteína que feijão e sabor aprovado**. Embrapa Soja: Notícias. 22 out. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/47445298/nova-soja-preta-tem-mais-proteina-que-feijao-e-sabor-aprovado>. Acesso em: 27 maio 2020.
- LIU, S.; WANG, D.; MEI, Y.; XIA, T.; XU, W.; ZHANG, Y.; YOU, X.; ZHANG, X.; WANG, N. N. Overexpression of GmAAP6a enhances tolerance to low nitrogen and improves seed nitrogen status by optimizing amino acid partitioning in soybean. **Plant Biotechnology Journal**, v. 18, n. 8, p. 1749-1762, 2020. DOI: 10.1111/pbi.13338.
- LORINI, I. (Ed.). **Qualidade de sementes e grãos comerciais de soja no Brasil - safra 2017/2018**. Londrina: Embrapa Soja, 2019. 220 p. (Embrapa Soja. Documentos, 422).
- NAKAGAWA, A. C. S.; ITOYAMA, H.; ARIYOSHI, Y.; ARIO, N.; TOMITA, Y.; KONDO, Y.; IWAYA-INOUE, M.; ISHIBASHI, Y. Drought stress during soybean seed filling affects storage compounds through regulation of lipid and protein metabolism. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 6, p. 111, 2018.
- ROLLETSCHEK, H.; HOSEIN, F.; MIRANDA, M.; HEIM, U.; GÖTZ, K. P.; SCHLERETH, A.; BORISJUK, L.; SAALBACH, I.; WOBUS, U.; WEBER, H. Ectopic expression of an amino acid transporter (VfAAP1) in seeds of *Vicia narbonensis* and pea increases storage proteins. **Plant Physiology**, v. 137, n. 4, p. 1236-1249, 2005. DOI: 10.1104/pp.104.056523.
- SANDERS, A.; COLLIER, R.; TRETHERWY, A.; GOULD, G.; SIEKER, R.; TEGEDER, M. AAP1 regulates import of amino acids into developing *Arabidopsis* embryos. **The Plant Journal**, v. 59, n. 4, p. 540-552, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03890.x.
- TAN, Q.; GRENNAN, A. K.; PELISSIER, H. C.; RENTSCH, D.; TEGEDER, M. Characterization and expression of French bean amino acid transporter PvAAP1. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 348-356, 2008. DOI: 10.1016/j.plantsci.2007.12.008.
- TEGEDER, M.; TAN, Q.; GRENNAN, A. K.; PATRICK, J. W. Amino acid transporter expression and localisation studies in pea (*Pisum sativum*). **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 11, p. 1019-1028, 2007. DOI: 10.1071/FP07107.
- WARRINGTON, C. V.; ABDEL-HALEEM, H.; HYTEN, H. D. L.; CREGAN, P. B.; ORF, J. H.; KILLAM, A. S.; BAJJALIEH, N.; LI, Z.; BOERMA, H. R. QTL for seed protein and amino acids in the Benning × Danbaekkong soybean population. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 5, p. 839-850, 2015. DOI: 10.1007/s00122-015-2474-4.
- YU, X.; YUAN, F.; FU, X.; ZHU, D. Profiling and relationship of water-soluble sugar and protein compositions in soybean seeds. **Food Chemistry**, v. 196, p. 776-782, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.09.092.
- ZHANG, J.; WANG, X.; LU, Y.; BHUSA, S. J.; SONG, Q.; CREGAN, P. B.; YEN, Y.; BROWN, M.; JIANG, G. L. Genome-wide scan for seed composition provides insights into soybean quality improvement and the impacts of domestication and breeding. **Molecular Plant**, v. 11, n. 3, p. 460-472, 2018. DOI: 10.1016/j.molp.2017.12.016.
- ZHAO, Y.; XU, Y.; WANG, Z.; ZHANG, J.; CHEN, X.; LI, Z.; LI, Z.; JIN, L.; WEI, P.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; WANG, R.; WEI, F. Genome-wide identification and characterization of an amino acid permease gene family in *Nicotiana tabacum*. **RSC Advances**, v. 7, n. 60, p. 38081-38090, 2017.

## Fitonematoides em diferentes modelos de produção envolvendo a soja no norte e noroeste do Paraná

GLOOR, V. S.<sup>1</sup>; CECATTO, S. el K.<sup>2</sup>; ALMEIDA, L. F. A.<sup>3</sup>; FRANCHINI, J. C.<sup>4</sup>; BALBINOT JUNIOR, A. A.<sup>4</sup>; SANTOS, E. L. dos<sup>5</sup>; FURLANETTO, R. H.<sup>6</sup>; NUNES, E. da S.<sup>6</sup>; DEBIASI, H.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculdade Pitágoras, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, [vinicius\\_gloor@hotmail.com](mailto:vinicius_gloor@hotmail.com); <sup>2</sup>Estudante de doutorado, UEL; <sup>3</sup>Estudante de Agronomia, UEM; <sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Soja; <sup>5</sup>Centro Universitário FAG, Cascavel, PR; <sup>6</sup>Engenheiro Agrônomo, Cocamar Cooperativa Agroindustrial.

### Introdução

No norte e noroeste do Paraná, predominam modelos de produção de grãos com baixa diversidade de espécies vegetais e baixo aporte de fitomassa da parte aérea e de raízes, baseados nas sucessões milho 2<sup>a</sup> safra/soja e, em menor grau, trigo/soja (Debiasi et al., 2015). Uma das consequências negativas desses modelos é a intensificação dos danos ocasionados por fitonematoides, particularmente na cultura da soja (Dias et al., 2010). Mais de 100 espécies de nematoides têm sido associadas a cultivos de soja em todo o mundo, e no Brasil destacam-se os nematoides de galhas (*Meloidogyne javanica* e *M. incognita*), das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*), de cisto (*Heterodera glycines*) e o reniforme (*Rotylechulus reniformis*). Outros nematoides frequentemente encontrados em áreas de produção de soja, e que apresentam potencial para ocasionar danos em raízes de soja, são *Scutellonema brachyurus* e *Helicotylenchus dihystera* (Machado et al., 2019).

Em geral, a soja, o milho e o trigo são bons hospedeiros de todas essas espécies de nematoides, à exceção de *H. glycines* e *R. reniformis*, que parasitam apenas a 1<sup>a</sup> cultura (Dias et al., 2010). Desse modo, os sistemas de sucessão predominantes no Norte e Noroeste do Estado tendem a aumentar, ao longo do tempo, a densidade populacional destes parasitas. Além disso, a densidade populacional e a magnitude dos danos dos nematoides à soja é maior em solos física, química e biologicamente degradados (Debiasi et al., 2017), o que geralmente ocorre em áreas sob modelos de produção pouco diversificados e com baixo aporte de palha raízes, como nos casos das sucessões milho 2<sup>a</sup> safra/soja e trigo/soja (Debiasi et al., 2015).

O presente trabalho fundamenta-se na hipótese de que a presença de fitonematoides é mais frequente e com maiores densidades populacionais em áreas sob modelos de produção baseados na sucessão milho e/ou trigo/soja comparativamente aos que apresentam maior diversidade de espécies vegetais. Para testar essa hipótese, o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de ocorrência e as densidades populacionais de fitonematoides de importância para a cultura da soja, em lavouras comerciais sob diferentes modelos de produção.

## Material e Métodos

Foram selecionadas 25 áreas agrícolas nas regiões norte e noroeste do Paraná, agrupadas em quatro sub-regiões definidas tendo como base a localização, o material de origem do solo e a altitude (Tabelas 1 e 2): (1) Noroeste Arenito: sete áreas nos municípios de Iporã, Cafezal do Sul, Cruzeiro do Oeste e Cianorte, com altitude < 500 m e solos arenosos; (2) Noroeste basalto: cinco áreas em Maringá e Jussara, com altitude < 600 m e solos muito argilosos; (3) Norte Alto: sete áreas em Apucarana, Arapongas, Cambira e Rolândia, com altitude > 750 m e solos muito argilosos; e (4) Norte Baixo: seis áreas em Bela Vista do Paraíso, Santa Mariana e Sertaneja, com altitude < 600 m e solos argilosos ou muito argilosos. As 25 áreas amostradas apresentam históricos de uso diferentes; 21 vem sendo utilizadas para a produção de grãos sob sistema plantio direto (SPD) há mais de 15 anos (áreas consolidadas, Tabela 1), enquanto que as outras quatro foram convertidas de produção de cana-de-açúcar ou pastagem degradada para produção de grãos há menos de três anos (áreas de expansão, Tabela 2). As áreas estudadas foram classificadas em dois grupos (Tabela 1), conforme o modelo de produção adotado nas últimas três safras antes da amostragem (2017/2018, 2018/2019 e 2019/2020): (1) Padrão: sucessão milho 2ª safra/soja e trigo/soja, ou alternância trigo-milho antecedendo a oleaginosa; e (2) Aprimorado: modelos de produção com maior diversidade de espécies vegetais e/ou maior potencial de produção e persistência de palha e raízes no solo, com o cultivo de plantas de cobertura.

**Tabela 1.** Localização e caracterização dos modelos de produção (últimas três safras) utilizados em 21 áreas com agricultura de grãos consolidada.

Região	Área (A)	Município	Sequência de culturas <sup>(1)</sup>		Modelo de produção
			Inverno <sup>(2)</sup>	Verão	
Noroeste Arenito	A1	Cianorte	Ruz (2 safras) Ruz + CroO	Soja	Aprimorado
	A2	Iporã	Ruz (3 safras)	Soja	Aprimorado
	A3	Cianorte	Milho	Soja	Padrão
	A4	Iporã	Milho	Soja	Padrão
Noroeste Basalto	A5	Maringá	Milho + Ruz (2 safras) Trigo	Soja	Aprimorado
	A6	Maringá	Milho + Mix	Soja	Aprimorado
	A7	Jussara	Milho (2 anos) Trigo	Soja	Padrão
	A8	Maringá	Milho	Soja	Padrão
Norte Alto	A9	Cambira	Aveia	Soja	Aprimorado
	A10	Rolândia	Milho-milheto Trigo Ruz + Nabo	Soja	Aprimorado
	A11	Rolândia	Ruz (3 safras)	Soja (2 safras) Milho	Aprimorado
	A12	Rolândia	Trigo Milho + Ruz (2 anos)	Soja	Aprimorado
	A13	Apucarana	Trigo	Soja	Padrão
	A14	Apucarana	Trigo Milho (2 safras)	Soja	Padrão
	A15	Arapongas	Milho	Soja	Padrão
	Norte Baixo	A16	Bela Vista Paraíso	Milho + Ruz	Soja
A17		Santa Mariana	Milho + Ruz	Soja	Aprimorado
A18		Bela Vista Paraíso	Milho	Soja	Padrão
A19		Santa Mariana	Milho	Soja	Padrão
A20		Sertaneja	Milho	Soja	Padrão
A21		Sertaneja	Milho (2 safras) Trigo	Soja	Padrão

<sup>(1)</sup> Refere-se à sequência de culturas nas safras 2017/2018, 2018/2019 e 2019/2020. Dentro de cada área e estação do ano, a listagem das culturas segue essa ordem de safras, de cima para baixo. <sup>(2)</sup> Ruz = braquiária ruziense (*Urochloa ruziziensis*); CroO = *Crotalaria ochroleuca*; Mix = mistura de espécies de cobertura: nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) + aveia preta (*Avena strigosa*) + aveia branca (*Avena sativa*) + centeio (*Secale cereale*).

**Tabela 2.** Localização e histórico recente das quatro áreas de expansão da produção de grãos amostradas.

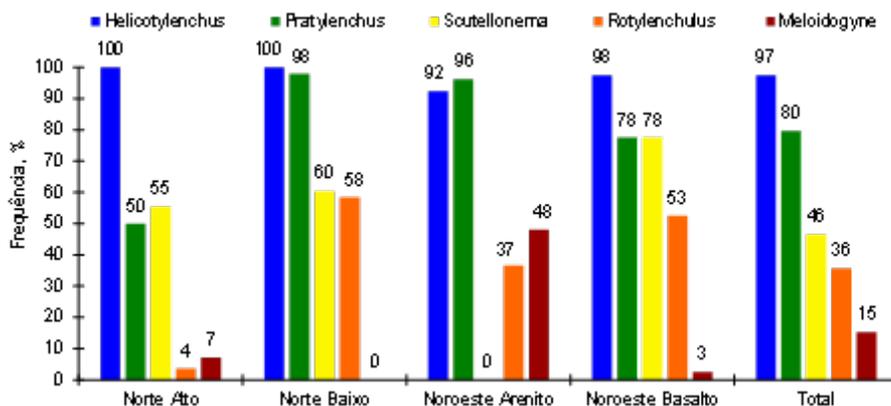
Área (A)	Município	Região	Histórico recente
A22	Cafezal do Sul	Noroeste Arenito	Pastagem degradada/soja (2018/2019) Braquiária ruziziensis/soja (2019/2020)
A23	Cruzeiro do Oeste		Cana-de-açúcar/soja (2016/2017) Pousio/soja (2017/2018) Braquiária ruziziensis/soja (2018/2019 e 2019/2020)
A24	Jussara		Cana-de-açúcar (2017/2018) Braquiária ruziziensis/soja (2018/2019 e 2019/2020)
A25	Jussara	Noroeste Ba-salto	Cana-de-açúcar/soja (2019/2020)

Para quantificação da presença e da densidade populacional de fitonematoídes, foram coletadas oito amostras de solo e raízes junto às linhas de semeadura, composta por cinco subamostras, em cada uma das áreas estudadas. Para a extração dos nematoides, foram utilizadas as metodologias de Boneti e Ferraz (1981) para as raízes, e do funil de Baermann (Baermann, 1917) para o solo. A frequência de ocorrência dos fitonematoídes foi estimada pela porcentagem de amostras nas quais determinada espécie foi diagnosticada. O teste U de Mann-Whitney (não paramétrico,  $p < 0,05$ ) foi utilizado para a comparação entre as densidades populacionais médias obtidas nos modelos padrão e aprimorado das áreas de produção consolidadas, e entre as áreas de expansão com histórico anterior de pastagem degradada e cana-de-açúcar, uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov,  $p > 0,05$ ). Ambos os testes foram realizados por meio do programa Statistica v.12 (StatSoft Inc.).

## Resultados e Discussão

Independentemente da região, *Helicotylenchus dihystera* foi o nematoíde de maior ocorrência, sendo diagnosticado em 97% das amostras (Figura 1). Nas regiões Norte Alto e Norte Baixo, *H. dihystera* foi encontrado em 100% das amostras de solo + raiz. O nematoíde das lesões radiculares (*Pratylenchus* sp.) foi detectado em 80% das amostras, com frequências variando de 50% (Norte Alto) a 98% (Norte Baixo). A 3ª espécie de ocorrência mais frequente

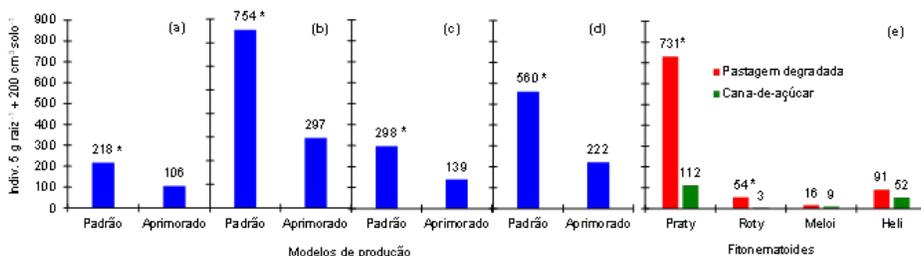
foi *Scutellonema brachyurus*, presente em 46% das amostras. *S. brachyurus* foi diagnosticado somente nas regiões de solos argilosos e muito argilosos e com histórico mais longo de uso na produção de soja, trigo e milho (Norte Alto e Baixo, e Noroeste Basalto), não sendo encontrado em nenhuma amostra proveniente do Noroeste Arenito. *Rotylenchulus reniformis* (nematóide reniforme) foi encontrado em 36% das amostras; as maiores frequências foram observadas no Norte Baixo (58%) e no Noroeste Basalto (58%), enquanto que a menor, no Norte Alto (4%). Já o nematóide de galhas (*Meloidogyne* sp.) ocorreu em 15% das amostras, a maioria das quais coletadas em lavouras localizadas no Noroeste Arenito (48%). Ressalta-se que as espécies *Heterodera glycines* (nematóide-de-cisto da soja) e *Tubixaba tuxaua* não foram diagnosticados em nenhuma das amostras de solo e raiz. Em levantamento realizado no Paraná, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina, Machado et al. (2019) também encontraram que *H. dihystra*, *Pratylenchus* sp. e *S. brachyurus* foram os fitonematóides de maior ocorrência. A maior ocorrência destes nematóides encontra-se associada, provavelmente, à capacidade de se alimentar de várias espécies de plantas (polifagia) e, também, ao predomínio de modelos de produção com baixa diversidade biológica e envolvendo culturas suscetíveis, como milho, soja e trigo (Dias et al., 2010; Machado et al., 2019). A maior ocorrência de *R. reniformis* em comparação a *Meloidogyne* sp é explicada principalmente pelo histórico de cultivo de algodão (décadas de 70 a 90) em muitas áreas do Norte Baixo e Noroeste do Estado, cultura de alta suscetibilidade à *R. reniformis* (Dias et al., 2010).



**Figura 1.** Frequência de ocorrência de fitonematóides em amostras de solo e raízes coletadas durante a fase reprodutiva de lavouras de soja (n=188) e milho verão (n=8) nas regiões Norte e Noroeste do Paraná, safra 2019/2020.

Dos fitonematoides diagnosticados, os danos ocasionados à soja por *Pratylenchus* sp., *Meloidogyne* sp. e *R. reniformis* são bem conhecidos (Dias et al., 2010). Por outro lado, *S. brachyurus* e *H. dihystra* têm sido considerados nematoides com baixo potencial de ocasionar danos. Porém, a ocorrência de danos de *S. brachyurus* e *H. dihystra* em plantas de soja, com o escurecimento acentuado das raízes, foi recentemente comprovada em ensaios de casa-de-vegetação (Machado et al., 2019).

As densidades populacionais médias dos fitonematoides com maior frequência de ocorrência neste estudo foram menores nos modelos de produção aprimorados comparativamente ao padrão utilizado pela maioria dos produtores (Figura 2). Os modelos aprimorados proporcionaram reduções na densidade populacional (solo + raízes) de 2,1; 2,5; 2,1; e 2,5 vezes em relação ao padrão, para *Pratylenchus* sp., *S. brachyurus*, *R. reniformis* e *H. dihystra*, respectivamente. Adicionalmente, a proporção de amostras com ausência de nematoides no solo e nas raízes foi superior nas áreas que adotam modelos de produção aprimorados em relação ao padrão. Nesse sentido, a frequência de amostras negativas (solo+raiz) foi de 15, 25, 51 e 1% no modelo padrão, e de 32, 42, 71 e 4% nos modelos aprimorados, para *Pratylenchus* sp.; *S. brachyurus*, *R. reniformis* e *H. dihystra*, respectivamente. Ressalta-se que a comparação entre os modelos de produção para *Meloidogyne* sp não foi realizada em função do número pequeno de amostras positivas.



Praty: *Pratylenchus* sp.; Scut: *Scutellonema brachyurus*; Roty: *Rotylenchulus reniformis*; Meloi: *Meloidogyne* sp.; Heli: *Helicotylenchus dihystra*.

**Figura 2.** Densidade populacional média de fitonematoides em amostras de solo e raiz coletadas durante a fase reprodutiva de lavouras de soja (n=188) e milho verão (n=8) nas regiões Norte e Noroeste do Paraná (safra 2019/2020), em função do modelo de produção adotado nas áreas consolidadas para *Pratylenchus* sp. (a), *Scutellonema brachyurus* (b), *Rotylenchulus reniformis* (c) e *Helicotylenchus dihystra* (d), e do uso anterior nas áreas de expansão da produção grãos (e). \* Diferenças entre médias significativas pelo teste U de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

É interessante notar que, na maioria das situações, os modelos de produção aprimorados envolveram a utilização de culturas suscetíveis aos nematoides diagnosticados (Tabela 1) e, mesmo assim, a sua utilização resultou em menor frequência de ocorrência e densidade populacional. Provavelmente, a maior diversificação de espécies vegetais e o maior aporte de palha e raízes nos modelos aprimorados proporcionaram ambiente mais favorável à biota do solo, potencializando assim o controle biológico conservativo dos nematoides (Stirling et al., 2011).

Nas áreas de expansão, as densidades populacionais foram, em geral, similares às observadas nas áreas consolidadas sob modelos de produção aprimorados, à exceção de *Pratylenchus* sp. na área de expansão sobre pastagem degradada. Comparando-se os usos anteriores à produção de grãos, observa-se diferenças relevantes apenas para *Pratylenchus* sp., que apresentou densidade populacional média cerca de 6,5 vezes maior na área de pastagem degradada em relação às de cana-de-açúcar. Esse resultado pode ser explicado pelo longo histórico de uso do solo com pastagem de *Paspalum notatum* (grama mato-grosso), um bom hospedeiro de *Pratylenchus* (Stradioto et al., 1983), seguido pelo cultivo de braquiária ruzizensis e soja (Tabela 2), culturas suscetíveis ao nematoide (Dias et al., 2010). Adicionalmente, trata-se de área com solo de textura arenosa (118 g kg<sup>-1</sup> de argila), ácido e com baixos teores de bases trocáveis (V = 29%, dados não apresentados), fatores que favorecem a reprodução e os danos de *Pratylenchus* (Franchini et al., 2014; Debiasi et al., 2018).

## Conclusão

A ocorrência e a densidade populacional dos fitonematoides mais frequentes nas regiões Norte e Noroeste do Paraná (*Helicotylenchus dihystera*, *Pratylenchus* sp., *Scutellonema brachyurus* e *Rotylenchulus reniformis*) é maior em modelos de produção que envolvem o cultivo contínuo de milho e/ou trigo no outono-inverno e soja no verão. A utilização de modelos de produção com maior diversidade de espécies vegetais e maior produção de fitomassa da parte aérea e raízes, é importante ferramenta para o manejo de fitonematoides.

## Referências

- BAERMANN, G. Eine einfache methode zur auffindung von ankvlostomum (Nematoden) larven in erdproben. **Tijdschrift voor Nederlandsch-Indië**, v. 57, p. 131-137, 1917.
- BONETI, J. I.; FERRAZ, S. Modificações no método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, p. 533, 1981.
- DEBIASI, H.; FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; CONTE, O. **Diversificação de espécies vegetais como fundamento para a sustentabilidade da cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 60 p. (Embrapa Soja. Documentos, 366).
- DEBIASI, H.; FRANCHINI, J. C.; DIAS, W. P.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; RAMOS JUNIOR, E. U.; OLIVEIRA JUNIOR, A. de. Calagem diminui a densidade populacional do nematoide das lesões radiculares em solos com texturas contrastantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 8., 2018, Goiânia. **Inovação, tecnologias digitais e sustentabilidade da soja**: anais. Brasília, DF: Embrapa, 2018. p. 829-831.
- DEBIASI, H.; FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JUNIOR, A. A. Estratégias essenciais de manejo do solo como fator determinante da produtividade e renda. In: FANCELLI, A. L. (Org.). **Feijão: condicionantes da produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2017, p. 41-76.
- DIAS, W. P.; ASMUS, G. L.; SILVA, J. F. V.; GARCIA, A.; CARNEIRO, G. E. S. Nematoides. In: ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S. (Eds.). **Soja: doenças radiculares e de hastes e inter-relações com o manejo do solo e da cultura**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. p. 173-206.
- FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; DIAS, W. P.; RAMOS JR., E. U.; SILVA, J. F. V. Perda de produtividade da soja em área infestada por nematoide das lesões radiculares na região médio norte do Mato Grosso. In: BERNARDI, A. C. de C.; NAIME, J. de M.; RESENDE, A. V. de; BASSOI, L. H.; INAMASU, R. Y. (Eds.). **Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar**. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2014. p. 274-278.
- MACHADO, A. C. Z.; AMARO, P. M.; SILVA, S. A. da. Two novel potential pathogens for soybean. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, e0221416, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0221416.
- STIRLING, G. R.; HALPIN, N. V.; BELL, M. J. Surface mulch of crop residues enhances suppressiveness to plant-parasitic nematodes in sugarcane soils. **Nematropica**, v. 41, p. 109-121, 2011.
- STRADIOTO, M. F.; FERRAZ, L. C. C. B.; PITELLI, R. A. Dinâmica populacional de *Pratylenchus brachyurus* em cultura de milho (*Zea mays* L.) infestada por plantas daninhas. **Nematologia Brasileira**, v. 7, p. 99-115, 1983.

## Determinação da capacidade máxima de adsorção de fósforo em solos de mata nativa e de cultivo, no município de Londrina, PR

ARAUJO, A. C. B. de<sup>1</sup>; TASHIMA, D. L. M.<sup>1</sup>; KLEINERT, J. J.<sup>2</sup>; GERMANO, M. G.<sup>2</sup>; OLIVEIRA JUNIOR, A. de<sup>3</sup>; INOUE, T. T.<sup>4</sup>; BATISTA, M.<sup>4</sup>; CASTRO, C. de<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, [aline.cb.araujo@hotmail.com](mailto:aline.cb.araujo@hotmail.com); <sup>2</sup>LASTV, Embrapa Soja; <sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Soja, <sup>4</sup>Universidade Estadual de Maringá.

### Introdução

O fósforo (P) é um dos elementos essenciais para o adequado desenvolvimento das plantas estando diretamente ligado ao crescimento vegetal, fornecendo maior resistência às doenças e sendo responsável pelo armazenamento e transferência de energia (Marschner, 2012).

Em Londrina, PR, uma das classes de solo predominante é a dos Latossolos, que se caracterizam por serem altamente intemperizados, e onde o fósforo é encontrado predominantemente na forma de fosfatos inorgânicos e orgânicos (Barros et al., 2008). A deficiência de P no solo limita de forma direta a produção e existem muitos fatores ou práticas que podem aumentar a eficiência da adubação com fósforo, como a calagem, a localização do fertilizante fosfatado e o manejo de solo.

A calagem é a prática de adubação com calcário que tem o objetivo de corrigir a acidez do solo. Os solos do Brasil são naturalmente ácidos em função da pobreza de bases de solo e a correção do pH é de grande importância, pois dessa forma o fósforo que se encontra adsorvido formando compostos com ferro e alumínio, é liberado diminuindo a capacidade máxima de adsorção de fósforo (CMAP) do solo (Novais; Smyth, 1999).

Tratando-se de solos de cultivo, existem duas formas de manejo: a) o sistema plantio direto, fundamentado na mínima mobilização do solo, na cobertura permanente por culturas ou por seus resíduos e pela adoção de modelos de produção diversificados, baseados na rotação e consorciação de culturas, e b) sistema convencional, onde o solo é revolvido incorporando a palha, portanto, sem a manutenção da camada de palha, deixando o solo mais exposto (Conte et al., 2020). Estudos conduzidos na Embrapa Soja mostram que na camada de 0-5 cm de solo foi possível observar uma redução do valor da

CMAP em semeadura direta e isso se deve ao aumento de matéria orgânica disponível (Oliveira Junior et al., 2010).

A matéria orgânica serve como fonte natural de fósforo no solo e está diretamente relacionada com sua disponibilidade e quantidade, liberando-o gradualmente à medida em que ocorre sua mineralização, processo no qual o fósforo em sua forma orgânica não assimilável pela planta torna-se disponível na forma mineral ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) (Santos et al., 2008). Esse processo é favorecido devido ao aumento de oxigênio e incorporação da matéria orgânica ao solo e, como ocorre de forma gradual, possibilita maior chance de a planta absorver o fósforo, minimizando as perdas por adsorção específica.

O resultado da análise do fósforo remanescente (P-rem) apresenta correlação com a CMAP e com o teor de argila no solo. A eficácia da extração do fósforo disponível, com o extrator Mehlich-1, é influenciada pela capacidade tampão de fosfatos do solo, a qual pode ser medida indiretamente através da concentração de fósforo remanescente (Silva, 2009). Assim, é possível estimar a capacidade máxima de adsorção de fósforo e caracterizar os solos em relação ao fator capacidade (Alvarez et al., 2017). No método de interpretação do teor disponível de P, utilizado em alguns estados brasileiros, o P-rem substitui o teor de argila, quando o P é extraído com a solução Mehlich-1.

O objetivo do trabalho foi estudar a capacidade de adsorção de fósforo, comparando o solo de uma área cultivada há mais de 30 anos e o solo de mata nativa, ambas as condições localizadas na Faz. Experimental da Embrapa Soja, em Londrina, PR.

## Material e Métodos

### Capacidade Máxima de Adsorção de Fósforo

Para a determinação de CMAP do solo foram pesados aproximadamente 2 g de amostra de cada tratamento (solo cultivado e de mata) em triplicata e transferidas para tubos falcon de 50 mL, em seguida foi adicionado 20 mL de solução de equilíbrio e padrão com quantidades crescentes de fósforo (0; 20; 40; 60; 80; 120; 160 e 200  $\text{mg L}^{-1}$  de P). Posteriormente os tubos foram levados para agitação em mesa agitadora linear por um período de 4 horas e posteriormente, foram deixadas em repouso por mais 20 horas com as amostras em contato com a solução, totalizando 24 horas. Em seguida, foi realizada a centrifugação durante 4 minutos e retirada alíquota de 5 mL das soluções

de 0 a 80 ppm. Para as soluções de 120 a 200 mg L<sup>-1</sup> de P, foi realizada uma diluição em que se retirou alíquota de 0,5 mL da solução e adicionado 4,5 mL de CaCl<sub>2</sub>. Em todas as soluções foi adicionado 5 mL de reagente de trabalho e após 30 minutos foram efetuadas as leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda 725 nm. Os resultados foram ajustados ao modelo matemático da isoterma de Langmuir.

### Solução de Equilíbrio

A solução foi preparada com 1,47g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 0,2637g de HK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dissolvidos em 1000 mL de água deionizada. A solução final continha 0,01 mol L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> e 60 mg L<sup>-1</sup> de P.

### Reagente de Trabalho

Foi dissolvido 0,4 g de ácido ascórbico em aproximadamente 100 mL de água deionizada, adicionados 50 mL da solução 725 e adicionado água deionizada até completar volume de 450 mL.

### Solução ácida de molibdato de amônio com bismuto (Reagente “725”). (Braga; Defelipo, 1974)

Preparou-se duas soluções (A e B). Para a solução A dissolveu-se 1,0 g de subcarbonato de bismuto, (BiO)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, em aproximadamente 200 mL de água deionizada e adicionou-se 139 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Para a solução B foram dissolvidos 20 g de molibdato de amônio, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O, em aproximadamente 500 mL de água deionizada. As duas soluções foram misturadas, o volume completado para 1000 mL.

### Isoterma de Lagmuir

Essa isoterma permite estimar a CMAP e a constante relacionada com a energia de ligação. Em sua forma hiperbólica é descrita por:

$$\frac{x}{m} = \frac{abC}{(1 + aC)}$$

em que  $x/m$  é a quantidade de P adsorvido ao solo, em mg P g<sup>-1</sup> solo,  $a$  é uma constante relacionada com energia de ligação do elemento ao solo, em (mg L<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>,  $b$  é a CMAP do solo, em mg g<sup>-1</sup>, e  $C$  é a concentração de P na solução de equilíbrio, em mg L<sup>-1</sup>.

valor da CMAP é estimado através da declividade da reta ajustada.

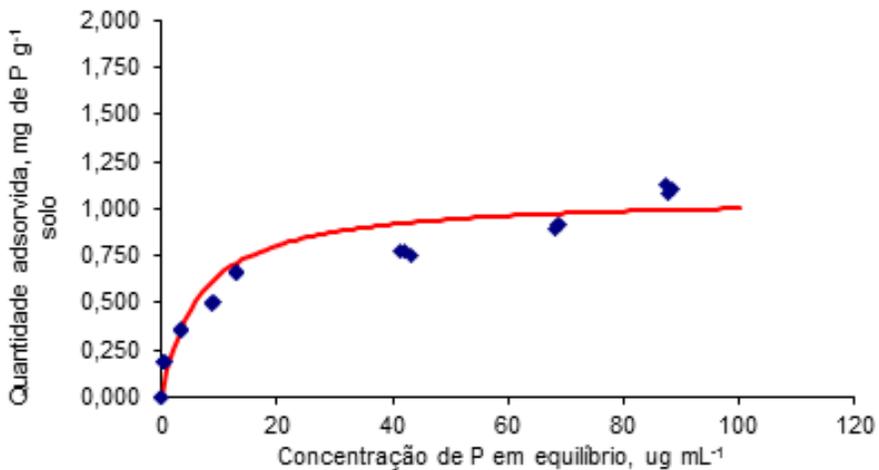
## Resultados e Discussão

A determinação do P-rem foi realizada previamente para que, a partir do teor determinado, se definisse a faixa de valores de concentração para se determinar a CMAP. Os teores de P-rem para os dois tratamentos estão apresentados na Tabela 1.

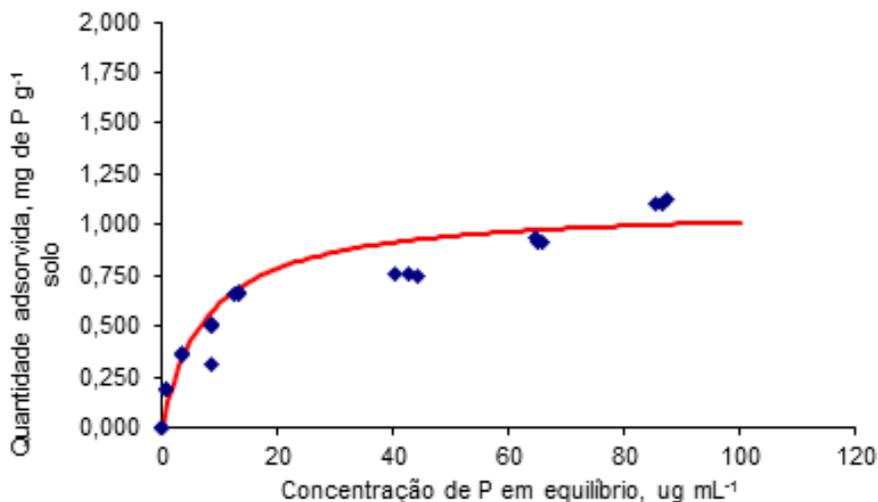
**Tabela 1.** Teores de P-rem para mata nativa e solo cultivado.

Tratamento	Profundidade (cm)	P-rem (mg L <sup>-1</sup> )	pH (CaCl <sub>2</sub> )
Mata nativa	0-20	34,7	5,3
Solo cultivado	0-20	33,3	5,3

A partir dos valores de P-rem foram definidas as concentrações de P já descritas anteriormente e os dados das leituras obtidas foram tratados de acordo com a Isoterma de Langmuir. As isotermas de cada tratamento estão apresentadas nos Figuras 1 e 2.



**Figura 1.** Isoterma de Langmuir relativa à mata nativa.



**Figura 2.** Isoterma de Langmuir relativa ao solo de cultivo.

A partir das isotermas, foi possível observar que o comportamento da adsorção de fósforo é bem semelhante para os dois tratamentos. No solo de mata a ciclagem do P se dá com a deposição natural e constante de matéria orgânica, por meio da queda de material oriundo da vegetação (folhas, frutos, galhos, etc.). Já o solo sob sistema plantio direto, esse processo se dá pela adubação fosfatada anual, em quantidades geralmente superiores às exportadas pelas culturas, e pelo não revolvimento do solo.

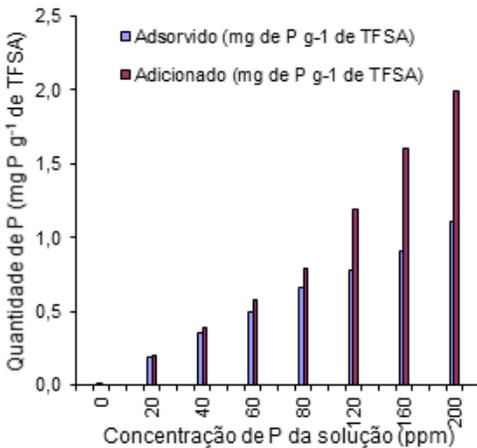
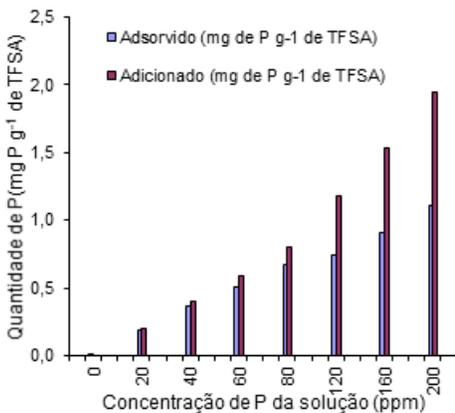
O comportamento das duas isotermas pode ter uma explicação, em função do pH do solo. Observa-se na Tabela 1 que os valores de pH são iguais, e considerando que o pH está diretamente relacionado com a capacidade máxima de adsorção de fósforo do solo, isso explicaria o comportamento semelhante dos dois tratamentos.

A Tabela 2 apresenta os valores da CMAP obtidos pela equação de Langmuir e pode-se concluir que a quantidade de fósforo adsorvido nos solos analisados é muito similar.

**Tabela 2.** Capacidade máxima de adsorção de fósforo no solo de cada tratamento.

Tratamento	b ( mg de P g <sup>-1</sup> de solo )
Mata nativa	1,065
Solo cultivado	1,091

As isotermas apresentam uma característica particular a respeito da CMAP. Quando se analisa a tendência das curvas, observa-se que a medida em que aumenta a concentração de fósforo adicionado na solução, diminui a capacidade de adsorção do solo. Portanto, o solo apresenta um limite de adsorção de fósforo, como mostram as Figuras 3 e 4.

**Figura 3.** Comparação da quantidade de fósforo adicionado com a CMAP do solo de mata nativa.**Figura 4.** Comparação da quantidade de fósforo adicionado com a CMAP do solo de cultivo.

A similaridade da capacidade de adsorção de fósforo dos solos de mata nativa e dos solos de cultivo indica se a forma de produção e cuidados com o solo nas lavouras está sendo feita de maneira a não prejudicar a qualidade e as características do solo.

## Conclusão

O solo manejado sob sistema plantio direto, durante 30 anos, apresenta uma capacidade máxima de adsorção de fósforo semelhante ao de mata nativa, visto que ambos apresentaram o valor de  $b$  de aproximadamente 1,0 mg de P g<sup>-1</sup> de TFSA e isoterma de mesmo comportamento, indicando que a concentração de fósforo disponível no solo limita a capacidade máxima de adsorção.

## Referências

- ALVAREZ V., V. H.; NOVAIS, R. F.; CANTARUTTI, R. B.; TEIXEIRA, P. C.; CAMPOS, D. V. B. de. Fósforo remanescente. In: TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K.; FONTANA, A.; TEIXEIRA, W. G. (Eds.). **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2017. pt. 2, cap. 25, p. 337-342.
- BARROS, O. N. F.; BARROS, M. V. F.; ARCHELA, R. S.; THÉRY, H.; MELLO, N. A. de; GRATÃO, L. H. B. **Atlas ambiental da cidade de Londrina: solos**. Londrina: UEL, 2008. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/atlasambiental/NATURAL/SOLOS.htm>. Acesso em: 30 jun. 2020.
- BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, v. 21, n. 113, p. 73-85, 1974.
- CONTE, O.; FRANCHINI, J. C.; DEBIASI, H.; BALBINOT JÚNIOR, A. A. Manejo do Solo. In: SEIXAS, C. D. S.; NEUMAIER, N.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; KRZYZANOWSKI, F. C.; LEITE, R. M. V. B. C. de (Eds.). **Tecnologias de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2020. cap. 7, p. 55-80. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 17).
- MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd. ed. London: Elsevier, 2012. 651 p.
- NOVAIS, R. F. de.; SMYTH, T. J. Adsorção de fósforo no solo. In: NOVAIS, R. F. de.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 21-32.
- OLIVEIRA JUNIOR, A. de; CASTRO, C. de; KLEPKER, D.; OLIVEIRA, F. A. de. Soja. In: SIMPÓSIO SOBRE BOAS PRÁTICAS PARA USO EFICIENTE DE FERTILIZANTES, 2009, Piracicaba. **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes: anais**. Piracicaba: IPNI, 2010. v. 3. p. 1-38.

SANTOS, D. R. dos; GATIBONI, L. C.; KAMINSKI, J. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema de plantio direto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 576-586, 2008.

SILVA, F. C. da (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009. 627 p.

## Caracterização da proteína 14-3-3 nos nematoides que infectam a soja

HISHINUMA-SILVA, S. M.<sup>1</sup>; LOPES-CAITAR, V. S.<sup>2</sup>; NOMURA, R. B. G.<sup>1</sup>; NASCIMENTO, L. C.<sup>3</sup>; DIAS, W. P.<sup>4</sup>; HEWEZI, T.<sup>2</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Vegetais, Universidade do Tennessee, Knoxville, TN; <sup>3</sup>UNICAMP, Laboratório de Genômica e Expressão, Instituto de Biologia, Campinas, SP; <sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

### Introdução

Os nematoides parasitas de plantas (NPP) são pequenos vermes, metazoários com um plano corporal simples, e parasitas biotróficos que se alimentam da seiva celular e dos nutrientes extraídos das plantas hospedeiras (Vieira; Gleason, 2019). São pragas economicamente importantes e podem levar a perdas de produtividade em todo o mundo (Ali et al., 2018). Em geral, os NPPs podem ser divididos em endoparasitas sedentários (*Meloidogyne* e *Heterodera/Globodera*) ou endoparasitas migradores (*Pratylenchus* spp.), sendo os fitonematoides mais importantes em termos agrônômicos os que parasitam grande número de espécies de plantas (Ali et al., 2017).

O parasitismo bem-sucedido dos nematoides nas raízes das plantas é decorrente da secreção de proteínas e outras moléculas, conhecidas como efetores, nos tecidos do hospedeiro através de seus estiletes. Esses efetores são tipicamente sintetizados e secretados nas glândulas esofágicas em diferentes fases parasitárias dos nematoides. Quando secretados pelos nematoides, os efetores induzem uma série de alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares nas células das raízes das plantas para promover a infestação e a colonização do hospedeiro (Ali et al., 2017, 2018; Vieira; Gleason, 2019).

Vários estudos vêm sendo conduzidos visando a identificação e caracterização das proteínas envolvidas no parasitismo dos nematoides (Vieira; Gleason, 2019). Dentre essas, a proteína 14-3-3, uma proteína de 30 kDa altamente conservada, codificada por famílias multigênicas e específica para eucariotos, foi identificada nos nematoides *Meloidogyne incognita* (Jaubert et al., 2004), *Pratylenchus brachyurus* (Lopes-Caitar, 2018), *Pratylenchus zaei* (Fosu-Nyarko et al., 2016b), *Pratylenchus penetrans* (Vieira et al., 2012), *Heterodera avenae* (Chen et al., 2017) e *Heterodera schachtii* (Fosu-Nyarko et al., 2016a). Estas proteínas atuam como fosso sensores, ligando proteí-

nas fosforiladas e modulando suas funções, ou seja, atuando no controle do metabolismo, sinalização hormonal, divisão celular e respostas a estímulos abióticos e bióticos. A estrutura desta proteína pode ser dividida em três regiões, um terminal N variável, uma região central conservada e um terminal C variável (Lozano-Duran; Robatzek, 2015).

Neste estudo, buscou-se caracterizar *in silico* o gene codificante da proteína 14-3-3 dos nematoides *Meloidogyne javanica*, *M. incognita*, *Heterodera glycines* e *P. brachyurus*, que são os principais fitonematoídeos que parasitam a soja no Brasil, assim como determinar sua expressão nestes nematoídeos. Assim, o estudo visa fornecer conhecimentos sobre os genes de parasitismo dos nematoídeos parasitas da soja e contribuir para o desenvolvimento de amplas estratégias de controle.

## Material e Métodos

### População de nematoídeos e plantas

As populações dos nematoídeos foram multiplicadas em casa de vegetação no Laboratório de Nematologia da Embrapa Soja, Londrina, PR, em plantas de soja (*Meloidogyne* spp. e *Heterodera glycines*) e amendoim (*P. brachyurus*). Os nematoídeos sedentários foram processados de acordo com a técnica de Bonetti e Ferraz (1981), enquanto os nematoídeos migradores de acordo com a técnica de Coolen e D'Herde (1972). Os nematoídeos extraídos foram quantificados em câmara de Peter para se estimar o número total de nematoídeos. As sementes de soja Doko RC (Embrapa 20) e TMG115RR utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja.

### Caracterização *in silico* e análises comparativas da proteína 14-3-3

As sequências gênicas para a caracterização molecular da proteína 14-3-3 foram obtidas do banco de dados Wormbase Parasite Data (Howe et al., 2017), enquanto os dados de *P. brachyurus* foi obtido do estudo realizado por Lopes-Caitar (Lopes-Caitar, 2018). O peso molecular e o ponto isoelétrico teórico foram calculados usando a ferramenta ProtParam (2020). A localização subcelular foi detectada pela ferramenta Cello2Go (Yu et al., 2014). Para identificar os domínios conservados, as sequências de aminoácidos foram

analisadas usando o NCBI Conserved Domain Database (Marchler-Bauer et al., 2015). As estruturas secundárias de 14-3-3 foram previstas usando a Pôle Bioinformatique Lyonnais (PBIL) ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)). Além disso, o programa SignalP 4.1 (Nielsen, 2017) foi usado para prever o sinal de secreção putativo. Os domínios transmembrana foram avaliados usando o programa TMHMM (Krogh et al., 2001), enquanto a localização celular foi prevista pelo programa TargetP (Emanuelsson et al., 2000). O potencial endereçamento ao retículo endoplasmático foi identificado usando o programa Predotar (Liu et al., 2013). A árvore filogenética foi construída utilizando o algoritmo de Neighbor-joining através do programa MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) com 1000 repetições.

### **Hibridização *in situ***

Os iniciadores específicos do gene 14-3-3 de cada nematoide em estudo foram sintetizados para obter sondas de RNA (~ 200 pb) sense e anti-sense marcado com digoxigenina (DIG). A hibridização *in situ* foi realizada usando 10,000 indivíduos J<sub>2</sub> do *M. javanica* e *H. glycyne* e 3,000 indivíduos de todo o estágio infeccioso do *P. brachyurus*. Após a hibridização, a sonda foi detectada com o anticorpo antidigoxigenina conjugada à fosfatase alcalina (diluída 1:100) e os nematoides foram fotografados usando um microscópio Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss Corporation) e processada com o software MOTIC (versão 2.0).

### **Perfil de expressão do gene 14-3-3 durante a interação com a soja**

O RNA total foi extraído das raízes da soja infectadas com os nematoides em estudo em diferentes períodos de tempo de 12h, 1 dia (d), 2d, 4d, 5d, 8d, 10d, 15d, 17d, 19d, 21d e 35d, usando o método TRIzol (Invitrogen) de acordo com o fabricante. O RNA tratado com Deoxyribonuclease I (Invitrogen) prosseguiu para a etapa de síntese do cDNA, usando o SuperScript III Kit (Invitrogen), conforme recomendado pelo fabricante. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas em um termociclador StepOnePlus™ System (Thermo Fisher Scientific) usando o kit SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Como normalizador, empregou-se Mj\_actin para *M. javanica*, Mi\_actin para *M. incognita*, Hg\_actin para *H. glycyne* e Pb\_18s para *P. brachyurus*, sendo amplificados com primers específicos. A expressão do gene 14-3-3 de todos os

principais nematoides que infectam a soja foi calculada pelo programa REST usando o tempo de 12 horas como calibrador para cada tempo correspondente de cada nematoide em estudo.

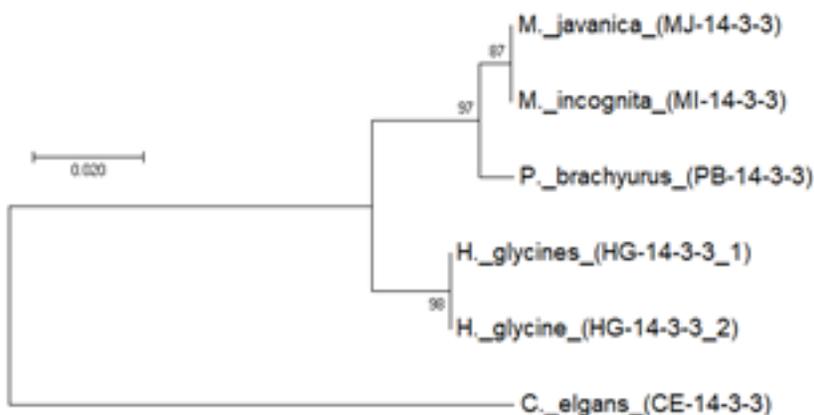
## Resultados e Discussão

A caracterização molecular do gene 14-3-3 revelou uma variação no comprimento gênico de 241 pb entre o *M. javanica* (MJ-14-3-3) e os dois genes de *H. glycines* (HG-14-3-3\_1 e HG-14-3-3\_2), sendo este 1.258 pb e 1.117 pb, respectivamente (Tabela 1). Por outro lado, o comprimento gênico entre as duas espécies do *Meloidogyne* não apresentou uma grande variação. O número de exons identificados foi menor em *H. glycines* e sem variação entre *M. javanica* e *M. incognita*. Devido à ausência do genoma completo de *P. brachyurus*, não foi possível obter essas informações para esse nematoide. O tamanho da proteína 14-3-3 dos nematoides em estudo variou entre 251 e 252 aminoácidos, sendo altamente conservada (Tabela 1). Como esperado, em todas as sequências analisadas, foi possível observar o domínio conservado da superfamília 14-3-3 (IPR023410), e uma estrutura secundária formada principalmente por conformações alfa-helicoidais. Além disso, o ponto isoelétrico e o peso molecular, em todas as sequências analisadas, variaram de 4,76 a 4,81 e 28,47 a 28,67 kDa, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Caracterização molecular da proteína 14-3-3 dos principais nematoides que infectam a soja

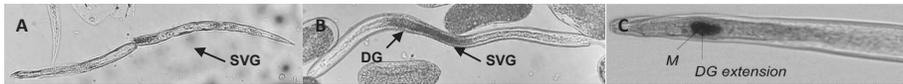
	Espécies				
	<i>M. javanica</i>	<i>M. incognita</i>	<i>H. glycines</i>		<i>P. brachyurus</i>
Nomenclatura	MJ-14-3-3	MI-14-3-3	HG-14-3-3_1	HG-14-3-3_2	PB-14-3-3
Gene (pb)	1358	1354	1117	1117	-
Região codificadora (pb)	759	759	756	756	753
Proteína (aa)	252	252	251	251	251
Nº exons	8	8	5	5	-
Nº introns	7	7	4	4	-
Orientação	Reverso	Reverso	Reverso	Reverso	-
Ponto isoelétrico	4,81	4,81	4,76	4,76	4,81
Peso molecular	28.675,08	28.675,08	28.473,81	28.473,81	28.517,87
Localização Subcelular	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma	Citoplasma
Domínio conservado	14-3-3	14-3-3	14-3-3	14-3-3	14-3-3

A análise filogenética revelou a relação as proteínas preditas de 14-3-3 entre os nematoides em estudo (Figura 1). Como esperado, a proteína 14-3-3 dos NPP agruparam separadamente do nematoide de vida livre, *Caenorhabditis elegans*. Além disso, as sequências de aminoácidos de *Meloidogyne* foram mais semelhantes com a de *P. brachyurus* do que com o *H. glycines*. Ao analisar a relação entre as duas espécies de *Meloidogyne*, foram possíveis identificá-las no mesmo ramo da árvore filogenética (Figura 1). Portanto os dados obtidos revelam que a proteína 14-3-3 é conservada entre as espécies em estudo.



**Figura 1.** Árvore filogenética das proteínas 14-3-3.

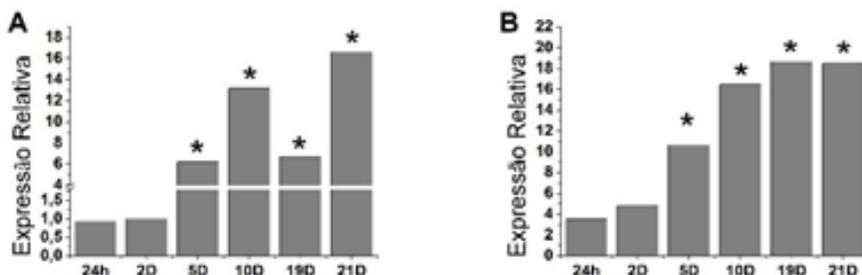
Para confirmar se as proteínas 14-3-3 dos nematoides em estudo apresentam potencial para serem consideradas como efetores, as sequências de aminoácidos foram empregadas na identificação do sinal de secreção, e ausência de domínio transmembrana, importantes características de proteínas preditas como secretadas. Curiosamente, todas as sequências analisadas resultaram na ausência de peptídeo sinal, contudo ao observar os resultados do experimento de hibridização *in situ* (Figura 2), foi possível identificar que os genes MJ-14-3-3, HG-14-3-3 e PB-14-3-3 são expressos na glândula esofágica (glândula dorsal ou subventral). Dados similares também foram descritos previamente para MI-14-3-3 (Jaubert et al., 2004). Desse modo, tais resultados corroboram com a hipótese de que esta proteína é potencialmente secretada nos tecidos do hospedeiro para facilitar o parasitismo, mesmo na ausência de um sinal de secreção.



**Figura 2.** Localização do gene 14-3-3 nos principais nematoides que infectam a soja. (A) Anti-sense MJ-14-3-3; (B) Anti-sense HG-14-3-3 (C) Antise-nse PB-14-3-3. SVG: Glândula subventral; DG: Glândula dorsal e M: metacarpo.

Diversos estudos têm descrito a ausência do peptídeo sinal em genes efetores de nematoides, mas que desempenham papéis fundamentais no parasitismo. Por exemplo, Leelarasamee et al. (2018) revelou que o efector MIPFN do nematoide *M. incognita* não possuía a sequência peptídica sinalizadora, mas quando expressas em *Arabidopsis thaliana*, as plantas eram mais suscetíveis ao patógeno, indicando envolvimento do efector no parasitismo. Portanto, a secreção dessas proteínas pode ser via secretória não canônica, que funciona independentemente do retículo endoplasmático e do complexo de golgi.

A análise de expressão do gene 14-3-3 ao longo da infecção dos nematoides, demonstrou que esses genes são expressos durante todo o ciclo, com diferentes perfis de expressão. Curiosamente, o MJ-14-3-3 e o MI-14-3-3 mostraram um baixo nível de expressão no início da infecção quando comparado ao tempo de 21 dias após a inoculação (dai), que foi o tempo com maior expressão (Figura 3A e B). Os resultados sugerem que essa proteína em *Meloidogyne* pode desempenhar um papel importante nos estágios intermediários do parasitismo. Por outro lado, o gene HG-14-3-3 apresentou uma expressão constante ao longo do ciclo com um leve aumento no tempo 2 dai (Figura 3C), o que pode estar associado à formação de sincícios e sua manutenção. Curiosamente, o nível de expressão do gene PB-14-3-3 mostrou-se elevado durante todo o estágio de desenvolvimento do nematoide (Figura 3D). Dentre estes, o tempo 24h, 4 dai e 8 dai apresentaram os maiores níveis de expressão, levando a acreditar que o gene 14-3-3 em *P. brachyurus* possa participar dos estágio iniciais do parasitismo.



**Figura 3.** Perfil de expressão do gene 14-3-3 em diferentes tempos de vida dos NPP. (A) MJ-14-3-3, (B) MI-14-3-3, (C) HG-14-3-3 e (D) PB-14-3-3. Um valor  $p \leq 0,05$ . \* indica significância estatística no nível de 5%.

## Conclusão

As proteínas 14-3-3 dos principais nematoides que infectam a soja apresentaram-se altamente conservados entre as espécies. Os resultados obtidos da hibridização *in situ* demonstram um grande potencial de que essas proteínas sejam secretadas durante o parasitismo, sendo sua indução observada nos estágios iniciais (Hg) e intermediários de infecção (Mj, Mi e Pb). Análises funcionais mediante estratégias de RNAi serão importantes para o entendimento da função dessas proteínas no parasitismo na soja.

## Referências

- ALI, M. A.; ANJAM, M. S.; NAWAZ, M. A.; LAM, H. M. CHUNG, G. Signal transduction in plant(-) nematode interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1648, 2018. DOI: 10.3390/ijms19061648.
- ALI, M. A.; AZEEM, F.; LI, H.; BOHLMANN, H. Smart parasitic nematodes use multifaceted strategies to parasitize plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1699, 2017. DOI:10.3389/fpls.2017.01699.
- BONETTI, J. I. S.; FERRAZ, S. Modificação do método de Hussey e Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* de raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 553, 1981.
- CHEN, C.; CUI, L.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; LIU P.; WU, P.; QIU, D.; ZOU, J.; YANG, D.; YANG, L. Transcriptional responses of wheat and the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* during their early contact stage. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2017.
- COOLEN, W.; D'HERDE, C. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue**. Ghent: State Agricultural Research Centre, 1972. 77 p.

- EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJINE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **Journal of Molecular Biology**, v. 300, n. 4, p. 1005-1016, 2000.
- FOSU-NYARKO, J.; NICOL, P.; NAZ, F.; GILL, R.; JONES, M. G. Analysis of the transcriptome of the infective stage of the beet cyst nematode, *H. schachtii*. **PloS ONE**, v. 11, n. 1, e0147511, 2016a. DOI: 10.1371/journal.pone.0147511.
- FOSU-NYARKO, J.; TAN, J. A. C.; GILL, R.; AGREZ, V. G.; RAO, U.; JONES, M. G. De novo analysis of the transcriptome of *Pratylenchus zaeae* to identify transcripts for proteins required for structural integrity, sensation, locomotion and parasitism. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 4, p. 532-552, 2016b.
- HOWE, K. L.; BOLT, B. J.; SHFIE, M.; KERSEY, P.; BERRIMAN, M. WormBase ParaSite - a comprehensive resource for helminth genomics. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 215, p. 2-10, 2017.
- JAUBERT, S.; LAFFAIRE, J. B.; LEDGER, T. N.; ESCOUBAS, P.; AMRI, E. Z.; ABAD, P.; ROSSO, M. N. Comparative analysis of two 14-3-3 homologues and their expression pattern in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 7, p. 873-80, 2004.
- KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJINE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- LEELARASAMEE, N.; ZHANG, L.; GLEASON, C. The root-knot nematode effector MiPFN3 disrupts plant actin filaments and promotes parasitism. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 3, e1006947, 2018.
- LIU, L.; ZHANG, Z.; MEI, Q.; CHEN, M. PSI: a comprehensive and integrative approach for accurate plant subcellular localization prediction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75826, 2013.
- LOPES-CAITAR, V. S. **Estudos moleculares do patossistema *Glycine max-Pratylenchus brachyurus*: de estratégias de infecção do patógeno e de defesa do hospedeiro, à interação proteína-proteína**. 2018. 164 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- LOZANO-DURAN, R.; ROBATZEK, S. 14-3-3 proteins in plant-pathogen interactions. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 28, n. 5, p. 511-518, 2015.
- MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S.; CHITSAZ, F.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222-D226, 2015.
- NIELSEN, H. Predicting secretory proteins with SignalP. In: NIELSEN, H. (Ed.). **Protein function prediction**. New York: Springer, 2017. p. 59-73.
- PROTPARAM. **ProtParam tool**. 2020. Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

VIEIRA, P.; BANORA, M. Y.; CASTAGNONE-SERENO, P.; ROSSO, M. N.; ENGLER, G.; ENGLER, J. de A. An immunocytochemical procedure for protein localization in various nematode life stages combined with plant tissues using methylacrylate-embedded specimens. **Phytopathology**, v. 102, n. 10, p. 990-996, 2012.

VIEIRA, P.; GLEASON, C. Plant-parasitic nematode effectors - insights into their diversity and new tools for their identification. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 50, p. 37-43, 2019.

YU, C.-S.; CHENG, C. W.; SU, W. C.; CHANG, K. C.; HUANG, S. W.; HWANG, J. K.; LU, C. H. CELLO2GO: a web server for protein subcellular localization prediction with functional gene ontology annotation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, e99368, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0099368.

# Níveis de infestação de *Euschistus heros* em genótipos com característica de resistência a insetos: parâmetros de produtividade e indicadores de tolerância

SOUZA, G. de<sup>1</sup>; ROCHA, C. A. M.<sup>1</sup>; MORAES, J. S.<sup>2</sup>; COTRIM, G. dos S.<sup>3</sup>; GRAÇA, J. P. da<sup>4</sup>; STUBS, R.P.<sup>4</sup>; ARIAS, C. A. A.<sup>5</sup>; HOFFMANN-CAMPO, C. B.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Graduação UNOPAR, souza\_giovana98@outlook.com, <sup>2</sup>Mestrado em Agricultura Conservacionista, IAPAR; <sup>3</sup>Especialização UNIFIL; <sup>4</sup>Pós -Doutorado, UEM; <sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Soja

## Introdução

A soja é o grão mais produzido no Brasil e, continuamente, está ameaçada por diversos estresses bióticos (insetos e doenças) e abióticos (fatores ambientais). Dentre os fatores bióticos que ameaçam a soja podemos citar os percevejos fitófagos (Hemiptera: Pentatomidae), sendo *Euschistus heros*, *Piezodorus guildinii* e *Nezara viridula*, as espécies consideradas de maior importância no Brasil (Panizzi et al., 2012).

Os percevejos atacam diretamente as vagens e grãos e, por isto, podem causar prejuízos irreversíveis à produção da soja, podendo ainda provocar retenção foliar, causando, conseqüentemente, a maturação desuniforme dos grãos de soja (Hoffmann-Campo et al., 2000). Além desses danos, por meio de suas picadas, os percevejos podem transmitir um fungo chamado *Eremothecium coryli* (syn. *Nematospora coryli*) que afeta a qualidade das sementes e, conseqüentemente, o seu valor comercial (Pinheiro et al., 2006).

Face a importância dos percevejos para a soja e a forte demanda de inseticidas para o seu controle, novas alternativas de manejo dessa praga devem ser estudadas. O uso excessivo de agrotóxicos, além de causar danos ambientais, induz o surgimento de populações resistentes a certas moléculas (Sosa-Gómez; Omoto, 2012). Uma das alternativas para o manejo de percevejos é o uso de genótipos resistentes, que pode ou não estar associado ao uso racional de agrotóxicos (Rossetto et al., 1986) e outras táticas como o controle biológico.

A resistência hospedeira ou resistência de plantas trata da manifestação de características herdadas geneticamente e que acabam por fazer com que determinada cultivar ou espécie apresente menores efeitos negativos que outra, considerada suscetível, por não possuir estas características (Baldin et al., 2019). Genótipos com resistência a insetos podem ser obtidos pelo método de melhoramento vegetal tradicional, ou seja pelo cruzamento de dois ou mais materiais genéticos ou, ainda, com auxílio de ferramentas biotecnológicas como o uso de marcadores moleculares, que contribuem muito nos programas de melhoramento, através de seleção assistida (Sosa-Gómez et al., 2012).

Para serem aceitas como alternativa para os agricultores, as novas cultivares devem possuir alta produtividade aliada a características de resistência a insetos e doenças, o que torna o processo de seleção mais difícil e complicado. Deste modo, este trabalho possui como objetivo avaliar a resistência/tolerância submetendo-se todos os genótipos às mesmas condições ambientais e sujeita aos danos do mesmo número de percevejos por gaiola, estabelecendo diferentes níveis de infestação de *E. heros* em plantas de soja, para posteriormente avaliar seus índices de produtividade e indicadores de resistência/tolerância. Assim, o presente trabalho visou testar quatro níveis de infestação em cultivares com a tecnologia Block (Hoffmann-Campo et al., 2019), e de linhagens promissoras desenvolvidas pelo programa de melhoramento da Embrapa Soja para resistência/tolerância a *E. heros*, além da cultivar BRS 399 RR já inserida no mercado, como padrão de produtividade e ciclo. Paralelamente, os experimentos foram realizados para testar também a hipótese de genótipos tolerantes e/ou resistentes abortam um menor número de vagens e/ou repõem em grande quantidade as vagens caídas, como consequência do dano causado pelo inseto.

## Material e Métodos

O experimento foi implantado na fazenda experimental da Embrapa Soja, localizada em Londrina, PR, onde foram semeados genótipos de soja das plataformas Convencional, Roundup Ready (RR) e Intacta (IPRO), sendo a cultivar BRS 399 RR considerada padrão de produtividade e ciclo. As características dos materiais testados estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características de genótipos, das plataformas convencional (produzidas por melhoramento tradicional), Roundup Ready e Intacta (genótipos geneticamente modificados) testados em gaiolas teladas.

Genótipo	Plataforma	Característica do genótipo
BRS 523 (=BRI13-5301)	Convencional	Cultivar com tecnologia Block *
BRS 391	Convencional	Cultivar com tecnologia Block **
BRI14-5721	Convencional	Linhagem promissora
BRS 543 RR =BRR113-1533)	Roundup Ready (RR)	Cultivar com tecnologia Block
BRS 399 RR	Roundup Ready (RR)	Cultivar padrão de produtividade e ciclo
BRS 1003 IPRO	Intacta (IPRO)	Cultivar com tecnologia Block
BRB15-243.036	Intacta (IPRO)	Linhagem promissora

\* Hoffmann-Campo et al. (2019); \*\* Arias et al. (2018)

A semeadura dos genótipos foi realizada no dia 12/11/2020, utilizando-se o delineamento de blocos ao acaso (DBC) em parcelas de 2 linhas medindo 1m de comprimento. Essas parcelas foram cobertas com telas, suportadas por dois ferros em forma de U e presos ao solo de forma cruzada (Figura 1), desde a floração da soja, de modo a evitar danos de outros insetos ou posturas de percevejos e, posteriormente, evitar a saída dos insetos colocados nas gaiolas.

Os níveis de infestação impostos em cada parcela foram zero (testemunha, sem infestação), 4, 8 e 16 percevejos adultos/gaiola, sendo a infestação realizada no início de R4 (Fehr; Caviness, 1977), no dia 28 de janeiro de 2020. Nas infestações foram utilizados adultos, oriundos de ninfas coletadas na área experimental da Embrapa Soja, mantidas em gaiolas até a infestação. Para manter o nível de infestação do início ao fim do experimento, semanalmente as gaiolas foram vistoriadas para reposição dos adultos mortos.

Para avaliar o número de vagens abortadas pela planta (caídas no solo) durante o período de infestação e danos dos percevejos foram realizadas três vistorias (20/02/2020, 04/03/2020 e 11/03/2020). A retirada dos insetos foi

realizada 31 dias após a infestação (27/02/2020). A retirada das gaiolas (telas e armação de ferro) ocorreu na colheita, realizada nos dias 16/03/2020 e 20/03/2020, quando as plantas das parcelas (gaiolas) testemunha sem infestação (nível 0) atingiram o ponto de maturação fisiológica. Nessa ocasião, avaliou-se a retenção foliar segundo escala de zero a quatro, variando de 0-25% (1), 25-50% (2), 50-75% (3) e 75-100% (4); a altura (cm) de plantas de todas as parcelas também foi aferida.



**Figura 1.** Gaiolas teladas utilizadas para a realização dos ensaios no campo. Cada gaiola era composta de 2 linhas com 1 m de comprimento de cada genótipo, com seus respectivos níveis de infestação (0, 4, 8 e 16 adultos de *Euschistus heros*/gaiola).

Após a colheita, as plantas foram acondicionadas, em sacos de algodão, para a contagem do número de plantas/parcela (gaiola), no laboratório. As avaliações estão em andamento, onde será avaliados o número de plantas/gaiola e destas, cinco estão sendo tomadas, ao acaso, para determinação do número de vagens cheias e de vagens sem grão/planta. Quando todas essas variáveis tiverem sido avaliadas, em todos os genótipos, as plantas serão trilhadas para estimativa de rendimentos/ parcela. Para tal, uma amostra de 50g por parcela será tomada para avaliação da qualidade de sementes e grãos de cada genótipo submetido a diferentes níveis populacionais de *E. heros*.

Todos os dados obtidos serão submetidos a análise fatorial (genótipo x níveis de infestação). Adicionalmente, serão realizadas as correlações entre os dados para determinar como o número de insetos afeta produtividade e a retenção foliar, assim como, para definir o efeito dos percevejos na queda de vagens e a diferença, entre os genótipos na reposição das vagens abortadas.

## Resultados e Discussão

Como parte da colheita foi feita nos dias que antecederam o período de isolamento social, em função do COVID-19, as análises pós-colheita, previstas para o laboratório, ainda estão sendo realizadas em regime de revezamento. Sendo assim, não houve tempo hábil para o processamento das amostras colhidas e dos dados obtidos, assim como, para a realização das correlações previstas e apresentação de resultados.

## Referências

- ARIAS, C. A. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORREA-FERREIRA, B. S.; LOPES, I. de O. N. Auxílio da genética. **Cultivar: grandes culturas**, v. 19, n. 229, p. 12-14, jun. 2018.
- BALDIN, E. L. L.; VENDRAMIN, J. D.; LOURENÇÃO, A. L. Introdução. In: BALDIN, E. L. L.; VENDRAMIN, J. D.; LOURENÇÃO, A. L. (Org.). **Resistência de plantas a insetos: fundamentos e aplicações**. Piracicaba: Fealq, 2019. v. 1, p. 25-64.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p. (Iowa Cooperative Extensive Service. Special Report, 80).
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; ARIAS, C. A. A.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; LIMA, D. de; LORINI, I. Melo, C. L. P. de. Manejo reforçado. **Cultivar: grandes culturas**, v. 20, n. 245, p. 14,16, 18 e 19, out 2019.
- HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; CORREA-FERREIRA, B. S.; OLIVEIRA, L. J.; SOSA-GOMEZ, D. R.; PANIZZI, A. R.; CORSO, I. C.; GAZZONI, D. L.; OLIVEIRA, E. B. de. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 30).
- PANIZZI, A. R.; BUENO, A. de F.; SILVA, F. A. C. da. Insetos que atacam vagens e grãos da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. cap. 5. p. 335-420.
- PINHEIRO, J. B.; VENDRAMIM, J. D.; LOURENÇÃO, A. L. Programas geram cultivares de soja resistente a insetos. *Revista Visão Agrícola*, n. 5, p. 56-59, jan. 2006.

ROSSETTO, C. J.; IGUE, T.; MIRANDA, M. A. C. de; LOURENÇÃO, A. L. Resistência de soja a insetos: Comportamento de genótipos em relação a percevejos. **Bragantia**, v. 45, n. 2, p. 323-335, 1986.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. cap. 10. p. 674-723.

SOSA-GÓMEZ, D.; CARVALHO, M. C. G. de; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. A biotecnologia, o melhoramento no manejo de pragas da soja. In: HOFFMAN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. cap. 11. p. 725-788.

# Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da ferrugem-asiática da soja, em Londrina, PR

ARAÚJO, L. M. de<sup>1</sup>; GODOY, C. V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Pitágoras Unopar, bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, ludi.araujo@hotmail.com; <sup>2</sup>Pesquisadora, Embrapa Soja

## Introdução

A ferrugem-asiática da soja, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*, é uma das doenças mais severas que incide na cultura da soja, com danos variando de 10% a 90% nas diversas regiões geográficas onde foi relatada (Yorinori et al., 2005).

Os sintomas iniciais da doença são pequenas lesões foliares, de coloração castanha a marrom-escura. Na face inferior da folha, pode-se observar urédias que se rompem e liberam os uredosporos. Plantas severamente infectadas apresentam desfolha precoce, que compromete a formação, o enchimento de vagens e o peso final do grão. Quanto mais cedo ocorrer a desfolha, menor será o tamanho do grão e, conseqüentemente, maior a perda de rendimento e de qualidade (Yang et al., 1991).

As estratégias de manejo recomendadas no Brasil para essa doença incluem: a utilização de cultivares de ciclo precoce e semeaduras no início da época recomendada, a eliminação de plantas de soja voluntárias e a ausência de cultivo de soja na entressafra por meio do vazio sanitário, o monitoramento da lavoura desde o início do desenvolvimento da cultura, a utilização de fungicidas no aparecimento dos sintomas ou preventivamente e a utilização de cultivares resistentes (Tecnologias..., 2013).

Desde a safra 2003/2004, ensaios cooperativos em rede vêm sendo realizados para a comparação da eficiência de fungicidas registrados e em fase de registro no controle da ferrugem-asiática. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência dos fungicidas registrados para controle da ferrugem-asiática da soja. Esse experimento faz parte dos ensaios cooperativos para controle da ferrugem-asiática na safra 2019/2020.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido em Londrina, PR, na fazenda experimental da Embrapa Soja. A cultivar de soja BRS 1003IPRO, tipo de crescimento indeterminado, grupo de maturação 6.3, ciclo médio, foi semeada em 20 de dezembro de 2019, em área com sistema de plantio direto. As sementes foram tratadas com o fungicida Vitavax-Thiram 200 SC® (carboxina + tiram) na dose 200 mL p.c./100 kg semente e com o inseticida CropStar® (tiocarbe), na dose 200 mL p.c./100 kg semente. As primeiras aplicações dos tratamentos (Tabela 1) foram realizadas no fechamento do dossel da lavoura, aos 49 dias após a semeadura (R2) (Fehr; Caviness, 1977), na ausência de sintomas de ferrugem e repetidas em intervalos de 13 (R4) e 15 dias após a primeira aplicação (R5 e R5.4), num total de 4 aplicações.

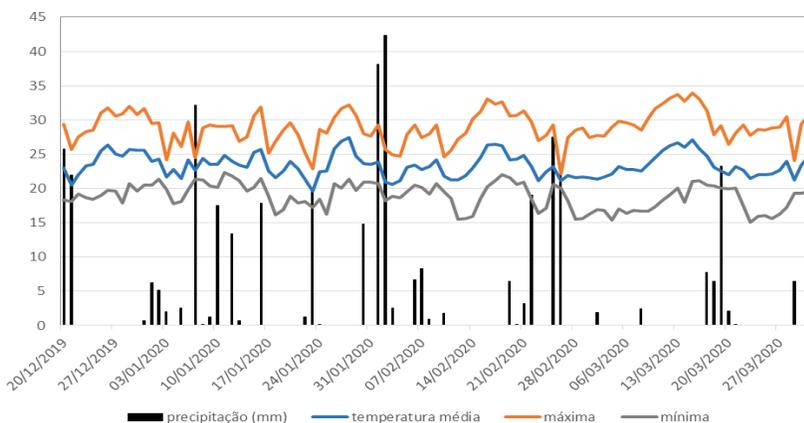
Para a aplicação dos produtos foi utilizado pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub>, pontas de pulverização XR11002, pressão de 30 libras e volume de calda equivalente a 200 L/ha. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 15 tratamentos (Tabela 1) e quatro repetições, sendo cada repetição constituída por parcelas com seis linhas de soja com 5 m de comprimento e espaçadas em 0,45 m, considerando-se as quatro linhas centrais como área útil para aplicação dos tratamentos e para as avaliações.

Foram realizadas avaliações periódicas da severidade da ferrugem no ensaio a partir de R5.1 (Fehr; Caviness, 1977). As avaliações foram realizadas estimando a severidade nos terços inferior, médio e superior do dossel das plantas, em quatro pontos ao acaso na área útil das parcelas, sendo a média utilizada como a média de severidade da parcela. Quando foi observada desfolha causada pela ferrugem, a severidade foi estimada em 100% para o terço desfolhado para compor a média da parcela. A porcentagem de controle foi estimada em relação à testemunha não tratada com fungicida. Ao final do ciclo, as duas linhas centrais das parcelas foram colhidas com a colhedora de parcelas Winterstaiger, para estimativa da produtividade. A produtividade foi estimada em kg/ha, a 13% de umidade.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e quando significativo foi utilizado o teste de Tukey para agrupamento dos tratamentos, utilizando o programa SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

## Resultados e Discussão

Na primeira aplicação, não havia sintomas de ferrugem. Os primeiros sintomas de ferrugem foram observados em R4 (Fehr; Caviness, 1977), sendo a doença que predominou no ensaio. As aplicações foram realizadas em 07/02 (49 dias após a semeadura), 20/02 (15DAA1 – R4), 06/03 (15 DAA2 – R5) e 21/03 (15 DAA3 – R5.4). Os primeiros sintomas de ferrugem na área foram observados entre a segunda e a terceira aplicação. Apesar das chuvas bem distribuídas em janeiro, quando a lavoura se encontrava em período vegetativo, houve redução na frequência de chuvas durante o período de formação e enchimento de vagens, quando foi detectada a ferrugem (Figura 1).



**Figura 1.** Precipitação (mm) e temperaturas médias, máxima e mínimas (°C) de 20 dezembro de 2019 a 31 de março de 2020. Estação meteorológica da Embrapa Soja, Londrina, 2019/2020.

Na avaliação de severidade aos 7 DAA3, o único tratamento com severidade superior aos demais foi tebuconazol + clorotalonil (T6), porém inferior a testemunha e com controle superior a 70%. Os demais tratamentos apresentaram controle superior a 90% nessa avaliação e severidade média na parcela inferior a 1%. Em R6, aos 6 DAA4, a severidade na testemunha foi de 64,8%. As maiores porcentagens de controle foram observadas para os tratamentos com mancozebe + picoxistrobina + tebuconazol (T8 – 97%), com os programas alternando fungicidas (T15 – 95% e T14 – 94%), com bixafen + protioconazol + trifloxistrobina (T13 – 94%), com picoxistrobina + benzovindiflupir (T10 – 93%) e com piraclostrobina + fluxapiróxade (T11 – 91%). As menores porcentagens de controle foram observadas para os tratamentos

com azoxistrobina + benzovindiflupir (T9 – 76%), com tebuconazol + clorotalonil (T6 – 81%) e com trifloxistrobina + ciproconazol (T3 – 82%), porém todos os tratamentos com controle acima de 70%, evidenciando baixa pressão de ferrugem-asiática no experimento (Tabela 1). Além da baixa pressão de doença, as elevadas temperaturas e as baixas precipitações no final do ciclo anteciparam a desfolha e a maturação das plantas anulando a diferença de produtividade entre os tratamentos e a testemunha sem fungicida. A diferença de produtividade não foi significativa entre os tratamentos (Tabela 1). Houve baixa correlação entre a variável severidade em R6 e a produtividade ( $r=0,43$ ).

**Tabela 1.** Severidade de ferrugem (SEV%) em R6, porcentagem de controle (%C) em relação a testemunha sem tratamento e produtividade (PROD) para os diferentes tratamentos.

PRODUTO COMERCIAL (ingrediente ativo)	L - kg p.c./ha	R6 6DAA4 SEV%	%C	PROD
				kg/ha
1. TESTEMUNHA		64,8 a		2407 n.s.
2. APROACH PRIMA <sup>1</sup> (picoxistrobina+ciproconazol)	0,3	7,0 cde	89	2685
3. SPHEREMAX <sup>2</sup> (trifloxistrobina+ciproconazol)	0,2	11,4 bcd	82	2590
4. FOX <sup>2</sup> (trifloxistrobina+protioconazol)	0,4	4,3 ef	93	2628
5. FUSÃO <sup>3</sup> (metominostrobin+tebuconazol)	0,725	7,6 cde	88	2277
6. FEZAN GOLD <sup>4</sup> (tebuconazol+clorotalonil)	2,5	12,6 bc	81	2607
7. AUDAZ/AUMENAX <sup>5</sup> (oxicloreto de cobre+fluxapiraxade)	1,2	7,0 cde	89	2754
8. CRONNOS <sup>6</sup> (mancozebe+picoxistrobina+tebuconazol)	2,5	2,2 f	97	2898
9. ELATUS <sup>7</sup> (azoxistrobina+benzovindiflupir)	0,2	15,3 b	76	2754
10. VESSARYA (picoxistrobina+benzovindiflupir)	0,6	4,8 ef	93	3104
11. ORKESTRA SC <sup>8</sup> (piraclostrobina + fluxapiraxade)	0,35	6,1 def	91	3259
12. ATIVUM <sup>8</sup> (piraclostrobina + epoxiconazol + fluxapiraxade)	0,8	6,2 de	90	2441
13. FOX XPRO <sup>2</sup> (bixafen+protioconazol+ trifloxistrobina)	0,5	3,7 ef	94	3007
14. PROGRAMA 1 <sup>9</sup> (T7/T13/T8/T3+ Previnil 720 1,5 L/ha)		3,7 ef	94	2947
15. PROGRAMA 2 <sup>9</sup> (T13/T12/ T5+Manfil 1,5 kg/ha / T2+Previnil 1,5 L/ha)		3,4 ef	95	3181
C.V. %		12,8%		7,5%

<sup>1</sup>Adicionado Nimbus 0,75 L/ha; <sup>2</sup>Adicionado Aureo 0,25% v/v; <sup>3</sup>Adicionado Iharol Gold 0,25% v/v; <sup>4</sup>Adicionado Agril Super 50 mL/ha; <sup>5</sup>Adicionado Rumba 0,5 L/ha; <sup>6</sup>Adicionado Orix 0,5 L/ha; <sup>7</sup>Adicionado Rumba 0,5 L/ha; <sup>8</sup>Adicionado Ochima 0,25 L/ha; <sup>9</sup>Adicionado Assist 0,5 L/ha; <sup>9</sup>Tratamentos aplicados em intervalos médios de 14 dias. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p\leq 0,05\%$ ).

## Conclusão

No experimento em Londrina houve incidência tardia (R4) e evolução lenta da ferrugem-asiática, em razão das altas temperaturas e das precipitações irregulares. Todos os tratamentos resultaram em controle acima de 70%, porém sem diferença significativa na produtividade entre os tratamentos.

## Referências

- CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri – Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, p. 18-24, 2001.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stage of soybean development**. Ames: Iowa State University, 1977. 12 p. (Iowa Cooperative Extensive Service. Special Report, 80).
- TECNOLOGIAS de produção de soja – Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 265 p. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 16).
- YANG X. B.; TSCHANZ A. T.; DOWLER W. M.; WANG T. C. Development of yield loss models in relation to reductions of components of soybeans infected with *Phakopsora pachyrhizi*. **Phytopathology**, v. 81, p. 1420-1426, 1991.
- YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. F.; HARTMAN, G. E.; GODOY, C. V.; NUNES JUNIOR, J. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay. **Plant Disease**, v. 89, p. 675-677, 2005.

# Planejamento e avaliação de sistemas de terraceamento utilizando imagens aéreas e ferramentas digitais

WALDRICH, G. A. T.<sup>1</sup>; SANTOS, E. L. dos<sup>2</sup>; FURLANETTO, R. H.<sup>3</sup>; ALMEIDA, L. F. A.<sup>4</sup>; DEBIASI, H.<sup>5</sup>; JUSTUS, W. P.<sup>1</sup>; FRANCHINI, J. C.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>UNOPAR, Bolsista PIBIC/CNPq, Arapongas, PR, Gabriel-alencar@outlook.com.br; <sup>2</sup>Centro Universitário FAG, Cascavel, PR; <sup>3</sup>COCAMAR, Maringá, PR; <sup>4</sup>UEM, Maringá, PR; <sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

## Introdução

A conservação do solo e da água na propriedade rural são princípios básicos para a sustentabilidade ambiental e da produção agrícola (Franchini et. al., 2016). O manejo inadequado pode influenciar diretamente na degradação do solo e da água, por meio do aumento do escoamento superficial, que é o excedente de água da chuva que não infiltra. A erosão, é um fenômeno natural que depende da interação de vários fatores como: a erosividade da chuva, a erodibilidade do solo, a declividade, o comprimento de rampa, a taxa de infiltração de água no solo e as práticas de manejo e de conservação do solo e da água. O terraceamento, é uma prática conservacionista bem difundida entre os agricultores para o controle da erosão hídrica, no entanto a sua alocação na área, de acordo com os critérios atuais utilizados no Paraná (Caviglione et al., 2010) tem sido questionada em função do número considerado excessivo de terraços alocados considerando o atual sistema de cultivo. O software Terraço 4.1 foi desenvolvido para o planejamento integrado dos recursos hídricos e é aplicado na conservação do solo e da água. Este software permite realizar simulações usando informações sobre a erosividade da chuva, dados de altimetria e declividade do terreno, forma de construção e dimensões das estruturas de contenção da enxurrada e a taxa de infiltração estável de água no solo (TIE). Este conjunto de informações permite realizar análises criteriosas das características locais, o que resulta em mais opções para o sistema de terraceamento a ser utilizado, facilitando a tomada de decisão de técnicos e produtores rurais (Cunha et al., 2011).

Identificar a variação espacial e temporal para melhor aplicação das práticas agrícolas e aproveitamento dos insumos, é uma das premissas da agricultura de precisão, que busca com isso melhorar a produtividade, reduzir o

custo de produção e impactos ambientais (Jorge; Inamasu, 2014). O monitoramento de áreas agrícolas pode ser realizado por meio de veículos aéreos não tripulados (VANTS), popularmente conhecidos como drones, e permite a obtenção de imagens aéreas de grandes áreas com baixo custo, com maior frequência e com alta resolução (Franchini et al., 2018). Além de monitorar o comportamento das culturas, as imagens aéreas também permitem obter o modelo digital de elevação (MDE) da área. O MDE permite a construção de bases precisas de altimetria e declividade facilitando o trabalho de planejamento do sistema de terraceamento. Outra informação importante para o planejamento de terraços é a TIE, uma vez que afeta diretamente a lâmina de escoamento superficial de água (LES) utilizada para o dimensionamento de terraços e, é fortemente influenciada pelo nível de diversificação de espécies vegetais no sistema de produção (Silva et al., 2018). Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar os sistemas de terraceamento implantados em áreas agrícolas com diferentes históricos do sistema de produção, na região norte e noroeste do Paraná, por meio da TIE e de ferramentas digitais para a obtenção do MDE e simulação de terraços.

## Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido em dez talhões de propriedades agrícolas, com diferentes históricos de manejo do sistema de produção, localizadas nas regiões norte e noroeste do Paraná (Tabela 1). Em cada área foram estabelecidos oito pontos amostrais, distribuídos no terço médio do talhão, para avaliação da textura e da TIE ( $\text{mm h}^{-1}$ ). As áreas avaliadas foram selecionadas em propriedades de cooperados da Cocamar Cooperativa Agroindustrial. Para a classificação textural das amostras foram utilizados os níveis estabelecidos por Santos et al. (2013), conforme apresentado na Tabela 1.

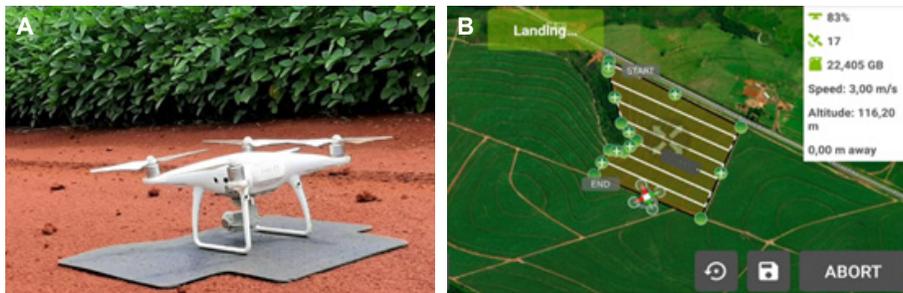
A TIE foi determinada com auxílio de um infiltrômetro construído conforme as especificações descritas por Ogden et al. (1997). Para as medidas, o reservatório de água do infiltrômetro era posicionado sobre um cilindro metálico com diâmetro de 24 cm e altura de 15 cm, previamente inserido a uma profundidade de 2 cm. O volume de chuva aplicado era determinado por meio de um sistema que permite a regulação da entrada de ar no sistema (Santi et al., 2006). Para determinar a TIE, foi simulada uma chuva com intensidade de aproximadamente  $300 \text{ mm h}^{-1}$ . O escoamento superficial foi determinado

a partir do volume de água coletado por uma mangueira posicionada em um orifício de 1 cm<sup>2</sup> localizado ao nível do solo na parte externa do cilindro. A TIE foi obtida pela diferença entre o volume de chuva aplicado e o volume de água escoado superficialmente. As leituras do volume de água no reservatório (chuva) e de água escoada superficialmente, foram realizadas a intervalos de 3 minutos. As avaliações se prolongaram até a estabilização das leituras de escoamento, o que durou em média 60 minutos por ponto.

**Tabela 1.** Localização, históricos de manejo do sistema de produção, textura do solo (camada 0-20 cm) e área dos talhões agrícolas avaliados na safra 2019/20 no Paraná.

Talhão	Município	Histórico de manejo	Textura (0-20 cm)	Área (ha)
1	Bela Vista do Paraíso	Soja/Milho + Urochloa sp. (4 safras)	Argiloso	36,5
2	Iporã	Soja/Urochloa sp. solteira (>5 safras)	Arenoso	10,6
3	Maringá	Soja/Trigo - Soja/Milho+Urochloa sp. (2 safras)	Muito argiloso	43,1
4	Apucarana	Soja/Trigo	Muito argiloso	36,6
5	Cianorte	Soja/Urochloa sp. solteira (2 safras)	Arenoso	16,4
6	Santa Mariana	Soja/Milho	Muito argiloso	13,6
7	Cafezal do Sul	Pasto - soja/Urochloa sp. solteira (1 safra)	Arenoso	34,5
8	Jussara	Soja/Milho	Média	52,3
9	Jussara	Cana - Soja (1 safra)	Muito argiloso	36,2
10	Cianorte	Soja/Milho	Média	16,9

As imagens aéreas foram obtidas com um VANT do tipo quadricóptero (Phantom 4 Pro<sup>®</sup>) com câmera com sensor RGB (bandas: red, green e blue), quando a cultura da soja estava entre os estádios fenológicos R<sub>3</sub> e R<sub>5</sub> (Figura 1 A). O plano de voo foi previamente definido no aplicativo Pix4D<sup>®</sup> capture (PIX4D, 2020), na altitude de 120 m e 75% de sobreposição longitudinal e 55% lateral (Figura 1B). As imagens geradas foram processadas por meio do software Agisoft Metashape v. 1.5.5 (Agisoft, 2020), gerando ao final do processo o ortomosaico e o Modelo Digital de Elevação (MDE).



**Figura 1.** Quadricóptero (Phantom 4 Pro®, DJI®) utilizado para obtenção das imagens (A); Plano de voo elaborado no software Pix4D® capture (B).

Não foram utilizados pontos de controle georreferenciados no solo para correção de distorções nas imagens geradas. Para a construção da base de dados de altimetria e declividade a partir do MDE, foi utilizada uma série de procedimentos utilizando os softwares Qgis (QGIS, 2020), Vesper (Minasny et al., 2006) e Surfer (Golden Software, 1999) (Figura 2A e 2B). Em resumo, a resolução do MDE foi reduzida de aproximadamente 10 cm para 20 metros no Qgis e remodelada por meio de geoestatística no Vesper. Os dados krigados foram retornados ao Qgis para o cálculo da declividade. Os dados de declividade também foram remodelados no Vesper. O modelo mais bem ajustado a altitude e a declividade foi o gaussiano, com distância máxima de 200 metros e número de lags variando entre 5 e 9, de acordo com as características das áreas. Para seleção do modelo e dos parâmetros foram utilizados os menores valores do índice AIC e da raiz quadrada do desvio padrão (RMSE). As bases de dados finais para uso no programa Terraço 4.1 foram geradas no programa Surfer, a partir dos dados krigados. As bases foram geradas com resolução de 1 m e exportadas no formato ASCII GRID, que permite a leitura diretamente no programa Terraço 4.1.

No programa Terraço 4.1 foram padronizados alguns parâmetros para a avaliação da eficiência dos sistemas de terraceamento em cada área agrícola. Foram utilizados os parâmetros de erosividade da chuva para a sede do município onde as propriedades estavam localizadas. O tempo de retorno da chuva do projeto foi estabelecido como sendo de 15 anos. Estes parâmetros determinam a quantidade de chuva (lâmina em mm/24horas) considerada para o cálculo da quantidade e dimensão dos terraços. Para todas as áreas

agrícolas avaliadas, os parâmetros de declividade, permitiram a construção de terraços de base larga. Deste modo, foi considerada a construção de terraços de base larga em nível com trator tracionando terraceador e coeficiente de uniformidade igual a 1. Foi utilizado o modo de espaçamento de terraços arbitrado, onde a altura do terraço é variável nos projetos de simulação. A TIE também foi considerada como variável nos projetos de simulação. A TIE tem relação direta com a lâmina de escoamento superficial (LES) e esta impacta no dimensionamento dos terraços de base larga por meio de sua altura. Deste modo, com o objetivo de encontrar a combinação entre a TIE e a altura de terraço que melhor refletia o sistema de terraceamento implantado nas áreas agrícolas, foram gerados projetos variando a altura (35, 40, 45, 50 e 55 cm) e a TIE (30, 40, 50 e 60 mm h<sup>-1</sup>). Os projetos gerados na forma de vetor contendo as cotas dos terraços foram exportados do Terraço 4.1 e carregados para o software Qgis. Por inspeção visual da sobreposição dos terraços às imagens dos ortomosaicos dos talhões, foi selecionado o projeto que mais bem se ajustava aos terraços existentes na área (Figura 2C).

Finalmente foram comparadas a TIE observada por medida direta e a TIE calculada nos projetos simulados para verificar se os sistemas implantados nos talhões agrícolas avaliados eram adequados. Quando a TIE observada foi igual ou superior a TIE determinada no projeto o sistema de terraceamento foi considerado adequado, caso contrário, foi considerado inadequado.

## Resultados e Discussão

A TIE avaliada nas dez **áreas agrícolas** (Tabela 2) foi classificada em baixa (<30; 1 área), média (30-60; 7 áreas) e alta (60-90; 2 áreas) mm h<sup>-1</sup>, conforme escala proposta por Silva et al. (2017). Os resultados apresentados indicam que o nível de diversificação de culturas no outono inverno, quando comparado com o sistema de referência mais tradicional na região do estudo, com soja no verão e milho na 2<sup>a</sup> safra esteve relacionado de forma positiva com a TIE. Sistema mais diversificados, com a introdução de *Urochloa ruziziensis* solteira ou em consórcio com o milho 2<sup>a</sup> safra, por mais do que um ano, proporcionam maior aporte de biomassa de parte aérea e raízes das plantas no sistema, o que contribuiu para diminuir o impacto direto das gotas na superfície (palhada) e aumentar a quantidade de poros contínuos (raízes) que fa-

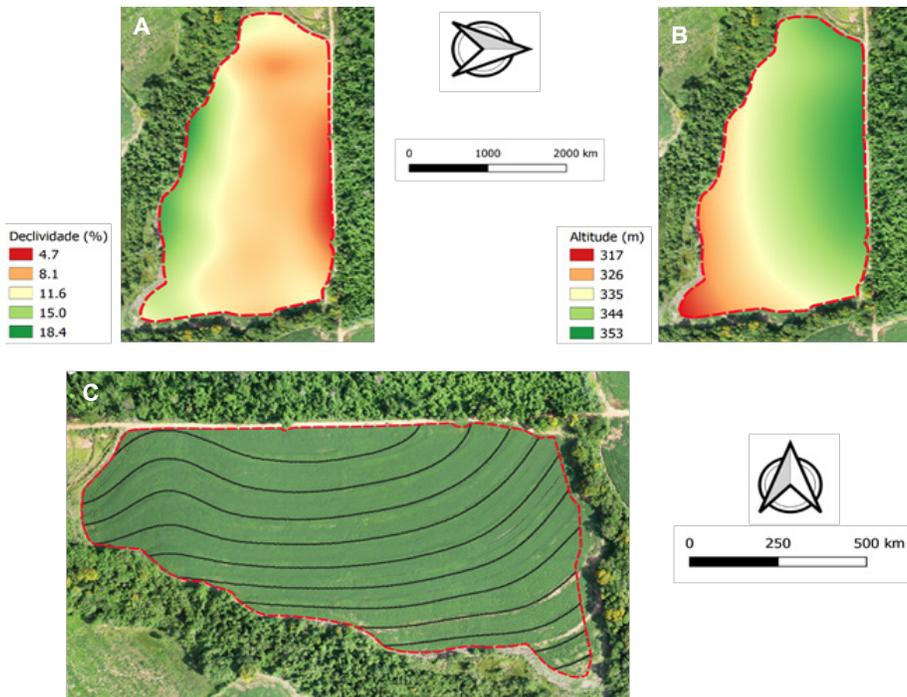
vorecem a infiltração e o armazenamento de água. O aumento da TIE, reduz a LES, o que pode contribuir para melhor funcionalidade dos sistemas de terraceamento implantado nos talhões agrícolas, evitando o transbordamento.

As simulações no software Terraço 4.1, variando a altura dos terraços de base larga e a TIE, permitiram identificar a combinação que mais bem se ajustava ao posicionamento do sistema de terraceamento implantado nos talhões agrícolas avaliados, conforme apresentado na tabela 2 e figura 2C. A TIE calculada para os sistemas projetados, ficou dentro da faixa de nível médio (entre 30 e 60 mm h<sup>-1</sup>) enquanto a altura variou entre 40 e 55 cm. A TIE observada, devido a sua relação direta com a LES foi utilizada como referência para avaliação relativa dos sistemas de terraceamento implantados. Nesse sentido, apenas em quatro talhões a TIE observada foi maior do que a TIE calculada, indicando que o sistema implantado poderia ser considerado adequado. Nos outros seis talhões, o fato da TIE observada ser menor do que a TIE calculada indica que, para os parâmetros considerados no cálculo dos sistemas de terraceamento, haveria maior probabilidade de transbordamento dos terraços do que a estabelecida para o período de retorno da chuva do projeto de 15 anos. Os talhões agrícolas onde a TIE observada foi maior do que a TIE calculada, foram caracterizados pelo uso de sistemas de produção mais diversificados e por mais de um ano, demonstrando a importância da diversificação para a melhoria da qualidade estrutural do solo. Segundo Pruski (2009) determinar corretamente a LES é fundamental para o dimensionamento correto da seção transversal de terraços, uma vez que, quanto maior a capacidade de infiltração de água no solo menor será o escoamento superficial produzido e menores podem ser as dimensões dos terraços.

**Tabela 2.** Características dos terraços projetados mais bem ajustados com os terraços implantados nos talhões agrícolas avaliados, TIE observada e classificação do sistema implantado.

Talhão	Município	Calculado			TIE (mm h <sup>-1</sup> )	Classificação
		Altura (cm)	TIE (mm h <sup>-1</sup> )	No terraços	Observada	
1	Bela Vista do Paraíso	50	40	11	133	Adequado
2	Iporã	45	40	11	68	Adequado
3	Maringá	45	40	17	62	Adequado
4	Apucarana	50	60	5	49	Inadequado
5	Cianorte	50	30	16	41	Adequado
6	Santa Mariana	50	50	6	38	Inadequado
7	Cafezal do Sul	40	40	20	36	Inadequado
8	Jussara	45	50	18	36	Inadequado
9	Jussara	55	50	8	35	Inadequado
10	Cianorte	40	40	15	20	Inadequado

O fato dos sistemas de terraceamento serem classificados como inadequados em seis talhões avaliados é preocupante, pois indica que sob condições inadequadas de manejo do solo, como compactação excessiva e cobertura do solo deficiente, existe grande probabilidade de que ocorra erosão significativa nestes talhões. No entanto, duas ações podem ser adotadas pelos produtores para correção da situação diagnosticada. A primeira seria o aumento da altura do terraço o suficiente para garantir o armazenamento da LES na TIE observada, o que envolve custos com horas de trabalho de máquinas e implementos, porém sem alterar a origem do problema, a baixa TIE. A segunda opção seria o uso de práticas de manejo do sistema de produção, baseadas na diversificação de espécies, por período maior do que um ano, como as observadas nos outros quatro talhões avaliados considerados adequados, que promovam o aumento da TIE observada. Assim, haveria redução da LES e o sistema de terraceamento implantado passaria a ser considerado adequado.



**Figura 2.** Declividade (A), altimetria (B) e configuração dos terraços projetados e alocados no talhão (C).

A metodologia utilizada no estudo contribuiu para o entendimento de que o funcionamento do sistema de terraceamento implantado nos talhões está intimamente relacionado com a qualidade estrutural do solo, representada pela TIE. Desta forma, o manejo do sistema de produção assume uma importância bem maior para o controle do processo erosivo do que a que vem sendo considerada, em detrimento das meras dimensões físicas dos terraços. A metodologia pode ser melhorada pelo uso de pontos de controle georeferenciados que permitiriam medir a altura dos terraços.

## Conclusão

A utilização de imagens aéreas e de softwares de processamento e planejamento aprimoram o processo de alocação e avaliação dos sistemas de terraceamento. A diversificação de espécies no sistema de produção contribui para aumentar a taxa infiltração de água no solo, tornando mais eficientes os sistemas de terraceamento.

## Referências

- AGISOFT. **Agisoft Metashape software 1.5.5**. c2020. Disponível em: <<https://www.agisoft.com/downloads/installer/>>. Acesso em: 30 jun. 2020.
- CAVIGLIONE, J. H.; FIDALSKI, J.; ARAÚJO, A. G. de; BARBOSA, G. M. de C.; FUENTES-LLANILLO, R.; SOUTO, A. R. **Espaçamentos entre terraços em plantio direto**. Londrina: IAPAR, 2010. 59 p. (IAPAR. Boletim Técnico, 71).
- CUNHA, F. F.; LEAL, A. J. F.; ROQUE, C. G. Planejamento de sistemas de terraceamento utilizando o software Terraço 3.0. **Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium**, v. 2, n. 1, p. 182-196, 2011.
- FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; JORGE, L. A. de C.; DEBIASI, H.; DIAS, W. P.; GODOY, C. V.; OLIVEIRA JUNIOR, A. de; CORREA, F. B.; OLIVEIRA, M. C. N. de. **Uso de imagens aéreas obtidas com drones em sistemas de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. 39 p. (Embrapa Soja. Documentos, 408).
- FRANCHINI, J. C.; PRUSKI, F. F.; ARAUJO, R.; DEBIASI, H.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; CONTE, O.; SANTOS, E. L. Avaliação do sistema de terraços após manutenção e readequação em uma fazenda na região norte do Paraná. In: REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA, 35., 2016, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2016. p. 52-54. (Embrapa Soja. Documentos, 372).
- GOLDEN SOFTWARE INC. **Surfer for window**. 1999. Disponível em: <https://www.goldensoftware.com/products/surfer>. Acesso em: 30 jun. 2020.
- JORGE, L. A. de C.; INAMASU, R. Y. Uso de veículos aéreos não tripulados (VANT) em agricultura de precisão. In: BERNARDI, A. C. de C.; NAIME, J. de M.; RESENDE, A. V. de; BASSOI, L. H.; INAMASU, R. Y. (Eds.). **Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. p. 109-134.
- MINASNY, B.; MCBRATNEY, A. B.; WHELAN, B. M. **Vesper 1.62: spatial prediction software for precision agriculture**. Sydney: Australian Centre for Precision Agriculture (ACPA), University of Sydney, 2006.
- OGDEN, C. B.; VAN ES, H. M.; SCHINDELBECK, R. R. Miniature rain simulator for field measurement of soil infiltration. **Soil Science Society of American Journal**, v. 61, n. 4, p. 1041-1043, 1997.
- PIX4D. **PIX4D capture software**. 2020. Disponível em: <https://www.pix4d.com/product/pix4dcapture>. Acesso em: 30 jun. 2020.
- PRUSKY, F. F. **Conservação de solo e água: práticas mecânicas para o controle da erosão hídrica**. Viçosa: UFV, 2009. 279 p.
- QGIS. **Geographic information system**. Open Source Geospatial Foundation Project, 2020. Disponível em: <http://qgis.org>. Acesso em: 30 jun. 2020.
- SANTI, A. L.; AMADO, T. J. C.; SCHENATO, R. B.; BELLE, G. L.; PES, L. Z.; DELLAMEA, R. B. C.; PIZUTTI, L. Infiltração de água no solo, em áreas com diferentes potenciais de produtividade e manejadas com técnicas de agricultura de precisão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGRICULTURA DE PRECISÃO, 2., 2006, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ESALQ/USP, 2006. 1 CD-ROM.

SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. de. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353 p.

SILVA, R. V.; SANTOS, E. L.; PEREIRA, G. S.; HASS, I. J.; FURLANETTO, R. H.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; DEBIASI, H.; FRANCHINI, J. C. Infiltração de água no solo em diferentes sistemas de manejo na região norte do Paraná. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 13., 2018, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2018. p. 188-194. (Embrapa Soja. Documentos, 401).

# Tempo de cozimento e rendimento de variedades de mandioca de mesa de polpa amarela em diferentes épocas de colheita

FRUTUOSO, B. C. S.<sup>1</sup>; MARINI, J. V.<sup>1</sup>; ROMANO, M. R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UNOPAR, Bolsista PIBIC/CNPq, Londrina, PR, brunocesarfts@hotmail.com; <sup>2</sup>Pesquisador, Embrapa Mandioca e Fruticultura

## Introdução

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das principais fontes de carboidrato da dieta dos habitantes de países em desenvolvimento e foi eleita pela Organização das Nações Unidas (ONU) como alimento do século XXI. O Brasil é o quinto maior produtor de mandioca e a Nigéria é o país que lidera a produção mundial (FAO, 2020). A mandioca de mesa, também denominada aipim, macaxeira ou mandioca mansa, se diferencia da mandioca brava, que é mais utilizada para a fabricação de farinha e fécula nos complexos agroindustriais, pelas concentrações abaixo de 100 ppm dos compostos tóxicos de glicosídeos cianogênicos na raiz. Seu uso na culinária brasileira é diversificado e regionalizado. Entretanto, a maioria das receitas com a raiz exige que ela seja submetida à cocção antes do consumo.

Entre as características desejáveis de uma variedade de mandioca, o rendimento de raízes, o baixo tempo de cozimento culinário e a manutenção da sua qualidade em diversas épocas de colheita, se destacam e podem ser decisivos para a adoção pelos agricultores. A coloração da polpa da raiz de mandioca pode variar de branca a graduações de amarelo. A preferência do consumidor pela raiz de polpa branca ou amarela varia com a região, mas tem sido observada uma tendência pela maior aceitação de mandiocas amarelas, mesmo em regiões tradicionais no consumo de raiz de polpa branca. Em São Paulo e no norte do Paraná, o consumo de mandioca amarela foi popularizado a partir da década de 80 pela variedade melhorada IAC 576-70, que além da produtividade elevada, apresenta elevado teor de  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A no organismo humano (Lorenzi, 1994). Esse caso de sucesso motivou os principais programas de melhoramento genético da mandioca a selecionar genótipos de mandioca de mesa de polpa amarela, entre

eles o Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Além dos programas de melhoramento, a grande variabilidade de mandioca encontrada no Brasil, considerado centro de origem da espécie, permite que os agricultores selecionem variedades crioulas bem adaptadas às condições edafoclimáticas regionais, com características qualitativas que atendam às exigências do consumidor.

O objetivo do trabalho foi avaliar o rendimento e o tempo de cozimento culinário de raízes de variedades melhoradas e crioulas de polpa amarela em diversas épocas de colheita.

## Material e Métodos

O experimento foi implantado em 05/10/2018 no campo experimental da Embrapa Soja, Londrina, PR, localizado sob as coordenadas 23°11' S, 51°11' O e altitude de 620 m. O clima é do tipo Cfa, segundo a classificação climática de Köpen-Geiger. O solo é do tipo Latossolo Vermelho distroférico. O preparo do solo foi realizado com operações motomecanizadas de subsolagem e gradagem niveladora. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, em esquema fatorial de parcelas subdivididas no tempo, sendo as épocas de colheita [meses após o plantio (MAP)] as parcelas e as variedades de mandioca as subparcelas, com três repetições e uma planta útil por parcela. As colheitas foram realizadas a cada 15 dias, totalizando 8 épocas, sendo em MAP: 9 (10/07/2019); 9,5 (24/07/19); 10 (08/08/19); 10,5 (22/08/19); 11 (03/09/19); 11,5 (19/09/19); 12 (01/10/19); 12,5 (23/10/19). As variedades de mandioca de mesa avaliadas foram três: BRS 429, variedade registrada pelo programa de melhoramento genético da Embrapa em 2019, de porte alto, ereta, ramificação alta, coloração da raiz amarelo intenso; Eucalipto, variedade crioula que predomina nas áreas de plantio da região de Mogi-Mirim/SP (principal região produtora de mandioca de mesa do Sudeste), porte ereto, sem ramificação, coloração da raiz amarela; Roxinha, variedade crioula cultivada na região de Mogi-Mirim/SP, porte baixo, ramificação baixa, coloração da raiz amarela. O plantio foi realizado com o posicionamento horizontal de manivas à profundidade de 10 cm, em sulcos preparados manualmente com enxada. O espaçamento de plantio foi de 1,0 m x 1,0 m. As manivas com 5

a 7 gemas foram obtidas pelo seccionamento de ramas sadias com facão. A adubação das plantas foi realizada aos 65 dias após o plantio (DAP) com a aplicação em cobertura de uma mistura de fertilizantes simples nas dosagens de 80 kg de  $P_2O_5$ , 40 kg de N e 30 kg of  $K_2O$ . O controle de plantas daninhas foi realizado com duas capinas manuais, aos 45 e aos 90 DAP. Em cada época de colheita as plantas das parcelas foram colhidas por arranquio manual. As raízes tuberosas foram destacadas das plantas, colocadas em saco de ráfia e pesadas com balança de gancho para a determinação do rendimento de raízes, expresso em quilos por planta ( $kg\ pl^{-1}$ ). Três raízes por parcela, com diâmetro mínimo de 4 cm, foram separadas e levadas, em menos de 24 horas, para teste de cozimento, realizado na cozinha experimental da Embrapa Soja. A determinação do tempo de cozimento culinário das raízes de mandioca, expresso em minutos (min), seguiu a metodologia proposta por Pereira et al. (1985). O tempo máximo considerado no teste de cozimento foi de 30 minutos. Os dados foram testados para normalidade de distribuição pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, submetidos à análise de variância e teste F. As médias dos tratamentos simples das parcelas (épocas de colheita) e das sub-parcelas (variedades) e do desdobramento das interações foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, com auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2010).

## Resultados e Discussão

O teste F para os tratamentos simples (épocas de colheita e variedades) não apresentou significância para a variável “rendimento de raízes” ( $p > 0,05$ ), porém apresentou significância a 5 % para a variável “tempo de cozimento culinário” (Tabela 1). O mesmo ocorreu para a interação entre épocas de colheita e variedades e, portanto, estão sendo mostrados e discutidos os dados obtidos para tempo de cozimento culinário (Tabela 2).

**Tabela 1.** Médias obtidas para as variáveis tempo de cozimento e rendimento de raízes em experimento com três variedades de mandioca de polpa amarela, colhidas em oito épocas. Londrina, 2019.

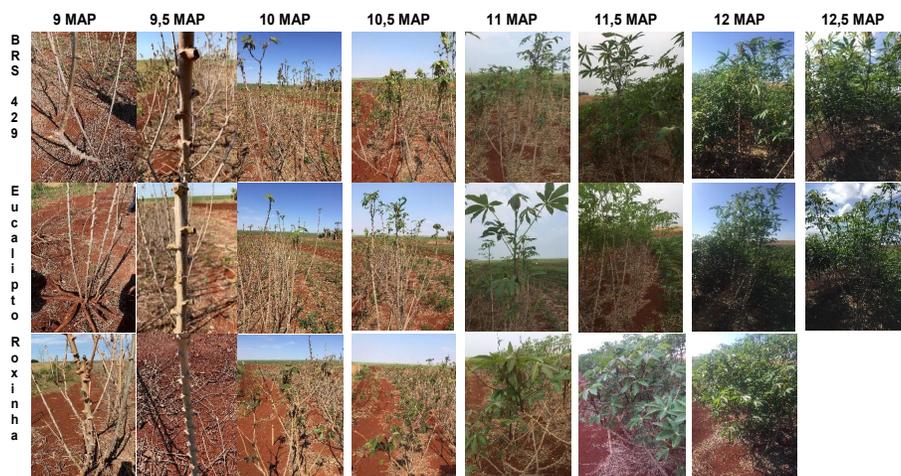
Épocas	Tempo de cozimento (min)		Rendimento de raízes (kg pl <sup>-1</sup> )
9 meses	19,56	bc <sup>1</sup>	2,99
9,5 meses	16,74	c	2,81
10 meses	20,71	b	2,79
10,5 meses	16,48	c	2,96
11 meses	22,03	b	2,92
11,5 meses	21,35	b	3,18
12 meses	21,60	b	3,53
12,5 meses	28,82	a	3,51
CV Parcela (%)	9,74		30,88
Variedades			
BRS 429	19,83	b	3,01
Eucalipto	23,31	a	3,23
Roxinha	18,27	c	2,95
CV Sub-parcela (%)	6,52		35,39

<sup>1</sup> médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p≤0.01); CV (%)= coeficiente de variação.

O tempo de cozimento para as épocas de colheita variou de 16,48 a 28,82 minutos, uma diferença superior a 12 minutos. Os menores tempos de cozimento foram observados nas colheitas de 9,5 e 10,5 MAP, mas sem diferença significativa para a colheita realizada aos 9 MAP. Das oito épocas de cozimento avaliada, cinco médias não diferiram entre si, com tempo de cozimento médio em torno de 21 minutos. De acordo com a classificação de Pereira et al. (1985), esse tempo médio classificaria a mandioca de mesa no nível regular de cozimento (21 a 30 minutos), mas bem próximo do nível bom (11 a 20 min). A última época de colheita, aos 12,5 MAP, apresentou o maior tempo de cozimento, 28,5 min, tempo ainda dentro do nível regular de cozimento, mas próximo do nível ruim (maior que 30 minutos).

O tempo de cozimento de raízes de mandioca de mesa é influenciado por diversos fatores que levam a alterações na composição química da raiz de mandioca, tais como variedade, idade e condições ambientais na colheita, fertilidade do solo e tratos culturais (Lorenzi, 1994; Oliveira; Moraes, 2009). Na prática, observa-se que, para a maioria das variedades, o tempo de cozi-

mento aumenta à medida que se reinicia um novo ciclo de desenvolvimento vegetativo, coincidente com o período das chuvas e o aumento da temperatura do ar. Nesse processo, boa parte do amido armazenado nas raízes durante a fase de repouso, é remobilizado para a formação de novos ramos e folhas, tornando a raiz da mandioca pobre em amido. No linguajar do agricultor, ela é conhecida como “aguada”. Observa-se na Figura 1, que a retomada do desenvolvimento vegetativo se iniciou aos dez meses para as três variedades e com pouca distinção no crescimento vegetativo entre elas. Possivelmente, processos bioquímicos regulados por fatores genéticos seja o determinante para que ocorra um retardamento ou aceleração na perda de qualidade do cozimento culinário nas variedades, com a retomada do desenvolvimento da planta.



**Figura 1.** Aspectos da parte aérea das variedades BRS 429, Eucalipto e Roxinha no repouso e na retomada do desenvolvimento vegetativo, ao longo de oito épocas de colheita de raízes. Londrina, 2019.

As médias de rendimento de raízes para as épocas de colheita não apresentaram diferença significativa, mas nota-se uma tendência no incremento do rendimento de raízes por planta a partir da colheita aos 11,5 MAP. A maior diferença de rendimento foi de 0,74 kg pl<sup>-1</sup>, cerca de 20%, para as épocas de 10 e 12 MAP. Pode-se atribuir ao alto coeficiente de variação resultante da análise estatística a causa para a ausência de diferença significativa entre as médias (Tabela 1). A elevada dispersão dos valores em torno da média pode estar associada ao pequeno número de plantas amostradas na parcela para a análise da característica de rendimento de raízes. A média de rendimento

das variedades BRS 429, Eucalipto e Roxinha, entre 9 e 12,5 MAP, foi em torno de 3,0 kg pl<sup>-1</sup> ou 30 t ha<sup>-1</sup>, considerando o estande de 10.000 pl ha<sup>-1</sup> adotado no experimento.

Na análise do desdobramento da interação variedade x época de colheita para a variável tempo de cozimento, observa-se que a variedade BRS 429 foi a que apresentou maior amplitude, variando de 14,93 a 27,65 min para o cozimento das raízes (Tabela 2). Em seis das oito épocas de colheita, o tempo de cozimento culinário obtido por essa variedade foi considerado bom de acordo com a classificação de Pereira et al. (1985). Aos 12,5 MAP, houve um elevado incremento no tempo de cozimento (27,65 min), quase atingindo o limite de 30 min estabelecido para o teste de cozimento. A variedade Eucalipto apresentou tempos médios para cozimento mais elevados que BRS 429 e Roxinha e, em apenas três das oito épocas de colheita (9, 9,5 e 10,5 MAP), o tempo de cozimento foi classificado no nível bom. Nessa variedade, a partir dos 11 MAP já se observa um aumento no tempo de cozimento, sendo que aos 12 meses o tempo de cozimento é igual ou superior a 30 minutos. A variedade Roxinha, diferentemente das demais, foi observada em sete épocas de colheita em função da pequena quantidade de material propagativo na implantação do experimento. No período entre 9 e 12 MAP, foi a variedade que apresentou os menores tempos de cozimento, mas sem diferir estatisticamente da BRS 429. Em apenas uma época a variedade Roxinha não foi classificada no nível bom de cozimento culinário, de acordo com a classificação de Pereira et al. (1985).

**Tabela 2.** Médias de tempo de cozimento culinário de raízes de três variedades de mandioca de polpa amarela em oito épocas. Londrina, 2019.

Épocas	BRS 429	Eucalipto		Roxinha	
	Tempo de cozimento (min)				
9 meses	20,56 bc A	20,40	cd A <sup>1</sup>	17,71	ab A
9,5 meses	16,60 cd AB	18,96	cd A	14,65	b B
10 meses	19,25 bc A	21,69	bc A	21,20	a A
10,5 meses	14,93 d A	18,11	d A	16,40	b A
11 meses	20,25 bc B	25,02	b A	20,81	a B
11,5 meses	21,11 b A	22,36	bc A	20,58	a A
12 meses	18,29 bcd B	30,00	a A	16,51	b B
12,5 meses	27,65 a A	30,00	a A	-	

<sup>1</sup> médias seguidas de letras diferentes minúsculas na coluna e maiúscula na linha apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p≤0.05)

## Conclusão

O tempo de cozimento culinário de raízes de mandioca não é estável em colheitas entre 9 e 12,5 meses após o plantio.

A variedade Eucalipto com plantio em outubro deve ser colhida com no máximo 11,5 meses de idade.

A nova variedade de mesa BRS 429 detém atributos de rendimento e tempo de cozimento comparáveis ou superiores às variedades crioulas de ampla adoção por agricultores.

## Referências

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 16 mar. 2020.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 5.3**: Sistema de análise de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 2010. Software.

LORENZI, J. O. Variação na qualidade culinária das raízes de mandioca. **Bragantia**, v. 53, n. 2, p. 237-245, 1994.

OLIVEIRA, M. A.; MORAES, P. S. B. Características físico-químicas, cozimento e produtividade de mandioca cultivar IAC 576-70 em diferentes épocas de colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 837-843, 2009.

PEREIRA, A. S.; LORENZI, J. O.; VALLE, T. L. Avaliação do tempo de cozimento e padrão de massa cozida em mandiocas de mesa. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 4, n. 1, p. 27-32, 1985.

# Análise do curso de Produção de Soja como ferramenta de comunicação na Embrapa Soja em 2019

AMADOR, C. P.<sup>1</sup>; KERN, H. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, clara.amador@colaborador.embrapa.br, <sup>2</sup>Analista, Embrapa Soja, Núcleo de Comunicação Organizacional.

## Introdução

Os eventos têm se tornado, cada vez mais, uma prática muito importante para as organizações, pois se trata de uma estratégia de comunicação que busca alcançar diferentes públicos de interesse (Silva, 2003). Os eventos divulgam a marca de uma organização, promovem seus produtos e serviços, potencializam seu relacionamento com os públicos e contribuem para a expansão comercial e conquista de novos mercados e parcerias, explicam os autores Fortes e Silva (2011, p. 34).

Na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) não poderia ser diferente, em se tratando de uma empresa de pesquisa e desenvolvimento de tecnologias, os eventos se apresentam como uma excelente ferramenta para transmissão e compartilhamento de informações e conhecimentos, como aponta Vilardo (2015, p. 4).

## Eventos como estratégia de relacionamento

De acordo com Fortes e Silva (2011), um evento é um veículo (não seria uma iniciativa ou um produto) de comunicação dirigida, cuja estratégia de comunicação é pensada de forma exclusiva para cada público, produzindo mensagens mais eficientes de acordo com as características próprias de cada receptor. Por exemplo, uma mesma mensagem deve ser compartilhada de forma diferente para comunicar com o público interno e o público externo da organização.

Segundo Santos (2016), no Manual de Eventos que regula a prática na Embrapa, o termo evento significa o desenvolvimento de atividades que buscam integrar a organização com seus públicos, buscando alinhar seus

interesses, “caracteriza-se como evento um conjunto de atividades, previamente planejadas, com o objetivo de projetar técnica e institucionalmente a Empresa e de promover a capacitação, a aproximação e a integração com seus públicos.” (Santos, 2016, p. 23).

Os eventos são de extrema importância dentro das organizações e proporcionam inúmeros benefícios:

a) melhoria nas relações com os públicos de interesse; b) lançamento de produtos/serviços da empresa voltado a seu mercado-alvo, ampliando assim sua visibilidade; c) geração de *mailing* para prospecção de novos clientes; d) aquisição de informações sobre o mercado e concorrentes; e) atualizações técnicas; f) transmissão de informações para os canais de distribuição; g) criação e fortalecimento da imagem/conceito institucional. Os autores acrescentam, por se tratar de um veículo de comunicação dirigida, “o evento consegue, em um tempo curto e de uma só vez, atingir boa parte do público de interesse das organizações” (Fortes; Silva, 2011, p. 35).

## **Os objetivos da realização dos cursos**

Existem, portanto, diversas modalidades de eventos para atender as particularidades de cada público e as necessidades de comunicação das organizações. Um desses eventos é o curso, amplamente utilizado pela Embrapa e por diversas organizações que se utilizam da transferência de tecnologias como forma de atingir seus públicos-alvo.

De acordo com Fortes e Silva (2011, p. 216 e 217), curso é um método planejado que utiliza diversas atividades, técnicas e práticas, de acordo com uma programação específica. O objetivo do curso é capacitar um grupo de pessoas com características homogêneas e interesses comuns, por se dirigir a um público específico.

Em concordância, Santos (2016, p. 23 e 24) classifica curso como um evento de capacitação, que engloba eventos de treinamento e desenvolvimento. A autora descreve curso como um evento que pode ser realizado de forma presencial, à distância ou mista, desenvolvido com o objetivo de aprendizagem que fundamentam seu conteúdo, carga horária e metodologias de ensino.

## **O Curso de Produção de Soja: estrutura e avaliação dos módulos de 2019**

A Embrapa Soja, uma das unidades descentralizadas da Embrapa, tem extensa grade de programação de diversos cursos ao longo do ano, com intuito de transmitir os conhecimentos e as tecnologias desenvolvidos na Empresa. Entre eles, encontra-se o Curso de Produção de Soja iniciado em 2016. O objetivo deste Curso é promover a atualização e a capacitação de técnicos e produtores sobre as tecnologias de produção de soja, buscando desenvolver um manejo mais produtivo, com estratégias para alcançar melhores resultados. São realizados dois módulos independentes anualmente, mas que possuem informações complementares: o módulo Manejo do solo e da cultura e o módulo Manejo fitossanitário. Ambos os módulos possuem aulas teóricas, demonstrações práticas no campo e visitas técnicas, com a carga horária de 36 horas cada. Os dois módulos do curso são realizados pelas áreas de Transferência de Tecnologia, Pesquisa e Desenvolvimento e Comunicação.

O Núcleo de Comunicação Organizacional (NCO) da Embrapa Soja colabora com toda a organização do evento, o que envolve desde o planejamento até a realização do evento. Entre as ações táticas encontra-se, por exemplo, o desenvolvimento a criação de uma identidade visual, a partir da qual são produzidas peças de comunicação, como banner eletrônico para divulgação, no site grupos de WhatsApp, perfil no Facebook e e-mail marketing. A identidade visual também é usada na elaboração do site do curso, que reúne informações gerais, programação do evento e gerenciamento das inscrições. O NCO também é responsável pela contratação e organização de materiais (bolsa, caderno, pen drive, caneta), formatação da programação, contratação de serviços, como coffee break e happy hour, organização de material técnico, lista de presença e aplicação de questionário de avaliação.

No ano de 2019 o Módulo I - Manejo do solo e da cultura foi realizado de 3 a 7 de junho e contou com a presença de 34 participantes, entre eles 67,7% de técnicos agrícolas, 23,5% de produtores agrícolas, 5,9% de estudantes e 2,9% de pesquisadores. O Módulo II - Manejo fitossanitário foi realizado de 18 a 22 de novembro e contou com a presença de 23 participantes, entre eles 52,2% de técnicos agrícolas, 30,4% de produtores agrícolas, 8,7% de estudantes e 8,7% de pesquisadores.

Uma das estratégias para aprimorar e atualizar a dinâmica do curso é a realização de avaliações com os participantes. Analisando quatro aspectos avaliados nos dois módulos ocorridos em 2019, chegou-se aos seguintes resultados apresentados nas Figuras 1 a 8.



**Figura 1.** Gráfico do Módulo I, Organização Geral do evento.



**Figura 2.** Gráfico do Módulo I, Quanto o curso atendeu a sua expectativa, participantes escolheram entre uma escala de 1 a 5.



**Figura 3.** Gráfico do Módulo I, Contribuição do evento para seu trabalho, participantes escolheram entre uma escala de 1 a 5.



**Figura 4.** Gráfico do Módulo I, Atribua uma nota ao evento de 1 a 5.



**Figura 5.** Gráfico do Módulo II, Organização do evento em geral.



**Figura 6.** Gráfico do Módulo II, Quanto o curso atendeu a sua expectativa, participantes escolheram entre uma escala de 1 a 5.



**Figura 7.** Gráfico do Módulo II, Contribuição do evento para seu trabalho, participantes escolheram entre uma escala de 1 a 5.



**Figura 8.** Gráfico do Módulo II, Atribua uma nota ao evento de 1 a 5.

## Discussão

Como se pode observar nos gráficos apresentados no item anterior, em ambos os módulos, a maioria dos participantes afirmou estar satisfeitos com a organização do evento, a maioria dos participantes declarou que o curso atendeu de forma satisfatória as suas expectativas, e a maioria dos participantes declarou que o curso foi relevante para o seu trabalho.

Ambos os módulos, I e II, receberam uma nota média alta, 4,91 e 4,57 respectivamente, em uma escala de 1 a 5. Todos os participantes afirmaram ter intenção de indicar o curso para outras pessoas. Tais dados apontam que a maioria dos participantes está satisfeito com o curso. Apesar da satisfação alta em participar dos cursos, a avaliação dos dois módulos trouxe sugestões de melhorias por parte dos participantes.

Para completar as sugestões de melhorias dos eventos, ainda foi realizada entrevista com o pesquisador da Embrapa Soja e organizador técnico do

evento André Prando. Realizando uma compilação das sugestões do pesquisador e as sugestões nas avaliações, seguem os itens que podem ser melhorados para as próximas edições:

- Aumento da quantidade de aulas práticas em alguns temas para tornar o curso mais didático.
- Entrega do material de apoio antes do início do curso para facilitar o acompanhamento por parte dos participantes.
- Realização de avaliação com os participantes no final do evento, sobre o conteúdo ensinado, para medir o conhecimento que o participante adquiriu durante o curso.

## Referências

FORTES, W. G.; SILVA, M. B. R. **Eventos: estratégias de planejamento e execução**. São Paulo: Summus, 2011. 232 p.

SANTOS, L. de S. **Manual de eventos**. Brasília, DF: Embrapa, Assessoria de Comunicação Social, 2016. 124 p.

SILVA, M. B. R. **O evento como estratégia na comunicação das organizações: modelo de planejamento e organização**. 2003. 12 p. Disponível em: [https://ead2.iff.edu.br/pluginfile.php/26430/mod\\_resource/content/2/Modelo%20de%20planejamento%20de%20eventos.pdf](https://ead2.iff.edu.br/pluginfile.php/26430/mod_resource/content/2/Modelo%20de%20planejamento%20de%20eventos.pdf). Acesso em: 10 jun. 2020.

VILARDO, A. F. L. **Sistematização da rotina de relacionamento com o público externo: documento orientador**. Londrina: Embrapa Soja, 2015. 34 p.

## Parâmetros biológicos de ninfas como indicadores do potencial de oviposição do percevejo *Euschistus heros*

CARRILHO, E. M.<sup>1</sup>; FERREIRA, N.<sup>2</sup>; MACIEL, R. M. A.<sup>3</sup>; UEDA, T. E.<sup>4</sup>; ROGGIA, S.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>UENP, Estagiário, Bandeirantes, PR, carrilho.em@hotmail.com; <sup>2</sup>UniFil, Bolsista Fundação Eliseu Alves, Londrina, PR; <sup>3</sup>UFPR, Doutorando, Curitiba, PR; <sup>4</sup>IAPAR, Pós-Doutoranda, Londrina, PR.; <sup>5</sup> Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, PR.

### Introdução

Os insetos-praga são responsáveis por grande parte das perdas na produtividade da soja, e dentre eles, destaca-se o *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae), como praga-chave da cultura da soja. Conhecido popularmente como percevejo-marrom da soja, é considerado praga de grande importância para a cultura, devido à sua abundância e danos severos que causa na lavoura, bem como pela dificuldade de controle com inseticidas sintéticos. Os danos podem ser causados desde o estágio de ninfas de 3º instar até a fase adulta (Panizzi et al., 2012).

Devido a evolução da resistência de *E. heros* à inseticidas químicos, outros métodos de controle têm sido utilizados, dentre eles, o controle biológico assume importância cada vez maior. Em 2019 foi publicada a especificação de referência do parasitoide *Telenomus podisi* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Platygasteridae) como forma de inseticida biológico, sendo uma etapa importante para sua utilização no controle biológico do percevejo-marrom em campo. Assim, a criação massal de *E. heros* para produção de ovos é uma parte importante do programa de controle biológico desta praga. Diversos estudos tem sido realizados visando o aperfeiçoamento da técnica de criação de *E. heros* (Fortes et al., 2006; Mendoza et al., 2016; Hayashida et al., 2018), porém em sua maioria utilizam experimentos que avaliam todo o ciclo de vida do percevejo, o que torna o estudo demorado e demanda tempo e mão de obra para sua execução. A complexidade dos protocolos experimentais limita a capacidade de rápida evolução na definição da melhor técnica de criação de *E. heros* para a produção de ovos. Nesse contexto, foi conduzido um estudo com objetivo de verificar a correlação da produção de ovos com parâmetros biológicos da fase de ninfa, visando estabelecer protocolos rápidos de experimentos para discriminar técnicas de criação de *E. heros*.

## Material e Métodos

Foi realizado um levantamento bibliográfico de publicações científicas sobre parâmetros biológicos de *E. heros*, utilizando as seguintes bases de busca: SciELO, Scopus, Science Direct, Web of Science, Google Academy, Researchgate e Elsevier. A busca foi realizada usando as seguintes palavras-chave: biologia de *E. heros*, composição etária de *E. heros*, parâmetros reprodutivos de *E. heros*, número médio de ovos por fêmea, biologia comparada de *E. heros*, características biológicas de *E. heros*, substratos artificiais para alimentação e oviposição de *E. heros*, desenvolvimento de *E. heros*, biologia reprodutiva de *E. heros*.

Em seguida foi elaborada uma tabela com a síntese dos parâmetros biológicos apresentados por cada publicação, individualizados por tratamento: duração e viabilidade de estádios imaturos, longevidade de adultos, oviposição, razão sexual e parâmetros da tabela de vida. Para atender aos objetivos do presente estudo, foram selecionadas as publicações que apresentavam dados de oviposição e de duração e viabilidade dos estádios imaturos. Posteriormente, foram calculados parâmetros derivados como duração e viabilidade de cada um dos estádios ninfais (N): N2, N3, N4, N5, N2-N3, N2-N4, N2-N5, N3-N4, N3-N5 e N4-N5. Em todas as publicações com mais de quatro tratamentos, foi procedido o cálculo da correlação de cada estágio ninfal e seus derivados com a oviposição total. Como os dados referentes à ninfas de primeiro instar nem sempre são apresentadas nas publicações e nas que apresentam a duração não varia com os tratamentos, esse estágio (N1) e as derivadas que este compõem (N1-N2, N1-N3, N1-N4, N1-N5) foram desprezadas para a discussão dos resultados. Os dados foram organizados em tabelas e feita correlação com auxílio da ferramenta de Análise de Dados do Excel e apresentados em gráficos de box-plot. Para confecção dos boxplot foi utilizado o programa BoxplotR (Spitzer et al., 2014). A extensão das linhas pontilhadas (whisker) foi determinada pelo método de Tukey, em que o limite inferior (LI) e o limite superior (LS) da linha são determinados por:

LI = valor do quartil inferior - (1,5 \* amplitude interquartil)

LS = valor do quartil superior + (1,5 \* amplitude interquartil)

## Resultados e Discussão

A relação do total de ovos ovipositados com o tempo de duração das fases imaturas apresentou correlação negativa indicando que são inversamente proporcionais, ou seja, quanto menor o tempo de duração das fases imaturas, maior é a oviposição na fase adulta (Tabela 1), já a relação entre a viabilidade dos estádios ninfais com a oviposição apresentou correlação positiva, mostrando-se diretamente proporcionais, ou seja, quanto maior a viabilidade maior a oviposição (Tabela 2). A produção de ovos, duração do estágio ninfal e viabilidade dos estádios ninfais são parâmetros de avaliação que são afetados pelo nível de adequação da criação, incluindo a adequação nutricional. Indica também que, dietas que proporcionam melhor desempenho da fase imatura, também são as que determinam maior produção de ovos na fase adulta. A disponibilidade de alimentos em abundância e de elevada qualidade nutricional faz com que o inseto atinja seu potencial fisiológico máximo desempenhando suas atividades, contribuindo para a próxima geração (Panizzi; Parra, 2009).

**Tabela 1.** Correlação da duração dos estádios ninfais com o total de ovos produzidos na fase adulta de *Euschistus heros*.

Estádios ninfais <sup>1</sup>	Bibliografias consultadas					
	Hayashida et al. (2018)	Mendoza et al. (2016)	Fortes et al. (2006)	Siqueira (2007)	Azambuja (2012)	Média
N2	-75,74	-43,96	-72,72	-90,06	-52,57	-67,01
N3	-96,63	-27,11	-46,34	-62,95	-76,78	-61,96
N4	-56,01	-84,91	-77,03	-63,49	-81,73	-72,63
N5	-90,31	-84,45	-93,25	-69,42	-76,63	-82,81
N2-N5	-65,98	-85,00	-81,43	-68,40	-75,60	-75,28
N3-N5	-86,36	-82,24	-83,20	-66,01	-80,96	-79,75
N4-N5	-79,76	-89,63	-86,86	-66,95	-79,46	-80,53
N2-N3	-94,02	-46,21	-85,20	-71,49	-67,96	-72,98
N2-N4	-80,24	-68,51	-80,05	-67,58	-77,15	-74,71
N3-N4	-79,31	-63,48	-70,79	-63,37	-81,92	-71,77
n. pares	5	24	4	5	5	

<sup>1</sup> o estágio de ninfa de primeiro instar (N1) não variou seu tempo de duração, não permitindo realizar análise de correlação.

O número total de ovos apresentou correlação próxima a -80% em relação à duração do estágio de ninfa de quinto instar (N5), aos períodos de ninfa de terceiro ao quinto instar (N3-N5) e de quarto ao quinto instar (N4-N5) (Tabela 1). O quinto instar é a última ecdise do inseto, e corresponde a uma fase de grandes modificações em que o inseto se prepara para passar para a fase adulta. Em insetos holometábolos, essas modificações ocorrem na fase de pupa, no entanto, em insetos hemimetábolos, como é o caso dos percevejos, isso ocorre no quinto instar e no início da fase adulta (Rafael et al., 2012). Assim, a adequação dos tratamentos para o desenvolvimento e reprodução dos percevejos reflete de forma representativa na duração deste instar. Azambuja et al. (2015) afirma que apesar do prolongamento do estágio ninfal adultos de *Edessa mediatubunda* conseguiram se reproduzir. Para Silva et al. (2008) verificou que a densidade dos insetos influencia na duração e viabilidade ninfal, bem como a fecundidade e reprodução dos adultos.

O número total de ovos apresentou correlação próxima a 86% em relação a viabilidade do estágio de ninfa para os períodos de segundo ao quinto instar (N2-N5) e terceiro ao quinto instar (N3-N5) (Tabela 2). Considerando os resultados de correlação do total de ovos com a duração e viabilidade de ninfas o período N3-N5 é o que se destaca com os melhores valores de correlações, sendo o período mais promissor para ser usado com indicador da fecundidade de fêmeas. Considerando cada instar de forma isolada o que se destaca com melhores valores de correlação do total de ovos com a duração e a viabilidade é o N5. Segundo Ralph (1976) e Panizzi e Parra (2009), neste instar, o inseto deve utilizar alimentos de alta qualidade nutricional, a fim de dar origem a um adulto com potencial reprodutivo máximo. Segundo Panizzi (2000), qualidades químicas e físicas dos alimentos demonstram respostas diferentes nos insetos, e podem causar aumento no tempo de desenvolvimento biológico dos insetos imaturos ou aumentar a mortalidade. A reprodução é outro processo biológico que está relacionado à qualidade nutricional do alimento, visto que uma elevada qualidade nutricional aumenta a produção de ovos e melhora a nutrição da progênie, entretanto fêmeas quando não supridas nutricionalmente podem reabsorver ovos e embriões e utilizar os nutrientes para aumentar sua longevidade (Awmack; Leather, 2002; Panizzi; Silva, 2009).

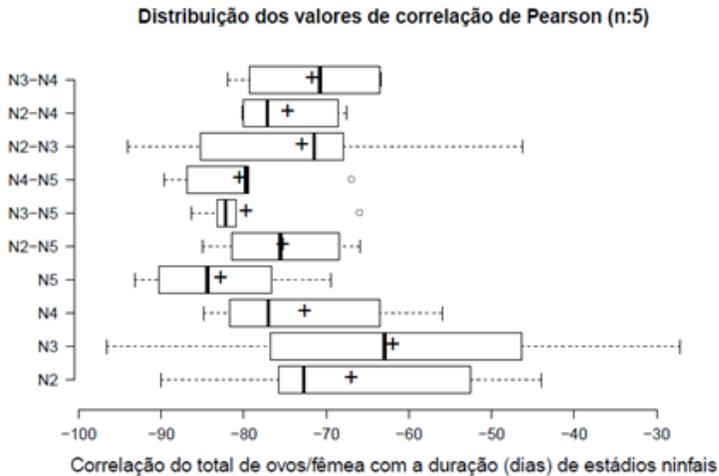
**Tabela 2.** Correlação da viabilidade de estádios ninfais com o total de ovos produzidos na fase adulta de *Euschistus heros*.

Estádios ninfais <sup>1</sup>	Bibliografias consultadas			
	Hayashida et al. (2018)	Mendoza et al. (2016)	Fortes et al. (2006)	Média
N2	67,62	67,29	-41,22	31,23
N3	92,92	76,45	66,92	78,76
N4	20,34	64,46	97,41	60,74
N5	71,56	77,18	92,28	80,34
N2-N5	88,57	78,15	90,86	85,86
N3-N5	81,65	82,27	93,06	85,66
N4-N5	61,41	76,95	97,68	78,68
N2-N3	81,91	72,21	8,48	54,20
N2-N4	81,60	74,34	65,22	73,72
N3-N4	65,85	77,20	94,04	79,03
n. pares	5	24	4	

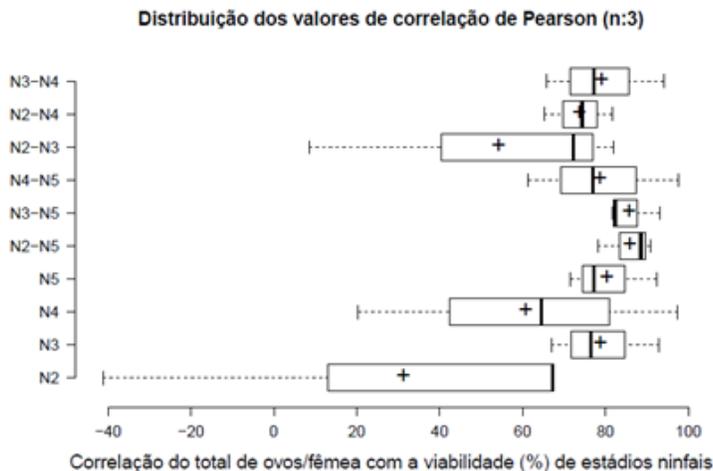
A análise da distribuição dos dados em gráficos de box-plot indica que as correlações do total de ovos com a duração de N3-N5 e N4-N5 e N5, são as que combinam melhores valores de correlação, com menor variabilidade das respostas entre os trabalhos científicos consultados (Figura 1). E quanto a viabilidade os períodos ninfais de N2-N5 e N3-N5 são os que se destacam pelos melhores valores de correlação com o total de ovos associada a menor variabilidade das respostas (Figura 2). A menor variabilidade é indicada pelo menor tamanho dos boxes nas figuras. A menor variabilidade dos dados indica, maior confiabilidade da resposta, sendo altamente desejável para se emitir recomendações para protocolos futuros que visem adotar uma metodologia simplificada para seleção de dietas ou outros tratamentos que afetem a produção de ovos do percevejo.

Uma análise global indica que é possível indicar os tratamentos que proporcionam melhor oviposição analisando apenas parâmetros biológicos da fase imatura, como duração e viabilidade. O período ninfal N3-N5 foi o que apresentou melhor correlação com a oviposição tanto quando analisada sua duração com viabilidade, além de apresentar menor variabilidade dos dados. Destaca-se que, ao adotar esse procedimento, os insetos devem ser expostos aos diferentes tratamentos desde N2, pelo menos, que é quando iniciam a sua alimentação, permanecendo até o final de N5. Esse procedimento dispensa a necessidade de avaliação diária, demanda apenas o registro exato

do início de N3 e do fim de N5. Outra vantagem é que, com os devidos ajustes metodológicos, possibilita que os insetos sejam mantidos em grupo, sem a necessidade de individualização, isso possibilita aproximar a metodologia experimental da realidade de uma criação massal.



**Figura 1.** Gráfico box-plot com a distribuição dos valores de correlação do total de ovos/fêmea com diferentes estádios e períodos ninfais de *E. heros*. O tamanho do box indica a variabilidade dos dados, a linha central indica a mediana e a cruz indica a média, os círculos indicam valores outlier.



**Figura 2:** Gráfico box-plot com a distribuição dos valores de correlação do total de ovos/fêmea com diferentes estádios e períodos ninfais de *E. heros*. O tamanho do box indica a variabilidade dos dados, a linha central indica a mediana e a cruz indica a média.

## Conclusão

A duração e a viabilidade do período ninfal de N3-N5 representam satisfatoriamente a oviposição do percevejo *E. heros*. Estes parâmetros biológicos podem ser usados em protocolos rápidos para indicar os melhores tratamentos em experimentos que visem aperfeiçoar a técnica de criação de *E. heros* para produção de ovos.

## Referências

- AWMACK, C. S.; LEATHER, S. R. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 817-844, 2002. DOI: 10.1146/annurev.ento.47.091201.145300.
- AZAMBUJA, R. **Biologia comparada de *Euschistus heros* (Fabr.) e *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) em soja *Glycine max* (L.) e algodoeiro *Gossypium hirsutum* (L.)**. 2012. 65 f. Dissertação (Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade) - Faculdades de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados.
- AZAMBUJA, R.; DEGRANDE, P. E.; SOUZA, E. P.; PEREIRA, F. F.; PASTORI, P. L. Reprodução de *Edessa mediatubunda* (Hemiptera: Pentatomidae) em algodoeiro. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, n. 2, p. 203-208, 2015.
- FORTES, P.; MAGRO, S. R.; PANIZZI, A. R.; PARRA, J. P. P. Development of a dry artificial diet for *Nezara viridula* (L.) and *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 567-572, 2006.
- HAYASHIDA, R.; BUENO, A. de F.; HERMEL, A. O.; HIRAKURI, M. H.; SILVA, F. A. C.; ROGGIA, S. *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) fitness on artificial diets: an approach to optimize mass rearing of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygasteridae) for augmentative biological control. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 4, p. 1605-1613, 2018.
- MENDOZA, A. C.; ROCHA, A. C. da; PARRA, J. R. P. Lyophilized artificial diet for rearing the Neotropical *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Science**, v. 16, p. 41, 2016.
- PANIZZI, A. R. Suboptimal nutrition and feeding behavior of hemipterans on less preferred plant food sources. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 112, 2000. DOI: 10.1590/S030180592000000100001.
- PANIZZI, A. R.; BUENO, A. de F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Org.) **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 335-420.
- PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. Introdução à bioecologia e nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas. In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Org.) **A bioecologia e a nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 21-35.

PANIZZI, A. R.; SILVA, F. A. C. Insetos sugadores de sementes (Heteroptera). In: PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. (Org.). **A bioecologia e a nutrição de insetos como base para o manejo integrado de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Londrina: Embrapa Soja, 2009. p. 465-522.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B. de.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012. 810 p.

RALPH, C. P. Natural food requirements of the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae), and their relation to gregariousness and host plant morphology. **Oecologia**, v. 26, p. 157-175, 1976.

SILVA, C. C.; LAUMANN, R. A.; MORAES, M. C. B.; BORGES, M. *Euschistus heros* mass rearing technique for the multiplication of *Telenomus podisi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 5, p. 575-580, 2008. DOI: 10.1590/S0100-204X2008000500004.

SIQUEIRA, F. **Adição de frutos de *Ligustrum lucidum* ait. (oleaceae) em dieta artificial seca para a criação do percevejo marrom *Euschistus heros* (f.) 79 (Heteroptera:Pentatomidae)**. 2007. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SPITZER, M.; WILDENHAIN, J.; RAPPILBER, J.; TYERS, M. BoxPlotR: a web tool for generation of box plots. **Nature Methods**, v. 11, n. 2, p. 121-122, 2014.

## Parâmetros para descarte de adultos em criação de *Euschistus heros* visando a produção de ovos

FERREIRA, N. <sup>1</sup>; MACIEL, R. M. A. <sup>2</sup>; CARRILHO, E. M. <sup>3</sup>; UEDA, T. E. <sup>4</sup>; ROGGIA, S. <sup>5</sup>

<sup>1</sup> UniFil, Bolsista Fundação Eliseu Alves, Londrina, PR, nathaliaferreiraagro@hotmail.com; <sup>2</sup> UFPR, Doutorando, Curitiba, PR; <sup>3</sup> UENP, Estágio obrigatório, Bandeirantes, PR; <sup>4</sup> IAPAR, Pós-Doutoranda, Londrina, PR; <sup>5</sup> Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, PR.

### Introdução

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma cultura de grande relevância para a economia do Brasil. Essa cultura tem seu rendimento e qualidade afetados pelo ataque de pragas, principalmente por percevejos fitófagos da ordem Hemiptera. Dentre estes destaca-se o percevejo marrom *Euschistus heros* Fabricius, 1798 (Hemiptera: Pentatomidae) pelo seu potencial de dano e dificuldade de controle (Panizzi et al., 2012).

Este percevejo possui a soja como principal planta hospedeira e é encontrado na lavoura nos períodos de novembro a abril (Panizzi et al., 2012). No demais meses o percevejo marrom permanece em hibernação (Mourão; Panizzi, 2000), habitualmente fora da lavoura. Durante esse período os insetos não se reproduzem, devido a isso e à incidência de doenças e parasitoides sobre as populações de campo, estabelecer uma criação em laboratório desses insetos é importante para o fornecimento de insetos para experimentos, com qualidade, sadios e padronizados ao longo de todo ano.

Mais recentemente a criação de percevejos em laboratório tem ganhado importância para a produção de ovos a serem utilizados para produção de parasitoides de ovos. Com a publicação da especificação de referência do parasitoide *Telenomus podisi* (Ashmead, 1893) (Hymenoptera: Platygasteridae), em 2019, muitas empresas de controle biológico se interessaram pela criação do percevejo para fins de produção do parasitoide, para ser usado no controle biológico de percevejos em campo. Nesse caso é demandada criação massal focada em produção de grande quantidade de ovos. A criação de percevejos em laboratório segue diversos critérios técnicos, baseados em seus parâmetros biológicos e em resultados de diversos estudos científicos. Porém em uma criação massal também precisam ser levados em conta critérios econô-

nicos. Segundo Hayashida et al. (2018) a mão de obra demandada é um dos principais parâmetros de custo da criação de percevejos. Outro aspecto a ser considerado é que até o início da produção de ovos uma criação gera apenas despesas. Com o aumento gradativo da produção de ovos a receita obtida tende a gerar saldo positivo, porém no final do ciclo dos insetos a produção de ovos reduz ao ponto de que os gastos com alimento e mão de obra para manutenção não são compensados pela reduzida produção. Nesse contexto o presente trabalho foi elaborado com objetivo de estudar parâmetros orientadores para o descarte de adultos em uma criação de *E. heros* destinada a produção de ovos.

## Material e Métodos

### Criação estoque

A criação de percevejos mantida no laboratório de percevejos da Embrapa Soja, é uma criação massal estabelecida e utilizada como fonte de insumos para experimentos e para criação de parasitoides. Uma vez por ano ocorre a coleta de insetos a campo, para manter a variabilidade genética da população de *E. heros*.

No mês de dezembro de 2019 foram coletados percevejos em plantas de soja na Embrapa Soja. Os insetos foram triados a fim de separar percevejos acometidos de patógenos ou parasitoides em laboratório e acondicionados em gaiolas com aproximadamente 100 insetos, mantidos em câmara climatizada ( $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C,  $70 \pm 10\%$  UR e fotoperíodo de 14L:10E horas). As gaiolas possuem aberturas lateral e superior fechada com tela de inox com abertura de 1 mm. O fundo das gaiolas é forrado com papel filtro para absorver a umidade excessiva e fezes dos insetos. Cada gaiola recebe, como alimento para os insetos, uma dieta composta por: quatro vagens de feijão *Phaseolus vulgaris* (L.), dois amendoins crus *Arachis hypogaea* e 10 grãos de soja *Glycine max* (L.) Merrill. A periodicidade de manutenção da criação para coleta dos ovos, troca de alimento e limpeza das gaiolas de criação é realizada três vezes por semana, nas segundas, quartas e sextas-feiras. O substrato de oviposição utilizado é um tecido de algodão com 7 x 25cm aproximadamente, sendo este substrato colocado no lado oposto a abertura vedada com tela de inox.

Ovos coletados são armazenados no nitrogênio líquido para serem utilizados na criação de parasitoides. Semanalmente, 0,17 gramas dos ovos colhidos são incubados em caixas de poliestireno cristal, tipo gerbox, para estabelecer um novo lote de criação. Quando a produção de ovos por caixa de adultos reduz, é realizado o descarte das caixas.

### Estudo biológico e custos da criação

A partir da criação estoque foram obtidos 50 casais de percevejos, com cinco dias da emergência para a fase adulta. Estes foram mantidos em caixas de poliestireno cristal, tipo gerbox de (11x11x3,5 cm), em grupo de cinco casais por caixa. Cada caixa continha um papel filtro forrando internamente seu fundo, e na tampa possuíam uma abertura de 1mm para possibilitar a ventilação. Em cada gerbox foi disponibilizado como alimento: duas vagens de feijão *Phaseolus vulgaris* (L.), dois amendoins crus *Arachis hypogaea* e 10 grãos de soja *Glycine max* (L.) Merrill. Em cada gerbox foi disponibilizado um tecido de algodão, de cor branca, de dimensões 7 x 25 cm, como substrato para oviposição. O estudo foi conduzido em câmara climatizada ( $25^{\circ} \pm 2^{\circ}$  C,  $70 \pm 10\%$  UR e fotoperíodo de 14L:10E horas). Três vezes por semana foi realizada a coleta e a quantificação dos ovos produzidos, a troca do alimento e limpeza da caixa, ao longo da fase adulta dos insetos.

A partir de dados biológicos e de custos da criação do estudo de Hayashida et al. (2018) e dos dados biológicos observados no presente estudo, foi estimado o custo de condução de uma criação comercial do percevejo. Foi calculado o gasto diário e diário acumulado com alimento e mão de obra ao longo de todo o ciclo da criação. Em paralelo, a partir da produção de ovos observada, dos 50 casais em estudo, foi calculada a receita derivada da produção de ovo, considerando o preço de mercado de R\$ 20,00 por grama de ovo e uma quantidade média de 2.000 ovos por grama. Por fim foi calculado o saldo, obtido pela diferença entre gastos e receita. O momento para o descarte das caixas, no final do ciclo, foi definido como sendo aquele de máximo saldo.

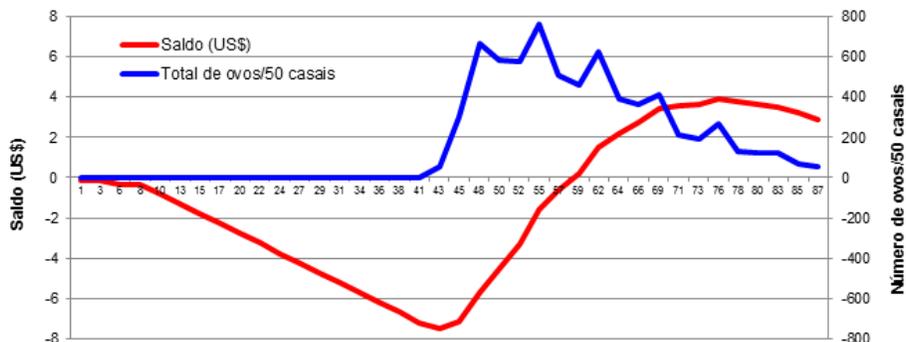
Adicionalmente foi calculada a correlações do total de ovos produzidos com a oviposição acumulada até diferentes datas da fase inicial de oviposição dos percevejos. A partir da indicação do período com correlação satisfatória as 10 repetições foram ranqueadas e foram simuladas diferentes taxas de descar-

te inicial de adultos, desprezando-se as repetições menos produtivas. Para cada simulação foram calculados os gastos com a manutenção da criação, receita potencial pela comercialização dos ovos, momento para o descarte final, e produção de ovos.

## Resultados e Discussão

A oviposição iniciou aos 43 dias de ciclo dos percevejos, 10 dias após a emergência dos adultos (Figura 1). O pico da produção de ovos ocorreu aos 55 dias de ciclo dos percevejos, com 762 ovos, acumulados de 3 dias de oviposição, o que equivale a 254 ovos/dia/50 casais. Nas semanas seguintes houve decréscimo gradual da produção de ovos devido a habitual redução da oviposição com o envelhecimento dos insetos e devido a início da mortalidade de fêmeas. O saldo acumulou valores negativos até os 57 dias de ciclo dos percevejos, dois dias após o pico da produção de ovos. A partir desse momento a receita associada a potencial venda dos ovos passou a compensar os gastos acumulados até essa data com a criação. O saldo foi crescente em uma distribuição parabólica até o pico de US\$ 3,90 aos 76 dias de ciclo dos percevejos, 21 dias após o pico de produção de ovos e 43 dias após a emergência dos adultos. Em seguida o saldo voltou a decrescer, indicando que a produção de ovos já não compensa os gastos com alimento e mão de obra para sua manutenção. Nesse momento é indicado o descarte da criação visando a melhor rentabilidade econômica.

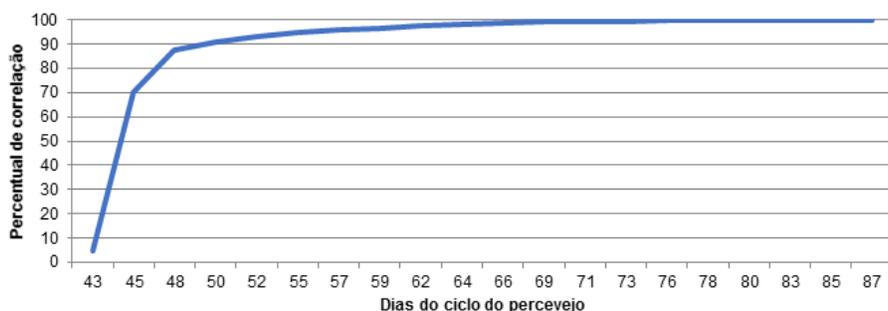
A tomada de decisão para descarte de insetos velhos é um questionamento frequente, principalmente para biofábricas. Manter insetos que não produzem ovos acaba gerando gastos desnecessários. O momento para o descarte pode ser variável entre uma criação e outra. Em ordem de relevância os principais fatores que determinam esse cálculo são: o custo da mão de obra para manutenção, o valor de mercado dos ovos, a produtividade de ovos/fêmea e o gasto com alimento. Também Hayashida et al. (2018) e Lopes et al. (2018) observaram que a mão de obra é o principal componente de custo de uma biofábrica. É importante destacar, sobre o presente estudo, que diversos outros custos estão associados a uma criação massal, armazenamento e comercialização dos ovos. Como esses custos variam de acordo com a escala de cada biofábrica e estratégia de vendas, esse estudo se limitou a estimar parâmetros de custos e receita ligados unicamente a parâmetros da criação.



**Figura 1.** Oviposição de 50 casais de *Euschistus heros* e balanço entre gastos com a manutenção da criação e receita relativa a venda dos ovos produzido. Estudo conduzido a  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ,  $70 \pm 10\% \text{UR}$  e fotoperíodo de 14L:10E horas.

A Figura 2 apresenta as correlações do total de ovos observados por caixa com o total de ovos acumulados em diferentes datas ao longo do período de oviposição. Quanto maior o período de contabilização de ovos acumulados melhor a correlação com o total de ovos. No entanto, os ovos acumulados na primeira semana de oviposição, até 48 dias do ciclo do percevejo, apresentaram correlação satisfatória (87,31%) em relação ao total de ovos. Assim, com base no desempenho da produção de ovos da primeira semana de oviposição é possível discriminar quais caixas serão mais produtivas ao longo do ciclo todo. A partir dessa indicação foram simuladas diferentes taxas de descarte inicial, aplicada ao final da primeira semana de oviposição. Os resultados dessa simulação são apresentados na Tabela 1.

Para o caso em estudo a melhor taxa de descarte inicial foi de 50%, pois foi a que proporcionou maior saldo final. Nesse caso a data de descarte final foi estendida para 83 dia do ciclo do percevejo, uma semana a mais do que na ausência de descarte inicial. O descarte das 50% caixas menos produtivas na primeira semana de oviposição implicou na perda aparente de 30,44% dos ovos (contabilizados na primeira semana de oviposição), mas considerando a oviposição observada no ciclo todo a perda de ovos foi menor (22,73%). Essa perda de ovos associada ao descarte inicial foi compensada pela economia de mão de obra e alimento devido a redução do número de caixas de adultos a partir da segunda semana de oviposição. A partir da taxa de descarte de 60% a perda do potencial de produção de ovos não foi compensatória gerando menor saldo final em relação ao descarte de 50%.



**Figura 2.** Distribuição das correlações do total de ovos produzidos com a oviposição cumulada até diferentes datas do ciclo do percevejo *Euschistus heros*. Estudo conduzido a  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR e fotoperíodo de 14L:10E horas.

**Tabela 1.** Simulação de descarte inicial de caixas de adultos de *Euschistus heros* menos produtivas após uma semana de oviposição e o reflexo sobre o saldo financeiro da criação, data indicada para descarte final do lote e produção de ovos. Estudo conduzido a  $25^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  UR e fotoperíodo de 14L:10E horas.

Simulação de descarte inicial			Descarte final <sup>1</sup>		Valores acumulados até a data de descarte final				
Taxa <sup>2</sup> de descarte	Percentual de ovos das caixas descartadas (%)		Data	Saldo (US\$)	Custos (US\$)			Total de ovos	Receita (US\$) com a venda dos ovos
	Até 48 dias <sup>3</sup>	Ciclo todo <sup>4</sup>			Alimento	Mão de obra	Total		
0 %	0,00	0,00	76	3,80	0,30	14,21	14,52	6372	18,42
10 %	3,61	0,90	76	3,93	0,29	14,12	14,41	6347	18,34
20 %	7,41	3,35	76	4,52	0,28	13,54	13,82	6347	18,34
30 %	12,78	11,44	83	5,17	0,29	13,97	14,26	6725	19,44
40 %	19,32	13,11	83	5,91	0,27	13,26	13,53	6725	19,44
50 %	30,44	22,73	83	6,64	0,26	12,54	12,79	6725	19,44
60 %	42,15	31,76	83	2,40	0,25	12,01	12,25	5070	14,65
70 %	55,41	43,02	83	1,35	0,23	11,24	11,47	4437	12,82

<sup>1</sup> Se refere ao descarte de todo o lote, ao final do ciclo de produção de acordo com o critério de máximo saldo, a data se refere aos dias do ciclo do percevejo. <sup>2</sup> Simulação de diferentes taxas de descarte das caixas de insetos menos produtivas, com base na produção de ovos acumulados da primeira semana de oviposição, aos 48 dias de ciclo do percevejo (Figura 1). <sup>3</sup> Corresponde os ovos produzidos na primeira semana de oviposição, até 48 dias do ciclo dos percevejos, parâmetro que usado como critério para o descarte das caixas menos produtivas. <sup>4</sup> Corresponde a total de ovos observados nas caixas a serem descartadas.

## Conclusão

O saldo resultante da diferença entre custos de manutenção da criação e receita obtida com a venda de ovos deve ser o principal critério para definir o momento adequado para o descarte de um lote de percevejos. No presente estudo indica-se descartar os adultos aos 76 dias de ciclo dos percevejos. Adicionalmente, o saldo final da criação pode ser melhorado pelo descarte das caixas menos produtivas ao final da primeira semana de oviposição, indicadas pela quantidade de ovos produzidos por caixa até esse momento, esse descarte pode ser de até 50% das caixas ou das caixas que representam até 22,73% da produção de ovos.

## Referências

- HAYASHIDA, R.; BUENO, A. de F.; HERMEL, A. O.; HIRAKURI, M. H.; SILVA, F. A. C.; ROGGIA, S. *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) fitness on artificial diets: an approach to optimize mass rearing of *Telenomus podisi* (Hymenoptera: Platygastridae) for augmentative biological control. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 4, p. 1605-1613, 2018.
- LOPES, S. R.; PAIXÃO, M. A. S. da; CRUZ, I. Viabilidade econômica de biofábrica de *Trichogramma pretiosum* para uso contra pragas agrícolas da ordem Lepidoptera. **Revista iPecege**, v. 4, n. 1, p. 44-50, 2018.
- MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Estágios ninfais fotossensíveis à indução de diapausa em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, p. 219-225, 2000.
- PANIZZI, A. R.; BUENO, A. de F.; SILVA, F. A. C. da. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MOSCARDI, F. (Eds.). **Soja: manejo integrado de pragas e outros artrópodes-pragas**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. cap. 5. p. 335-420.

# Otimização de ensaios de PCR Multiplex para a amplificação de alvos de interesse para o melhoramento genético da Soja

RODRIGUES, H. P.<sup>1</sup>; SILVA, D. C. G. da<sup>2</sup>; FERREIRA, E. G. C.<sup>2</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C. de<sup>3</sup>

<sup>1</sup>UEL, Londrina, PR, heloisapoliselorossi@gmail.com; <sup>2</sup>Embrapa Soja, Laboratório de Genética Molecular e Seleção Assistida; <sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

## Introdução

A seleção assistida por marcadores moleculares associados à resistência a doenças e herbicidas tem auxiliado programas de melhoramento de soja (*Glycine max* L.) na avaliação dos materiais com base em marcas genotípicas. Tais marcadores permitem a identificação de variações existentes entre gêneros, espécies e indivíduos, detectando alterações muito específicas nos segmentos de DNA. No início dos anos 1980, o uso de marcadores moleculares passou a integrar rotineiramente a análise do DNA das mais diversas espécies. Desde então, eles vêm sendo aperfeiçoados e evoluindo juntamente com os avanços nas técnicas biotecnológicas (Turchetto-Zolet et al., 2017).

A reação em cadeia da polimerase multiplex (mPCR) é uma variante da PCR na qual duas ou mais sequências alvo pode ser amplificadas, incluindo mais de um par de primers na mesma reação. Descrita pela primeira vez em 1988 (Chamberlain, 1988) a mPCR tem o potencial de produzir economias consideráveis de custo, tempo e trabalho em laboratório. A otimização da mPCR pode representar várias dificuldades, incluindo baixa sensibilidade e especificidade e/ou amplificação preferencial de certos alvos específicos, porém está se tornando um teste de triagem rápido e conveniente em laboratórios de pesquisa. O desenvolvimento de uma mPCR eficiente geralmente requer planejamento estratégico e várias tentativas para otimizar as condições da reação (Turchetto-Zolet et al., 2017). A mPCR traz vantagens para a seleção assistida por marcadores moleculares como maior rapidez na obtenção do resultado, assim como maior economia de reagentes, quando comparada a realização de uma PCR singleplex.

Em trabalhos de pesquisa realizados na Embrapa e outras instituições, 29 marcadores foram selecionados para detecção destes genes de resistência. Estes marcadores foram testados inicialmente em três genótipos de soja, para posteriormente serem testados em um painel maior. Neste trabalho, todos esses marcadores foram incorporados em um ensaio de PCR multiplex. Desta forma, o presente trabalho visa à padronização da amplificação em multiplex para os diferentes amplicons selecionados e desenvolvimento de index para ampliar o número de amostras capazes de serem sequenciadas via metodologia Next Generation Sequencing (NGS).

## Material e Métodos

As sementes de soja que foram utilizadas neste trabalho foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Soja e do acervo do Laboratório de Genética Molecular e Seleção Assistida (LGMSA) da Embrapa Soja, Londrina-PR. Tais sementes foram semeadas e as plantas resultantes, cultivadas em casa de vegetação. Amostras foliares foram coletadas após a expansão completa do primeiro trifólio, e foram submetidas a extração de DNA pelo método CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987), observadas quanto a integridade e quantificadas usando gel de agarose-Synergel 3% e Qubit® 2.0 Fluorometer - Thermo Fisher Scientific.

Com o auxílio dos programas Primers Express (Applied Biosystems) e Primer3Plus (Untergasser), foram desenhados primers para amplificação dos fragmentos de interesse, com base nos SNPs previamente identificados e mapeados (LGMSA). Tais primers foram desenhados de modo a conter adaptadores acoplados (Illumina). Foi também utilizada a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) para auxílio na verificação da sua especificidade. A qualidade, concentração de GC%, T<sub>M</sub>elting, comprimento, formação de dímeros e hairpins foram verificados utilizando o software Oligo Calculator, validando-os para uso in vitro. O software Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para analisar e comparar várias sequências de primers simultaneamente, relatando possíveis dímeros primários (homodímero e/ou heterodímero), formado por interações entre os primers sense e antisense, afim de combinar o maior número de primers na mesma PCR multiplex sem interações prejudiciais para o resultado e performance dos mesmos.

Primeiramente uma PCR singleplex foi conduzida com cada um dos pares de primers, para verificar sua performance individual. As condições de PCR são descritas na Tabela 1. Os produtos de DNA amplificado (amplicons) foram posteriormente analisados por eletroforese em agarose-Synergel 3%.

Para o planejamento da reação em PCR multiplex, foram feitos levantamentos de reações multiplex da literatura, para que fossem utilizadas como testes e serem otimizados conforme a necessidade. Como encontrou-se poucas publicações reportando otimizações de reações multiplex que não utilizassem Kits comerciais, então as três reações modelos foram retiradas de trabalhos que tinham como base gerar número maior de amplicons, ainda que usando apenas um par de primers. Foram usadas como modelos iniciais as reações descritas pra RAPD por Silveira et al. (2003), BOX AIR por Neiverth (2012) e ITS por Costamilan et al. (2008), reação utilizada internamente. Os testes de otimização, a partir dos protocolos escolhidos para teste, incluíram diferentes concentrações de primers, DNA, reagentes da PCR (Tabela 1), bem como diferentes temperaturas de anelamento, intervalo de tempo em cada etapa de um ciclo de amplificação e número de ciclos (Tabela 2).

**Tabela 1.** Descrição dos protocolos de reação em singleplex e multiplex testados, onde são apresentados os reagentes e sua concentração final em cada reação.

	Singleplex	Multiplex		
	Protocolo interno	Silveira et al. (2013)	Neiverth (2012)	Costamilan et al. (2008)
		Reação A	Reação B	Reação C
dNTPs (mM)	0,2	0,2	0,3	0,1
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,25	2	3	2,5
Tampão (X)	1	1	1	1
Primers (μM)	0,5	0,4	2	0,2
DNA (ng)	30	20	50	10
Taq High Fidelity (U)	0,2	0,9	0,7	0,4
Água	q.s.p. 50μ	q.s.p. 15μL	q.s.p. 25μL	q.s.p. 50μL

**Tabela 2.** Ciclagem recomendada em cada um dos protocolos testados.

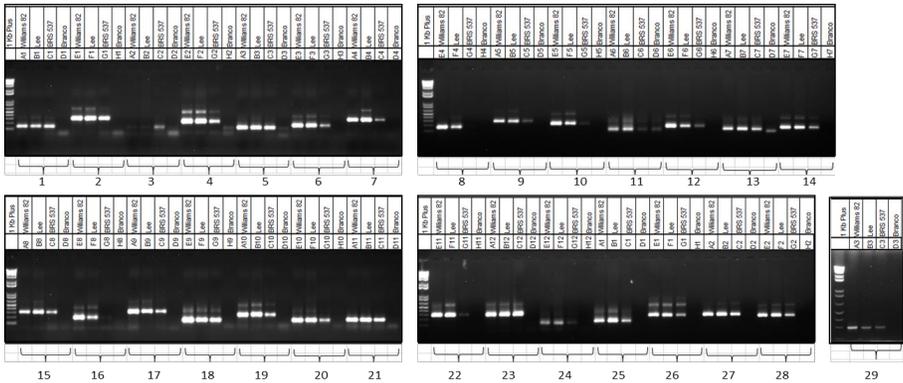
Singleplex (interno)			Neiverth (2012)			Silveira et al. (2003)			Costamilan et al. (2008)		
1x	94°C	5min	1x	95°C	7 min	1x	94°C	3 min	1x	95°C	5 min
	94°C	1min		94°C	1 min		94°C	1 min		94°C	1 min
35X	60°C	1min	30X	60°C	1 min	48X	55°C	1 min	35X	60°C	1 min
	72°C	1min		65°C	1 min		72°C	2 min		72°C	1 min
1x	72°C	7min	1X	65°C	16 min	1X	72°C	7 min	1X	72°C	7 min
	10°C	∞		10°C	∞		10°C	∞		10°C	∞

Inicialmente foram definidos conjuntos alternativos, por isso foi decidido que os primers seriam divididos em 3 grupos de ensaios multiplex menores, realizados em paralelo ao ensaio multiplex completo, com todos os 29 primers. A divisão dos três primeiros conjuntos ocorreu de forma que fosse facilmente detectadas as bandas de interesse no gel. Para isso, as bandas deveriam ter tamanhos diferentes. Os primers foram inseridos em um único tubo, conforme cada conjunto, para verificar sua compatibilidade em uma PCR multiplex.

Todas as amostras foram observadas em gel de agarose-Synergel 3%; as amostras (02, 04, 06, 08, 10, 12, 14, 16, 18 e 20) foram escolhidas para representar as reações, com produtos gerados pelos grupos de primers foram analisadas por eletroforese em microchip, no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent), o qual foi utilizado para a comparação das bandas e detecção dos picos.

## Resultados e Discussão

Os primers foram desenhados com tamanho médio de 25pb, com uma temperatura de *melting* entre 60°C e 65°C e concentração de GC acima de 40%. O número de bases complementares na análise de dímeros e hairpins entre os membros de uma mesmo par manteve-se abaixo de 5 bases. Os testes e validação dos 29 primers em singleplex, foram baseados na análise dos amplicons por eletroforese em agarose-Synergel 3% com todas as amostras, onde foi possível detectar as bandas esperadas para todos os alvos (Figura 1).

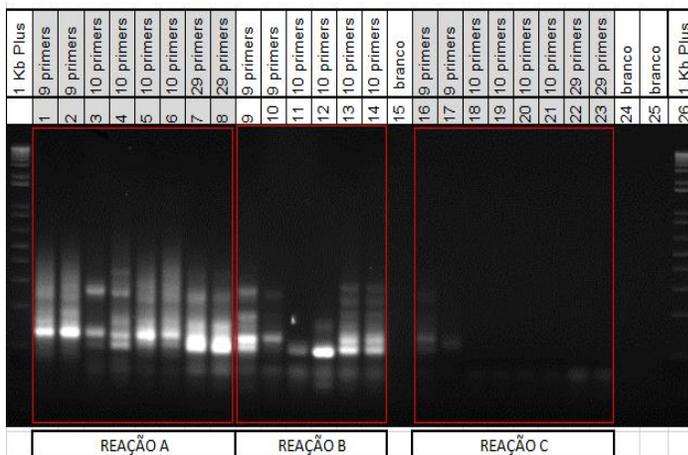


**Figura 1.** Produtos de amplificação da PI 543857 (Williams 82), Lee, BRS537 e branco, para os 29 primers testados, foram testados individualmente em reação singleplex, com protocolo de reação interna. Os fragmentos foram separados por eletroforese em agarose-Synergel a 3% para a visualização do DNA corado com brometo de etídio. Da esquerda para a direita de cada gel: Ladder de 1Kb (Invitrogen).

Na análise em multiplex, foi possível observar que a Reação A (Silveira et al., 2003) apresentou o maior número de bandas, as quais eram do tamanho esperado (100 a 400pb), em segundo lugar a reação B e em terceiro a reação C, cujos produtos, se presentes, não puderam ser detectados no gel de agarose-Synergel 3%. Correlacionamos esse resultado com o fato de a reação A ter o maior número de ciclos de amplificação, maior quantidade proporcional de enzima e menor quantidade de DNA molde. Fatores como número de ciclos e temperatura devem ser bem ajustados pois segundo Henegariu et al. (1997) quando muitos alvos são amplificados simultaneamente, os locais amplificados com mais eficiência influenciarão negativamente no rendimento do produto dos alvos menos eficientes. Isso se deve ao fato de a PCR ter um suprimento limitado de enzimas e nucleotídeos e todos esses alvos competirem pelo mesmo conjunto de reagentes. Além disso, excesso de DNA pode ser negativo para as amplificações, pois pode levar ao consumo elevado dos componentes de reação nos primeiros ciclos de amplificação, levando à escassez dos mesmos nos ciclos mais avançados. As Reações B (Neiverth, 2012) e C (Costamilan et al., 2008) apresentavam número de ciclos de amplificação consideravelmente menor, além da quantidade menor de enzima e quantidade maior de DNA.

Ao comparar grupos com diferentes números de primers em amplificações de mPCR, os grupos com menor número de alvos na mesma reação (9 e 10 pri-

mers) produziram melhores resultados em relação a multiplexação dos 29 primers. Dificuldades em individualizar os 29 alvos em uma range de 300pb no multiplex completo já eram esperadas, bem como a própria incapacidade de amplificação de alguns deles em multiplex devida à formação de pequenos dímeros de primers e eventuais amplificações inespecíficas. As bandas esperadas na faixa entre 100-400pb, estavam presentes na Reação A; Reação B e C não apresentaram todos os produtos/bandas esperados.



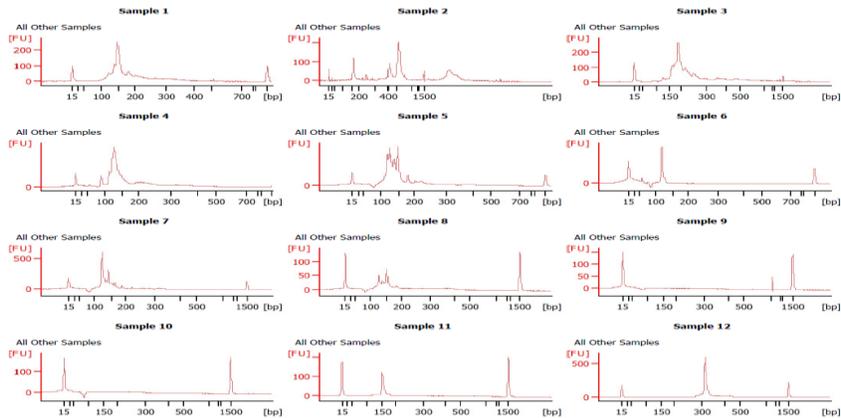
**Figura 2.** Produtos de amplificação da PI 543857, 4 grupos de primers (multiplex) em duplicata por reação testada. Os fragmentos foram separados por eletroforese em agarose-Synergel a 3% para a visualização do DNA corado com brometo de etídio. Da esquerda para a direita: Ladder de 1Kb (Invitrogen); Pistas 1 a 8: Reação A (Silveira et al., 2003): pistas 1-2: grupo 01 (09 primers); pistas 3-4: grupo 02 (10 primers); pistas 5-6: : grupo 03 (10 primers); pistas 7-8: : grupo 04 (29 primers). Pistas 9 a 14: Reação B (Neiverth, 2012) pistas 9-10 grupo 01 (09 primers); pistas 11-12: grupo 02 (10 primers); pistas 13-14: grupo 03 (10 primers). Pistas 15: Branco. Pistas 16 a 23: Reação C (Costamilan et al., 2008): Pistas 16-17: grupo 01 (09 primers); pistas 18-19: grupo 02 (10 primers); pistas 20-21: grupo 03 (10 primers); e pistas 22-23: grupo 04 (29 primers).

De acordo com Elnifro et al. (2000), aumentos da concentração de reagentes como dNTPs, tampão e enzima podem contribuir para o aumento da probabilidade de anelamentos inespecíficos dos primers com posterior produção de produtos de amplificação indesejáveis, que futuramente são eliminados nas etapas de clean up.

Para as análises no bioanalyzer doze amostras de produto de multiplex e singleplex, sendo dez amostras selecionadas com o intuito de representar todas

as reações testes e grupos de primers, já que as mesmas se encontravam em duplicata no gel (Fig.2) e duas amostras singleplex com alvos anteriormente validados (Sample 11= 150pb e Sample 12= 360pb). A Reação A (Silveira et al., 2003, Figura 3, Samples de 1–4), corroborando com os resultados do Synergel 3% (Figura 3), apresentou gráficos típicos de uma amostra com boa integridade e picos esperados, uma vez que a maior parte dos fragmentos se encontravam dentro da faixa de tamanho esperada (100 a 400pb). A Reação B (Neiverth, 2012, Fig.3, Samples 5–7) apresentou picos que não correspondiam aos amplicons esperados. A Reação C (Costamilan et al., 2008, Figura 3, Samples de 8–10), também corroborando com os resultados do Synergel 3% (Fig.2), não foi capaz de amplificar os produtos esperados (Figura 3).

Estudos anteriores relataram o uso do bioanalyzer para dimensionar os fragmentos de DNA com o intuito de auxiliar na otimização da precisão e reprodutibilidade dos produtos de multiplex. Nachamkin et al. (2001) analisando o gene flagelina de *Campylobacter jejuni*, encontrou problemas na resolução de fragmentos que diferiam em 8 a 20 pb ao utilizar o Bioanalyzer, em comparação com gel de agarose. Em contraste, Lu et al. (2002) estudaram mutações no DNA mitocondrial humano e descobriram que o Bioanalyzer apresentava melhor reprodutibilidade do que o método convencional de gel de agarose.



**Figura 3.** Eletroferograma das amostras de DNA, Multiplex (samples 1 – 10) e singleplex (samples 11 e 12). Os picos demonstram a fluorescência do marcador e os produtos dos primers. Samples de 1 – 4 correspondem as amostras escolhidas da Reação A. Samples 5 – 7 correspondem as amostras escolhidas da Reação B. Samples de 8 – 10, correspondem a Reação C. Samples 11 e 12 foram utilizadas como padrão de confiabilidade, já que se esperava amplificação dos primers em PCR singleplex na faixa de 150 e 400pb, respectivamente. FU indica a fluorescência por segundos.

No presente estudo, demonstramos que o bioanalyzer foi uma ferramenta útil para obter a faixa de tamanho esperado para nossos alvos, na Reação A, comprovando os resultados do Synergel 3% (Fig.1) apresentou gráficos tipo de uma amostra com boa integridade e picos esperados, uma vez que dependendo do grupo de primers, a variação de um alvo para o outro não passa de 5 pb. No entanto, na impossibilidade de usar este método, que exige alto investimento e custo elevado de consumíveis, o gel de agarose pode ser utilizado, já que os resultados de um corroboram os resultados do outro.

## Conclusão

Em conclusão, o ensaio mPCR desenvolvido provou ser um método sensível e confiável para a detecção simultânea de diferentes alvos de interesse para o programa de melhoramento genético, associados à resistência a doenças e herbicidas. Os iniciadores específicos para mPCR foram projetados e selecionados adequadamente com base na obtenção de produtos previstos do tamanho calculado. O método de mPCR escolhido detectou com sucesso os alvos simultaneamente usando uma única reação de PCR. A mPCR será útil em conjunto com outras ferramentas biotecnológicas para obter materiais com os alvos de resistência testados. À medida que os novos marcadores forem desenvolvidos, eles podem ser testados e adicionados a esse método e painel.

## Referências

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 11141-11156, 1988. DOI: 10.1093/nar/16.23.11141.

COSTAMILAN, L. M.; YORINORI, J. T.; ALMEIDA, A. M. R.; SEIXAS, C. D. S.; BINNECK, E.; ARAÚJO, M. R.; CARBONARI, J. A. First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* infecting soybean plants in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 5, p. 381-385, 2008.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

ELNIFRO, E. M.; ASHSHI, A. M.; COOPER, R. J.; KLAPPER, P. E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 559-570, 2000. DOI: 10.1128/CMR.13.4.559.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997. DOI:10.2144/97233rr01.

LU, C.-Y.; TSO, D.-J.; YANG, T.; JONG, Y.-J.; WEI, Y.-H. Detection of DNA mutations associated with mitochondrial diseases by Agilent 2100 bioanalyzer. **Clinica Chimica Acta**, v. 318, p. 97-105, 2002.

NACHAMKIN, I.; PANARO, N. J.; LI, M.; UNG, H.; YUEN, P. K.; KRICKA, L. J.; WILDING, P. Agilent 2100 bioanalyzer for restriction fragment length polymorphism analysis of the *Campylobacter jejuni* flagellin gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 754-757, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.2.754-757.2001.

NEIVERTH, W. **Diversidade morfológica e genética de rizobactérias endofíticas obtidas de solos de diferentes classes e manejos de cultivo**. 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, Marechal Cândido Rondon.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. de F.; SERA, T.; CARVALHO, V. de P.; COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 329-336, 2003. DOI:10.1590/S1415-47572003000300018.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C. M.; PASSAIA, G. (Org.). **Marcadores moleculares na era genômica: metodologias e aplicações**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p. Disponível em: [sbg.org.br/sites/default/files/e\\_book\\_marcadores\\_moleculares\\_sbg\\_2017\\_final.pdf](http://sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf). Acesso em: 30 jun. 2020.

# Processo de criação de identidade visual para eventos da Embrapa Soja

SONCELA, B.<sup>1</sup>; DALL'AGNOL, V. F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário Filadélfia - Unifil, Londrina, PR, beatriz.soncela@colaborador.embrapa.br, <sup>2</sup>Analista, Embrapa Soja, Núcleo de Comunicação Organizacional.

## Introdução

O design é uma atividade criativa de fundamental importância no cotidiano das empresas que buscam interação efetiva com seus diversos públicos. A Identidade visual é um conjunto de características comuns, constantes e exclusivas da empresa, que visa transmitir unidade e coerência (Embrapa, 2002). Em um evento empresarial, torna-se essencial criar esses padrões visuais sólidos por envolver áreas de alto fluxo de informações e mensagens. É por meio desta identidade visual que o público-alvo irá reconhecer determinada marca e criar relações de identificação, informação e instrução. Conhecer a história, os valores, a missão e a atuação de uma empresa são elementos que compõem todo seu panorama e devem influenciar diretamente na concepção de uma identidade visual. Faz-se necessário questionar como o design pode contribuir para a construção da identidade corporativa (Como..., 2018). É notório que cada empresa possui uma série de procedimentos, restrições e diferenciais. O padrão a ser estabelecido orientará quanto ao uso de elementos de identidade visual em conjunto com a marca Embrapa. O design apresentado para eventos não é somente uma composição gráfica, mas o reflexo da imagem que a empresa quer levar para seus consumidores e para todo o público.

Löbach (2001) afirma que “todo processo de design é tanto um processo criativo, como um processo de solução de problemas e incorpora características que possam satisfazer as necessidades humanas de forma duradoura, podendo-se desenvolver de maneira extremamente complexa, dependendo da magnitude do problema. Há quatro fases distintas: análise do problema, geração de alternativas, avaliação das alternativas e realização da solução do problema”.

Dessa forma, é possível perceber que a metodologia é essencial para a construção de projetos. Cada designer, ao conhecer um produto ou serviço, deve

analisar as variáveis envolvidas e aplicá-las às etapas que se adaptam ao seu projeto (Marques, 2009).

Serviços e/ou produtos devem ter uma boa gestão de marca para garantir o reconhecimento e a transmissão de seus valores ao público de forma eficaz. A marca é, de forma geral, a representação gráfica de um desenho, logotipo ou imagem, a qual agregamos valor, através de experiências vivenciadas ao longo do tempo. A identidade visual de eventos deve ser elaborada com cautela e profundidade para que se torne uma aliada da empresa em comunicar sua atuação, seus produtos e serviços em concomitância com questões inerentes a sua marca.

## Avaliação do logo da Reunião de Pesquisa de Soja

Para este estudo, analisou-se o logo da Reunião de Pesquisa de Soja (RPS), um dos mais relevantes e duradouros eventos realizados pela Embrapa Soja. Sua periodicidade é anual (com exceção dos anos em que ocorre o Congresso Brasileiro de Soja - CBSoja) e reúne um número elevado de participantes, provenientes de todo o território nacional.

Em sua primeira edição, ainda na década de 70, já se notou a necessidade de criação de uma marca para identificá-la como evento único, porém não havia registro disso e, por vezes, a identificação assumia formatos diferentes. O mapa do Brasil se equiparava a uma marca e era aplicado a algumas peças do evento (Figura 1).



**Figura 1.** Marcas da Reunião de Pesquisa de Soja utilizadas em diferentes edições, sem um padrão visual definido.

Ao longo dos anos, ampliou-se sua atuação, objetivos e metas. A comunicação do evento se aprimorou, contando com uma marca definitiva, mas ainda não havia uniformidade em toda sua comunicação visual. O mapa do Brasil com uma soja ao centro foi usado em 12 edições, de 2003 a 2017, na intenção de identificar o evento de forma mais efetiva (Figura 2).



**Figura 2.** Marca da Reunião de Pesquisa de Soja utilizada nas edições de 2003 a 2017, com destaque para o mapa do Brasil.

## Soluções para a melhoria do logo

O objeto que possui uma identidade visual fraca é pouco notado pela sua aparência, ou então ela é tão corriqueira, que não a memorizamos e nos esquecemos com facilidade. Já uma identidade visual forte leva nossa atenção ao objeto e, principalmente, faz com que nos lembremos dele quando o virmos de novo – ou seja, dá maior pregnância ao objeto (Peón, 2003).

Nessa perspectiva, a antiga marca usada não acompanhou o crescimento e a modernização naturais em eventos desse porte. Em 2010, aproveitou-se as mudanças técnicas e de formatação do evento, para também refinar a marca e a identidade visual. Eliminou-se a sombra esfumada e os gradientes ficaram mais discretos na intenção de deixá-la mais próxima do novo formato do evento (Figura 3). No entanto, somente a partir da edição de 2014, quando o evento passou a ser organizado inteiramente pela Embrapa Soja, inclusive tendo seu nome reduzido, foi pensado em todo o conjunto visual, com a criação de uma identidade única para as diversas peças de comunicação (publicação, folder, site, materiais de apoio e sinalização).



**Figura 3.** Proposta de logo da Reunião de Pesquisa de Soja utilizada nas edições de 2010 a 2014.

Em 2019, houve uma nova releitura e a marca da RPS sofreu mudanças mais drásticas para melhor se adaptar às várias aplicações em que é exposta. Toda a identidade visual do evento foi redesenhada. A marca ganhou forma, cores e aplicações mais simplificadas e objetivas, com a eliminação do mapa, dos gradientes e dos algarismos romanos.

As etapas deste processo foram definidas de acordo com as necessidades de projeto, conduzindo passo-a-passo as atividades em busca de um resultado impactante. A identificação clara dos componentes envolvidos no evento, tais como: conteúdo, público-alvo, objetivos, metodologias, atividades, adequação de linguagem, repertório interpretativo e comunicação visual (cores, tipologia, formas etc.), são pontos cruciais que devem ser levados em consideração nessa etapa do desenvolvimento da nova Identidade Visual. Isto é, deve-se procurar conhecer cada parte do todo, separadamente. Depois de colher os dados, é preciso analisar e julgar o que se deve ou não fazer, usar ou aproveitar para estabelecer o passo seguinte, o da criação. Durante o desenvolvimento do projeto agrega-se valores diferenciais e o desenho final é, então, uma síntese de todos dados colhidos e analisados criteriosamente (Figura 4).



**Figura 4.** Novo logo da Reunião de Pesquisa de Soja para a edição de 2019.

Depois de aprovado, inicia-se a fase de desenvolvimento do manual de identidade visual, que é um documento técnico que reúne recomendações, especificações e normas para a correta aplicação da nova marca, procurando garantir que o que foi planejado e desenvolvido não sofra interferências indesejadas em suas propriedades visuais e que possam comprometer sua legibilidade, reconhecimento e aceitação (Marques, 2009).

Este estudo teve o intuito de aprimorar o sistema de identidade visual para a Reunião de Pesquisa de Soja, podendo ser piloto para outros eventos da Unidade. Uma vez definida a marca, é ela quem deve guiar toda criação das peças referentes à comunicação do evento, facilitando a identificação e gerando seu reconhecimento imediato. Uma marca bem definida, traçada com critérios agregará valor e passará sentimentos de segurança e confiança para o cliente que a usa (Souza, 2016). Buscou-se estudar os conceitos e metodologias que envolvem gestão de marca e gestão do design, além de ferramentas que pudessem contribuir para soluções estratégicas, o que possibilitou traçar um projeto estruturado para as futuras edições, com ideias claras e concretas para a aplicação correta da marca em suas diversas plataformas.

## Conclusão

Considerando que a comunicação consiste em um processo contínuo, torna-se inevitável a revisão de suas práticas e ferramentas. No caso da comunicação visual, deve-se avaliar periodicamente a adequação da marca às mu-

danças que venham a surgir motivadas pela concorrência, comportamentos, posicionamentos ou mesmo eventuais falhas não previstas anteriormente. Cabe ao designer, em consonância com a empresa, inseri-la constantemente em novas perspectivas, de modo a não a tornar obsoleta e a atender as expectativas visuais e sensoriais do público a que se destina.

## Referências

COMO é criada uma identidade visual corporativa? **Portal Terra**, 9 maio 2018. Disponível em: <https://www.terra.com.br/noticias/dino/como-e-criada-uma-identidade-visual-corporativa,c57d4214a485a5526212b804acbbf59ch7c71cov.html>. Acesso em: 4 jun. 2020.

EMBRAPA. Assessoria de Comunicação Social. **Política de comunicação**. 2. ed. rev. ampl. Brasília, DF, 2002. 99 p.

LÖBACH, B. **Desenho industrial**: bases para configuração dos produtos industriais. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. 208 p.

MARQUES, E. B. **Desenvolvimento de uma nova marca e identidade visual para a empresa Cetric**. 2009. 78 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Design Gráfico) - Universidade do Oeste de Santa Catarina, Xanxerê.

PEÓN, M. L. **Sistemas de identidade visual**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora 2AB, 2003. 76 p.

SOUZA, L. de P. e. **Desenvolvimento da identidade visual da marca Design do Bem**. 2016. 146 f. Projeto de Conclusão de Curso (Design) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

# Variabilidade espacial do índice de vegetação da soja na safra 2018/2019 em propriedades agrícolas no norte e noroeste do Paraná

JUSTUS, W. P.<sup>1</sup>; WALDRICH, G. A. T.<sup>1</sup>; SANTOS, E.L. dos<sup>2</sup>; FURLANETTO, R. H.<sup>3</sup>; NUNES, E. da S.<sup>3</sup>; ALMEIDA, L. F. A.<sup>4</sup>; DEBIASI, H.<sup>5</sup>; BALBINOT JUNIOR, A. A.<sup>5</sup>; FRANCHINI, J.C.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>UNOPAR, Bolsista PIBIC/CNPq, Araçongas, PR, willian\_justus@hotmail.com; <sup>2</sup>Centro Universitário FAG, Cascavel, PR; <sup>3</sup>COCAMAR, Maringá, PR; <sup>4</sup>UEM, Maringá, PR, <sup>5</sup>Pesquisador, Embrapa Soja.

## Introdução

Monitorar a variação espacial e temporal das culturas para melhor aplicação das práticas agrícolas e aproveitamento dos insumos, é uma das premissas da agricultura de precisão, que busca com isso possibilitar o aumento da produtividade e reduzir os custos de produção e os impactos ambientais (Jorge; Inamasu, 2014). O monitoramento de áreas agrícolas pode ser realizado por meio de veículos aéreos não tripulados (VANTS), popularmente conhecidos como drones, e permite a obtenção de imagens aéreas de grandes áreas com baixo custo, com maior frequência e com alta resolução (Franchini et al., 2018).

O monitoramento da cultura da soja por imagens durante a safra pode antecipar seu comportamento produtivo. Além disso as imagens permitem identificar regiões com maior ou menor potencial produtivo permitindo o diagnóstico de fatores limitantes por comparação de fatores entre regiões. Os drones, por voarem a baixas altitudes, permitem a obtenção de imagens com maior resolução e em momentos onde a cobertura de nuvens interfere na qualidade e disponibilidade das imagens obtidas por sensores embarcados em plataformas orbitais (satélites). O índice de vegetação mais conhecido e utilizado, o NDVI  $[(\text{infravermelho próximo} - \text{vermelho}) / (\text{infravermelho próximo} + \text{vermelho})]$ , é obtido a partir da relação da refletância das bandas do vermelho e infravermelho próximo e demanda o uso de sensores multiespectrais, que são mais caros. Drones do tipo multirrotor são de fácil manuseio, tem autonomia de voo para cobertura de áreas com tamanho médio em torno de 50 ha e carregam sensores de alta resolução, com bandas na região do visível (azul, verde e vermelho). A refletância na região do visível é menor do que a

observada na região do infravermelho o que reduz a amplitude da escala dos índices obtidos, no entanto ainda existe boa relação com a produtividade da soja (Franchini et al., 2018). Neste contexto este trabalho teve como objetivo avaliar um índice de vegetação da região do visível, obtido em talhões de propriedades agrícolas nas regiões norte central, norte pioneiro e noroeste do Paraná, como ferramenta para a estimativa da variabilidade espacial do potencial produtivo da cultura da soja.

## Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido durante a safra 2018/2019, em 23 talhões de propriedades agrícolas, com diferentes históricos de manejo do sistema de produção, com o predomínio da produção de soja no verão e milho 2ª safra exclusivo ou em consórcio com braquiária e trigo, localizadas nas regiões noroeste, norte central e norte pioneiro do Paraná (Tabela 1). Em cada talhão foi realizado um voo para tomada de imagens quando a soja estava entre os estádios reprodutivos R3 e R4 (Figura 1). As imagens aéreas foram obtidas com um VANT multirrotor do tipo quadricóptero (Phantom 4 Pro®) com câmera com sensor RGB (bandas vermelho, verde e azul). O plano de voo foi previamente definido no aplicativo Pix4D® capture (PIX4D, 2020), na altitude de 120 m e 75% de sobreposição longitudinal e 55% lateral. Com estes parâmetros a resolução de pixel ficou entre 4 cm e 5 cm. As imagens foram processadas por meio do software Agisoft Metashape v. 1.5.5 (Agisoft, c2020), gerando ao final o ortomosaico. No programa Qgis (2020) foi calculado o índice MPRI (Modified Photochemical Reflectance Index) proposto por Yang et al. (2008). O índice é baseado na diferença normalizada entre as bandas verde e vermelha, segundo a expressão:  $MPRI = (G - R) / (G + R)$

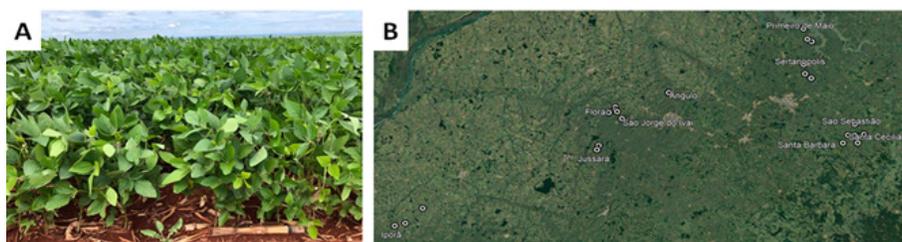
A seguir os valores obtidos foram divididos em três classes levando-se em consideração a média e o desvio padrão da seguinte forma: a classe de índice baixo correspondeu a média menos um desvio padrão; a classe de índice alto correspondeu a média mais um desvio padrão e a classe de índice médio correspondeu ao intervalo entre as classes baixo e alto. A partir da definição dos limites, foram calculados os valores percentuais de cada classe (Tabela 1).

**Tabela 1.** Município, área, data da obtenção da imagem e valor percentual das classes do índice de vegetação (MPRI) de 23 talhões de produção localizados nas regiões noroeste e norte central e norte pioneiro do Paraná.

	Município	Região	Área (ha)	Data da imagem	MPRI (%)		
					Baixo	Médio	Alto
1	Iporã_1	Noroeste	10	06/12/2018	12	23	65
2	Iporã_2	Noroeste	81	06/12/2018	16	32	52
3	Cafezal do Sul	Noroeste	37	06/12/2018	13	35	52
4	Jussara_1	Noroeste	79	04/12/2018	14	21	65
5	Jussara_2	Noroeste	7	29/11/2018	10	25	65
6	São Jorge do Ivaí	Norte Central	35	04/12/2018	10	30	60
7	Ângulo	Norte Central	61	30/11/2018	11	23	66
8	Floraí_1	Norte Central	36	30/11/2018	17	25	58
9	Floraí_2	Norte Central	46	30/11/2018	14	37	49
10	Floraí_3	Norte Central	78	30/11/2018	13	42	45
11	Floraí_4	Norte Central	11	30/11/2018	14	27	59
12	Sertanópolis_1	Norte Central	16	27/12/2018	14	18	68
13	Sertanópolis_2	Norte Central	17	27/12/2018	11	26	63
14	Sertanópolis_3	Norte Central	23	28/12/2018	10	29	61
15	Primeiro de Maio_1	Norte Central	53	27/12/2018	13	21	66
16	Primeiro de Maio_2	Norte Central	22	27/12/2018	14	19	67
17	Primeiro de Maio_3	Norte Central	13	27/12/2018	17	29	54

Continua...

	Município	Região	Área (ha)	Data da imagem	MPRI (%)		
					Baixo	Médio	Alto
19	Santa Barbara_2	Norte Pioneiro	46	17/12/2018	16	37	47
20	Santa Cecilia_1	Norte Pioneiro	21	17/12/2018	14	32	54
21	Santa Cecilia_2	Norte Pioneiro	29	17/12/2018	18	27	55
22	São Antônio do Paraíso	Norte Pioneiro	24	17/12/2018	15	30	55
23	São Sebastião da Amoreira	Norte Pioneiro	22	19/12/2018	14	37	49
	Média				14	28	58



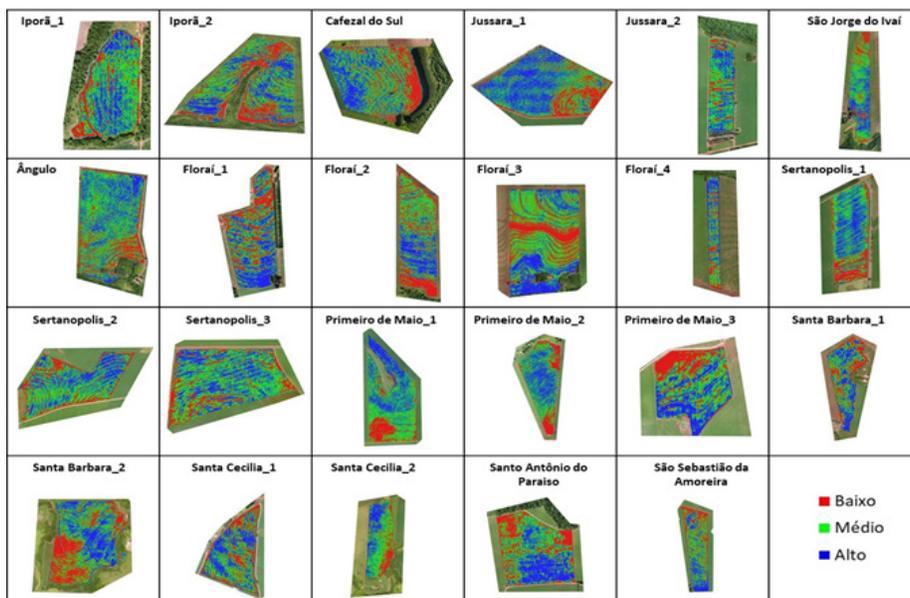
**Figura 1.** Estádio de desenvolvimento típico da soja no momento da obtenção das imagens (A). Localização aproximada das propriedades avaliadas (B).

## Resultados e Discussão

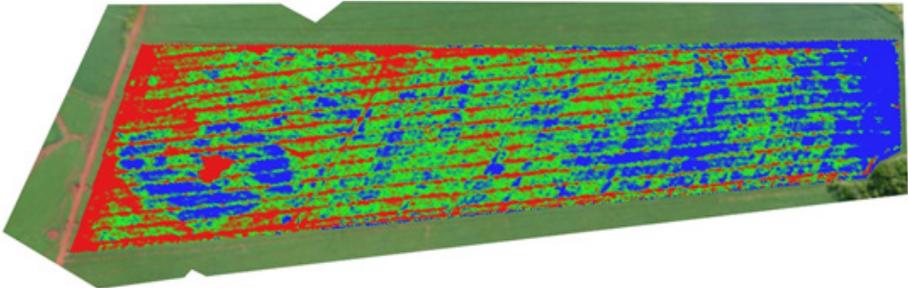
O índice MPRI demonstrou claramente que existe uma variabilidade bastante significativa em todos os talhões avaliados (Tabela 1 e Figura 2). Esta informação é importante porque chama a atenção para a necessidade da mudança na percepção que temos atualmente de que o manejo dos talhões de produção pode ser feito de forma homogênea. O percentual médio das classes do MPRI indicou que a cultura da soja apresentou índice vegetativo predominantemente alto e médio em todos os talhões (Tabela 1). Isso demonstra que, de forma geral, o manejo da cultura poderia ser considerado satisfatório. No entanto, em média, 14% da área dos talhões apresentou baixo MPRI, variando de um mínimo de 10% e um máximo de 18% (Tabela 1). As regiões com

baixo MPRI, seriam aquelas que prioritariamente deveriam receber especial atenção dos produtores, pois potencialmente seriam as que estariam causando perdas mais significativas de produtividade e rentabilidade.

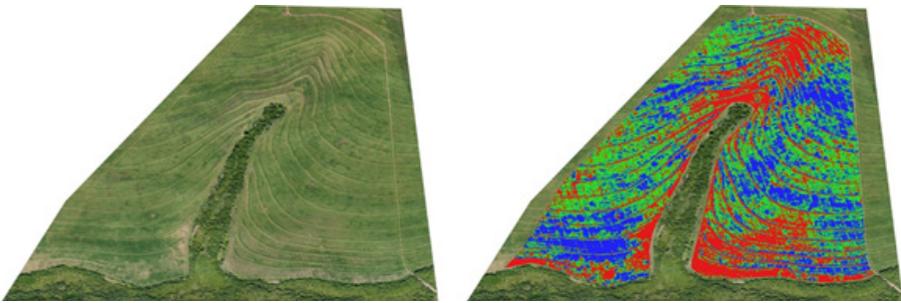
Em geral as regiões com baixo MPRI foram associadas com a presença de características como: rastros do pulverizador, crista e canal dos terraços e falhas operacionais, conforme pode ser observado nos exemplos das Figura 3, 4 e 5, respectivamente. Também foi possível observar regiões bem definidas com classes de MPRI alto, médio e baixo dentro dos talhões (Figura 2). Em alguns casos, a formação de regiões com diferentes classes de MPRI foi associada a posição no relevo (Figuras 5 e 6). A formação de regiões homogêneas com diferentes classes de MPRI é particularmente interessante para o processo de diagnóstico das possíveis causas da variabilidade e se constitui em uma das grandes vantagens do uso das imagens aéreas. A coleta de amostras de solo para análises químicas, físicas ou biológicas, por exemplo, nas diferentes regiões, pode auxiliar a identificar a origem do problema nas regiões com menor índice vegetativo.



**Figura 2.** Variabilidade espacial do índice de vegetação (MPRI) de 23 talhões de produção localizados nas regiões noroeste, norte central e norte pioneiro do Paraná.



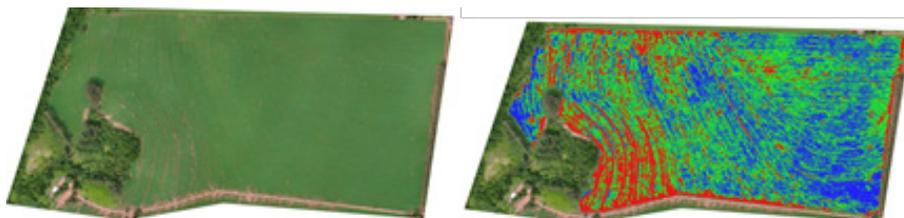
**Figura 3.** Imagem aérea do índice MPRI obtidas no talhão São Sebastião da Amoreira. Imagem mostra regiões de índice MPRI baixo e médio associados ao amassamento da cultura provocado pelos pneus do pulverizador.



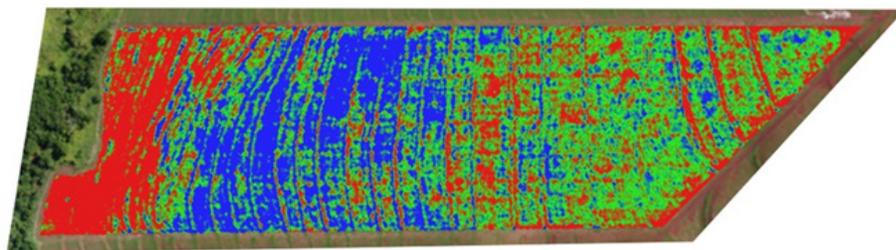
**Figura 4.** Imagens aéreas RGB (à esquerda) e MPRI (à direita) obtidas no talhão Iporã\_2. Imagem mostra regiões de índice MPRI baixo associado ao terraço.

A identificação de falhas operacionais, como falhas no plantio, falhas na germinação ou falhas na aplicação de defensivos também são importantes para melhorar a eficiência das operações e diminuir as perdas que poderiam ser controláveis. O amassamento pelo tráfego do pulverizador é inevitável, porém deve ser restrito ao mínimo necessário. Em média para passadas espaçadas 28 metros seria esperado uma perda por amassamento de aproximadamente 4%. O valor mínimo de 10% para a classe de MPRI baixo sugere que estão ocorrendo perdas associadas a outros fatores que, teoricamente poderiam ser controladas. Na pior das hipóteses, se os fatores envolvidos na alteração do índice vegetativo, não puderem ser manejados, como uma diferença na textura, por exemplo, o manejo para o local pode ser modificado, usando o conceito de zonas de manejo sitio específico. A partir do diagnóstico seria possível realizar operações a taxa variável de insumos, incluindo sementes, fertilizantes e defensivos, utilizando os conceitos da agricultura de precisão.

O índice vegetativo da cultura da soja, contribuiu para o entendimento de que os talhões de produção têm regiões com diferente potencial produtivo que pode ser mais bem manejado por meio de um processo dirigido de diagnóstico e intervenção, para que a máxima produtividade e rentabilidade seja atingida.



**Figura 5.** Imagens aéreas RGB (à esquerda) e MPRI (à direita) obtidas no talhão Ângulo. Imagem mostra que o predomínio da classe de MPRI baixo estava associado com o terço inferior do talhão e a falhas de plantio.



**Figura 6.** Imagens aéreas do índice MPRI obtida no talhão Florai\_2. Imagem mostra o predomínio da classe de MPRI alto no terço médio do talhão.

## Conclusão

A utilização de imagens aéreas para a obtenção de índices vegetativos da cultura da soja permitiu identificar a variabilidade intrínseca de talhões de produção e tem grande potencial para dirigir o processo de diagnóstico e intervenção dos fatores limitantes à produtividade e otimização do uso de insumos.

## Referências

AGISOFT. **Agisoft Metashape software 1.5.5**. c2020. Disponível em: <<https://www.agisoft.com/downloads/installer/>>. Acesso em: 30 jun. 2020.

FRANCHINI, J. C.; BALBINOT JUNIOR, A. A.; JORGE, L. A. de C.; DEBIASI, H.; DIAS, W. P.; GODOY, C. V.; OLIVEIRA JUNIOR, A. de; CORREA, F. B.; OLIVEIRA, M. C. N. de. **Uso de imagens aéreas obtidas com drones em sistemas de produção de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2018. 39 p. (Embrapa Soja. Documentos, 408).

JORGE, L. A. de C.; INAMASU, R. Y. Uso de veículos aéreos não tripulados (VANT) em agricultura de precisão. In: BERNARDI, A. C. de C.; NAIME, J. de M.; RESENDE, A. V. de; BASSOI, L. H.; INAMASU, R. Y. (Eds.). **Agricultura de precisão: resultados de um novo olhar**. Brasília, DF: Embrapa, 2014. p. 109-134.

PIX4D. **PIX4D capture software**. 2020. Disponível em: <https://www.pix4d.com/product/pix4dcapture>. Acesso em: 30 jun. 2020.

QGIS. **Geographic information system**. Open Source Geospatial Foundation Project, 2020. Disponível em: <http://qgis.org>. Acesso em: 30 jun. 2020.

YANG, Z.; WILLIS, P.; MUELLER, R. Impact of band-ratio enhanced AWIFS image to crop classification accuracy. In: PECORA 17., 2008, Denver. **The future of land imaging: going operational**. Proceedings... [S. l.: s. n.], 2008. p. 18-20. Disponível em: <https://www.asprs.org/a/publications/proceedings/pecora17/0041.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2020.

# Volumes de calda no tratamento industrial sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja armazenadas em diferentes períodos e ambientes

CARVALHO, B. L.<sup>1</sup>; ABATI, J.<sup>2</sup>; HENNING, A. A.<sup>3</sup>; FRANÇA-NETO, J. B.<sup>3</sup>; KRZYZANOWSKI, F. C.<sup>3</sup>; HENNING, F. A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Agronomia, Faculdade Pitágoras, Londrina, PR; <sup>2</sup>Departamento de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual de Maringá, Campus Regional de Umuarama, Umuarama, PR; <sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Soja, Londrina, PR.

## Introdução

Com o avanço tecnológico da agricultura, as empresas produtoras de sementes vêm adotando técnicas para maximizar o rendimento da cultura e seus processos, como o tratamento industrial de sementes (TIS), no qual as sementes são tratadas na própria linha de beneficiamento (Brzezinski et al., 2017).

Há uma gama de produtos disponíveis que podem ser utilizados no tratamento industrial das sementes, tais como fungicidas, inseticidas, nematocidas, bioestimulantes, micronutrientes, inoculantes, polímeros, entre outros (Brzezinski et al., 2015). Entretanto, em algumas situações, alguns princípios ativos ou interações entre produtos podem acarretar diminuição da qualidade fisiológica, e conseqüentemente do estabelecimento de plântulas em decorrência de fitotoxicidade nas sementes (Taylor; Salanenka, 2012; Alves et al., 2017). Além disso, pouco se sabe sobre a relação de volume de calda aplicado e suas conseqüências na conservação do potencial fisiológico ao longo do armazenamento, uma vez que este processo normalmente utiliza produtos líquidos.

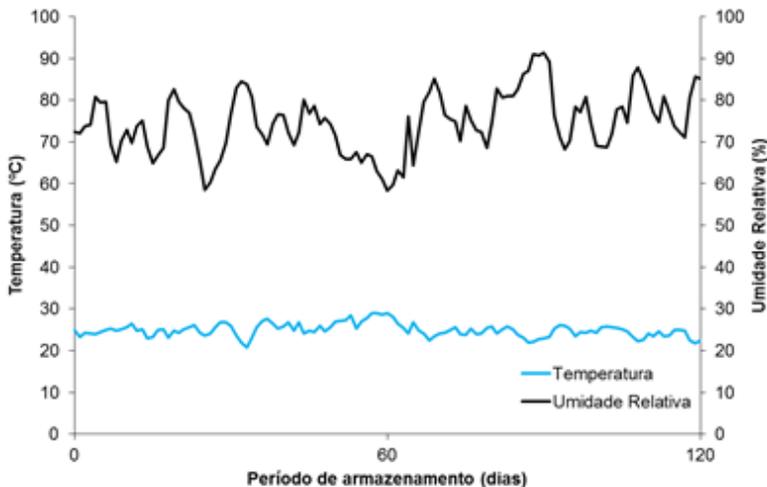
Ainda, atualmente, com a crescente demanda pelo tratamento industrial, muitas empresas produtoras de sementes têm trabalhado de forma intensa em um curto período que antecede a semeadura. Para isso, são necessários resultados que forneçam indicativos de melhor volume de calda, período e ambiente de armazenamento, para planejar melhor esta etapa da produção, além da possibilidade de redução de custos (Pereira et al., 2018).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de volumes de calda, obtidos pela combinação de diferentes produtos químicos, via tratamento industrial, sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja ao longo do armazenamento em diferentes ambientes.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Núcleo Tecnológico de Sementes e Grãos, da Embrapa Soja, Londrina, PR, nos Laboratórios de Fisiologia e Tecnologia de Sementes, com a cultivar de soja BRS 359 RR.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3, com quatro repetições. Os fatores foram constituídos por cinco volumes de calda utilizados no tratamento industrial de sementes (0, 600, 1200, 1800 e 2400 mL 100 kg<sup>-1</sup> de sementes), obtidos a partir da combinação de diferentes produtos utilizados comercialmente, e três períodos de armazenamento (0, 60 e 120 dias), avaliados separadamente em dois ambientes (armazém não controlado e câmara fria). Durante o experimento foram monitoradas a temperatura e a umidade relativa (UR) do ar no ambiente não controlado, com equipamento Data Logger modelo HT-500 (Figura 1). Em câmara fria, a temperatura e a UR foram programadas e mantidas em 10 °C e 50%, respectivamente.



**Figura 1.** Média diária da temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) durante o período de armazenamento de sementes de soja em ambiente não controlado.

Para a obtenção dos diferentes volumes de calda, determinou-se inicialmente o volume máximo a ser utilizado e, a partir desse, foram obtidos os demais volumes através da redução nas doses de bioestimulante, polímero, inoculante e micronutriente (Tabela 1). Os produtos utilizados foram: F: fungicidas (carbendazim + thiram); I: inseticidas (imidacloprido + tiodicarbe); N: nematocida (abamectina); M: micronutrientes (cobalto, molibdênio e zinco); P: polímero (peridiam); B: bioestimulante (cinetina + ácido giberélico, como GA3 + ácido 4-indol-3-ilbutírico) e IN: inoculante (*Bradyrhizobium japonicum*).

**Tabela 1.** Produtos utilizados no tratamento de sementes de soja e respectivas doses, para obtenção de diferentes volumes de calda. Fungicida (F), inseticida (I), nematocida (N), micronutriente (M), polímero (P), bioestimulante (B) e inoculante (IN).

Tratamentos	F	I	N	M	P	B	IN	Total
	Dose mL 100 kg <sup>-1</sup>							
1	-	-	-	-	-	-	-	0
2	200	300	100	-	-	-	-	600
3	200	300	100	400	200	-	-	1200
4	200	300	100	400	200	600	-	1800
5	200	300	100	400	200	800	400	2400

O tratamento das sementes foi realizado com auxílio de uma máquina modelo BMC (Batch Modular Coater), similar às utilizadas no tratamento industrial de sementes, porém projetada para menores quantidades de sementes. Após o tratamento industrial e os períodos de armazenamento em cada ambiente, foi determinada a qualidade fisiológica das sementes por meio das seguintes avaliações:

- **Germinação:** realizado com duas subamostras de 50 sementes por repetição, totalizando 400 sementes por tratamento. As sementes foram distribuídas em rolos de papel germitest, umedecidos com água destilada, na quantidade de 2,5 vezes a massa seca do substrato. Após a montagem, os rolos foram acondicionados em germinador sob temperatura de 25 °C, pelo período de oito dias, quando se contabilizou a porcentagem das plântulas normais (Brasil, 2009).
- **Emergência de plântulas em areia:** realizada com 400 sementes por tratamento, divididas em subamostras de 100 sementes para cada repetição. A semeadura foi realizada em bandejas plásticas contendo areia,

na qual as sementes foram dispostas a uma profundidade de três centímetros. O teste foi conduzido em condições de casa de vegetação e a umidade mantida com irrigações, de acordo com a necessidade das plântulas. A avaliação final do número de plântulas normais emergidas foi realizada ao décimo segundo dia e, os resultados foram expressos em porcentagem.

- **Índice de velocidade de emergência de plântulas:** realizado em conjunto com o teste de emergência de plântulas em areia. As avaliações foram realizadas diariamente, a partir do início da emergência, registrando-se o número de plântulas emergidas até o décimo segundo dia após a semeadura. Para o cálculo do índice de velocidade de emergência (IVE) utilizou-se a equação sugerida por Maguire (1962):  $IVE = N1/D1 + N2/D2 + Nn/Dn$ , onde N1= número de plântulas emergidas no primeiro dia; Nn= número acumulado de plântulas emergidas; D1= primeiro dia de contagem; Dn= número de dias contados após a semeadura.

Os dados obtidos foram analisados quanto à normalidade e homocedasticidade, utilizando-se os testes de Shapiro-Wilk e de Hartley, respectivamente, os quais indicaram a não necessidade de transformação. Foi realizada análise de variância e, as médias para períodos de armazenamento e volume de calda foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, separadamente para cada ambiente de armazenamento. As análises foram executadas por meio do programa computacional Sistema para Análise de Variância – SISVAR (Ferreira, 2011).

## Resultados e Discussão

Em todas as variáveis analisadas verificou-se interação entre os fatores estudados, em ambos os ambientes de armazenamento. Em ambiente de câmara fria não houve redução nos valores de germinação até 60 dias, exceto para o maior volume de calda (Tabela 2). Decorridos 120 dias, não ocorreu diferença significativa apenas para a testemunha e para o volume 1800 mL 100 kg<sup>-1</sup> de sementes.

**Tabela 2.** Germinação de sementes de soja da cultivar BRS 359 RR em função de diferentes ambientes e períodos de armazenamento e volumes de calda utilizados no tratamento industrial de sementes.

<b>Câmara fria</b>			
<b>Volume de calda (mL)</b>	<b>Período de armazenamento (dias)</b>		
	<b>0</b>	<b>60</b>	<b>120</b>
0	89 Aa	87 Aa	80 Aa
600	72 Ab	80 Aa	59 Bb
1200	72 Ab	66 ABb	58 Bb
1800	62 Abc	54 Ac	54 Abc
2400	60 Ac	47 Bc	45 Bc
CV (%)		9,45	
<b>Armazém não controlado</b>			
0	89 Aa	91 Aa	53 Ba
600	72 Ab	70 Ab	21 Bb
1200	57 Acd	60 Ab	11 Bbc
1800	62 Abc	45 Bc	8 Cc
2400	48 Ad	30 Bd	1 Cc
CV (%)		11,43	

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

Ainda, no ambiente câmara fria, nas comparações entre os volumes de calda, dentro de cada período de armazenamento, para todos os períodos a testemunha obteve resultados de germinação superior (Tabela 2). Observou-se que o número de plântulas normais reduziu de acordo com o aumento do volume de calda e ao longo do armazenamento. De maneira geral, este mesmo comportamento é observado para o índice de velocidade de emergência (Tabela 3) e para a emergência de plântulas em areia (Tabela 4).

**Tabela 3.** Índice de velocidade de emergência de plântulas de soja da cultivar BRS 359 RR em função de diferentes períodos de armazenamento e volumes de calda utilizados no tratamento industrial de sementes.

Câmara fria			
Volume de calda (mL)	Período de armazenamento (dias)		
	0	60	120
0	25,50 Aa	26,82 Aa	19,13 Bab
600	25,00 Aa	20,08 Bb	19,64 Ba
1200	19,75 Ab	16,95 Bc	15,29 Bc
1800	19,75 Ab	16,10 Bc	16,72 Bbc
2400	19,25 Ab	14,62 Bc	14,74 Bc
CV (%)		6,84	
Armazém não controlado			
0	25,61 Aa	26,71 Aa	12,23 Ba
600	22,78 Ab	21,74 Ab	4,75 Bb
1200	20,03 Acd	17,32 Bc	3,81 Cb
1800	22,01 Abc	17,56 Bc	3,18 Cb
2400	18,64 Ad	9,51 Bd	3,37 Cb
CV (%)		8,79	

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

**Tabela 4.** Emergência de plântulas de soja em areia da cultivar BRS 359 RR em função de diferentes períodos de armazenamento e volumes de calda utilizados no tratamento industrial de sementes.

Câmara fria			
Volume de calda (mL)	Período de armazenamento (dias)		
	0	60	120
0	96 Aa	92 Aa	94 Aab
600	96 Aa	83 Bb	95 Aa
1200	94 Aab	78 Cb	84 Bcd
1800	88 Ab	72 Bc	88 Abc
2400	89 Ab	72 Cc	80 Bd
CV (%)		3,64	

Continua...

**Tabela 4.** Continuação.

Câmara fria			
Volume de calda (mL)	Período de armazenamento (dias)		
	0	60	120
Armazém não controlado			
0	96 Aa	91 Aa	68 Ba
600	95 Aa	85 Bab	33 Cb
1200	92 Aab	79 Bb	28 Cbc
1800	90 Aab	81 Bb	23 Cc
2400	84 Ab	52 Bc	20 Cc
CV (%)		5,87	

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

Brzezinski et al. (2015), ao testar a antecipação do tratamento químico industrial de sementes de soja com as principais marcas comerciais utilizadas isoladamente e em combinações de fungicidas, inseticidas e nematicidas, concluíram que o tratamento de sementes de soja antecipado, em 240 dias antes da semeadura, prejudica o estabelecimento da cultura, a massa de mil sementes e a produtividade de grãos, em relação ao tratamento em pré-semeadura. Além disso, os autores evidenciaram que os tratamentos químicos testados contendo fungicidas e inseticidas associados favorecem o estabelecimento da cultura, porém não alteram o desempenho produtivo da soja, quando utilizados em pré-semeadura que vem ao encontro do objetivo básico do tratamento químico, que é conferir proteção às sementes e plântulas.

No ambiente não controlado, a germinação variou no decorrer do período de armazenamento e entre os volumes de calda; na testemunha a germinação reduziu significativamente aos 120 dias, entretanto, para as sementes tratadas à medida que aumentava o volume de calda, a redução se intensificou, com redução significativa da germinação já aos 60 dias nos maiores volumes de calda (Tabela 2). Em geral, comportamento similar à germinação ocorreu nas variáveis índice de velocidade de emergência (Tabela 3) e emergência de plântulas em areia (Tabela 4).

Neste trabalho, no ambiente não controlado ocorreram oscilações da temperatura, com mínimas de 21 °C e máximas de aproximadamente 30 °C, com temperatura média ao longo do período de armazenamento de 25 °C; e umidade relativa do ar entre 58% a 91%, com média de 75% (Figura 1), justificando a maior redução da qualidade fisiológica das sementes em armazém com ambiente não controlado, principalmente nos maiores volumes de calda, em relação à câmara fria.

Desta forma, para a cultivar BRS 359 RR, independentemente do volume de calda do tratamento industrial de sementes de soja, há perda de qualidade com o armazenamento, principalmente após 60 dias. Porém, com o aumento do volume de calda, há uma tendência de prejudicar ainda mais o potencial fisiológico. De modo geral, no ambiente não controlado, a maior temperatura e variações na umidade relativa do ar intensificam o processo de perda da qualidade. Estes resultados sugerem que os investimentos em armazenagem com controle de temperatura e umidade relativa do ar e ajustes no volume de calda podem potencializar o período de armazenamento, amenizando os danos à qualidade fisiológica dos lotes de sementes.

## Conclusão

A qualidade fisiológica de sementes de soja, de maneira geral, é reduzida com o aumento do volume de calda utilizado no tratamento industrial e com o prolongamento do período de armazenamento, contudo, esse efeito é mitigado pelo armazenamento em condições controladas de câmara fria.

## Referências

ALVES, E.; AGUIAR, E.; PEREIRA, C.; MOREIRA, I.; FILHO, L.; SANTINI, J. M. K. Efeito do tratamento químico com inseticida/fungicida e polímero na qualidade fisiológica da semente de soja. **Cientific@. Multidisciplinary Journal**, v. 4, n. 1, p. 12-18, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 395 p. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/2946\\_regras\\_analise\\_sementes.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/2946_regras_analise_sementes.pdf). Acesso em: 30 jun. 2020.

BRZEZINSKI, C. R.; ABATI, J.; HENNING, F. A.; HENNING, A. A.; FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; ZUCARELI, C. Spray volumes in the industrial treatment on the physiological quality of soybean seeds with different levels of vigor. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 2, p. 174-181, 2017.

BRZEZINSKI, C. R.; HENNING, A. A.; ABATI, J.; HENNING, F. A.; FRANÇA-NETO, J. de B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; ZUCARELI, C. Seeds treatment times in the establishment and yield performance of soybean crops. **Journal of Seed Science**, v. 37, n. 2, p. 147-153, 2015.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, p. 176-177, 1962.

PEREIRA, L. C.; MATERA, T. C.; BRACCINI, A. L.; PEREIRA, R. C.; MARTELI, D. C. V.; SUZUKAWA, A. K.; PIANA, S. C.; FERRI, G. C.; CORREIA, L. V. Addition of biostimulant to the industrial treatment of soybean seeds: physiological quality and yield after storage. **Journal of Seed Science**, v. 40, n. 4, p. 442-449, 2018.

TAYLOR, A. G.; SALANENKA, Y. A. Seed treatments: phytotoxicity amelioration and tracer uptake. **Seed Science Research**, v. 22, n. 1, p. 86-90, 2012.

# Otimização de um método de extração de DNA de sementes de soja não destrutivo

AVELINO, B. B.<sup>1</sup>; FERREIRA, E. G. C.<sup>1</sup>; da SILVA, D. C. G.<sup>2</sup>; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, brunabavelino@gmail.com; <sup>2</sup>Embrapa Soja, Laboratório de Biotecnologia Vegetal; <sup>3</sup>Pesquisadora, Embrapa Soja.

## Introdução

O melhoramento de plantas é considerado a ciência e a arte que engloba um conjunto de técnicas, métodos, estratégias e/ou os recursos, com o intuito de modificar geneticamente as plantas, incorporado algum processo para torná-las mais úteis ao homem, com o objetivo de obter genótipos superiores, em relação com o ambiente em que esta espécie será cultivada (Chaves, 2001). Embora o melhoramento genético seja efetivo, é relativamente demorado, por serem necessários vários ciclos de recombinações, avaliações e seleções. Nesse sentido a utilização de marcadores moleculares surgiu como uma grande contribuição, sendo possível selecionar genótipos ou genes específicos e associados a eles. O emprego dos marcadores de DNA na seleção possui como vantagens a ausência de efeito ambiental, abundância e alto polimorfismo nos genomas, além de estarem relacionados a características herdáveis (Ferreira, Grattapaglia, 1998). Uma das mais importantes etapas nas análises genéticas quando se utilizam fragmentos de DNA, é o isolamento e a purificação do DNA em quantidades suficientes e com boa qualidade. Para isso, a utilização de um protocolo de extração otimizado é de extrema importância (Chaves, 2001; Faleiro, 2011).

O objetivo do presente estudo foi padronizar um método de extração de DNA a partir de lascas de semente de soja, com o intuito de otimizar um protocolo rápido, de baixo custo, eficiente e não destrutivo, para ser utilizado na seleção assistida por marcadores do tipo SNPs ligados à resistência à ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e ao cancro da haste (*Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*), duas importantes doenças da cultura da soja, contribuindo assim para os programas de melhoramento genético da soja.

## Material e Métodos

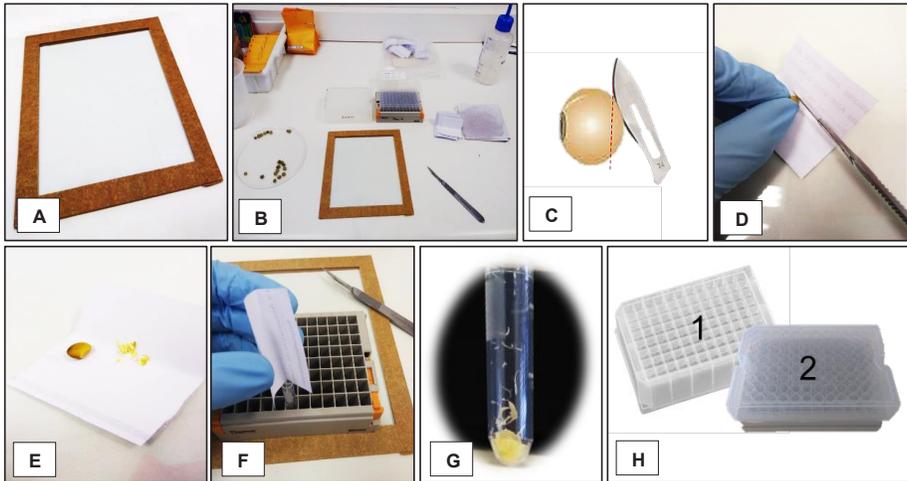
Os materiais vegetais utilizados foram obtidos da coleção do Laboratório de Genética Molecular e Seleção Assistida (LGMSA) da Embrapa Soja. Foram selecionadas duas populações  $F_{2,3}$  diferentes e segregantes, para a resistência à ferrugem asiática e ao cancro da haste, o qual foram extraídas lascas para extração de DNA e posterior qPCR, além de avaliar a viabilidade destas sementes após o período de um mês e três meses de armazenamento em câmara fria. As sementes utilizadas eram compostas de nove famílias  $F_{2,3}$  para cada doença, sendo os tratamentos constituídos por cinco sementes cortadas e cinco sementes não cortadas (controle), de cada família no tubete, já no teste de germinação foram utilizadas apenas cinco sementes cortadas de cada família (Tabela 1).

**Tabela 1.** Tratamentos utilizados no experimento em tubete e no teste de germinação, para extração de DNA e verificação da viabilidade de armazenamento das sementes após serem tiradas as lascas.

DOENÇA E PÉRIODO DE AVALIAÇÃO	SEMENTES UTILIZADAS	TUBETE		TESTE DE GERMINAÇÃO
		Cortadas	Sem Cortar	Cortadas
Ferrugem e Cancro da haste	9 famílias $F_{2,3}$ com sementes $F_3$ de cada doença	5 sementes de cada família	5 sementes de cada família	5 sementes de cada família
Quantidade de sementes	18 famílias $F_{2,3}$ com sementes $F_3$	45 sementes	45 sementes	45 sementes
Ferrugem e Cancro da haste	9 famílias $F_{2,3}$ com sementes $F_3$ de cada doença	5 sementes de cada família	5 sementes de cada família	5 sementes de cada família
Quantidade de sementes	18 famílias $F_{2,3}$ com sementes $F_3$	45 sementes	45 sementes	45 sementes
TOTAL	---	180 sementes		90 sementes

O experimento no terceiro mês foi conduzido com as mesmas famílias e os mesmos tratamentos referentes ao primeiro mês, totalizando 180 sementes avaliadas em tubete e 90 sementes no teste de germinação em ambos os períodos de armazenamento, as quais foram distribuídas nos tratamentos descritos na Tabela 1. Foram realizados cortes de espessura fina, na parte posterior ao hilo da semente. A quantidade de lascas foi baseada na quantidade

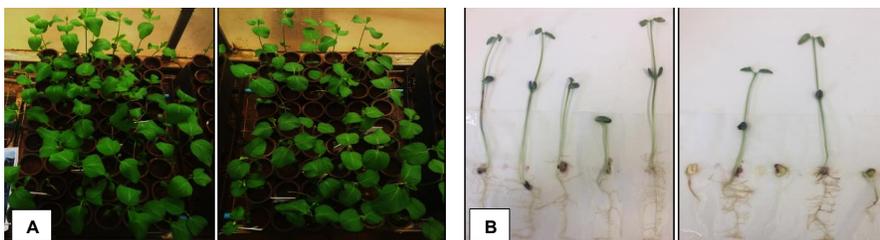
utilizada na extração de DNA e padronizada para 10 cortes bem finos (Figura 1). Foram utilizados tubos individuais sem tampa para adicionar as lascas, os quais eram depositados em racks de 96 poços (Matrix, termo Scientific), e em seguida vedados com plástico filme e mantidos em câmara fria durante os tempos descritos na Tabela 1.



**Figura 1.** Corte de lascas das sementes para extração de DNA, onde: (A) placa de vidro para apoiar as sementes e retirar as lascas, (B) disposição dos materiais na bancada, (C e D) posição onde era realizado o corte na semente (parte posterior ao hilo), (E) quantidade aproximada de lascas retiradas por semente, (F) transferência das lascas ao tubo individual, (G) quantidade de lascas retiradas da semente no tubo de extração de DNA, (H) a placa número 1 é aquela onde a semente era adicionada após ser cortada e a placa número 2 é aquela onde eram depositadas as lascas da semente para realizar a extração de DNA.

As lascas de sementes foram liofilizadas e utilizadas para a extração de DNA com dois métodos rápidos e simples: SAM-R Semente (Brummer et al., 2013) e Quick Extract Seed (Illumina). Realizou-se reação de qPCR com os detectores SNP 295 e SNP 359 (ferrugem) e Rdm GBS 219, Rdm GBS 734 (cancro da haste) para os dois métodos de extração. As reações de qPCR foram conduzidas em equipamento Applied Biosystems 7900HT Fast conforme fabricante, em placas de 384 wells, ajustando o volume final de 5  $\mu$ L, sendo usado os extratos diluídos a 1/25. Os parâmetros de ciclagem foram os recomendados pelo fabricante. O gráfico de discriminação alélica foi gerado pelo software TaqMan® Genotyper. Para o Rdm GBS 734 foi necessário fazer diluir as amostras de DNA para 1/100 e adicionar 20 ciclos para melhoria na discriminação alélica.

Os testes de germinação em tubete e em papel de germinação, foram realizados em dois períodos, após 1 e 3 meses de armazenamento das sementes. Cinco sementes cortadas e cinco sementes sem cortar por família foram semeadas em tubete, adicionando uma semente por tubete, colocando a semente sobre o substrato previamente esterilizado, e cobrindo com areia esterilizada. A avaliação foi realizada 14 dias após a semeadura, verificando a presença ou ausência de plântulas. Já no teste de germinação, foram utilizadas três camadas de papel de germinação, com as cinco sementes sem cortar por família, distribuídas no meio e umedecidos com água na proporção de 2X o peso do substrato seco em mL de água. A Figura 2 exemplifica como ficaram os testes após o período para avaliação, tanto em tubetes como no papel de germinação.



**Figura 2.** Ensaio de germinação das sementes após a retirada das lascas. As sementes foram armazenadas por 1 e 3 meses, sendo a germinação avaliada em solo com semeadura (A) em tubetes e (B) papel de germinação.

Os rolos de papel de germinação com as sementes foram colocados em um béquer de plástico e cobertos com um saco plástico e mantidos em câmara de crescimento a 25°C, com fotoperíodo de 12h. A avaliação da germinação foi realizada após 7 dias do início do teste. Em ambos os casos a água era fornecida de acordo com a necessidade.

## Resultados e Discussão

Em ambos os métodos de extração foi obtido DNA com qualidade e quantidade suficientes para as genotipagens via qPCR empregando metodologia TaqMan. Na Tabela 2 estão apresentados os resultados do qPCR comparando os dois métodos de extração testados quando do emprego dos SNPs para seleção dos genes de resistência a ferrugem. Para o detector SNP 295, ao comparar os métodos SAM-R Semente e Quick Extract, algumas amostras

apresentaram resultados divergentes, sendo essas amostras identificadas como “16x-1717.F2.P3.26, 16x-1717.F2.P6.38 e 16x-1717.F2.P5.24”.

**Tabela 2.** Resultado de detecção por qPCR de amostras obtidas de DNA extraído de lascas de semente para os detectores de ferrugem. Os dados foram exportados do software TaqMan® Genotyper. “POS/POS” são amostras resistentes, “NEG/POS e POS/NEG” são heterozigotos e “NEG/NEG” são materiais suscetíveis, “---” não possui o resultado para aquele método de extração, “N/A” não foi possível identificar e avaliar, “UND” são amostras indeterminadas e “NOAMP” são aquelas que não amplificaram. Os locais que estão em verde são onde as avaliações estão concordantes, em vermelho onde estão divergentes e em amarelo as que estão sem avaliação para aquele método de extração.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA Ferrugem	SNP 295		SNP 359		SNP 251	
	SAM-R Semente	Quick Extract	SAM-R Semente	Quick Extract	SAM-R Semente	Quick Extract
16x-1717.F2.P1.2	NEG/POS	NEG/POS	NEG/POS	NEG/POS	POS/NEG	---
16x-1717.F2.P1.41	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	---
16x-1717.F2.P2.48	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	---
16x-1717.F2.P3.26	POS/POS	NEG/POS	POS/POS	NEG/POS	POS/POS	---
16x-1717.F2.P5.22	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	---
16x-1717.F2.P5.24	NEG/POS	NEG/NEG	NEG/POS	NEG/NEG	POS/NEG	---
16x-1717.F2.P5.30	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	---
16x-1717.F2.P5.41	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	---
16x-1717.F2.P6.38	POS/POS	NEG/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	---
E16-1125.1 (PI 594756)	POS/POS	NOAMP	POS/POS	NOAMP	POS/POS	---
E16-1125.1 (PI 594756)	POS/POS	NOAMP	POS/POS	NOAMP	POS/POS	---
E16-1125.1 (PI 594756)	POS/POS	NOAMP	POS/POS	NOAMP	POS/POS	---
E16-1127.1 (PI 594891)	NEG/NEG	NOAMP	NEG/NEG	NOAMP	NEG/NEG	---
E16-1127.1 (PI 594891)	NEG/NEG	NOAMP	NEG/NEG	NOAMP	NEG/NEG	---
E16-1127.1 (PI 594891)	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	---
Branco	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	---
CBE1	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	---
CBE2	NOAMP	POS/POS	NOAMP	NEG/NEG	NOAMP	---

Além disto, três controles resistentes “E16-1125.1 (PI 594756)” extraídos pelo método Quick Extract, bem como dois controles suscetíveis “E16-1127.1 (PI 594891)” não amplificaram. Outro aspecto importante é o fato de um dos controles brancos de extração “CBE2” ter amplificado, o que não deveria ter ocorrido. O mesmo ocorreu para o detector SNP 359 com as seguintes amostras “16x-1717.F2.P3.26, 16x-1717.F2.P5.24”, três controles resistentes “E16-1125.1 (PI 594756)”, dois controles suscetíveis “E16-1127.1 (PI 594891)” e o “CBE2”. Para o detector SNP 251, o qual foi utilizado apenas o método de extração de DNA SAM-R Semente, não houve nenhuma incongruência tanto para as amostras, como para os controles. No caso do emprego dos SNPs para seleção dos genes de resistência ao cancro da haste (Tabela 3), para o marcador Rdm GBS 219 o método SAM-R permitiu detectar todos os SNPs conforme o esperado em todas as amostras avaliadas, enquanto com o método Quick Extract Seed (Illumina) foram observadas 2 incongruências, (amostras “16x-17.23.F2:3.169” e “16x-1723.F2:3.179”), duas amostras ficaram indeterminadas (“16x-17.23.F2:3.152” e “16x-17.23.F2:3.164”), um dos controles resistentes “Crockett” não foi identificado, e ainda o “CBE2” teve amplificação. Para o Rdm GBS 734, inicialmente não foi possível fazer a discriminação e separar os materiais mesmo após uma nova diluição e ciclagens adicionais na PCR. Devido a esses problemas na genotipagem nos diferentes métodos avaliados, gerando clusters sobrepostos no plot de amplificação, sugere-se uma falha no desenho do próprio marcador.

**Tabela 3.** Resultado de detecção por qPCR de amostras obtidas de DNA extraído de lascas de semente para os detectores de cancro da haste. Os dados foram exportados do software TaqMan® Genotyper. “POS/POS” são amostras resistentes, “NEG/POS e POS/NEG” são heterozigotos e “NEG/NEG” são materiais suscetíveis, “---” não possui o resultado para aquele método de extração, “N/A” não foi possível identificar e avaliar, “UND” são amostras indeterminadas e “NOAMP” são aquelas que não amplificaram. Os locais que estão em verde são onde as avaliações estão concordantes, em vermelho onde estão divergentes.

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA Cancro da haste	Rdm GBS 219		Rdm GBS 734		Repetição do Rdm GBS 734 DNA 1:100 SAM-R Semente					
	SAM-R Semente	Quick Extract	SAM-R Semente	Quick Extract	Ciclagem normal	1 ciclagem	2 ciclagem	3 ciclagem	4 ciclagem	
16x-1723.F2:3.152	POS/POS	UND	NEG/NEG	NEG/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	
16x-1723.F2:3.161	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	UND	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	
16x-1723.F2:3.164	NEG/POS	UND	NEG/NEG	UND	UND	UND	UND	UND	UND	
16x-1723.F2:3.169	POS/POS	NEG/POS	NEG/NEG	UND	UND	UND	UND	UND	UND	
16x-1723.F2:3.179	POS/POS	NEG/NEG	NEG/NEG	UND	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	POS/POS	
16x-1723.F2:3.181	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	UND	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	
16x-1723.F2:3.209	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	UND	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	
16x-1723.F2:3.212	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	UND	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	
16x-1723.F2:3.221	NEG/NEG	NEG/NEG	UND	UND	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	NEG/NEG	
Crockett	POS/POS	POS/POS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Crockett	POS/POS	POS/POS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Crockett	POS/POS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BR 23	NEG/NEG	NEG/NEG	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BR 23	NEG/NEG	NEG/NEG	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
BR 23	NEG/NEG	NEG/NEG	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
Branco	NOAMP	NOAMP	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
CBE1	NOAMP	NOAMP	NEG/POS	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	
CBE2	NOAMP	NEG/NEG	UND	POS/POS	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	NOAMP	

Maia et al. (2013) desenvolveram um protocolo de extração de DNA para soja de baixo custo, com qualidade e quantidade suficientes e adaptado para larga escala, sendo utilizados discos foliares, logo com a necessidade do plantio do material a ser avaliado. Já Brumer et al. (2013) desenvolveram um protocolo de extração de DNA, denominado "SAM", com baixo custo e para emprego em larga escala, utilizando sementes inteiras moídas para a aplicação no programa de melhoramento de soja da Embrapa. Os resultados foram promissores, no entanto, baseia-se num processo destrutivo da semente. Neste trabalho foi possível validar o método de extração SAM-R Semente utilizando lascas de sementes (método não destrutivo) para emprego na genotipagem em larga escala via qPCR, sendo mais assertivo na genotipagem das amostras, tanto para marcadores ligados a resistência a ferrugem quanto ao cancro da haste, quando comparado ao Quick Extract Seed (Illumina).

Ao avaliar a emergência e a germinação das sementes após um e três meses, foi observada uma redução na quantidade de plântulas viáveis após o armazenamento em ambos os testes de germinação, em tubetes e em papel de germinação, no entanto esta não foi apenas associada aos cortes realizados, uma vez que em ambas as sementes, cortadas e não cortadas, a redução foi observada. Esta redução foi vista como uma perda "natural", não tendo o fator corte como influenciador. Ao avaliar a germinação das sementes cortadas no período de um mês, observou-se que a porcentagem de sementes cortadas que germinaram ficou na média de 77% no papel de germinação e 81% no tubete, comparado a 85,5% nas sementes sem corte avaliadas em tubete. Este é um resultado importante e favorável, pois mesmo após a semente sofrer o dano, a maior parte continuou viável e em percentuais similares as sementes sem corte. Após o período de 3 meses, houve uma redução brusca, de cerca de 22%, observada apenas no teste em papel de germinação. Na germinação em tubete, mesmo após 3 meses os percentuais de germinação diferiram em apenas 7,5% entre as sementes cortadas (77%) e sem cortar (84,5%).

**Tabela 4.** Resultado da emergência de plântulas em tubetes a partir de sementes cortadas e não cortadas após o período de um e três meses de armazenamento em câmara fria.

DOENÇA E PERÍODO DE AVALIAÇÃO	DADOS	TUBETE						TESTE DE GERMINAÇÃO	
		Cortadas		Sem Cortar		Cortadas		Germinaram	Não Germinaram
		Germinaram	Não Germinaram	Germinaram	Não Germinaram	Germinaram	Não Germinaram		
Ferrugem 1 mês	Nº de Plantas	33	12	40	5	35	10		
	Porcentagem	73%	27%	89%	11%	78%	22%		
Cancro da haste 1 mês	Nº de Plantas	40	5	37	8	34	11		
	Porcentagem	89%	11%	82%	18%	76%	24%		
Médias	Nº de Plantas	36,5	8,5	38,5	6,5	34,5	10,5		
	Porcentagem	<b>81%</b>	19%	<b>85,5%</b>	14,5%	<b>77%</b>	23%		
Ferrugem 3 meses	Nº de Plantas	30	15	37	8	26	19		
	Porcentagem	67%	33%	82%	18%	58%	42%		
Cancro da haste 3 meses	Nº de Plantas	39	6	39	6	23	22		
	Porcentagem	87%	13%	87%	13%	51%	49%		
Médias	Nº de Plantas	69	10,5	38	7	24,5	20,5		
	Porcentagem	<b>77%</b>	23%	<b>84,5%</b>	15,5%	<b>54,5%</b>	45,5%		

## Conclusão

Considerando todos os aspectos abordados, este trabalho foi capaz de validar o método de extração SAM-R Semente para a análise de lascas de sementes de soja, com sucesso na genotipagem utilizando marcadores SNP via metodologia TaqMan por qPCR. Adicionalmente, o método empregado demonstrou ser um método não destrutivo, garantindo que as sementes avaliadas pudessem ainda ser utilizadas para o plantio, mesmo após armazenamento por período mínimo de um mês, permitindo um significativo ganho de tempo nos processos de seleção assistida para introgressão de caracteres de interesse, como a resistência a doenças.

## Referências

- BRUMER, B. B.; MAIA, M. S.; DALCIN, M. B.; KUWAHARA, M. K.; NOVAES, R. M. L.; SILVA, D. C. G.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ABDELNOOR, R. V. Otimização de um método de extração de DNA eficiente, rápido e de baixo custo de sementes de soja para fins de seleção assistida por marcadores moleculares. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 8., 2013, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2013. p. 46-50.
- CHAVES, L. J. Interação de genótipos com ambientes. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S. de; VALADARES-INGLIS, M. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento-plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 673-713.
- FALEIRO, F. G. Aplicações de marcadores moleculares como ferramenta auxiliar em programas de conservação, caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético vegetal. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JUNIOR, F. B. dos. (Eds.). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. p. 55-118.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20).
- MAIA, M. S.; BRUMER, B. B.; NOVAES, R. M. L.; SILVA, D. C. G.; KUWAHARA, M. K.; DALCIN, M. B.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ABDELNOOR, R. V. Método de extração de DNA de folhas de soja adaptado para larga escala. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 8., 2013, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2013. p. 146-151. (Embrapa Soja. Documentos, 339).

**Embrapa**

---

**Soja**