

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análises genéticas revelam oportunidades e obstáculos da tolerância ao  
fungo da ferrugem asiática da soja**

**Elesandro Bornhofen**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em  
Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento  
de Plantas

**Piracicaba  
2019**

**Elesandro Bornhofen**  
**Engenheiro Agrônomo**

**Análises genéticas revelam oportunidades e obstáculos da tolerância ao fungo da ferrugem asiática da soja**

Orientador:  
Prof. Dr. **NATAL ANTONIO VELLO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba**  
**2019**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**  
**DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Bornhofen, Elesandro

Análises genéticas revelam oportunidades e obstáculos da tolerância ao fungo da ferrugem asiática da soja / Elesandro Bornhofen - - Piracicaba, 2019.

126 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Análise espacial 2. Estresse biótico 3. Interação genótipos por ambientes 4. *Glycine max* 5. *Phakopsora pachyrhizi*. I. Título

## DEDICATÓRIA

*Essa tese é especialmente dedicada aos meus pais, Ari e Ivanir, por todo o suporte e amor ao longo da vida, e a minha avó paterna, Angelina, pelo imenso carinho.*

*Eu também dedico essa tese aos muitos amigos que contribuíram para tornar essa esplêndida jornada mais divertida.*

*Por fim, porém não menos importante, dedico esses anos de trabalho, aqui sumarizados em alguns poucos milhares de palavras, aos agricultores brasileiros, empresários resilientes e comprometidos em continuamente evoluir a agricultura nacional.*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de ressaltar que a existência desta tese é fruto da valiosa contribuição de tantos, dos quais sou muito grato.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio constante desde o início dessa jornada, especialmente aos meus pais Ari e Ivanir Bornhofen. A minha linda noiva, Dra. Tábata Bergonci, pelo companherismo, inteligência, amor e dedicação, não medindo esforços para me auxiliar em direção ao sucesso. Meu muito obrigado também destina-se a todos os amigos próximos que, quer seja pelos momentos alegres ou difíceis, o certo é que crescemos juntos.

Sou imensamente grato ao Professor Dr. Natal A. Vello pelo espaço disponibilizado em seu grupo de pesquisa, o que me proporcionou a oportunidade de conviver com cientistas notáveis, além de suas conversas e valorosas orientações. Estendo também meus agradecimentos ao Professor da Universidade de Minnesota, Ph.D. Aaron J. Lorenz, por ter me recebido como pesquisador visitante em seu grupo e por ter dedicado muito do seu tempo em tornar minha experiência agradável e rica em conhecimentos.

Aos professores do Departamento de Genética e dos demais departamentos pelos ensinamentos por meio de aulas agradáveis e conversas informais. Também, agradeço aos colegas da pós-graduação dos vários departamentos da instituição pelos momentos de estudo e pelas amizades conquistadas. Não posso deixar de mencionar as grandes amizades conquistadas durante o estágio no exterior, especialmente dos colegas de moradia (*Minnesota Graduate Club*), de laboratório e do futebol; sei que estão espalhados pelos quatro cantos do mundo mas espero um dia revê-los.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, por meio de bolsas no período de 01 de agosto de 2015 a 31 de julho de 2016. Também, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo número 142370/2016-9, pela bolsa vigente entre 01 de agosto de 2016 a 31 de agosto de 2017 e, especialmente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio dos processos 2017/11235-0, vigente no período de 01 de setembro de 2017 a 28 de fevereiro de 2018 e 01 de setembro de 2019 a 31 de julho de 2019, e do processo 2017/24266-0 referente a bolsa de estágio em pesquisa no exterior (BEPE), vigente no período de 01 de março a 31 de agosto de 2018. Sem o auxílio essencial dessas instituições, dificilmente teria alcançado tamanha conquista. Estendo meus agradecimentos à Universidade de São Paulo e em especial a todos os servidores do Departamento de Genética da ESALQ pelos anos de convivência e aprendizado.

Gostaria de estender meus agradecimentos aos técnicos de laboratório do grupo de pesquisa em melhoramento da soja (SGAEA) Claudinei A. Didondé, Marcos C. Nekatschalow e Antonio R. Cogo (*in memoriam*) pelo apoio nas atividades e pela amizade, e aos colegas pós-graduandos do grupo Gabriela F. Rocha, Fernanda A.C. Pereira, Felipe M. Nazato, Fernando G. Espolador, Pedro A.M. Barbosa, Renan S. Souza e Rafael M. Yassue pelas discussões científicas, auxílio nas atividades e pela amizade.

Muito obrigado.

## EPÍGRAFE

*“O medo surge com a imaginação, é uma penalidade,  
é o preço da imaginação”*

*Thomas Harris, RED DRAGON*

*“Evite a manada. Faça o seu próprio pensamento de forma  
independente. Seja o jogador de xadrez, não a peça”*

*Ralph Charell*

*“Coma bem, leia livros, estude você mesmo,  
expand a sua mente, faça melhor e seja melhor.*

*Lembre-se, você é o seu maior investimento”*

*Warren Buffet*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>11</b>
2.1. A SOJA “COMMODITY” .....	11
2.2. MELHORAMENTO GENÉTICO E DESAFIOS DA SOJA TROPICAL .....	12
2.2.1. <i>Ganho genético no melhoramento da soja</i> .....	14
2.3. PHAKOPSORA PACHYRHIZI, O AGENTE CAUSAL DA FERRUGEM DA SOJA .....	15
2.3.1. <i>A ferrugem da soja e os impactos no agronegócio</i> .....	17
2.3.2. <i>Estratégias de controle não genéticas</i> .....	18
2.4. MECANISMOS MOLECULARES DE DEFESA DAS PLANTAS CONTRA AS DOENÇAS .....	19
2.4.1. <i>Resistência genética à ferrugem</i> .....	22
2.4.2. <i>Tolerância à ferrugem</i> .....	23
2.5. MELHORAMENTO GENÉTICO PARA TOLERÂNCIA A <i>P. PACHYRHIZI</i> .....	24
2.6. FENOTIPAGEM DE ALTO RENDIMENTO NO MELHORAMENTO DE PLANTAS .....	25
2.7. ANÁLISE ESPACIAL DE EXPERIMENTOS AGRÍCOLAS .....	27
2.7.1. <i>Correção espacial via splines bidimensionais</i> .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1. GERMOPLASMA AVALIADO E DELINEAMENTO GENÉTICO .....	31
3.2. ESTRATÉGIA PARA O MANEJO DA FERRUGEM ASIÁTICA DA SOJA .....	31
3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ESTRATÉGIAS DE EXPERIMENTAÇÃO .....	32
3.3.1. <i>Experimentação das populações segregantes</i> .....	33
3.3.2. <i>Seleção fenotípica de plantas</i> .....	33
3.3.3. <i>Experimentação das linhagens</i> .....	34
3.3.4. <i>Experimentação dos genitores</i> .....	34
3.4. CARACTERES AVALIADOS .....	35
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	38
3.5.1. <i>Análises estatísticas das populações F<sub>5</sub></i> .....	38
3.5.2. <i>Análises estatísticas das linhagens experimentais</i> .....	40
3.5.3. <i>Análises estatísticas dos genitores</i> .....	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
4.1. PANORAMA GERAL DOS EXPERIMENTOS E CLIMA .....	45
4.2. PERFORMANCE DAS POPULAÇÕES F <sub>5</sub> E PARÂMETROS GENÉTICOS .....	46
4.3. INVESTIGAÇÃO PRELIMINAR DA PERFORMANCE DAS LINHAGENS E ESTUDOS DE TOLERÂNCIA .....	53
4.3.1. <i>Efeito do estresse pela ferrugem nas correlações</i> .....	58
4.3.2. <i>Caracterização da tolerância na interação soja × P. pachyrhizii</i> .....	61
4.4. PERFORMANCE DOS GENITORES E INTERAÇÃO GENÓTIPOS × AMBIENTES .....	63
4.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PARA O MELHORAMENTO DA SOJA .....	68
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>120</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>123</b>

## RESUMO

### Análises genéticas revelam oportunidades e obstáculos da tolerância ao fungo da ferrugem asiática da soja

No início dos anos 2000, a constatação da ferrugem asiática da soja na América do Sul deu origem ao que seria uma batalha multibilionária pela manutenção da viabilidade econômica da cultura. Embora várias medidas de controle tenham sido pesquisadas e disponibilizadas aos agricultores, o controle por meio de fungicidas ainda constitui a principal estratégia. No entanto, tendências globais de redução no uso de agroquímicos, diminuição da eficiência das moléculas fungicidas contra o agente causal da doença e razões econômicas despertam a necessidade de outros modelos de controle. Nesse sentido, a tolerância genética como uma tática para manutenção da performance produtiva na presença do estresse pode constituir uma alternativa interessante. Poucos estudos têm pesquisado prospectivamente as complicações e benefícios do melhoramento da soja para tolerância a *P. pachyrhizii*. O propósito da presente pesquisa foi o de buscar fundamentações para a utilização da tolerância em programas de melhoramento de soja, identificar genitores hábeis na transmissão dessa característica, averiguar a importância da interação genótipos  $\times$  ambientes ( $G \times E$ ) e examinar a existência de custo de alocação, característica na qual os custos metabólicos para a defesa da planta não são traduzidos em performance na ausência do patógeno. Foram conduzidos experimentos adjacentes na presença e na ausência da ferrugem ao longo de três anos consecutivos e dois locais de experimentação. Foram testadas 64 populações biparentais  $F_5$  derivadas de um dialelo parcial  $8 \times 8$ , 768 linhagens selecionadas  $F_{5,6}$  e 256 linhagens  $F_{5,7}$ , além dos 16 genótipos genitores (codificados de 21 a 36), totalizando 4.424 parcelas experimentais. Em adição aos caracteres agronômicos mensurados em todas as parcelas, as linhagens  $F_{5,6}$  e genitores tiveram as amostras de cem sementes avaliadas via fenotipagem de alto rendimento a partir de imagens digitais. Todas as análises estatísticas foram executadas via modelos mistos, com correção espacial via regressão por splines penalizadas bidimensionais para os experimentos contendo as populações  $F_5$  e linhagens  $F_{5,6}$ . A presença da ferrugem reduziu a média geral da produtividade de sementes em 16,18% para as populações e 27,30% para as linhagens. A estratégia de experimentos adjacentes com manejos diferentes de fungicidas foi eficiente e foram detectadas diferenças para o efeito da doença em todos os caracteres mensurados. A seleção para tolerância deve ser praticada a partir de informações coletadas em experimentos conduzidos em multi-ambientes devido à relevância da interação  $G \times E$ . O melhoramento para tolerância deve priorizar o incremento do período de granação (enchimento de grãos) na presença do estresse devido à correlação positiva com a produtividade ( $P < 0,05$ ). Efeitos não-aditivos foram detectados e confirmados ( $P < 0,05$ ) em geração avançada de endogamia, especialmente para o peso de cem sementes. É possível concluir que os genitores USP 04-17.011 (30) e USP 231-2228-01 (31) são os melhores em gerar descendentes tolerantes e, ao mesmo tempo, com alta produtividade na ausência do estresse. Em adição, existe custo de alocação no patossistema soja  $\times$  *P. pachyrhizii*, porém, há variabilidade genética suficiente para a seleção de linhagens elites tolerantes e com produtividade elevada.

**Palavras-chave:** Análise espacial; Estresse biótico; Interação genótipos por ambientes; *Glycine max.* *Phakopsora pachyrhizii*.

## ABSTRACT

### Genetic analysis reveals opportunities and obstacles of tolerance to the Asian soybean rust fungus

In the early 2000s, the first detection of Asia soybean rust in South America gave rise to what would become a multibillion-dollar battle to sustain the economic viability of the crop. While several strategies of control have been investigated and delivered to farmers, the rust management stills rely on fungicide sprays. However, global trends in reducing the use of agrochemicals, the continuous decrease in the efficiency of fungicide molecules against the causal agent of the disease, and economic reasons raise the need for other models of control. In this sense, genetic tolerance as an approach to sustain yield performance in the presence of rust stress can be an interesting alternative. Few studies have prospectively investigated the obstacles and benefits of soybean breeding for tolerance to *P. pachyrhizii*. The purpose of the this study was to design basis for the use of tolerance in soybean breeding programs, to identify valuable parents in terms of combing ability for this mechanism, to establish the importance of genotype  $\times$  environment interaction ( $G \times E$ ) for tolerance and to investigate the existence of allocation cost, characteristic in which the metabolic costs of plant defense are not translated into performance in the absence of the pathogen. Adjacent experiments contrasting only for rust stress (presence and absence of rust) were carried out for three consecutive years and two locations. A total of 4,424 experimental plots were evaluated, including trials composed by 64  $F_5$  biparental populations derived from an  $8 \times 8$  partial diallel, 768  $F_{5:6}$  and 256  $F_{5:7}$  inbred lines, in addition to the 16 parental genotypes (coded from 21 to 36). In addition to the agronomic traits measured in all plots, the  $F_{5:6}$  inbreds and the parental genotypes had the samples of one hundred seeds evaluated through high-throughput phenotyping of digital imagery. All statistical analyses were performed via mixed models and for the trials containing the  $F_5$  populations and the  $F_{5:6}$  inbreds, an extra term was added to the model aiming the spatial correction through two-dimensional penalized spline regression. The rust stress reduced the overall seed yield in 16.18% for populations and 27.30% for inbred lines. The strategy of adjacent experiments with different fungicide management was efficient and differences were detected for the effect of the disease on all measured traits. The selection for tolerance should be practiced employing information collected in experiments carried out in multi-environment due to the relevance of the  $G \times E$  interaction. The results show that increasing the period of seed filling in the presence of rust stress can benefit the breeding for tolerance due to a positive correlation with yield ( $P < 0.05$ ). Non-additive genetic effects were detected and confirmed ( $P < 0.05$ ) in late selfing generations, especially for the hundred seed weight trait. The finds indicate that USP 04-17.011 (30) and USP 231-2228-01 (31) are the best parents at generating tolerant descendants and, at the same time, able to deliver high yield in the absence of rust stress. In addition, there is allocation cost in the soybean  $\times$  *P. pachyrhizii* pathosystem, however, there is sufficient genetic variability for the simultaneous selection of tolerant elite lines with high yield.

**Keywords:** Biotic stress; Genotype by environment interaction; *Glycine max*; *Phakopsora pachyrhizii*; Spatial analysis.

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios do século 21 será o de suprir a demanda mundial crescente por alimentos, roupas e energia com o menor impacto possível nos recursos naturais. Nesse sentido, o processo de melhoramento genético é um componente fundamental, assegurando progressos que têm se mostrado contínuos para as principais culturas agrícolas de interesse da sociedade. Em adição, o avanço da ciência têm permitido o desenvolvimento de insumos mais tecnificados e o aperfeiçoamento das práticas de manejo, assegurando a contínua melhoria ambiental das áreas de cultivo. Logo, o correto posicionamento de genótipos elites ao longo dos ambientes-alvo resulta em efeitos sinérgicos, maximizando a expressão dos caracteres de interesse. Em outros termos, genótipo (G), ambiente (E) e sua interação ( $G \times E$ ) constituem as três dimensões que têm sido otimizadas ao longo do tempo, mas principalmente no último século, como resposta ao crescimento populacional acentuado. A consonância entre G, E e  $G \times E$  é, todavia, constantemente desafiada por eventos causadores de estresses de natureza biótica (e.g., pragas e doenças) e abiótica (e.g., estresse hídrico e por salinidade). Estima-se que apenas as epidemias são responsáveis por perdas anuais em culturas agrícolas de aproximadamente 16% (Oerke, 2006), mas com potencial de causar danos muito maiores caso não ocorra o devido controle.

Pelas suas características únicas, a soja é a principal oleaginosa cultivada no mundo. Suas aplicações são inúmeras, desde aquelas usuais (e.g., fabricação de biodiesel e farelo para alimentação animal) até usos pouco conhecidos (e.g., fabricação de vodka e tintas). No Brasil, além de ser a principal cultura agrícola, a soja é muitas vezes responsável pelo superávit da balança comercial. A importância econômica da cultura tem fomentado a pesquisa e o desenvolvimento (P&D) de tal maneira que combinações G, E e  $G \times E$  têm resultado em progressos na produtividade de grãos na ordem de  $44 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  (3,20% ano<sup>-1</sup>), valor médio computado para a série histórica entre 1976 e 2018 (CONAB, 2018). Nesse mesmo período, a produtividade da soja nos Estados Unidos da América cresceu cerca de  $33,70 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  [1,90% ano<sup>-1</sup>] e a mundial  $27,40 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  [1,77% ano<sup>-1</sup>] (FAOSTAT, 2018). Na média das últimas cinco safras, a produtividade da soja brasileira foi de  $3.360 \text{ kg ha}^{-1}$ , sendo ligeiramente superior à produtividade norte-americana e cerca de 17% superior à média mundial. Estudos científicos tendem a convergir no valor de 1% ano<sup>-1</sup> para o ganho genético na produtividade de grãos fruto das atividades de melhoramento da soja. Assim, nota-se que a melhoria ambiental também tem desempenhado papel fundamental na evolução das produtividades, especialmente no Brasil. Todavia, a contínua melhoria em E, componente mais oneroso da equação, tem sido impactado pela ocorrência de estresses bióticos em larga escala, principalmente da ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*).

Epidemias afetando culturas agrícolas apresentam implicações sociais sérias, especialmente em países em desenvolvimento (Vurro et al., 2010). A ferrugem está amplamente disseminada nas regiões brasileiras produtoras de soja e conduz a severas perdas anualmente quando o controle químico não ocorre de forma adequada. Desde o primeiro relato no Brasil na safra 2001/02, os custos bilionários da convivência com a doença só vêm aumentando. Embora várias estratégias de minimização dos impactos

da doença tenham sido desenvolvidas e implementadas, o uso de fungicidas ainda é a principal maneira de atenuar os efeitos negativos da doença. Impactos danosos na produtividade das plantas são reflexo de inúmeros mecanismos, os quais incluem a i) perda de folhas, implicando na redução da radiação solar absorvida, ii) redução da área foliar verde, proveniente do total de área foliar comprometida pelas lesões da doença e, iii) redução na eficiência com que a energia solar absorvida é convertida em matéria seca [eficiência de uso da radiação] (Kumudini et al., 2008). A alternativa mais eficiente de controle não só da ferrugem, mas de qualquer agente causador de estresse, é por meio de mecanismos genéticos como a tolerância e a resistência. Porém, a agressividade, a diversidade genética e a fácil disseminação do fungo restringem as opções de controle.

A tolerância é uma estratégia genética de minimização dos impactos da doença e que vem sendo objeto de estudo em inúmeras pesquisas científicas em diversas culturas agrícolas. É definida como a habilidade da planta em sustentar um certo nível de danos causados pela multiplicação do patógeno nos tecidos sem, no entanto, comprometer a produtividade e/ou qualidade tal qual a observada em uma planta suscetível. Quanto à soja, ainda há escassez de estudos visando o entendimento da tolerância ao fungo *P. pachyrhizii*, sendo a maior fração das pesquisas direcionadas ao estudo da resistência genética. Portanto, a motivação da presente pesquisa foi a de criar conteúdo inédito e com potencial de ser utilizado pelo público especializado com vistas à redução dos impactos negativos da ferrugem no agronegócio da soja. Isso ganha ainda mais importância, pois existe a tendência global de diminuição no uso de pesticidas (Ney et al., 2013), embora o que tem se observado na produção da soja seja o contrário.

A presente tese foi delineada objetivando compreender e avançar o conhecimento sobre a tolerância genética ao fungo *P. pachyrhizii*, testar estratégias para mensurar a tolerância e selecionar linhagens elites, investigar o impacto do estresse causado pela ferrugem em diversos caracteres agronômicos e suas relações e, também, avaliar o efeito da interação genótipos  $\times$  ambientes na tolerância e expressão de caracteres agronômicos da soja. Para responder a esses objetivos, foram conduzidos experimentos envolvendo genitores, populações segregantes e linhagens em três anos agrícolas, dois locais de teste contrastantes e variando a exposição ao estresse devido à presença do fungo *P. pachyrhizii* (ausência e presença da doença, por meio de experimentos com diferentes manejos de fungicidas). Essa tese está organizada em um único texto em que são trazidos conteúdos relevantes sobre a cultura da soja, sobre a ferrugem asiática e suas interações na forma de revisão de literatura, além de detalhes dos experimentos, procedimentos de análise dos dados, resultados e discussões. A literatura citada foi selecionada de maneira a apresentar o estado da arte dos diversos temas que permeiam o objetivo central da pesquisa, no sentido de facilitar a leitura e o entendimento do texto.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A soja “commodity”

Na recente história da agricultura brasileira, várias espécies de plantas cultivadas tiveram papel relevante na economia. Com o passar das décadas, algumas declinaram em termos de participação no PIB (Produto Interno Bruto) do agronegócio, enquanto outras se mantiveram em lugar de destaque no cenário econômico nacional. Em meio a isso, novas culturas foram introduzidas e, a partir de intensa pesquisa, adaptaram-se às características do país. Uma das mais importantes introduções foi a da soja (*Glycine max* (L.) Merr.), que ocorreu inicialmente no Estado da Bahia a partir de sementes trazidas dos Estados Unidos em 1882. Porém, devido à baixa adaptação ao clima local, a soja encontrou ambiente favorável ao cultivo na região Sul do Brasil. Assim, a primeira metade do século XX foi caracterizada por inúmeros avanços e tentativas de consolidar a cultura no agronegócio brasileiro. Certamente, uma das maiores conquistas e que proporcionou a expansão massiva da soja para áreas de baixa latitude foram as pesquisas envolvendo a sensibilidade reduzida ao fotoperíodo (Hartwig e Kühn, 1979). Essa característica é conhecida como período juvenil longo e deve-se primariamente a variações naturais do tipo perda de função no locus *J*, alongando as fases vegetativas e maximizando a produtividade em condições de dias curtos (Lu et al., 2017). Anterior a isso, o cultivo da soja ao redor do globo era restrito a regiões temperadas e subtropicais com latitude próxima ou superior a 30° (Gavioli, 2013).

A soja é uma planta de dias curtos pertencente à família Fabaceae, terceira maior família de plantas no mundo, e apresenta cleistogamia (i.e., polinização e fecundação da flor hermafrodita antes da abertura). *G. max* é uma espécie paleopoliploide ( $2n=4x=40$ ) com tamanho de genoma estimado em 1,1 giga bases, 46.430 genes preditos codificando proteínas e apresentando o genoma altamente duplicado, i.e., aproximadamente 75% dos genes possuem múltiplas cópias, fruto de dois eventos de duplicação do genoma ocorridos por volta de 59 e 13 milhões de anos atrás (Schmutz et al., 2010), além de evidência de alto desequilíbrio de ligação (Lam et al., 2010), o que favorece a seleção assistida por marcadores moleculares. É uma das principais fontes globais de proteína e óleo e a primeira espécie leguminosa a ter seu genoma sequenciado (Schmutz et al., 2010). Em média, as sementes são constituídas por aproximadamente 40% de proteína e 20% de óleo. No entanto, o que torna a espécie única é a capacidade de produção de proteína de alta qualidade sem necessidade de adição de insumos nitrogenados no sistema, graças ao processo natural de fixação biológica de nitrogênio ( $N_2$ ). Esse processo ocorre por meio da simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e respondeu, por exemplo, por cerca de 16,4 milhões de toneladas de N fixado globalmente em 2005, representando 77% da fixação por espécies leguminosas naquele ano em que a área cultivada com soja foi de 93,4 milhões de hectares (Herridge et al., 2008).

A domesticação da soja ocorreu por volta de 5.000 anos atrás na China, centro de origem da espécie (Carter et al., 2004) a partir da *G. soja* Sieb. & Zucc., parente selvagem da espécie cultivada. Achados arqueológicos apontam para o Vale do Rio Amarelo (Huanghe River) como região candidata

aonde ocorreu a domesticação da soja (Wang et al., 2016). No entanto, pesquisas apontam para múltiplos sítios de domesticação no leste asiático (Xu et al., 2002; Lee et al., 2011). Da domesticação até a soja moderna, a seleção impôs profundas alterações nas frequências alélicas e seleção de alterações com fenótipo favorável, e.g., uma deleção de 20 pares de bases no gene *SHAT1-5* favoreceu sua superexpressão e perda da característica de debulha natural (abertura precoce das vagens para dispersão de sementes), favorecendo o cultivo da soja em estágios iniciais da domesticação (Sedivy et al., 2017). Atualmente, existem genes de efeito maior mapeados controlando as principais características de interesse dos melhoristas como a série de genes *E* (*E1-E10*) determinando a duração do ciclo (Samanfar et al., 2017), os genes *Dt1* e *Dt2* que definem o hábito de crescimento (Bernard, 1972), os genes *W1*, *W2*, *W3*, *W4*, *Wm* e *Wp* para cor de flor (Yan et al., 2014), dentre várias outras características. Foram milênios de atividades que moldaram a soja da forma como é conhecida atualmente e que permitiram torná-la a leguminosa mais importante do mundo, com área de cultivo global igual a 125 milhões de hectares e produção de 340 milhões de toneladas na safra 2017/18 (USDA, 2019).

## 2.2. Melhoramento genético e desafios da soja tropical

A obtenção de cultivares elite com performance produtiva superior àquelas já disponíveis no mercado ou com características exclusivas que sustentem seu lançamento é resultado de um processo que consome muito tempo (5 a 7 anos) e é cercado de decisões críticas. Recursos genéticos ao alcance dos melhoristas permitem a seleção de genótipos que serão utilizados nas hibridações, as quais ocorrem primariamente via cruzamento biparental (Mikel et al., 2010). Populações segregantes são então avançadas em direção a homozigose por algumas gerações e seguindo algum método de melhoramento específico. Destas populações, linhagens endogâmicas são derivadas e testadas ao longo do tempo e do espaço, seguindo critérios definidos pela equipe de melhoramento e em acordância com as normas vigentes para lançamento de cultivares. Esse fluxo de trabalho, sucintamente relatado, é o eixo central no melhoramento da soja. Entretanto, visando a otimização na alocação de recursos nos programas de melhoramento, bem como o ganho genético no decorrer do tempo, diversas ferramentas têm surgido para assistir os melhoristas, e.g., seleção assistida por marcadores (Collard e Mackill, 2008), mapeamento de QTLs [*Quantitative Trait Loci*] (Lynch e Walsh, 1998; Cooper et al., 2009), predição genômica (Meuwissen et al., 2001) e fenotipagem de alto rendimento (Araus et al., 2018).

Para o design e sucesso das estratégias de melhoramento, há necessidade de profundo conhecimento acerca de diversos parâmetros genéticos como a herdabilidade e a herança dos caracteres de interesse. Além disso, é de interesse do melhorista conhecer a habilidade combinatória dos genótipos disponíveis, bem como os cruzamentos específicos que maximizem a probabilidade de se obterem linhagens promissoras. Essas e outras questões podem ser respondidas a partir de cruzamentos seguindo algum delineamento genético. Nesse sentido, os cruzamentos dialélicos consistem no delineamento genético mais comumente usados pelos melhoristas e geneticistas (Dhillon, 1978). No entanto, quando o número de genitores ( $n$ ) aumenta, a quantidade de cruzamentos acaba extrapolando a capacidade de teste,

e.g., em um dialelo completo e sem recíprocos, existem  $n(n - 1)/2$  possíveis cruzamentos; para  $n = 10$  existem 45 combinações enquanto que para  $n = 50$ , 1.225 combinações são esperadas. De maneira a minimizar esse entrave, o uso de dialelos parciais foi proposto por Kempthorne e Curnow (1961). Nesse esquema,  $ns/2$  cruzamentos são realizados, sendo  $s$  o número de cruzamentos por genitor. Mais tarde, a metodologia foi expandida para a situação de experimentos em multi-ambiente (Dhillon, 1978). A decomposição da variância fenotípica em variância devido aos efeitos de capacidade geral de combinação (CGC) e capacidade específica de combinação (CEC), além daquelas de natureza do delineamento experimental, são úteis ao melhorista e acrescentam informações relevantes na pesquisa científica. Assim, obtém-se as variâncias aditiva  $\sigma_A^2$  calculando  $\sigma_{CGC}^2$  ( $\sigma_A^2 = 4\sigma_{CGC}^2$ ) e de dominância  $\sigma_D^2$  pela estimativa da  $\sigma_{CEC}^2$  ( $\sigma_D^2 = \sigma_{CEC}^2$ ), assumindo que interações epistáticas são fracas (Lynch e Walsh, 1998). O uso de dialelos parciais é relativamente comum na literatura, com aplicações em arroz (Torres e Geraldí, 2007), café (Musoli et al., 2013), milho (Sharma e Carena, 2016) e soja (Pinheiro et al., 2005; Oliveira et al., 2014). Pesquisas utilizando cruzamentos em esquema dialélicos dificilmente irão resultar em uma cultivar, porém, as informações geradas podem aumentar a probabilidade de sucesso do melhorista.

A cultura da soja encontrou diversos desafios desde a sua introdução no Brasil. Foram mais de 80 anos do primeiro registro da chegada da espécie no país até a grande expansão que teve início na década de 1970. Algumas explicações do crescimento da soja no Brasil são discutidas por Gavioli (2013) e Unfried e Braga (2011) e se resumem em disponibilidade de áreas, incorporação do fotoperíodo longo no germoplasma, crescimento da demanda mundial pela oleaginosa e contínua melhoria da infraestrutura logística no interior do país, além da pesquisa científica intensiva. Com relação a essa última, é fundamental mencionar o papel relevante do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que mediante seu programa de melhoramento, iniciou testes em 1959 das cultivares fruto de hibridações Santa Rosa, Industrial, IAC-1 e IAC-2, as quais alavancaram a expansão da soja na década seguinte (Unfried e Braga, 2011). Além do IAC, vale mencionar a importância dos trabalhos realizados no Centro Nacional da Pesquisa de Soja (CNPSo) em Londrina – PR, que muito contribuíram na expansão da soja por todo o país. Atualmente, dezenas de instituições nacionais e estrangeiras conduzem programas de melhoramento de soja no Brasil, sendo responsáveis por 1.932 registros de cultivares no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2019).

Da perspectiva fitossanitária, a cultura da soja enfrentou várias ameaças ao longo das últimas décadas. A primeira epidemia a atingir proporções nacionais foi causada pelo fungo *Cercospora sojina*, causador da doença conhecida como mancha “olho-de-rã”, primeiramente relatada na safra de 1970/71 (Siqueri et al., 2011). Na sequência surgiram problemas causados por *Rhizoctonia solani* (*damping-off* ou tombamento) e *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco) ainda na década de 70; *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* (cancro da haste) entre 1988/89 até 1995/96, *Erysiphe diffusa* (oídio) em 1996/97 e *Phakopsora pachyrhizi* (ferrugem asiática da soja) em 2001 (Siqueri et al., 2011). Vários outros agentes patogênicos interagem com a soja resultando em dezenas de doenças com maior ou menor impacto na produtividade e qualidade dos grãos a depender da região de cultivo. Todavia, desde o primeiro relato de ocorrência em

território nacional, a ferrugem tornou-se a principal doença, contabilizando perdas bilionárias (Siqueri et al., 2011; Godoy et al., 2015). Portanto, atenuar os impactos negativos da ferrugem foi e continua sendo um dos principais desafios da pesquisa especializada. Essa doença será detalhada nos tópicos que seguem esta revisão de literatura.

### 2.2.1. Ganho genético no melhoramento da soja

Até a soja moderna, vários eventos de gargalos genéticos ocorreram, incluindo a domesticação e formação das linhagens locais (landraces) na Ásia, introdução dessas linhagens na América do Norte e melhoramento genético nas últimas décadas, implicando em perdas acentuadas de variabilidade genética e alelos raros (Hyten et al., 2006; Kim et al., 2012b). No Brasil, estudos apontam para estreitamento da base genética (Maldonado dos Santos et al., 2016), com poucos genótipos ancestrais contribuindo largamente para a base genética atual (Wysmierski e Vello, 2013). Isso não é exclusividade apenas da pesquisa em melhoramento de soja no Brasil, e.g., das 494 cultivares registradas entre 1999 e 2008 na América do Norte, 23% possuem contribuição genética de pelo menos 25% proveniente da cultivar Asgrow A3127 (Mikel et al., 2010), oriunda do cruzamento Williams × Essex. No entanto, mesmo com a diversidade genética restrita em genótipos modernos, os ganhos genéticos para produtividade de grãos têm sido contínuos (Morrison et al., 1999; Lange e Federizzi, 2009; Fox et al., 2013; Koester et al., 2014; Rogers et al., 2015; de Felipe et al., 2016; Qin et al., 2017), sendo, muitas vezes, o maior contribuinte para o aumento da produtividade nas lavouras (Fox et al., 2013).

O ganho genético no decorrer do tempo ( $R_t$ ) pode ser definido como:

$$R_t = \frac{ir\sigma_A^2}{y} \quad [\text{Eq.1}]$$

em que,  $i$  é a intensidade de seleção,  $r$  é a acurácia de seleção,  $\sigma_A^2$  representa a variância genética e  $y$  é o tempo em anos por ciclo (Falconer e Mackay, 1996). O ganho genético em programas de melhoramento pode ser estimado a partir de experimentos com cultivares lançadas ao longo dos anos ou por meio de resultados de ensaios de VCU (Valor de Cultivo e Uso). Estimar o ganho genético é essencial em programas de melhoramento para medir o sucesso das estratégias adotadas, bem como delinear novas formas de melhorar as estimativas (Bornhofen et al., 2018). O ganho genético aproxima-se de 1,0 a 1,5% ao ano para a produtividade de grãos nos três principais produtores mundiais [Brasil, Estados Unidos e Argentina] (Lange e Federizzi, 2009; Koester et al., 2014; de Felipe et al., 2016). Ganhos históricos a essas taxas são relatados serem dirigidos por incrementos lineares na eficiência de interceptação de luz pelo dossel, conservação de energia luminosa em biomassa e particionamento da biomassa em grãos (Koester et al., 2014). Isso garante que cultivares modernas sejam mais eficientes em produzir e alocar recursos baseados em carbono para sementes do que suas predecessoras (Morrison et al., 1999). Elevado índice de colheita e taxa fotossintética, bem como reduzida altura de planta e índice de área foliar são também características compartilhadas por cultivares modernas (Morrison et al., 1999; Jin et al., 2010). No entanto, alguém pode questionar se as alterações em práticas de manejo, como o intenso uso de fungicidas nas

últimas duas décadas em resposta a epidemias, teve efeito nas taxas de ganho genético. O estudo desenvolvido por Weidenbenner et al. (2014) foi desenhado de maneira a responder a essa questão. Os autores concluíram, com base na avaliação de 116 cultivares lançadas entre 1923 e 2008, que a taxa de melhoria na produtividade atribuída aos melhoristas não foi influenciada pelo manejo de fungicida. Estudos também apontam para o contínuo incremento da produtividade ao longo do tempo, mesmo quando resistência genética é adicionada ao germoplasma em resposta a estresses bióticos (De Bruin e Pedersen, 2008; Keep et al., 2016) o que também conduz a maximização da estabilidade fenotípica quando o nível de estresse difere no espaço. Por fim, a interação práticas de manejo × ganho genético pode resultar em efeito sinérgico, contribuindo para aumentar as taxas de ganho em produtividade (Rowntree et al., 2013).

### **2.3. *Phakopsora pachyrhizi*, o agente causal da ferrugem da soja**

A doença conhecida como ferrugem asiática da soja é causada pelo fungo biotrófico *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd. Trata-se de um basidiomiceto (grande grupo de fungos nos quais a meiose ocorre em células especializadas chamadas de basídios) pertencente a ordem Uredinales e foi inicialmente descrito no Japão em 1903 (Hennings, 1903). O genoma nuclear do patógeno ainda não foi sequenciado e a maior parte das informações moleculares têm sido obtidas a partir de trabalhos com sequenciamento de transcriptoma associado a análises de bioinformática (Rincão et al., 2018). Esforços no sentido de sequenciar o genoma do fungo foram reportados por Loehrer et al. (2014). Os autores estimaram um tamanho de genoma dicariótico de aproximadamente 1 giga base, o que é considerado imenso comparado com outros fungos causadores de ferrugem, e uma quantidade grande de elementos transponíveis (>45%). Outra peculiaridade do fungo é a penetração direta via cutícula foliar e não pelos estômatos (Edwards e Bonde, 2011), diferente de outros fungos causadores de ferrugem (Loehrer et al., 2014). A penetração ocorre via força mecânica e, possivelmente, com a ajuda de enzimas digestivas (Edwards e Bonde, 2011).

A ocorrência natural do fungo *P. pachyrhizi* está restrita a dois tipos de esporo, os uredósporos (esporos assexuados; forma predominante na natureza) e os teliósporos (raros de serem observados na natureza). O fungo produz massivas quantidades de uredósporos dicarióticos (n+n) que são rapidamente dispersos pelo vento, servindo de fonte de inóculo para novos ciclos de infecção (Zhang et al., 2012). Esses esporos surgem entre 5 e 8 dias após a inoculação (Goellner et al., 2010). Muito embora não existam relatos de reprodução sexuada, principal mecanismo de liberação da variância genética, a existência de variabilidade patogênica do fungo é rotineiramente reportada (Stewart et al., 2019), bem como supressão da resistência conferida por genes de efeito maior [genes R] (Yorinori et al., 2005). Isso se deve a um importante mecanismo compartilhado por fungos filamentosos, conhecido como anastomose hifal (hibridização somática) e formação de heterocários (Vittal et al., 2012). Os mecanismos que sucedem as fusões de hifas são ainda pouco compreendidos na espécie *P. pachyrhizi*. Em outros Uredinales, presume-se que fusões de hifas e, conseqüentemente, a criação de uma rede, permitem trocas de núcleos, possível rearranjo e troca de cromossomos inteiros, recombinação, entre outros mecanismos (Park et al., 1999;

Park e Wellings, 2012). O primeiro relato da ocorrência de anastomose de tubos germinativos e migração de núcleo ao longo das redes formadas em *P. pachyrhizii* foi publicado por Vittal et al. (2012).

A diversidade do fungo, possivelmente reflexo dos processos anteriormente mencionados, têm sido objeto de inúmeros estudos em regiões geográficas aonde a cultura da soja apresenta importância econômica relevante. McLean e Byth (1976) foram os pioneiros em relatar a existência de diversidade de virulência de *P. pachyrhizii* em cultivares de soja. Estudos recentes sobre diversidade genética e variabilidade patogênica do fungo *P. pachyrhizii* foram conduzidos com isolados da Nigéria (Twizeyimana et al., 2011), leste da África (Murithi et al., 2017), Estados Unidos (Twizeyimana et al., 2011; Zhang et al., 2012), Uruguai (Stewart et al., 2019) e nos três principais produtores da América do Sul (Akamatsu et al., 2013). Usando genótipos diferenciadores, i.e., àquelas com diferentes genes de resistência à ferrugem da soja (genes *Rpp: resistance to P. pachyrhizii*), Stewart et al. (2019) identificaram um espectro de virulência amplo nos isolados de *P. pachyrhizii* coletados no Uruguai. Além disso, observaram que os padrões de virulência foram idênticos a patótipos coletados ao longo do continente. Esse resultado evidencia a facilidade de disseminação dos esporos a grandes distâncias. Mesmo assim, as populações de *P. pachyrhizii* na América do Sul variam quanto a patogenicidade temporal e geograficamente (Akamatsu et al., 2013). Isso justifica a necessidade de avaliações em multi-ambiente para a seleção de genótipos de soja resistentes/tolerantes à ferrugem.

Além da soja cultivada, o fungo *P. pachyrhizii* possui hospedeiros alternativos nos quais consegue estabelecer o processo infeccioso e gerar novos esporos. Um dos hospedeiros mais conhecidos é o kudzu (*Pueraria spp.*), amplamente disseminado na região sudeste dos EUA (Jordan et al., 2010), mas com ocorrência restrita no Brasil. Ono et al. (1992) resumiu em uma lista 91 espécies da subfamília Papilionoideae capazes de hospedar o fungo *P. pachyrhizii*. Com o posterior surgimento do fungo no hemisfério oeste, Slaminko et al. (2008) conduziram ensaios para determinar novos possíveis hospedeiros do patógeno. A presença de esporulação foi detectada em 65 novas espécies de 25 gêneros. Portanto, nota-se a ampla gama de hospedeiros nos quais o patógeno consegue permanecer durante o período de entressafra da soja.

Esporos do fungo são transportados por enormes distâncias por meio de correntes de ar e se depositam sobre a lâmina foliar de plantas de soja em crescimento e desenvolvimento nas lavouras. Em condições favoráveis de umidade (mínimo de 6h de molhamento foliar) e temperatura (21 a 27° C), a germinação dos esporos irá ocorrer, dando início ao processo de infecção. A germinação resulta no surgimento de um tubo germinativo que termina em uma estrutura chamada de apressório, no qual surge a hifa de penetração (Goellner et al., 2010). Já no espaço intercelular, surge a hifa de infecção (Bromfield, 1984), separada por um septo da hifa de penetração. Na sequência, surge o haustório que precede uma fase de intensa colonização do mesófilo ao ponto de os espaços intercelulares ficarem cheios de micélio (Goellner et al., 2010). O ciclo assexual completa-se com o aparecimento das urédias, estruturas nas quais são produzidos os novos uredósporos. O patógeno é capaz de realizar múltiplos ciclos de infecção durante o desenvolvimento da cultura, produzindo alta quantidade de esporos. As lesões de suscetibilidade (lesões TAN) que surgem após a infecção, afetam o acúmulo de biomassa pela redução da interceptação

de luz e da capacidade fotossintética, impactando negativamente a qualidade e tamanho de sementes produzidas. Em condições normais, a doença frequentemente ocorre no período reprodutivo, reduzindo a produtividade principalmente pela granação (enchimento de grãos) deficiente. Assim, mensurar atributos de semente é uma estratégia importante na avaliação do impacto da doença.

### 2.3.1. A ferrugem da soja e os impactos no agronegócio

Apenas duas espécies são conhecidas com a habilidade de causar ferrugem na soja, a primeira, já descrita, é a *P. pachyrhizii* e a segunda, a *P. meibomiae*, porém, com pouca relevância em termos de perdas econômicas. Em 1998, as perdas em produção da soja causadas por doenças foram estimadas em US\$ 1,6 bilhões no Brasil, sendo apenas 10% das áreas tratadas com fungicidas (Wrather et al., 2001). Após a constatação da ferrugem no país na safra 2001/02, as perdas aumentaram substancialmente, atingindo US\$ 2 bilhões em 2003/04 devido apenas à ferrugem (Yorinori et al., 2005). Entre as safras 2001/02 a 2009/2010, as perdas acumuladas foram estimadas em US\$ 18 bilhões, contabilizando perdas de grãos, arrecadação e o custo de controle (Siqueri et al., 2011). Nesse período, o incremento anual no volume de perdas foi de aproximadamente US\$ 247 milhões de dólares. Na safra 2013/14, o custo de cerca de US\$ 2 bilhões foi atribuído apenas ao controle da doença [US\$25 aplicação<sup>-1</sup> × 3 aplicações] (Godoy et al., 2016).

Perdas de 37% e 67% na produtividade de sementes foram reportadas em condições experimentais quando a infecção pelo fungo iniciou nos estádios R5 e R2, respectivamente (Kumudini et al., 2008). No que tange as lavouras comerciais, perdas em produtividade de grãos podem ser tão elevadas quanto 80% (Hartman, 1991; Yorinori et al., 2005). No Brasil, desde a safra de 2003/04, ensaios em rede e cooperativos vêm sendo executados para monitoramento da eficiência de fungicidas registrados e em fase de registro (Godoy et al., 2017). Esses ensaios são conduzidos em dezenas de locais nas principais regiões produtoras e por várias instituições de pesquisa e os resultados são reportados por meio de circulares técnicas. A partir desses dados e observando a redução da produtividade para a testemunha (tratamento sem o controle da doença), nota-se que a perda em produtividade média entre as safras 2013/14 e 2017/18 foi de 33,20±5,90%. Esse valor é um indicativo do potencial da doença em diminuir a produtividade da soja brasileira caso o controle químico não seja efetuado. Em termos monetários, considerando a expectativa de colheita na safra 2018/19 de 122 milhões de toneladas (USDA, 2019) e a cotação de US\$9,2325 Bushel<sup>-1</sup> (fechamento: 28/01/2019 [contrato março/19]), as perdas seriam de aproximadamente US\$ 12 bilhões.

A ferrugem é uma das principais fontes de perdas para a produção da soja no Brasil e, nesse sentido, os Estados Unidos apresentam uma grande vantagem competitiva, já que a doença ocorre de maneira sutil apenas nos estados do sul. Por outro lado, praticamente todas as áreas de produção da soja no Brasil estão sujeitas a ocorrência da doença. Isso traz enormes consequências a capacidade de geração de fluxo de caixa nos empreendimentos rurais ao longo do país, comprometendo as margens pelo alto custo de controle aliado a eventuais perdas pela agressividade das epidemias. O efeito cascata de uma possível redução na eficiência das estratégias de controle sob diversos aspectos sociais e econômicos gera

preocupações e incertezas sobre o futuro da produção da soja no país. Isso porque a quantidade de municípios com área produtiva de soja encontra-se na ordem dos milhares, sendo muitas vezes a principal fonte geradora de recursos. Em levantamento visando analisar os impactos econômicos da ferrugem na cadeia da soja até o ano de 2025, pesquisadores mencionaram as restritas opções de controle baseadas em produtos químicos, bem como a perda de eficiência desses, que podem levar a grandes riscos econômicos e sociais (IEAg, 2015).

### 2.3.2. Estratégias de controle não genéticas

O uso de fungicidas é o principal meio para o controle da doença utilizado pelos agricultores no Brasil. O uso desses produtos tem o efeito de aumentar a massa de sementes enquanto mantém seu número, contribuindo para a produtividade (Weidenbenner et al., 2014). Todavia, produtos químicos não são a única estratégia, mas sim uma ferramenta adicional de um arcabouço de táticas desenvolvidas desde o aparecimento da doença. Integram a esse o vazio sanitário, período de 60 a 90 dias a depender da região no qual não pode haver soja nas lavouras (Godoy et al., 2016), a semeadura antecipada e o uso de genótipos com ciclo rápido (Cruz et al., 2012), dimensionamento de uma população de plantas adequada, permitindo a penetração do fungicida e luz solar ao longo de todo o dossel. Isso é importante pois esporos de *P. pachyrhizii* são sensíveis ao comprimento de onda ultravioleta, bem como a radiação solar total (Isard et al., 2006), comprometendo a germinação dos esporos nos tecidos vegetais.

Para o uso racional dos fungicidas, há a necessidade do intenso monitoramento das condições sanitárias da lavoura, bem como monitorar a proximidade com que surgem novos casos de ferrugem. No Brasil, o monitoramento dos locais de ocorrência de casos de ferrugem a cada nova safra é disponibilizado online pelo CAF (Consórcio Antiferrugem, 2019) [<http://www.consorcioantiferrugem.net>]. Nos Estados Unidos, uma ferramenta similar é o sistema SBR-PIPE (*Rust-Pest Information Platform for Extension and Education*) que monitora em tempo real a distribuição e a severidade da ferrugem no espaço da América do Norte (VanKirk et al., 2012) [<http://www.sbrusa.net>]. O monitoramento favorece a aplicação no momento correto, otimizando o uso de recursos na produção da oleaginosa.

A capacidade de desenvolver novas raças em resposta a pressões seletivas impostas pelo meio é uma característica conhecida do fungo *P. pachyrhizii*. A seleção imposta pelo uso intensivo de fungicidas desde o aparecimento da doença no Brasil conduziu a redução na eficiência de controle de alguns dos principais grupos químicos utilizados. Inicialmente, a perda de sensibilidade do patógeno foi observada para os fungicidas Metil-benzimidazol-carbamato (MBC), e.g., carbendazim e benomil, os quais agem interferindo na mitose e divisão celular do fungo (Seiler, 1975). Produtos comerciais com esses princípios ativos tiveram registro suspenso para o controle da ferrugem. O surgimento de raças do fungo menos sensíveis também ocorreu para os fungicidas dos grupos DMIs (*demethylation-inhibitors*) e QoIs (*quinone-outside-inhibitors*), conhecidos como triazóis e estrobilurinas, respectivamente. Os DMIs inibem a síntese do ergosterol, importante componente da membrana celular em fungos, enquanto que os QoIs interferem na respiração mitocondrial ao ligarem-se a sítios específicos do citocromo, impedindo a transferência de

elétrons (Gisi et al., 2000). Mecanismos de resistência contra os DMIs são mais variados e complexos (Schmitz et al., 2014) envolvendo, dentre outros meios, mutações pontuais no gene *CYP51* e.g., F120L (substituição fenilalanina por leucina), I145F (substituição isoleucina por fenilalanina) e I475T (substituição isoleucina por tirosina). Todavia, isolados com mutações nesse gene parecem ter menor habilidade reprodutiva (*fitness cost*) quando comparado com isolados sensíveis (Klosowski et al., 2016a). No caso de isolados menos sensíveis aos QoIs, mutações pontuais nos códons 129 (substituição fenilalanina por leucina) e 143 (substituição glicina por alanina) do gene citocromo b (*CYTB*) são alguns dos mecanismos de resistência presentes (Schmitz et al., 2014; Klosowski et al., 2016b).

As misturas entre ingredientes ativos dos grupos DMI e QoI foram a principal forma de controle da ferrugem por vários anos. No entanto, o surgimento de isolados com baixa sensibilidade demandou novas opções de controle. Começaram então a ser utilizadas as Carboxamidas ou SDHI (*succinate dehydrogenase inhibitor*), as quais também agem na respiração mitocondrial, mais especificamente no complexo II, inibindo a enzima succinato desidrogenase (Sierotzki e Scalliet, 2013). Entretanto, logo nos primeiros anos de utilização comercial para controle do patógeno *P. pachyrhizii*, foram observados isolados com baixa sensibilidade decorrente de uma mutação no gene *SdhC*, que resulta em uma substituição de aminoácido I86F na subunidade C do complexo da succinato desidrogenase (Simões et al., 2018). Por fim, além das misturas entre os grupos químicos anteriormente destacados, o que tem chamado a atenção dos produtores é a utilização de fungicidas com múltiplos sítios de ação, também conhecidos como protetores, os quais apresentam baixo risco de causar resistência no patógeno (Hirooka e Ishii, 2013). No entanto, esses devem ser utilizados em associação com os fungicidas sítio-específicos para o controle eficaz (Juliatti et al., 2017).

#### **2.4. Mecanismos moleculares de defesa das plantas contra as doenças**

Inicialmente, para apresentar os mecanismos envolvidos em respostas de plantas ao ataque de patógenos, é preciso antes definir as principais estratégias utilizadas por plantas para a defesa. De forma simples, resistência refere-se a habilidade do hospedeiro em limitar a multiplicação do patógeno nos tecidos enquanto que a tolerância refere-se a capacidade do hospedeiro em reduzir os efeitos da infecção na habilidade reprodutiva (*fitness*), independentemente do nível de multiplicação do patógeno nos tecidos (Ney et al., 2013; Pagán e García-Arenal, 2018). Em termos estatísticos, a resistência é tipicamente medida como o inverso da intensidade de infecção (quantidade do patógeno no hospedeiro) enquanto que a tolerância pode ser entendida como o coeficiente angular de uma reta de regressão entre a sanidade (ou outra medida, e.g., produtividade ou *fitness*) e a quantidade de estruturas do patógeno nos tecidos do hospedeiro (Koskela et al., 2002; Raberg et al., 2009). Enquanto a resistência é conhecida por impor uma severa pressão seletiva sobre o patógeno e, desta forma, coevoluiem (Kover e Schaal, 2002) seguindo um modelo zigue-zague (Jones e Dangl, 2006), a tolerância não possui efeito negativo na performance do patógeno e, portanto, não há seleção de raças passíveis de superarem esse mecanismo de defesa (Raberg et al., 2009).

As plantas apresentam dois grandes tipos de resistência às doenças, a defesa basal e aquela mediada por genes R. A defesa basal, também conhecida como imunidade inata, representa a primeira linha de defesa contra a infecção e é separada em resistência de não hospedeiro [RNH] e em resistência de hospedeiro [RH] (Gururani et al., 2012). Os patógenos produzem moléculas essenciais a sua sobrevivência que funcionam como eliciadores [PAMPs – *patogen associated molecullar patterns*] que são reconhecidos pela planta por meio de proteínas chamadas de receptores de reconhecimento padrão [PRRs - *pattern recognition receptors*] (Zipfel e Felix, 2005). Esses receptores também reconhecem componentes do próprio hospedeiro liberados pelo patógeno no processo de infecção [DAMPs – *damage-associated molecular patterns*] (Choi e Klessig, 2016). O reconhecimento desencadeia uma cascata de eventos que resulta na reação de resistência PTI [*pathogen triggered immunity*]. PAMPs e DAMPs são altamente conservados e seu reconhecimento constitui um importante mecanismo da RNH (Brunner et al., 2002). Esse mecanismo de defesa pode resultar em ausência de sintomas ou reações de hipersensibilidade (RH), que é a morte celular no local em que houve a tentativa de infecção. Um exemplo de RNH é a tentativa falha de uredósporos de *P. pachyrhizii* germinarem e estabelecerem infecção em tecidos da planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Loehrer et al., 2008). Essa forma de resistência tem ganhado atenção de pesquisadores por não ser raça específica e seu uso em plantas cultivadas poderia trazer enormes benefícios. No que se refere a RH, essa é dividida em qualitativa (resistência vertical) e quantitativa (resistência horizontal). Enquanto há carência de informações dos mecanismos moleculares e da arquitetura genética da resistência quantitativa, a resistência qualitativa é objeto de diversos estudos para interações planta × patógeno de interesse econômico. Esse mecanismo, também conhecido como resistência gene-a-gene devido ao modelo proposto por Flor (1971), surge como resultado da adaptação dos patógenos aos mecanismos de resistência basal da planta (Gururani et al., 2012) e constitui a segunda linha de defesa. Esses patógenos adaptados produzem efetores (fatores de virulência) codificados pelos genes *Avr/avr* (avirulência/virulência) que constituem um arsenal de moléculas secretadas pelo patógeno, algumas das quais são reconhecidas por proteínas R, codificadas por genes *R/r* do hospedeiro, mecanismo conhecido como ETI [*effector triggered immunity*] (Dodds e Thrall, 2009). A habilidade de um fungo biotrófico em infectar e colonizar um hospedeiro é, pelo menos parcialmente, função da coleção de efetores expressos durante o ciclo de vida (Kunjeti et al., 2016). A resistência desencadeada por proteína R é geralmente raça específica, i.e., apenas efetiva contra as raças que expressam a proteína efetora cognata [proteína *avr*] (Gururani et al., 2012). Para o fungo *P. pachyrhizii*, 35 genes candidatos a efetores foram reportados Kunjeti et al. (2016). Qi et al. (2016) caracterizaram o efector *PpEC23* de *P. pachyrhizii* como sendo capaz de suprimir as respostas de defesa basal da soja associadas a PTI.

O emprego do termo tolerância como estratégia de defesa contra patógenos foi inicialmente relatado em plantas a mais de cem anos (Cobb, 1894). Até os dias atuais, pouco se conhece dos mecanismos moleculares responsáveis por sustentar a produtividade e/ou qualidade na presença da doença. Uma fração importante das publicações científicas discutem aspectos teóricos da tolerância e sua relação evolucionária com a resistência, sendo poucos estudos dedicados a mensurar e entender as suas bases moleculares. Todavia, existe um vasto conteúdo disponível sobre tolerância a estresses abióticos,

com genes e mecanismos funcionais já identificados (Mickelbart et al., 2015). Sabe-se também que alguns mecanismos moleculares de defesa a estresses abióticos podem ter efeito positivo na tolerância a estresses bióticos (Kim et al., 2007). Modificações morfológicas e fisiológicas candidatas a explicarem diferentes níveis de tolerância observados em plantas foram revisados por Ney et al. (2013). De acordo com os autores, os mecanismos associados à tolerância a estresses bióticos operam em três níveis: i) órgão (e.g., aumento da assimilação em tecidos sadios e inativação de toxinas), ii) planta (e.g., alta relação fonte/dreno inicial e alta capacidade de remobilização de reservas) e iii) cultura (e.g., arquitetura favorável e elevado número de unidades produtivas por área). Assim, genótipos de soja poderiam atenuar os danos da presença do fungo *P. pachyrhizii* simplesmente por possuírem maior índice de área foliar e, portanto, mantendo níveis suficientes de fotossíntese por um período maior. De acordo com Bingham e Topp (2009), uma grande área de dossel pode conferir tolerância a patógenos, pois a relação entre área de dossel e a radiação interceptada não é linear. Esses autores demonstraram o aumento da tolerância em cevada (*Hordeum vulgare*) como resultado do aumento no índice de área foliar. Nessa situação, é possível a identificação de poucos genes/QTLs responsáveis pelas alterações morfológicas e, conseqüentemente, variações na capacidade de tolerância. Em adição, alguns QTLs para características de dossel em soja já foram reportados (Jun et al., 2014; Xavier et al., 2017). Em *Arabidopsis thaliana*, foi observado que plantas resistentes (gene R presente) a *Pseudomonas syringae* (contendo o gene *Rpm1*) foram mais tolerantes que as suscetíveis, mostrando que o gene R teve impacto na tolerância e, portanto, *Rpm1* foi demonstrado ser um QTL comum para resistência e tolerância (Roux et al., 2010). Em estudo similar, Gao et al. (2009) não observaram efeito do gene *Rps5* na tolerância em *Arabidopsis thaliana*. No entanto, altos níveis de tolerância são esperados para aqueles genótipos capazes de realizar vários ajustes (morfológicos, fisiológicos e bioquímicos) perante a doença e, assim, a natureza poligênica do controle genético para tolerância fica clara.

Como consequência da interação *P. pachyrhizii* × soja, três respostas diferentes podem surgir e serão resultado dos genótipos envolvidos do fungo e da planta. A lesão típica de susceptibilidade é denominada TAN, caracterizada pela intensa presença de pústulas e esporulação abundante. A lesão TAN será observada em genótipos do hospedeiro susceptíveis, tolerantes e aqueles que possuem resistência quantitativa (resistência parcial). A resposta de hipersensibilidade evidenciada nos tecidos de genótipos com gene(s) de resistência é denominada RB (*reddish brown*). As lesões RB são características de genótipos contendo genes de grande efeito para a resistência ao patógeno. Todavia, mesmo em lesões RB ainda é possível observar algum nível de formação de urédias e esporulação (Miles et al., 2011), caracterizando uma resistência incompleta. Além disso, há redução da área fotossintética da planta, principalmente quando a pressão de inóculo é elevada (Kumudini et al., 2010). Por fim, a interação *P. pachyrhizii* × soja pode não resultar em sintomas; reação conhecida como imunidade (ausência de sinais e sintomas da doença). Esse tipo de reação foi reportada em plantas de soja transformadas expressando o gene *CcRpp1* de guandu [*Cajanus cajan*] (Kawashima et al., 2016).

### 2.4.1. Resistência genética à ferrugem

Inicialmente, a resistência implica em redução da quantidade de estruturas do patógeno nos tecidos do hospedeiro quando comparado com um genótipo suscetível (Pilet-Nayel et al., 2017). A resistência da soja ao fungo *P. pachyrhizii* pode ser de natureza qualitativa ou quantitativa. Na primeira, há presença de genes de grande efeito (genes *Rpp* - *resistance to P. pachyrhizii*) cujas proteínas codificadas irão interagir com as proteínas efetoras provenientes do patógeno, resultando em reação de hipersensibilidade (lesões RB). Nesse tipo de resposta, os fenótipos mensurados seguem uma distribuição discreta. Por outro lado, a resistência quantitativa implica em uma distribuição contínua de fenótipos entre suscetível e resistente (Vale et al., 2001; Pilet-Nayel et al., 2017). Nesse caso, múltiplos genes de efeito menor são responsáveis pelos fenótipos observados. Esse tipo de resistência está presente em vários níveis em cultivares e para muitos dos patógenos importantes que às atacam (Vale et al., 2001), sendo considerada mais durável que aquela conferida por genes R (Pilet-Nayel et al., 2017).

Em relação a resistência qualitativa, sete *loci* foram identificados e mapeados em soja até da publicação dessa tese, sendo alguns multialélicos: *Rpp1/Rpp1-b* (McLean e Byth, 1980; Chakraborty et al., 2009; Kim et al., 2012a), *Rpp2/rpp2* (Bromfield e Hartwig, 1980; Garcia et al., 2008; Silva et al., 2008; Calvo et al., 2008), *Rpp3/Rpp?(Hyuuga)* (Bromfield e Melching, 1982; Hartwig e Bromfield, 1983; Monteros et al., 2007; Kendrick et al., 2011), *Rpp4/Rpp4-b* (Hartwig, 1986; Silva et al., 2008; King et al., 2017), *Rpp5/rpp5* (Garcia et al., 2008; Calvo et al., 2008; Kendrick et al., 2011), *Rpp6/Rpp[PI567068A]* (Li et al., 2012; King et al., 2016) e *Rpp7* (Childs et al., 2018). Exceto o gene *Rpp1* que resulta em fenótipos com ausência de sintomas (reação de imunidade) em resposta a isolados avirulentos, todos os demais (*Rpp1-b* ao *Rpp7*) implicam no aparecimento de lesões do tipo RB (Pedley et al., 2018). Stewart et al. (2019) demonstraram a alta virulência de isolados de *P. pachyrhizii* do Uruguai, os quais provavelmente deslocam-se do Brasil por meio do vento, em genótipos contendo *Rpp1*, *Rpp3* e *Rpp4*. Os autores observaram resistência eficaz para os genes *Rpp1-b* (PI 587880A e PI 594767A), *Rpp5* e do genótipo com os genes *Rpp2*, *Rpp4* e *Rpp5* piramidados. Esses três genes piramidados também conferiram um genótipo com forte resistência a 13 isolados coletados em Bangladesh (Hossain e Yamanaka, 2018). De fato, a piramidação dos genes de resistência pode constituir uma estratégia interessante de longo prazo no controle da doença. Todavia, além do processo demorado de piramidação, o qual pode conduzir a um “atraso” na produtividade comparado com as cultivares mais recentes (*yield lag*), genótipos doadores geralmente são pouco melhorados e quando retrocruzados, podem impactar negativamente a produtividade (*yield drag* ou *linkage drag*).

O uso de genes de resistência pelos programas de melhoramento comerciais tem sido modesto. No Brasil, pelo menos duas empresas desenvolvem cultivares comerciais das quais algumas possuem genes de resistência. As cultivares resistentes lançadas pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) podem ser identificadas pela tecnologia Shield® ao passo que as cultivares resistentes desenvolvidas pela TMG (Tropical Melhoramento e Genética) são identificadas pela tecnologia Inox®.

Com relação a resistência quantitativa à ferrugem, vários QTLs têm sido identificados explicando porções significativas da variância para o caráter severidade da doença no dossel de genótipos de soja. Harris et al. (2015) identificaram quatro QTLs em diferentes cromossomos explicando entre 5,2 a 17,3% da variância fenotípica para esse caráter. Os autores sugerem que o QTL de maior efeito, localizado no grupo de ligação Gm15, constitui um bom candidato para a seleção assistida por marcadores. Nessa mesma região do genoma, dois QTLs foram reportados conferindo resistência ao mofo branco [*Sclerotinia sclerotiorum*] (Arahana et al., 2001) e a podridão radicular [*Phytophthora sojae*] (Wu et al., 2011), sugerindo a existência de um mecanismo de defesa comum a mais de um patógeno. A resistência quantitativa em soja contra à ferrugem também foi tema de pesquisa em outras publicações (Miles et al., 2011; Paul et al., 2011). Por não ser raça específica, o uso da resistência parcial no melhoramento da soja pode constituir um estratégia importante de controle de longo prazo (Harris et al., 2015).

#### 2.4.2. Tolerância à ferrugem

O termo tolerância é frequentemente utilizado de maneira errônea na literatura e no dia a dia dos agricultores e prestadores de assistência técnica. Não raro, houve-se que um determinado genótipo é tolerante pela sua capacidade de limitar a quantidade de sintomas da doença nos tecidos, quando na verdade esse conceito está relacionado a resistência quantitativa. Na literatura, também existem casos em que a tolerância foi avaliada utilizando escalas de sintomas com posterior análise para detecção de QTLs controlando a característica (Zhu et al., 2003; del Blanco et al., 2014). Assim, é importante definir o que está sendo considerado como tolerância em estudos científicos. Diferentes definições de tolerância são apresentadas na literatura. Schafer (1971) define tolerância como a capacidade de uma cultivar em apresentar menores perdas em produtividade ou qualidade quando comparada com outras cultivares ou culturas experimentando a mesma severidade de uma determinada doença. Restrito a doenças causadas por fungos e herbivoria, Ney et al. (2013) definem tolerância como a habilidade da planta ou cultura em sustentar performance produtiva, habilidade reprodutiva ou qualidade na presença de sintomas expressos, i.e., lesão real ou doença. Os mecanismos de tolerância existentes em uma interação planta  $\times$  patógeno podem ainda conduzir a respostas de supercompensação, na qual o ataque do patógeno resulta em um aumento da performance do hospedeiro (Doeschl-Wilson et al., 2012; Pagán e García-Arenal, 2018) e custo de alocação, i.e., genótipos do hospedeiro tolerantes na presença do patógeno, expressam baixa performance na ausência desse devido aos custos energéticos para sustentar os mecanismos de tolerância (Simms e Triplett, 1994; Stowe et al., 2000; Raberg et al., 2009). A existência de custos ao hospedeiro provenientes da tolerância tem sido relatada para algumas espécies (Simms e Triplett, 1994) ao passo que a supercompensação é um fenômeno comum na tolerância a herbivoria (Agrawal, 2000), caracterizando uma relação de mutualismo. Para a interação soja  $\times$  *P. pachyrhizi*, ainda não existem relatos da existência de custo de alocação e supercompensação, carecendo de estudos científicos.

A tolerância, como uma alternativa de redução dos impactos negativos causados pela ferrugem tem sido tema de pesquisas com resultados proeminentes (Kawuki et al., 2004; Jarvie e Shanahan, 2009;

Oloka et al., 2009; Araujo e Vello, 2010; Melo et al., 2015; Pereira et al., 2018). Avaliando 51 linhagens de soja na Uganda, Kawuki et al. (2004) concluíram que linhagens precoces foram as mais tolerantes, seguidas das de ciclo médio e tardio. Jarvie e Shanahan (2009) utilizaram medidas de adaptabilidade e estabilidade e foram capazes de identificar genótipos de soja combinando alta produtividade de grãos e desempenho consistente ao longo dos ambientes (estabilidade) e na presença de estresse pela ferrugem. Variabilidade genética para tolerância também foi observada em germoplasma de soja brasileiro e genótipos tolerantes têm sido identificados (Melo et al., 2015; Pereira et al., 2018). Além da ferrugem, a existência de tolerância já foi reportada para outras doenças da soja, como o mofo branco [*Sclerotinia sclerotiorum*] (Xue et al., 2010) e a podridão radicular de fitóftora [*Phytophthora sojae*] (Ferro et al., 2004). Logicamente, o uso isolado da tolerância para o manejo da ferrugem não deve ser recomendado, assim como o uso individualizado de qualquer outra estratégia de manejo. Esse mecanismo apresenta algumas desvantagens, como a produção intensa de inóculo que pode comprometer áreas de produção próximas nas quais são cultivados genótipos não tolerantes. Além disso, dificilmente uma cultivar com intenso desenvolvimento de sintomas e sinais da doença irá performar melhor do que uma cultivar sadia. Nesse sentido, o uso de germoplasma tolerante pode ser empregado no sentido de reduzir o consumo de fungicidas pela menor dose do ingrediente ativo e número de aplicações. A durabilidade dessa estratégia pela ausência ou baixa pressão seletiva no patógeno, além de que mecanismos de tolerância a *P. pachyrhizi* podem também ser eficientes contra outros patógenos, são características que apontam para a importância do entendimento da tolerância como uma alternativa promissora para o manejo de doenças na soja.

## 2.5. Melhoramento genético para tolerância a *P. pachyrhizi*

Um dos primeiros passos ao se iniciar o processo de melhoramento para uma determinada característica é a identificação de germoplasma contendo a característica de interesse. Para o melhoramento visando a tolerância ao fungo *P. pachyrhizi*, há a necessidade de uma triagem inicial (*screening*) do germoplasma disponível. A estimativa do nível de tolerância dos acessos disponíveis pode ser computada a partir de contrastes entre a performance de cada genótipo avaliado em parcelas protegidas por fungicidas e não protegidas (Hartman, 1995; Jarvie e Shanahan, 2009). Testes a campo para a avaliação da tolerância são facilitados pela ampla ocorrência da doença em praticamente todas as regiões produtoras do Brasil, diferentemente de outros estresses bióticos que necessitam de inoculação, onerando o processo de fenotipagem. Genótipos tolerantes são então cruzados entre si ou com genótipos elite de acordo com algum esquema de cruzamentos para gerar variabilidade genética. Quanto ao avanço de gerações, é pouco provável que a seleção precoce resulte em ganho genético para tolerância assim como é pouco eficiente para a produtividade. Assim, a seleção deve ser atrasada para gerações avançadas de endogamia. De acordo com Tukamuhabwa e Maphosa (2010), para explorar a tolerância em programas de melhoramento, linhagens de soja em fases avançadas devem ser avaliadas em várias zonas agroecológicas, amostrando locais nos quais a pressão da doença é assegurada. Índices podem então ser construídos permitindo a identificação de materiais de alta performance e tolerantes. O índice de tolerância a estresses (STI) têm

sido utilizado por pesquisadores do Centro Mundial de Pesquisa com Legumes (AVRDC) para identificação de linhagens tolerantes à ferrugem (Tukamuhabwa e Maphosa, 2010). As linhagens elite identificadas como tolerantes e que reúnem as demais características requeridas pelo mercado podem ser disponibilizadas como cultivares comerciais e/ou usadas em novos cruzamentos.

A produtividade de sementes pode ser definida como um “índice” formado pelos caracteres componentes: número de vagens por planta, número de sementes por vagem e peso de cem sementes, assumindo um estande ótimo de plantas. Assim, a tolerância também pode ser acessada via contrastes entre esses caracteres, especialmente o peso de cem sementes (Pereira et al., 2018). Mensurar a tolerância via peso de cem sementes pode ser vantajoso pela maior herdabilidade do caráter e, especialmente, em ensaios iniciais de competição de linhagens. Nesses experimentos, existe restrição na quantidade de sementes disponível ao pesquisador e, por isso, os experimentos são geralmente conduzidos com as novas entradas não replicadas. Todavia, a seleção de caracteres alvo com o objetivo de melhorar a tolerância é um processo que deve levar em consideração as correlações existentes entre os caracteres e possíveis efeitos desvantajosos, e.g., Vos e Willi (2015) observaram que plantas de *Arabidopsis lyrata* tolerantes a geada apresentavam menor tamanho na ausência do estresse.

Fenotipagem a campo para ferrugem está geralmente limitada a uma única vez ao ano, devido a disponibilidade do patógeno e restrições impostas pelo vazão sanitário. Como programas de melhoramento frequentemente realizam duas safras por ano, uma na presença e uma na ausência do patógeno, deve-se adequar as estratégias de avaliação e seleção de maneira a não penalizar os avanços no controle genético da doença enquanto se reduz o tempo para obtenção de linhagens elite para produtividade. Em adição, a natureza dessa característica e as dificuldades e custos de fenotipagem, uma vez que há necessidade de duplicar os experimentos, apontam para os benefícios do uso da predição genômica (Meuwissen et al., 2001). Estudos de predição genômica para a resistência quantitativa em importantes patossistemas estão disponíveis na literatura (Bao et al., 2015; Gowda et al., 2015), sugerindo a possibilidade de aplicação também no melhoramento para tolerância. Além disso, a seleção recorrente visando o aumento da frequência alélica de genes responsáveis por mecanismos relacionados a tolerância pode ser uma estratégia útil a longo prazo. Detalhes sobre a seleção recorrente em soja podem ser acessados nas publicações de Vello e Nazato (2017) e Lewers e Palmer (2010). Por fim, os ganhos em produtividade de grãos de genótipos de soja tolerantes comparados com as testemunhas suscetíveis são reportados oscilando entre 22 a 60% (Tschanz e Tsai, 1983; AVRDC, 1992).

## **2.6. Fenotipagem de alto rendimento no melhoramento de plantas**

Muito do progresso genético em espécies atualmente cultivadas deve-se ao melhoramento baseado em intensa avaliação fenotípica dos caracteres de interesse. Todavia, os crescentes custos envolvidos na fenotipagem clássica, aliados a eficiência reduzida e a acurácia nem sempre alta, sinalizam para a necessidade de novos meios de mensurar caracteres. Isso ganha ainda mais importância em espécies altamente melhoradas, nas quais o ganho genético é cada vez mais difícil de ser sustentado. De acordo

com Araus et al. (2018), a inabilidade de implementar a fenotipagem de alto rendimento (*high-throughput phenotyping*) de forma eficiente tem sido percebida como um componente chave que limita o ganho genético em programas de melhoramento. Nesse sentido, mais de 90 softwares baseados em análises de imagens foram desenvolvidos nos últimos anos com o objetivo de otimizar a tomada de dados fenotípicos. Eles podem ser consultados online por meio da base de dados *plant-image-analysis.org* (Lobet et al., 2013). Geralmente específicos para um determinado órgão da planta, esses softwares conseguem extrair informações de raiz (Le Bot et al., 2010), dossel (Hartmann et al., 2011), folha (Easlon e Bloom, 2014; Sayama et al., 2017), semente (Tanabata et al., 2012), entre outros, a partir de imagens RGB (*Red, green e blue*).

Além de análise de imagens no comprimento de onda visível do espectro eletromagnético, novos métodos de fenotipagem incluem diversas outras estratégias para extração de novas informações das unidades experimentais, e.g., uso de sensores multiespectrais, hiperespectrais, de fluorescência e termais. Essas informações podem ser coletadas manualmente, usando veículos adaptados, drones ou mesmo satélites. No processamento dos dados, há possibilidade de construção de índices como NDVI (*Normalized Difference Vegetation Index*), EVI (*Enhanced Vegetation Index*), GNDVI (*Green Normalized Difference Vegetation Index*) e reconstrução 3D das unidades experimentais. No entanto, Araus et al. (2018) salientam que o uso de imagens RGB tende a ser maximizado pelo baixo custo, alta resolução das câmeras, disponibilidade de softwares gratuitos e facilidade de aplicação. Em adição, resultados sugerem ser possível a obtenção de performance superior de índices baseados em imagens RGB comparados com NDVI para fenotipagem de alto rendimento (Kefauver et al., 2015). As aplicações de imagens de órgãos de plantas são comuns na literatura e inclusive utilizadas para mensurar a tolerância de plantas a doenças (Mikaberidze e McDonald, 2018).

A capacidade de melhoria das taxas de ganho genético por meio do uso da fenotipagem de alto rendimento têm sido reportada na literatura (Rutkoski et al., 2016; Crain et al., 2018). Isso se deve a melhoria na herdabilidade, conceito fundamental na pesquisa em melhoramento de plantas inicialmente introduzido por Sewall Wright e Ronald Fisher, além da possibilidade de otimização no tempo entre ciclos de seleção e quantidade de indivíduos sendo testados, ou seja, impacta positivamente a Eq. 1, anteriormente apresentada.

Na fenotipagem de sementes, a mensuração manual de características como as dimensões pode ser realizada via paquímetro digital, porém, existem restrições na quantidade de amostras que podem ser rapidamente processadas a um custo baixo, além da acurácia dos parâmetros estimados (Tanabata et al., 2012; Clohessy et al., 2018). Nesse sentido, a fenotipagem de alto rendimento de vários parâmetros 2D de conformação de sementes tem sido possível devido ao desenvolvimento recente de softwares (Tanabata et al., 2012; Moore et al., 2013; Whan et al., 2014), permitindo acessar várias características morfológicas até então pouco exploradas devido à dificuldade de avaliação manual, e.g. circularidade e perímetro das sementes.

Pesquisas demonstram a natureza quantitativa de caracteres morfológicos de semente de soja, com muitos QTLs envolvidos no controle genético (Salas et al., 2006; Niu et al., 2013; Hu et al., 2013;

Teng et al., 2017), além de independência genética entre tamanho e a conformação de semente (Hu et al., 2013). No caso da interação soja  $\times$  *P. pachyrhizij*, o estudo dos impactos da doença no tamanho e conformação das sementes pode trazer informações úteis ao melhoramento com vistas ao incremento da tolerância. Isso porque, em grande parte das regiões produtoras do Brasil, à ferrugem frequentemente ocorre nos estádios reprodutivos da soja, especialmente em R5 (Consórcio Antiferrugem, 2019) e, assim, os impactos na produtividade decorrem principalmente do enchimento incompleto das sementes ao invés de redução no número destas por planta. Portanto, justifica-se a fenotipagem das sementes como estratégia para mensurar os impactos da doença e obter informações novas e relevantes ao melhoramento da cultura. Em adição, a alta herdabilidade de caracteres de sementes em soja (Cober et al., 1997; Salas et al., 2006) favorecem a obtenção de informações sólidas quando comparadas àquelas obtidas pela avaliação unicamente da produtividade.

## 2.7. Análise espacial de experimentos agrícolas

Caracteres quantitativos tendem a ser diferencialmente expressos à medida que variáveis ambientais oscilam. A influência ambiental no desempenho genotípico ao longo dos locais de teste (i.e., interação genótipos  $\times$  ambientes) têm sido tema de inúmeras pesquisas no melhoramento da soja (Yan e Rajcan, 2002; Xavier et al., 2017; Matei et al., 2017; Zdziarski et al., 2018). No entanto, variações ambientais são frequentemente encontradas em escala menor, como por exemplo, dentro de um experimento agrícola conduzido a campo. Ajustar para essas tendências espaciais é essencial para a correta avaliação e seleção de genótipos em experimentos de melhoramento (Velazco et al., 2017). A maneira mais comum de controle a priori da variabilidade espacial em uma área experimental é por meio do uso de blocos. Todavia, essa estratégia é falha em alguns aspectos relacionados a posição que cada bloco deve ocupar na área e em capturar a variação intrabloco. Em experimentos agrícolas, variáveis alvo, e.g., produtividade de grãos e óleo, geralmente possuem valores dispostos em duas dimensões no campo experimental (linha e coluna). Esses valores oscilam no espaço do layout experimental (variação espacial) e possuem correlação entre si em nível local e global (dependência espacial). Variações em larga e pequena escalas são comuns em dados de experimentos de campo com parcelas pequenas (Gilmour et al., 1997). Isso ocorre, pois, vários fatores podem produzir gradientes ao longo do campo experimental (e.g., fertilidade, disponibilidade hídrica, profundidade do solo e presença de rochas) e precisam ser contabilizados para uma melhor estimação dos parâmetros do modelo, minimizando a variância residual. Parte das variações podem ser atribuídas a efeitos sistemáticos como o efeito de linhas e colunas e podem ser facilmente contabilizadas em modelos estatísticos. Usualmente, essas variações ditas estranhas, i.e., introduzidas por operações experimentais, são modeladas por meio do efeito aleatório de linha e coluna (Burgueño et al., 2000). Por outro lado, variação espacial aleatória como a existência de padrões de fertilidade na área é difícil de ser modelada (Rodríguez-Álvarez et al., 2018).

Variação espacial é uma característica comum em experimentos agrícolas de campo, principalmente no melhoramento de plantas, em que grandes quantidades de genótipos são comparados

(Velazco et al., 2017; Rodríguez-Álvarez et al., 2018). Um problema central confrontado pelos melhoristas quando comparam genótipos em experimentos de campo é que a produtividade de um genótipo é notavelmente afetada pelas condições presentes aonde a parcela está localizada, particularmente devido a umidade do solo e fertilidade (Gleeson, 1997). Várias estratégias para contabilizar as variações espaciais foram desenvolvidas desde o surgimento do interesse em corrigir para eventuais tendências na área experimental. Inicialmente, foi proposta a ideia de ajustar a performance de uma parcela devido a variabilidade espacial usando para isso informações das parcelas circunvizinhas (Papadakis, 1937; Wilkinson et al., 1983). Na sequência, foram apresentadas metodologias que, de maneira geral, se baseiam em estruturas de variância-covariância espacial (Gilmour et al., 1997; Piepho e Williams, 2010) e técnicas de suavização [*smoothing*] (Verbyla et al., 1999; Rodríguez-Álvarez et al., 2018). Gilmour et al. (1997) propôs um procedimento de análise espacial que é muito utilizado atualmente e baseia-se no produto direto da estrutura de correlação autoregressiva (AR) para linhas e colunas ( $AR1 \times AR1$ ) de maneira a acomodar as tendências locais da área experimental, enquanto que variações globais ao longo do campo são modeladas, por exemplo, em única dimensão via splines cúbicas no sentido de linhas e colunas. Todavia, de acordo com Velazco et al. (2017), esse procedimento apresenta limitações devido a necessidade de múltiplos passos para a análise, risco de super ajuste (*over-fitting*) no processo de seleção de modelos e problemas de convergência.

Diferentemente de experimentos nos quais as parcelas possuem replicatas e a precisão aumenta à medida em que mais repetições são adicionadas, melhoristas frequentemente conduzem experimentos em que cada novo genótipo é representado por apenas uma única parcela. Nas gerações precoces em programas de melhoramento, os benefícios do uso de repetições são menos claros já que o interesse principal é o ranqueamento dos genótipos ao invés de predizer a sua performance produtiva (Kempton e Gleeson, 1997). Além disso, existe restrição na quantidade de sementes disponíveis para a execução de experimentos com repetições. Assim, delineamentos experimentais frequentemente utilizados em gerações precoces possuem parcelas com repetições de variedades padrões (testemunhas) distribuídas em meio a parcelas sem repetições das linhagens sendo testadas (Federer, 1956; Cullis et al., 1989). A expansão da análise espacial de experimentos com tratamentos replicados para a situação de uma única parcela dos genótipos testados e várias das testemunhas foi proposta por Cullis et al. (1989), modelando as tendências por meio de um processo ARIMA (*autoregressive integrated moving average*). Mesmo sem repetições, a produtividade dos genótipos testados pode prover informação interna ao experimento sobre a variação espacial, o que pode conduzir a uma maior eficiência da seleção (Cullis et al., 1992).

O melhoramento genético de plantas tem movido em direção a execução de predições de indivíduos não fenotipados devido à redução acentuada nos custos para genotipagem, bem como maior poder computacional e existência modelos sofisticados de análise de dados. Assim, a obtenção de dados fenotípicos mais precisos, os quais serão utilizados para treinar os modelos de predição, é crucial e vem sendo tema de pesquisas científicas. Além da coleta de dados otimizada a partir do uso de técnicas de fenotipagem de alto rendimento, informações fenotípicas acuradas também dependem do controle para variabilidade espacial na área experimental. Moreau et al. (1999) mostraram, a partir de dados de

experimentos sem repetições, que quando considerada a heterogeneidade espacial por meio de modelos estatísticos apropriados, a acurácia da predição dos valores genéticos apresenta melhoras e algum ganho genético pode ser alcançado com um reduzido número de experimentos. Também, Lado et al. (2013) observaram que a correção para a variabilidade espacial é um ingrediente crucial para o aumento da acurácia de predição em modelos de seleção genômica. Por fim, os métodos de modelagem das correlações espaciais tem permitido aos experimentadores obter estimativas mais precisas dos efeitos de tratamentos e/ou reduzir o número de repetições, podendo também fornecer análises confiáveis de experimentos sem repetições (Payne, 2006).

### 2.7.1. Correção espacial via splines bidimensionais

Para experimentos exibindo variabilidade espacial dentro da área, boas predições do mérito genético requerem modelos que estimem e particionem de maneira acurada os efeitos espaciais da fonte de variação genética (Robbins et al., 2012). O uso de splines bidimensionais na correção de tendências espaciais têm sido reportada na literatura como uma estratégia robusta e superior aos métodos clássicos de análise espacial (Robbins et al., 2012; Velazco et al., 2017). Inicialmente, regressões spline são funções de ajuste de curvas eficientes compostas por partes polinomiais, geralmente quadráticas ou cúbicas, que são unidas por pontos chamados “nós” (Velazco et al., 2017). Existe um número ótimo de nós que leva a uma quantidade de suavização (*smoothing*) que evita o sub ou super-ajuste dos dados (Griggs, 2013). Esse número ótimo é aproximado por meio de uma função de penalização sobre os coeficientes, forçando-os a variar suavemente (Eilers e Marx, 2003), diferente da penalidade que encolhe os coeficientes de regressão em direção a zero na *ridge regression*. Na estrutura de spline penalizada (P-spline), a função bivariada de suavização  $f(u_i, v_j)$  definida sobre as posições de linha ( $u_i$ ) e coluna ( $v_j$ ) é modelada pelo produto tensor de bases B-spline (Dierckx, 1993). Essa penalização é ajustada por um ou mais parâmetros de suavização que controlam o grau de suavidade da superfície espacial ajustada de maneira a evitar o super ajuste (Velazco et al., 2017). Os valores ótimos para os parâmetros de suavização são razões de variâncias estimadas a partir dos dados por REML (máxima verossimilhança restrita). O que torna o método interessante para a análise de experimentos agrícolas é a conectividade entre P-spline e modelos mistos, permitindo a inclusão de efeitos fixos e aleatórios adicionais, e.g., efeito de genótipos (Rodríguez-Álvarez et al., 2018). Para detalhes adicionais sobre a formulação e o uso de splines, os leitores são aconselhados a consultar Dierckx (1993), Eilers e Marx (2003), Lee et al. (201), Griggs (2013) e Rodríguez-Álvarez et al. (2018).

Aplicações da correção espacial via regressão P-spline têm sido destacadas na literatura com características vantajosas em relação aos demais métodos. O modelo SpATS proposto por Rodríguez-Álvarez et al. (2018) integra o modelo misto clássico com a regressão P-spline fornecendo, para cada componente do modelo sendo ajustado, um valor de dimensão efetiva ( $ED_k$ ), i.e., uma medida da complexidade do componente do modelo, no qual valores iguais a zero indicam que o referido componente não contribui na variabilidade da variável resposta. Além disso, quando o efeito genotípico é

incluído no modelo como aleatório, a herdabilidade generalizada (Oakey et al., 2006; Rodríguez-Álvarez et al., 2018) pode ser computada pela divisão da dimensão efetiva associada ao efeito de genótipo pelo número efetivo de genótipos menos um. Velazco et al. (2017) mostrou que o modelo SpATS produziu previsões dos valores genéticos equivalentes ao modelo mais elaborado disponível para análise espacial. Os autores ainda salientam que a maior vantagem reside no fato de que as tendências locais e globais na área experimental são modeladas em um mesmo passo, simplificando o processo de seleção de modelo. Um pacote escrito em linguagem R denominado SpATS está disponível para o ajuste de modelos via splines penalizadas para dados de experimentos agrícolas com informações de linha e coluna (Rodríguez-Álvarez et al., 2018).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Germoplasma avaliado e delineamento genético

O material vegetal avaliado nesta pesquisa é não-transgênico e originou-se de um programa de seleção recorrente estabelecido no Setor de Genética Aplicada às Espécies Autógamas (SGAEA), localizado no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, em Piracicaba – SP. Especificamente, as etapas abrangidas nesta pesquisa referem-se a conclusão do segundo ciclo de seleção recorrente (Figura 1). As 64 populações de soja utilizadas na pesquisa são derivadas de cruzamentos dialélicos entre 16 linhagens de soja e pertencem ao programa codificado nos registros do SAGEA pelo número 42. Os genitores possuem grupo de maturação compreendido entre 6.6 e 8.4. Os cruzamentos biparentais foram realizados em ambiente controlado no ano agrícola de 2010/11 obedecendo ao delineamento genético de dialelos parciais entre dois grupos de genitores, cada grupo com oito genitores e apresentando um conjunto de características agronômicas únicas. As populações segregantes foram avançadas em direção à endogamia na ausência de seleção artificial e natural. Isso foi possível por meio do emprego do método de descendência de sementes múltiplas (MSD - *multiple seed descent*). Nesse método, todas as plantas de uma determinada geração de endogamia foram trilhadas individualmente e um número igual de sementes de cada planta foi amostrado e posteriormente misturado para ser utilizado na geração subsequente. Assim, todos os indivíduos apresentaram a mesma probabilidade de serem amostrados e compõem a geração posterior. Maiores detalhes a respeito da linha do tempo do programa de melhoramento conduzido podem ser consultados na Figura 2. Resultados experimentais das avaliações realizadas ao longo do avanço de gerações até F<sub>4</sub> foram publicados por Rocha (2016) e Rocha et al. (2018).

#### 3.2. Estratégia para o manejo da ferrugem asiática da soja

Antes de serem detalhados os experimentos conduzidos ao longo dos três anos agrícolas, é importante apresentar a estratégia adotada para acessar o nível de tolerância dos genótipos estudados. Todos os experimentos executados foram conduzidos em duplicata (ver Figura 2), i.e., duas cópias do mesmo experimento foram implantadas de forma adjacente e diferindo apenas para a exposição ao patógeno *P. pachyrhizii*. Essa tática foi adotada em substituição às parcelas subdivididas devido à grande quantidade de tratamentos sendo avaliados, além de que esse delineamento implicaria em restrição à aplicação mecanizada de fungicidas. Tomaram-se as devidas precauções de forma a manter todas as condições ambientais homogêneas entre os experimentos adjacentes, exceto a exposição ao estresse causado pelo fungo *P. pachyrhizii*, minimizando assim um possível confundimento do efeito da ferrugem com diferenças na área. Dois manejos de exposição das plantas a doença foram adotados: i) Man.1 (ausência da ferrugem): nesse manejo, foram efetuadas pulverizações alternando princípios ativos dos grupos químicos triazol (DMI) [epoxiconazol 50 g L<sup>-1</sup>], estrobirulina (QoIs) [piraclostrobina 133 g L<sup>-1</sup> e

azoxistrobina 300 g ka<sup>-1</sup>] e carboxamida (SDHIs) [benzovindiflupir 150 g kg<sup>-1</sup>], e ii) Man.2 (presença da ferrugem): nesse manejo, foram efetuadas pulverizações de fungicida contendo o princípio ativo carbendazim 500 g L<sup>-1</sup>, pertencente ao grupo químico dos Benzimidazóis. Esse princípio ativo não apresenta efeito aparente no desenvolvimento do patógeno causador da ferrugem, fato comprovado por uma série de experimentos previamente executados pela equipe do SGAEA. Todavia, esse fungicida possui efeitos satisfatórios no controle das demais doenças corriqueiras da soja, incluindo o complexo de doenças de final de ciclo (DFCs). As doses utilizadas nas aplicações seguiram as recomendações dos fabricantes. As aplicações foram realizadas de acordo com intenso monitoramento das áreas e visando assegurar o controle eficaz do patógeno no Man.1 e das demais doenças no Man.2. O desempenho dos genótipos nos dois manejos foi utilizado para a construção de índices de forma a mensurar o efeito da ferrugem nos caracteres. Por fim, a infecção pelo fungo *P. pachyrhizi* se deu por vias naturais nos três anos agrícolas.

### 3.3. Delineamento experimental e estratégias de experimentação

Todas as práticas de manejo adotadas nos experimentos seguiram as recomendações técnicas para o cultivo da soja na região (EMBRAPA, 2013; RPSRS, 2014). Preferencialmente, o controle de lepidópteras foi realizado por meio do controle biológico utilizando o inseto *Trichogramma pretiosum* (100.000 pupas cartela<sup>-1</sup>). Em adição, todos os experimentos receberam fertilização na base na quantidade de 400 kg ha<sup>-1</sup> da formulação 02-20-20 (N-P-K) e irrigação por aspersão logo após a semeadura e em momentos de menor oferta hídrica natural no decorrer do ciclo da cultura. Foi adotado o tamanho padrão de parcelas igual a um metro quadrado (uma linha de dois metros e espaçamento de 0,50 m entre linhas) com densidade de semeadura igual a 30 sementes por metro linear, almejando estande de plantas igual a 50 plantas por parcela. Bordaduras foram adicionadas em todas as direções de maneira a evitar o favorecimento das parcelas próximas aos corredores de passagem do trator agrícola e extremidades dos experimentos. As operações de semeadura seguiram o sistema convencional e as colheitas foram realizadas de forma manual, sendo a debulha executada com auxílio de uma trilhadora estacionária.

Dois locais de experimentação foram utilizados para a execução da presente pesquisa, ambos localizados em áreas experimentais próprias do Departamento de Genética da ESALQ/USP. O local 1 (22°50'27,1"S e 48°01'24,9"W; altitude de 545 m) está situado na Fazenda São João da Montanha, local sede da ESALQ, e apresenta solo com teores mais elevados de argila (Figura 3). O local 2 (22°42'15,2"S e 47°38'24,6"W; altitude de 460 m) está situado na Estação Experimental de Genética Anhumas e apresenta solo com textura moderadamente arenosa, sendo um ambiente aonde frequentemente obtém-se altas produtividades de soja. Ambos os locais de experimentação estão situados no município de Piracicaba – SP e distantes em aproximadamente 42 km (linha reta). Embora próximos, o local 1 encontra-se na ecorregião Florestas do Interior do Paraná/Paranaíba enquanto que o local 2 está situado na ecorregião Cerrado (Borsato et al., 2015 [ver Apêndice A para detalhes das ecorregiões]); duas importantes regiões de produção de soja do país. Em adição, ambos os locais pertencem à macro região sojícola 2, região

edafoclimática 203 (Kaster e Farias, 2012 [ver ANEXO A para detalhes das regiões de adaptação]). O clima da região é classificado como Cfa (clima subtropical, com verão quente e ausência de estação seca) de acordo com Köppen e a precipitação média anual de 1.268 mm (LEB-ESALQ, 2019).

Em todos os experimentos conduzidos ao longo dos três anos agrícolas, foram utilizadas as mesmas cultivares testemunhas BRS 133 (FT-Abyara × BR83-147), IAC 100 (IAC 78/2318 × IAC 12) e a linhagem experimental CB 07-958-B cedida pela empresa Tropical Melhoramento e Genética (TMG). Por fim, as três testemunhas apresentaram sinais e sintomas da ferrugem em todos os anos de avaliação.

### 3.3.1. Experimentação das populações segregantes

As 64 populações na geração F<sub>5</sub> de endogamia foram avaliadas no ano agrícola de 2015/16 em dois locais contrastantes (Figura 2). A semeadura dos experimentos foi realizada entre os dias 11 e 12 de outubro de 2015 no local 1 e no dia 19 de outubro de 2015 no local 2. Em cada local/manejo da ferrugem, as populações foram dispostas na área experimental em delineamento de blocos completos casualizados (DBC) com quatro repetições. Devido às dimensões acentuadas, cada bloco foi dividido em dois conjuntos experimentais compartilhando três testemunhas em comum, com a finalidade de capitalização e correção a posteriori de possíveis heterogeneidades na área experimental. Portanto, cada experimento foi composto por 280 parcelas, sendo 256 referentes às populações e 24 de testemunhas espaciais. No total, 1.120 parcelas foram conduzidas em 2015/16 para avaliação das progênies F<sub>5</sub>.

### 3.3.2. Seleção fenotípica de plantas

Foi efetuada a seleção de plantas na geração F<sub>5</sub> de endogamia de maneira balanceada em cada uma das populações quando, na média da parcela, as plantas atingiram o estágio R8 (Fehr e Caviness, 1977). Nessa geração, a variância genética ( $\sigma_g^2$ ) dentro da unidade de seleção é igual a  $15/8 \sigma_A^2 + 15/64 \sigma_D^2$ . A seleção foi efetuada nos dois locais e apenas nos experimentos com presença da doença (Man.2). Foram selecionadas cinco plantas fenotipicamente superiores em cada unidade experimental, totalizando 40 plantas de cada progênie F<sub>5</sub>. No processo de seleção, as plantas das extremidades da parcela e aquelas localizadas imediatamente ao lado de falhas de estande foram desconsideradas. As plantas selecionadas eram marcadas com tinta spray vermelha e posteriormente destacadas. Após alguns dias de secagem em temperatura ambiente e em local sombreado, as plantas eram então trilhadas mecanicamente. Por fim, o total de plantas selecionadas foi de 2.560 (1.280 plantas por local), as quais foram trilhadas individualmente e tiveram as respectivas massas de sementes computadas. O valor da massa de sementes das plantas selecionadas foi adicionado a produção da parcela para fins de cálculo da produtividade. Na segunda etapa de seleção, as seis plantas com maior produção de sementes (massa em gramas) por local/população foram então identificadas e deram origem às 768 novas linhagens F<sub>5;6</sub> (96,874% dos loci em homozigose). Com a quantidade de sementes produzida por planta, foi possível conduzir duas unidades experimentais padrões na safra subsequente, sendo uma para cada manejo da doença.

### 3.3.3. Experimentação das linhagens

A performance das linhagens  $F_{5,6}$  selecionadas foi testada no ano agrícola de 2016/17 no delineamento de blocos aumentados [delineamento II de Federer; (Federer, 1956)]. A semeadura dos experimentos foi realizada nos dias 07 e 08 de novembro de 2016. Os experimentos foram desenhados de forma a conterem 32 blocos, cada qual com 25 novas entradas (linhagens) e aumentado com mais três testemunhas para captar a variância interblocos, totalizando 864 unidades experimentais (768 de novas entradas + 96 de testemunhas). A quantidade de testemunhas representa 12,50% do total de entradas do bloco. Assim como foi realizado com as populações, o experimento das linhagens foi duplicado e os manejos da doença Man.1 e Man.2 foram implementados. Portanto, um total de 1.728 unidades experimentais foram avaliadas nos experimentos de performance das linhagens em 2016/17. Essas parcelas foram dispostas em um grid de 44 fileiras por 24 colunas no Man.1 e 38 fileiras por 25 colunas no Man.2. Essas informações de posição linha-coluna foram posteriormente utilizadas para correção de variações espaciais. Além disso, vale destacar que todas as práticas e operações experimentais foram executadas de maneira a proporcionar a menor heterogeneidade possível dentro dos blocos.

De posse dos resultados dos caracteres avaliados na safra 2016/17, principalmente para altura de plantas, acamamento, valor agrônômico (ver sessão caracteres avaliados) e performance produtiva, 256 linhagens  $F_{5,7}$  (33,33% de intensidade de seleção) foram selecionadas para o segundo ano de teste (safra 2017/18). Essa seleção foi realizada de maneira balanceada, i.e., foram selecionadas as quatro melhores linhagens por cruzamento. Os experimentos foram implantados nos dias 22 e 23 de novembro de 2017. O delineamento experimental adotado foi DBC, com quatro repetições. Novamente, os blocos foram estratificados em conjuntos experimentais, cada qual compartilhando três testemunhas em comum a fim de capitalizar qualquer variação intrabloco de natureza não genética. Nos dois anos de experimentação das linhagens, os experimentos foram conduzidos no local 1 (Figura 2). Esse experimento foi conduzido em um momento de escassez de recursos humanos para realizar as avaliações e o principal intuito foi a multiplicação e renovação das sementes. Portanto, trata-se de um experimento de caráter adicional no qual apenas a produtividade de sementes foi computada. As informações geradas com esse experimento foram utilizadas para complementar análises realizadas com os experimentos das safras anteriores.

### 3.3.4. Experimentação dos genitores

De forma anexa a cada experimento executado ao longo dos três anos agrícolas, foi conduzido um experimento padrão contendo os 16 genitores do dialelo, acrescido das três testemunhas. Como uma das testemunhas também era genitor, esse genótipo teve o número de observações por experimento duplicado. Os tratamentos foram delineados em DBC, cada um contendo três repetições. Portanto, cada experimento foi composto por 57 unidades experimentais. No total, esse experimento padrão foi repetido oito vezes no decurso dos três anos agrícolas e ao longo dos dois locais, somando 456 unidades experimentais avaliadas. Por terem sido conduzidos em multi-ambiente e constituídos por genótipos

homozigotos, esses ensaios foram essenciais no estudo do efeito da interação genótipos  $\times$  ambientes ( $G \times E$ ) na expressão da tolerância ao fungo *P. pachyrhizii*.

### 3.4. Caracteres avaliados

A escala de estádios de desenvolvimento fenológico proposta por Fehr e Caviness (1977) foi utilizada de maneira a padronizar o momento das avaliações dos caracteres. Nas avaliações das populações segregantes e para aqueles caracteres mensurados a campo, utilizou-se a média de cinco plantas para a obtenção do valor final da parcela. Na sequência são apresentados os caracteres mensurados:

- i) Produtividade de sementes [PS]: massa de sementes de cada parcela mensurada após secagem em temperatura ambiente (até  $\approx 13\%$  de umidade) e extrapolada para  $\text{kg ha}^{-1}$ ;
- ii) Valor agrônômico [VA]: escores de 1 a 5 conferidos a cada unidade experimental como reflexo da atratividade das plantas que compõem a parcela para os atributos que definem um ideótipo de soja (e.g., grande quantidade de vagens, porcentagem de vagens com três sementes em relação ao total, arquitetura de planta compatível com operações mecanizadas e ausência de retenção foliar). Parcelas com escore igual a um indicam plantas agronomicamente inadequadas e alta probabilidade de a performance produtiva ser insatisfatória. Por outro lado, parcelas com escore igual a cinco são constituídas de plantas agronomicamente excepcionais e tendência de alto desempenho produtivo. Em síntese, esse caráter reflete o “olho do melhorista” quando este executa o processo de seleção dos melhores genótipos a campo.
- iii) Peso de cem sementes [PCS]: massa de 100 sementes amostradas aleatoriamente do total de sementes produzidos por cada unidade experimental e expresso em gramas. Esse caráter é um indicativo do tamanho de sementes e é altamente impactado pela ocorrência da ferrugem;
- iv) Dias da emergência a maturação [DEM]: número de dias entre a emergência e o estágio de maturação plena R8;
- v) Altura de planta [AP]: altura em cm da interface solo-planta até a extremidade da haste principal mensurada quando as parcelas atingiram o estágio R8;
- vi) Escores de acamamento [ACM]: escores de um a cinco conferidos a cada unidade experimental sendo um para plantas totalmente eretas e cinco para plantas totalmente acamadas, i.e., tocando completamente o chão;
- xii) Estande de plantas na parcela [STD]: escores de um a cinco conferidos a cada unidade experimental no momento em que ela atingiu o estágio R8. Parcelas com escore igual a um indicam muitas falhas de estabelecimento do estande (até quatro plantas por metro linear), ao passo que unidades experimentais com estande igual a cinco indicam uma parcela uniforme e completa. Esse caráter foi utilizado para o eventual descarte de parcelas (estande  $\leq$  dois) e correção da performance produtiva para o estande ideal;

- viii) Severidade da ferrugem [SEV]: escores de um a seis conferidos a cada unidade experimental como medida da severidade da ferrugem avaliada de acordo com a escala diagramática proposta por Godoy et al. (2006) [vide ANEXO B] e avaliada três vezes durante o ciclo da cultura, com intervalos de cerca de sete dias e início no estágio R5.1 (apenas para os experimentos com presença da doença [Man.1]);
- iv) Volume de sementes [VOL]: as mesmas amostras de sementes utilizadas para mensurar o PCS foram mergulhadas em provetas graduadas contendo um volume conhecido de água. A diferença de volume antes e após a imersão das sementes indica o volume das cem sementes expresso em  $\text{cm}^3$ ;
- x) Densidade de sementes [DEN]: a densidade foi computada pela divisão PCS pelo VOL e expressa em  $\text{g}/\text{cm}^3$ ;
- xi) Número de dias para o estágio R5 [DR5]: número de dias entre a emergência e o início da granação ou enchimento de grãos (estádio R5);
- xii) Número de dias para o estágio R7 [DR7]: número de dias entre a emergência e o início da maturação (estádio R7);
- xiii) Período de granação ou enchimento de grãos (R5 a R7) [EG]: esse caráter compreende a quantidade de dias dedicados pelas plantas ao enchimento de grãos e é obtido subtraindo DR5 de DR7. Trata-se de um caráter altamente influenciado pela ferrugem devido à redução na área foliar fotossinteticamente ativa e, conseqüentemente, senescência acelerada;
- xiv) Escore de área foliar [EAF]: escores de um a seis para o volume de folhas no dossel da parcela dado em R6. Parcelas com índice igual a seis apresentaram alta biomassa aérea em termos de quantidade de folhas. Esse foi um caráter adicional avaliado apenas em 2016/17 para verificar a existência de correlação com a tolerância.

A partir das amostras de cem sementes utilizadas para mensurar o caráter PCS, foram obtidas imagens RGB utilizando uma câmera digital de 8 mpx. Inicialmente, foi desenvolvida uma estrutura de madeira capaz de acomodar a câmera na parte superior e a amostra de sementes na base (Figura 4.A). Outra estrutura laminar foi desenvolvida contendo 100 pontos côncavos rasos para acomodar as sementes de tal maneira que evitasse o contato físico entre elas. Nessa estrutura, também há uma graduação em centímetros que serve como escala para o cálculo das dimensões reais das sementes e padronização quando a distância entre a câmera e a amostra varia. As imagens coletadas eram salvas em uma pasta e renomeadas com a identificação da parcela no campo. No total, foram capturadas 2.184 fotografias. No processamento dessas imagens, foi utilizado o software SmartGrain para fenotipagem de alto rendimento de sementes (Tanabata et al., 2012). A rotina implementada no software e escrita em Visual C++ possibilita a avaliação de parâmetros de tamanho e conformação de cada semente da amostra e fornece, no arquivo de saída, os dados individualizados e na média (mais desvio padrão) de todas as sementes presentes na amostra fotografada. Assim, os seguintes caracteres foram mensurados (ver também Figura 4):

- xv) Área de semente [AS]: medida do tamanho 2D da semente dentro do perímetro e expresso em mm<sup>2</sup>;
- xvi) Perímetro de semente [PL]: medida do tamanho do contorno da semente e expressa em mm;
- xvii) Comprimento de semente [L]: o comprimento é mensurado a partir da detecção da máxima distância entre pontos do perímetro da semente e expresso em mm;
- xviii) Largura de semente [W]: a largura é mensurada como a maior distância entre dois pontos do perímetro perpendicular a L e também é expresso em mm;
- xix) Relação comprimento/largura [LWR]:  $LWR = L/W$  fornece um indicativo da conformação da semente;
- xx) Circularidade de semente [CS]: calculado pela expressão  $CS = 4\pi(AS)/PL^2$ ; trata-se de uma medida da proximidade com que a semente se assemelha a um círculo. Os valores podem oscilar de zero a um, sendo um a semente com aspecto semelhante a um círculo perfeito. Se a semente apresenta protuberâncias em sua superfície, é esperado que os valores de CS sejam reduzidos (Cervantes et al., 2016).
- xxi) Distância entre IS e CG [DS]: distância entre a intersecção L e W (IS) com o centro de gravidade da semente (CG) expressa em mm. Esse caráter também mede variações na conformação da semente.

As populações F<sub>5</sub> foram avaliadas para os caracteres listados entre um e dez. Na safra seguinte, os caracteres um a 14, excluindo o nove e o dez, foram avaliados nas linhagens F<sub>5,6</sub>. Em adição, todas as unidades experimentais desse ano foram avaliadas para os sete caracteres de tamanho e conformação de sementes por meio das imagens digitais. Logo, 1,728 fotos foram capturadas, totalizando 172,800 sementes analisadas. Por fim, os experimentos contendo os genitores foram avaliados para a maior parte dos caracteres como está detalhado na Tabela 1.

Para aqueles experimentos nos quais foi avaliada a severidade da doença (SEV), foi computada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença [AACPD] (Shaner, 1977) de acordo com a equação Eq. 2.

$$AACPD = \sum_{i=1}^{N_i-1} \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i) \quad [\text{Eq. 2}]$$

sendo o termo  $(y_i + y_{i+1})/2$  correspondente à média de severidade da doença entre duas avaliações consecutivas, multiplicado pela diferença de tempo  $(t_{i+1} - t_i)$  entre estas duas avaliações. Para o cálculo, os escores foram convertidos para porcentagem de severidade de acordo com a escala diagramática proposta por Godoy et al. (2006) [ANEXO B].

Para a avaliação do nível de tolerância intrínseco de cada genótipo em resposta à doença, dois índices de tolerância a estresses frequentemente utilizados na literatura foram empregados. O primeiro consiste do índice de tolerância a estresses [STI] (Fernandez, 1992) computado pela fórmula  $STI = Y_s \times Y_{ns} / \bar{Y}_{ns}^2$  e o segundo no índice de estabilidade para um dado caráter [YSI] (Bousslama e Schapaugh, 1984) mensurado pela expressão  $YSI = Y_s / Y_{ns}$ , na qual  $Y_s$  é a performance de um dado genótipo sob estresse e  $Y_{ns}$  é a situação oposta. Esses índices, bem como inúmeros outros, são rotineiramente empregados em estudos de avaliação da tolerância de genótipos a estresses abióticos, principalmente em testes de tolerância a seca (Thiry et al., 2016). Todavia, são perfeitamente adaptáveis para a avaliação da tolerância a estresses de natureza biótica.

### 3.5. Análises estatísticas

Os subitens que seguem esse tópico foram estruturados de maneira a detalhar todas as análises estatísticas e técnicas de visualização de dados implementadas ao longo do manuscrito. Optou-se por separar os diferentes métodos em três sessões, as quais detalham as análises dos experimentos envolvendo as populações F<sub>5</sub>, as linhagens experimentais e os genitores, porém, conectando as três sessões no decorrer das discussões. Após tabulados, todos os dados passaram por uma cautelosa avaliação em busca de valores discrepantes (*outliers*) e inconsistências, além de testes para examinar as premissas dos modelos, principalmente por meio de gráficos de diagnóstico (e.g., Q-Q plot e resíduos  $\times$  ajustados) visando observar a normalidade dos resíduos, homocedasticidade e independência. Todos os procedimentos estatísticos foram executados usando a linguagem de programação R, por meio do software RStudio (R Core Team, 2018).

#### 3.5.1. Análises estatísticas das populações F<sub>5</sub>

Inicialmente, foi executada a etapa de correção para o estande ideal naquelas unidades experimentais em que ocorreu algum problema no estabelecimento normal das plantas. A correção para o estande ideal foi feita a partir de um fator de compensação estimado dos dados (Vencovsky e Cruz, 1991). Na sequência, a análise das populações foi dividida em dois estágios. No primeiro estágio, foi executada uma análise individual para cada um dos quatro experimentos segundo o modelo apresentado na Eq. 3 e considerando genótipos como de efeito fixo. A Eq. 3 integra o modelo misto clássico com a análise espacial via regressão penalizada P-Spline e foi ajustado usando o pacote em R SpATS (Rodríguez-Álvarez et al., 2018).

$$\mathbf{y} = f(\mathbf{u}, \mathbf{v}) + \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_\gamma\boldsymbol{\gamma} + \mathbf{Z}_b\mathbf{b} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad [\text{Eq. 3}]$$

em que,  $\mathbf{y}$  é o vetor das observações fenotípicas,  $\boldsymbol{\beta}$  é o vetor dos termos considerados fixos incluindo o intercepto e genótipo (populações mais testemunhas), sendo a matriz  $\mathbf{X}$  a que atribui as observações aos efeitos fixos. O vetor  $\boldsymbol{\gamma}$  compreende os subvetores mutualmente independentes referentes aos efeitos

aleatórios de linha e coluna, com matriz de delineamento  $\mathbf{Z}_\gamma = [\mathbf{Z}_u | \mathbf{Z}_v]$  e matriz de covariância  $\mathbf{U} = \text{diag}(\sigma_u^2 \mathbf{I}_u, \sigma_v^2 \mathbf{I}_v)$ . O vetor  $\mathbf{b}$  refere-se ao efeito de bloco e conjunto dentro de bloco, considerados aleatórios e com matriz de incidência  $\mathbf{Z}_b$ . O vetor  $\boldsymbol{\varepsilon}$  refere-se aos resíduos espacialmente independentes e assumidos como  $\boldsymbol{\varepsilon} \sim N(\mathbf{0}, \sigma_\varepsilon^2 \mathbf{I})$ . A função de suavização  $f(\mathbf{u}, \mathbf{v})$  é igual à soma dos termos  $\mathbf{X}_s \boldsymbol{\beta}_s + \mathbf{Z}_s \mathbf{s}$  (Velazco et al., 2017), sendo a expressão da superfície espacial suavizada no formato compatível com o modelo misto. No processo de ajuste do modelo, foi definido o número máximo de interações em 300, com as estimativas dos efeitos fixos e aleatórios sendo atualizadas a cada interação até a convergência. Com o efeito das progênies considerado como fixo, foram estimados os BLUEs (melhor estimador linear não viesado). Quando o efeito das progênies foi considerado aleatório, a herdabilidade generalizada  $H_g^2$  foi computada pelos valores de dimensão efetiva do efeito de genótipos ( $ED_g$ ) assim como descrito por Rodríguez-Álvarez et al. (2018) e apresentado na Eq. 4.

$$H_g^2 = \left( \frac{ED_g}{m_g - 1} \right) \quad [\text{Eq. 4}]$$

em que,  $m_g$  representa o número efetivo de genótipos analisados. Os valores de herdabilidade de cada caráter e em cada ambiente acrescido da média do experimento e da soma das dimensões efetivas oriundas da variabilidade espacial foram apresentados na forma de tabelas.

Para cada um dos quatro experimentos conduzidos em 2015/16, obteve-se um vetor com os BLUEs de tamanho  $m \times n$  igual a  $64 \times 1$  observações por caráter. Esses dados foram explorados por meio da análise dialélica multi-ambiente para o esquema de dialelos parciais, constituindo o segundo estágio da análise. Os componentes de variância devido a capacidade geral de combinação (CGC) e capacidade específica de combinação (CEC) foram estimados de acordo com o modelo descrito na Eq. 5.

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}_{CGCg1}\mathbf{u}_{CGCg1} + \mathbf{Z}_{CGCg2}\mathbf{u}_{CGCg2} + \mathbf{Z}_{CEC}\mathbf{v}_{CEC} + \mathbf{Z}_{CGCg1*local}\mathbf{u}_{CGCg1*local} + \mathbf{Z}_{CGCg2*local}\mathbf{u}_{CGCg2*local} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad [\text{Eq. 5}]$$

em que:

$$\mathbf{u}_{CGCg1} \sim NID(\mathbf{0}, \mathbf{G}_{CGCg1}),$$

$$\mathbf{u}_{CGCg2} \sim NID(\mathbf{0}, \mathbf{G}_{CGCg2}),$$

$$\mathbf{v}_{CEC} \sim NID(\mathbf{0}, \mathbf{G}_{CEC}),$$

$$\mathbf{u}_{CGCg1*local} \sim NID(\mathbf{0}, \mathbf{G}_{CGCg1*local}),$$

$$\mathbf{u}_{CGCg2*local} \sim NID(\mathbf{0}, \mathbf{G}_{CGCg2*local}) \text{ e}$$

$$\boldsymbol{\varepsilon} \sim NID(\mathbf{0}, \mathbf{R}),$$

em que:

$$\mathbf{G}_{CGCg1} = \sigma_{CGCg1}^2 * \mathbf{A},$$

$$\mathbf{G}_{CGCg2} = \sigma_{CGCg2}^2 * \mathbf{A},$$

$$\mathbf{G}_{CEC} = \sigma_{CEC}^2 * \mathbf{I}_a,$$

$$\mathbf{G}_{CGCg1*local} = \sigma_{CGCg1}^2 * \mathbf{I}_b,$$

$$\mathbf{G}_{CGCg2*local} = \sigma_{CGCg2}^2 * \mathbf{I}_b,$$

$$\mathbf{R} = \begin{bmatrix} \sigma_\varepsilon^2 & & \\ & \sigma_\varepsilon^2 & \\ & & \ddots \end{bmatrix},$$

em que,  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Z}$  são as matrizes de incidência referentes aos efeitos fixos e aleatórios, respectivamente.  $\boldsymbol{\beta}$  é o vetor dos efeitos fixos da média e local,  $\mathbf{u}_{CGCg1}$  e  $\mathbf{u}_{CGCg2}$  são os vetores contendo os efeitos aleatórios das

capacidades gerais de combinação referentes ao grupo 1 quando cruzado com o grupo 2 e do grupo 2 quando cruzado com o grupo 1, respectivamente,  $\mathbf{v}_{CEC}$  é o vetor contendo os efeitos aleatórios da capacidade específica de combinação (CEC) e  $\mathbf{u}_{CGCg1*local}$  e  $\mathbf{u}_{CGCg2*local}$  são os vetores de efeito aleatório da interação entre as capacidades gerais de combinação do grupo 1 e grupo 2, respectivamente, versus locais de avaliação. Por fim,  $\boldsymbol{\varepsilon}$  é o vetor de resíduos, o qual encontra-se confundido com os efeitos da interação entre CEC  $\times$  local. Os componentes de variância foram estimados por meio de máxima verossimilhança restrita (REML) usando o software ASReml versão 4.0 (Gilmour et al., 2014). A significância das fontes de variação do modelo foram verificadas por meio do teste de razão de verossimilhança [LRT] (Stram e Lee, 1994). Nesse teste, são obtidas as deviances do modelo completo e do modelo reduzido, ou seja, do modelo sem o componente a ser testado, por meio da expressão  $D = -2\text{Log}L$ , sendo  $\text{Log}L$  o logaritmo de máxima da função de verossimilhança. A diferença na deviance entre os dois modelos é então testada contra o valor de qui-quadrado com um grau de liberdade e 5% de probabilidade de erro ( $\chi^2 = 3,84$ ). Os efeitos de  $\mathbf{u}_{CGCg1}$  e  $\mathbf{u}_{CGCg2}$  estão associados a matriz de parentesco  $\mathbf{A}$ , a qual modelo uma estrutura de variância-covariância dos efeitos dos genitores, adicionando no modelo as relações de parentesco mostradas na Figura 1. Essas relações de parentesco voltam em duas gerações atrás na genealogia dos genitores.

A herdabilidade no sentido amplo ( $H^2$ ) baseada na média das entradas foi computada de maneira similar a expressão utilizada por Gowda et al. (2012), sendo ela:  $H^2 = \left( \sigma_{cgc_{g1}}^2 + \sigma_{cgc_{g2}}^2 + \sigma_{CEC}^2 \right) / \left[ \left( \sigma_{cgc_{g1}}^2 + \sigma_{cgc_{g2}}^2 + \sigma_{CEC}^2 \right) + \sigma_{CGCg1 \times local}^2 / No.L + \sigma_{CGCg2 \times local}^2 / No.L + \sigma_e^2 / No.L \right]$ , em que,  $No.L$  refere-se ao número de locais e  $\sigma_e^2$  é a variância residual confundida com  $\sigma_{CEC*local}^2$ . A importância dos efeitos aditivos e de dominância na expressão dos caracteres foi verificada pela relação de Baker (Baker, 1978) pela expressão: Razão de Baker =  $\left( \sigma_{cgc_{g1}}^2 + \sigma_{cgc_{g2}}^2 \right) / \left( \sigma_{cgc_{g1}}^2 + \sigma_{cgc_{g2}}^2 + \sigma_{CEC}^2 \right)$ .

### 3.5.2. Análises estatísticas das linhagens experimentais

Inicialmente, os valores de produtividade de sementes para aquelas parcelas com falhas no estabelecimento das plantas foram ajustados para um estande ótimo por meio de análise de covariância. Embora a deficiência no estande de plantas possa ser de origem genética e, portanto, fazer parte do tratamento, notou-se que a principal causa das falhas foram pequenos sulcos de erosão do solo observados após eventos de chuvas abundantes.

Os experimentos em 2016/17, cada qual contendo 864 parcelas, ocuparam porções significativas da área experimental. Visto que se tratam de experimentos nos quais as novas entradas (linhagens  $F_{5,6}$ ) não foram replicadas por motivos já discutidos, optou-se pelo uso de um modelo estatístico que integra um componente espacial, assim como implementado para a análise das populações  $F_5$ . Assim, a variância fenotípica observada em cada experimento (Man.1 e Man.2) foi decomposta de acordo com o modelo estatístico apresentado na Eq. 6.

$$\mathbf{y} = f(\mathbf{u}, \mathbf{v}) + \mathbf{X}_b \boldsymbol{\beta}_b + \mathbf{X}_\tau \boldsymbol{\tau}_\tau + \mathbf{Z}_g \mathbf{c}_g + \mathbf{Z}_r \mathbf{c}_r + \mathbf{Z}_c \mathbf{c}_c + \boldsymbol{\varepsilon} \quad [\text{Eq.6}]$$

em que,  $\mathbf{y}$  contem as observações fenotípicas,  $f(\mathbf{u}, \mathbf{v})$  representa uma função de suavização bivariada definida sobre as posições de linhas ( $\mathbf{u}$ ) e colunas ( $\mathbf{v}$ ), a qual otimiza a superfície do layout experimental penalizando ou encolhendo os efeitos espaciais (Rodríguez-Álvarez et al., 2018). As matrizes de incidência  $\mathbf{X}_b$  ( $n \times 32$ ) e  $\mathbf{X}_\tau$  ( $n \times 3$ ) atribuem observações aos efeitos fixos de blocos e testemunhas, respectivamente.  $\mathbf{Z}_g$  ( $n \times 768$ ) é a matriz de incidência associada aos efeitos de genótipos  $\mathbf{c}_g = (\mathbf{c}_{g1}, \dots, \mathbf{c}_{g768})^t \sim N(\mathbf{0}, \sigma_g^2 \mathbf{I}_{768})$  assumidos como de efeito aleatório.  $\mathbf{Z}_c$  e  $\mathbf{Z}_r$  são as matrizes de incidência para os efeitos aleatórios de coluna  $\mathbf{c}_c \sim N(\mathbf{0}, \sigma_c^2 \mathbf{I}_c)$  e linha  $\mathbf{c}_r \sim N(\mathbf{0}, \sigma_r^2 \mathbf{I}_r)$ . Por fim, o vetor de erros aleatórios é assumido  $\boldsymbol{\varepsilon} \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{I}_n)$ . Para o produto tensor P-Spline, as dimensões base foram assumidas iguais as quantidades de linhas e colunas de cada experimento (Man.1 [25 e 38, respectivamente] e Man.2 [24 e 44, respectivamente]). Os componentes de variância foram estimados via máxima verossimilhança restrita [REML] (Stram e Lee, 1994). Foram computados os melhores preditores lineares não viesados (BLUPs) do efeito aleatório de genótipo, o qual é uma propriedade do modelo. As análises espaciais foram executadas utilizando o pacote SpATS (Rodríguez-Álvarez et al., 2018). As matrizes de correlação de Pearson foram apresentadas de forma gráfica utilizando o pacote em R “corrplot” (Wei e Simko, 2017). Para a análise das linhagens experimentais selecionadas F<sub>5:7</sub> avaliadas em 2017/18, adotou-se um modelo linear misto similar ao ajustado para os genótipos genitores (Eq. 7) adicionado do efeito aleatório de conjunto experimental dentro de bloco. Esse modelo foi ajustado com o efeito de genótipos sendo aleatório para a obtenção dos BLUPs.

Para cada um dos 64 cruzamentos, foram computados os valores reprodutivos (B.V. - *breeding values*), pela soma dos efeitos das CGC preditos para cada genitor, e os valores genéticos (G.V. - *genetic values*), obtidos somando os valores reprodutivos ao efeito de CEC predito para o cruzamento. Os valores de B.V. e G.V. foram calculados nas duas condições de estresse. Esses valores computados a partir do modelo de análise dialélica ajustado foram correlacionados com os BLUPs médios de cada cruzamento em cada condição de estresse obtidos em 2016/17 para quatro caracteres (PS, PCS, DEM e AP) e com PS avaliada no experimento conduzido em 2017/18 (único caráter avaliado nesse ano agrícola). O intuito dessa análise foi verificar a previsibilidade da performance das linhagens em gerações avançadas com base nos parâmetros genéticos preditos, confirmar a importância dos efeitos não aditivos e apurar a existência de correlações distintas entre condições de estresse causado pelo patógeno *P. pachyrhizii*.

De maneira a testar a existência de custo de alocação da tolerância, utilizaram-se os dados dos experimentos com as 768 linhagens F<sub>5:6</sub> avaliadas no ano agrícola de 2016/17. Inicialmente, as linhagens foram divididas em três grupos baseado no caráter dias da emergência a maturação, sendo os grupos: i) precoce (<130 dias), ii) médio (entre 130,1 e 140 dias) e iii) tardio (maior que 140,1 dias). Essa divisão foi feita de maneira a observar e também a reduzir o efeito do tempo desigual de exposição à ferrugem nas correlações entre a tolerância (aqui calculada como a performance diferencial entre cada um dos genótipos avaliados nas duas condições de estresse) e a performance na ausência da doença. A existência de

correlações negativas entre a tolerância e o desempenho na ausência do estresse são indicativos de existência de custo de alocação. Também, uma segunda análise foi executada de modo a contornar a inexistência de independência entre os vetores de tolerância e performance na ausência do estresse, uma vez que o segundo é utilizado no cálculo do primeiro. Assim, como cada um dos 64 cruzamentos biparentais estava representado por 12 linhagens  $F_{5,6}$ , realizou-se uma amostragem aleatória nos dados do experimento sem estresse de 6+6 linhagens para comporem dois vetores de dados com as respectivas médias (vetores 1  $[\mathbf{y}_1]$  e 2  $[\mathbf{y}_2]$  de tamanho  $m \times n$  igual a  $64 \times 1$ ). No experimento exposto ao estresse, obteve-se a média das 12 linhagens para cada cruzamento, resultando no vetor 3 ( $\mathbf{y}_3$ ) com tamanho  $m \times n$  igual a  $64 \times 1$ . Na sequência, a operação  $\mathbf{y}_3 - \mathbf{y}_1$  resultou na primeira estimativa da tolerância média de cada cruzamento que foi correlacionada com  $\mathbf{y}_2$ . Por fim, a segunda estimativa de tolerância foi obtida pela operação  $\mathbf{y}_3 - \mathbf{y}_2$ , que foi então correlacionada com  $\mathbf{y}_1$ . Nessa metodologia, embora as linhagens não sejam repetidas entre os conjuntos  $\mathbf{y}_1$  e  $\mathbf{y}_2$ , os alelos são altamente replicados por se tratar de irmãos germanos. Esses resultados foram plotados em gráficos de dispersão usando o pacote em R “ggplot2” (Wickham, 2009) e adicionado a magnitude das correlações e respectivo P valor.

### 3.5.3. Análises estatísticas dos genitores

Assim como detalhando anteriormente, os genitores foram experimentados oito vezes ao longo dos dois locais, três anos agrícolas e duas condições de estresse. Cada combinação desses três fatores foi considerada como sendo um ambiente distinto nas análises estatísticas descritas na sequência. Inicialmente, a performance produtiva de cada parcela foi ajustada para o estande ideal a partir de um fator de compensação estimado dos dados (Vencovsky e Cruz, 1991). Em adição, assim como especificado na Tabela 1, nem todos os caracteres foram mensurados em todos os anos agrícolas. Devido as análises multivariadas realizadas requererem dados balanceados, os valores ausentes no conjunto de dados foram imputados por meio do pacote em R MissForest (Stekhoven e Buhlmann, 2012). Trata-se de um método de imputação não-paramétrico baseado em florestas aleatórias (*random forest*). Na sequência, foi realizada a análise individual de cada experimento de acordo com o modelo apresentado na Eq. 7.

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{u} + \mathbf{Z}_b\mathbf{b} + \mathbf{Z}_g\mathbf{g} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad [\text{Eq. 7}]$$

em que,  $\mathbf{u}$  é o escalar referente média geral (efeito fixo),  $\mathbf{b}$  é o vetor contendo os efeitos aleatórios de bloco definido como  $\mathbf{b} \sim N(\mathbf{0}, \sigma_b^2 \mathbf{I})$ ,  $\mathbf{g}$  é o vetor contendo os efeitos aleatórios dos tratamentos (genótipos) assumido que  $\mathbf{g} \sim N(\mathbf{0}, \sigma_g^2 \mathbf{I})$  e  $\boldsymbol{\varepsilon}$  é o vetor contendo os resíduos assumidos  $\boldsymbol{\varepsilon} \sim N(\mathbf{0}, \sigma^2 \mathbf{I})$ .  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Z}$  são as matrizes de incidência para os efeitos fixos e aleatórios, respectivamente. A significância dos efeitos aleatórios foi testada via LRT comparando a deviance do modelo completo versus modelo reduzido, assim como detalhado anteriormente. O coeficiente de variação experimental foi computado pela expressão  $CV_e = \sqrt{\sigma^2}/\bar{Y}$ , em que  $\bar{Y}$  é a média geral do experimento. Os BLUPs preditos pelo modelo foram então utilizados nas análises multivariadas GGB biplot (efeito principal de genótipo + genótipo  $\times$

bloco de ambientes) utilizando o pacote em R ‘gge’ (Laffont et al., 2013). Na análise GGB biplot, os ambientes são agrupados de acordo com uma variável categórica que, no presente estudo, foi a condição de estresse. Para essa análise, os dados foram centrados no ambiente, não escalonados e com os valores singulares inteiramente particionados dentro dos autovetores de ambientes, permitindo uma melhor visualização das associações entre ambientes. Por fim, foi computada a tolerância pelo índice STI para os caracteres produtividade e peso de cem sementes a partir dos experimentos adjacentes sob manejos contrastantes da doença. Esses dados foram utilizados na análise GGE biplot (efeito principal de genótipo + genótipo × ambiente) do tipo “performance média × estabilidade” (Yan e Kang, 2002) por meio do pacote em R GGEBiplotGUI (Frutos et al., 2014). Os dados foram centrados no ambiente (G+GE), escalonados com o desvio padrão de locais e com os valores singulares inteiramente particionados dentro dos autovetores de genótipos [JK biplot – preservação métrica das linhas] (Yan e Kang, 2002).

Foi realizada a análise conjunta dos experimentos contendo os genitores para cada um dos manejos da doença. Nessa análise, as suposições da ANOVA clássica de genótipos avaliados em multi-ambiente de que as variâncias genéticas expressas em cada ambiente são iguais e que as correlações dos valores genotípicos são também as mesmas para todos os pares de ambientes, foi relaxada combinando o efeito de G e G × E em um único componente devido ao efeito de genótipo aninhado dentro de ambiente  $G(E)_{ij}$ . Essa formulação permite especificar padrões de variâncias genotípicas dentro de ambientes e também de estrutura de correlação para os efeitos de um genótipo comum ao longo dos ambientes (Isik et al., 2017a). O modelo misto ajustado para essa análise está descrito na Eq. 8.

$$\mathbf{y} = \mu\mathbf{1} + \mathbf{X}\mathbf{s} + \mathbf{Z}_1\mathbf{sr} + \mathbf{Z}_2\mathbf{gs} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad [\text{Eq.8}]$$

em que,  $\mathbf{y}$  é o vetor dos dados fenotípicos,  $\mu$  é a média geral,  $\mathbf{X}$  é a matriz de incidência para os efeitos fixos e  $\mathbf{Z}_1$  e  $\mathbf{Z}_2$  são as matrizes de incidência para os efeitos aleatórios. Os vetores  $\mathbf{s}$ ,  $\mathbf{sr}$ ,  $\mathbf{gs}$  e  $\boldsymbol{\varepsilon}$  correspondem ao efeito fixo de ambiente, efeito aleatório de repetição dentro de ambiente, efeito aleatório de genótipo dentro de ambiente e erro aleatório, respectivamente. Aqui  $\mathbf{gs} \sim \text{MVN}(\mathbf{0}, \mathbf{I}_g \otimes \mathbf{G}_s)$ , em que  $\otimes$  é a designação do produto Kronecker das matrizes, é uma matriz de tamanho  $4 \times 4$ , uma vez que existem quatro ambientes sendo estudados e possui a seguinte forma:

$$\mathbf{G}_s = \begin{pmatrix} \sigma_{gs1}^2 & \sigma_{gs1gs2} & \sigma_{gs1gs3} & \sigma_{gs1gs4} \\ \sigma_{gs2gs1} & \sigma_{gs2}^2 & \sigma_{gs2gs3} & \sigma_{gs2gs4} \\ \sigma_{gs3gs1} & \sigma_{gs3gs2} & \sigma_{gs3}^2 & \sigma_{gs3gs4} \\ \sigma_{gs4gs1} & \sigma_{gs4gs2} & \sigma_{gs4gs3} & \sigma_{gs4}^2 \end{pmatrix}$$

em que, os termos diagonais referem-se a variância genética em cada ambiente e os termos fora da diagonal correspondem as covariâncias genéticas entre quaisquer dois ambientes. Essa estrutura de var/cov é denominada não estruturada (US) e demanda a estimação de  $s(s + 1)/2$  parâmetros, sendo  $s$  a quantidade de ambientes. Em adição, a matriz  $\mathbf{R}$  referente aos resíduos foi definida com uma estrutura bloco diagonal, permitindo a heterogeneidade das variâncias ao longo dos ambientes. Essa definição foi baseada na existência de grandes diferenças na variância residual entre os ambientes observada nas análises

individuais. A estrutura bloco diagonal também foi assumida para o efeito aleatório de repetição dentro de local, permitindo que as variâncias de repetição dentro de locais fossem heterogêneas. Essa definição de modelo é bastante complexa e pode apresentar problemas de convergência quando o número de ambientes é grande, mas sua vantagem no sentido biológico é clara. As predições obtidas dos efeitos genotípicos foram plotadas em gráficos de lagarta (*caterpillar plots*) para as duas condições de estresse, permitindo que o leitor identifique facilmente as diferenças entre genótipos e o efeito da exposição ao patógeno. O modelo foi ajustado usando o software ASReml versão 4.0 (Gilmour et al., 2014).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Panorama geral dos experimentos e clima

A eficiência da infecção pelo fungo *P. pachyrhizii* por vias naturais foi alta, sendo observada severidade intensa da ferrugem nos três anos agrícolas de testes. Como era esperado, os primeiros sintomas foram registrados na fase reprodutiva, próximo ao estágio de R5 (Fehr e Caviness, 1977) e atingiram severidades elevadas ao passo que as plantas cresciam e se desenvolviam em direção a senescência. Isso permitiu uma sólida capacidade de avaliação da performance diferencial dos genótipos testados quando em contato ou não com o patógeno. Também, não foram constatados problemas significativos com outras doenças em ambos os manejos da ferrugem e foi verificada alta eficiência de controle da ferrugem nos experimentos com controle químico apropriado (Man.1). No experimento das populações F<sub>5</sub> em 2015/16, a primeira avaliação de severidade da ferrugem no local 1 resultou em um valor médio de 1%, subindo para 70% na última avaliação (intervalo de 21 dias entre a primeira e a última avaliação). No local 2, a severidade aumentou de 4% para 45% no mesmo espaço de tempo. Portanto, fica atestada a eficiência da infecção natural em gerar sintomas e sinais da doença em níveis elevados em condições de campo. De maneira geral, as condições experimentais foram favoráveis nos três anos agrícolas, permitindo a coleta de dados por meio da mensuração de caracteres agronômicos e a geração de informações robustas a partir das análises estatísticas. Em adição, a estratégia de manejo da ferrugem, gerando as condições de presença e ausência do estresse pelo uso de um programa de aplicação de fungicidas apropriado, mostrou-se eficiente. Também, a existência de efeitos da interação entre genótipos × fungicidas afetando a performance dos materiais em estudo pode ser considerada desprezível. Swoboda e Pedersen (2009) realizaram testes para detectar possíveis efeitos de fungicidas baseados em triazol e estrobilurinas aplicados em soja na ausência de doenças. Os autores não identificaram efeitos significativos em produtividade entre tratamentos e o controle, atestando a inexistência de efeito promotor.

Em termos gerais, os resultados das análises de solo indicam que o local 1 apresenta maior fertilidade (Figura 3). O solo desse local também apresenta 33% a mais de capacidade de troca de cátions (CTC), importante parâmetro que corresponde a soma das cargas negativas presentes em frações do solo como as argilas minerais e substâncias húmicas, capazes de reter cátions essenciais como Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>. No entanto, o desempenho produtivo dos genótipos foi superior no local 2, com 30 e 38% a mais de produtividade de sementes para o manejo na ausência e na presença da ferrugem, respectivamente. Isso provavelmente é reflexo da textura média arenosa característica do solo no local 2, a qual é preferida pela soja em detrimento de solos mais “pesados”, i.e., com altos teores de argila. De acordo com a Figura 3, o solo do local 1 apresenta 39% de argila e 50% de areia, enquanto que o solo do local 2 apresenta apenas 17,6% de argila, porém, aproximadamente 80% de areia e, por isso, é considerado moderadamente arenoso. O desempenho superior dos genótipos de soja no local 2 é frequentemente observado em pesquisas realizadas pelo Setor de Genética Aplicada a Espécies Autógamas (SGAEA). No entanto, as

linhagens obtidas a partir das populações testadas no ano agrícola 2015/16 foram avaliadas apenas no local 1 nos anos seguintes. Isso ocorreu pela restrição na quantidade de sementes e pelo fato de que esse local reúne as condições ambientais alvo do programa de melhoramento.

A infecção natural eficiente pelo fungo *P. pachyrhizi* depende da existência de umidade relativa elevada e molhamento foliar em amplas regiões geográficas para a multiplicação e disseminação dos esporos. Observando a Figura 5, nota-se que o volume precipitado e a distribuição das chuvas ao longo do crescimento e desenvolvimento das plantas foram satisfatórios, gerando condições ambientais propícias a ocorrência da doença. Em adição, nos anos em que foi avaliada a severidade da ferrugem, nota-se que os primeiros sintomas foram observados após eventos de muita precipitação durante vários dias (Figura 5) e com a provável ocorrência de tempestades, importante meio pelo qual os esporos do fungo se disseminam ao longo de grandes regiões geográficas (Schneider et al., 2005).

A necessidade hídrica da soja para obtenção do máximo rendimento varia entre 450 a 800 mm ciclo<sup>-1</sup>, com exigências diárias aumentando com o desenvolvimento da planta, atingindo 7 a 8 mm dia<sup>-1</sup> durante a floração e enchimento de grãos (EMBRAPA, 2013). O total de precipitação registrado durante o ciclo da cultura foi de aproximadamente 1000, 870 e 750 mm para os anos agrícolas de 2015/16, 2016/17 e 2017/18, respectivamente (dados da estação meteorológica; LEB-ESALQ, 2019). Somado ao uso da irrigação por aspersão logo após a semeadura e em eventuais momentos críticos, conclui-se que não houveram eventos de restrição hídrica durante os três anos de experimentação.

Por vários motivos, pesquisadores frequentemente optam por conduzir experimentos separados para cada nível do estresse que se deseja testar. Essa estratégia otimiza práticas operacionais e elimina o efeito de parcelas circunvizinhas experimentando diferentes estresses em delineamentos como o de parcelas subdivididas. Todavia, a ausência de repetições do estresse nesses experimentos adjacentes implica em confundimento com o efeito de área, tornando não estimáveis alguns efeitos (Piepho et al., 2016). No entanto, estudos com níveis de estresse testados em experimentos adjacentes são aceitos e estão disseminados na literatura (Alza e Fernandez-Martinez, 1997; Singh et al., 2009; Ahmadi et al., 2011). Assim, é importante salientar, anteriormente a apresentação e discussão dos resultados, que todo cuidado possível foi tomado de modo a garantir uma rigorosa similaridade ambiental entre os experimentos adjacentes, garantindo ao máximo que a única diferença entre eles fosse uma aproximação do efeito puro da ferrugem (vide APÊNDICE B). Ao longo das análises estatísticas implementadas, esse efeito foi primariamente explorado via técnicas de visualização de dados (*dataViz*), permitindo ao leitor identificar facilmente os impactos da doença nos caracteres.

## 4.2. Performance das populações F<sub>5</sub> e parâmetros genéticos

A existência de um delineamento genético estruturando as populações em F<sub>5</sub> permitiu a estimação de parâmetros genéticos úteis ao estudo, principalmente pelo fato de os dados serem balanceados nas duas situações de estresse biótico causado pelo fungo *P. pachyrhizi*. Porém, anteriormente as análises dialélicas, foram realizadas as análises espaciais para todos os caracteres com o intuito de ajustar

a performance dos genótipos em eventuais ocorrências de tendências espaciais significativas. Esse procedimento foi motivado pelas dimensões acentuadas dos experimentos, característica que aumenta a probabilidade de aparecimento de padrões espaciais ao longo das duas dimensões (2D) do layout experimental, além da existência de modelos sofisticados para a análise geoestatística de experimentos agrícolas (Gilmour et al., 1997; Rodríguez-Álvarez et al., 2018). As tendências espaciais ajustadas pelo modelo SpATS (Rodríguez-Álvarez et al., 2018) para cada um dos quatro experimentos e sete caracteres agronômicos são apresentadas na Figura 6. Note que, para todos os caracteres, o modelo identificou variabilidade espacial dentro dos experimentos, a qual foi contabilizada e removida para a obtenção de valores genotípicos próximos aos reais. De acordo com Robbins et al. (2012), ensaios exibindo variabilidade espacial necessitam de modelos que consigam estimar e particionar de forma acurada os efeitos espaciais dos efeitos genéticos para uma correta predição do mérito genético de cada indivíduo. As magnitudes dos efeitos espaciais (na forma de dimensões efetivas –  $ED_k$ ) e genéticos (na forma de herdabilidade generalizada -  $H_g^2$ ) estão disponíveis na Tabela 2. Nessa tabela, quanto maior a magnitude de  $ED_k$ , mais elevada a variabilidade espacial capturada pelo modelo. Para a produtividade de sementes, nota-se que o experimento no local 2 e na presença da ferrugem foi aquele que evidenciou a maior variabilidade espacial (vide Figura 6 para visualização das tendências), possivelmente em decorrência da maior dimensão no sentido de linhas dos experimento conduzidos no local 2 (6 colunas  $\times$  54 linhas) em comparação aqueles conduzidos no local 1 (11 colunas  $\times$  26 linhas). Em uma mesma condição de área experimental, é esperado que experimentos mais “longos” sofram em maior grau com a variabilidade espacial do que aqueles apresentando uma razão comprimento/largura próximos a unidade. Assim, verifica-se que o uso da análise espacial nos experimentos promoveu resultados satisfatórios. De fato, Borges et al. (2019) verificaram que a inclusão do componente espacial resultou em modelos de análise de experimentos com maior performance comparados àquelas sem esse efeito, mas que apenas a modelagem espacial não é substituta de um bom design experimental. Várias são as possíveis origens de variações espaciais na área e podem inclusive ter origem em práticas agrícolas como adubação e aplicação de produtos químicos no experimento já estabelecido.

Além dos parâmetros discutidos anteriormente, a Tabela 2 traz as médias de cada caráter em cada um dos quatro experimentos conduzidos. De maneira geral, a performance média das populações oscilou consideravelmente ao longo dos ambientes para todos os caracteres. Isso mostra que a escolha dos dois locais de testes foi apropriada para medir as diferenças na expressão dos caracteres pelas progênes e o impacto da interação genótipos  $\times$  ambientes ( $G \times E$ ). A diferença na média de produtividade de sementes foi maior para o efeito de local (local 2 produziu 33,70% mais sementes do que o local 1) em comparação ao efeito do estresse causado pela ferrugem (Man.1 produziu 16,18% a mais de sementes do que o Man.2). Todavia, houveram populações nas quais o controle da doença resultou em produtividades acima de 200% da observada na situação de estresse. Mueller et al. (2009) reportam aumentos entre 16 e 140% em parcelas experimentais tratadas com fungicidas no Paraguai. A diferença na produtividade média entre manejos pode não parecer tão aguda quando comparada com os resultados reportados na literatura

(Yorinori et al., 2005; Kumudini et al., 2008), porém, vale salientar que o germoplasma em estudo já sofreu seleção para tolerar o fungo *P. pachyrhizii*. O efeito de local também foi superior ao do estresse para os caracteres valor agrônômico, densidade de semente e altura de plantas. Os caracteres peso e volume de cem sementes tiveram expressão reduzida em  $\approx 18\%$  na presença da doença. Isso provavelmente foi resultado da redução na área foliar fotossinteticamente ativa e, conseqüente, do desbalanço da relação fonte/dreno, implicando em menos fotoassimilados translocados para as sementes. Em adição, a densidade de sementes foi aproximadamente 5% superior no local 1, onde a produtividade foi inferior. A densidade de sementes é um caráter componente do rendimento que é positivamente correlacionado com a concentração de proteína na semente (Li e Burton, 2002). Para esse caráter, o efeito da ferrugem foi praticamente nulo. Por fim, os caracteres acamamento, densidade de sementes e valor agrônômico apresentaram baixas estimativas de herdabilidade, especialmente no local 1, enquanto os demais caracteres apresentaram estimativas consideradas média a alta.

Em espécies de plantas monoicas, quando os mesmos indivíduos são usados como fêmeas e machos para melhoramento, o esquema de cruzamentos empregado é chamado de dialelo (Isik et al., 2017b). O uso de dialelos permite avaliar os genitores e as famílias de irmãos completos fornecendo informações úteis ao melhoramento como a importância dos efeitos genéticos aditivos e de dominância. Na presente pesquisa, um vetor  $\mathbf{y}$  contendo os BLUEs (melhores estimadores lineares não viesados) para cada uma das populações, foi obtido em cada um dos locais em um primeiro estágio da análise. Esses valores ajustados do efeito do delineamento foram utilizados no segundo estágio da análise, na qual foi ajustado um modelo de análise em esquema de dialelo parcial multi-ambiente. As estimativas dos componentes de variância devido a capacidade geral de combinação (CGC) e capacidade específica de combinação (CEC) para todos os caracteres avaliados nas populações foram compilados e apresentados de maneira gráfica na Figura 7. Para o caráter produtividade de sementes, o teste de razão de verossimilhança (LRT) mostrou que o efeito da CEC foi significativamente maior a zero ( $P < 0,05$ ) na condição sem estresse, ao passo que na condição de presença da doença, apenas o efeito de  $CGC_{\text{grupo1}}$  foi significativamente maior do que zero ( $P < 0,05$ ). Em adição, nas duas condições de estresse, o efeito de local foi significativo pelo teste de Wald. O total de variância fenotípica capturada pelo efeito de CEC na ausência de estresse e mesmo na geração avançada de endogamia das populações em estudo (geração  $F_5$ ) pode ser reflexo de interações epistáticas do tipo aditiva  $\times$  aditiva, assim como verificado na soja em gerações avançadas por Hanson et al. (1967). Como os efeitos de dominância que contribuem para a CEC em gerações precoces foram “removidos” em sua maior parcela pelas sucessivas autofecundações, têm-se que o efeito de CEC capturado possa ter origem em interações epistáticas. A interação epistática aditiva  $\times$  aditiva é uma das mais importantes em espécies autógamas pois é fixável em genótipos homocigotos. De acordo com Bernardo (2010), o contínuo ganho genético em espécies autógamas, como a soja, têm ocorrido, em grande parte, pela fixação da epistasia no decorrer dos ciclos de melhoramento. É importante ressaltar que o design genético aqui utilizado não é o mais apropriado para a detecção de epistasia. Para essa finalidade, variações do design Carolina do Norte II (NC II) podem apresentar resultados mais realísticos (Holland, 2010).

A interação  $GCA_{\text{grupo1}} \times \text{local}$  foi significativa para os caracteres valor agrônômico e altura de planta na condição de estresse e dias da emergência a maturação (ciclo, de maneira abreviada) nos dois manejos da doença (Figura 7). A existência de efeito significativo de CGC e  $CGC \times \text{local}$  sugere a necessidade da seleção de diferentes genitores para a produção de híbridos específicos para cada local. Além disso, estimativas da magnitude da variância de  $G \times E$  fornecem uma medida do viés em estimar parâmetros genéticos a partir de experimentos conduzidos em um único local (Singh et al., 1993). Para o peso e volume de cem sementes, as proporções da variância fenotípica capturada foram similares para cada uma das fontes de variação entre as duas condições de estresse, sendo  $CGC_{\text{grupo2}}$  e CEC responsáveis pela maior porção da variação capturada. Isso se deve a elevada correlação entre esses dois caracteres. Para a razão entre eles, ou seja, a densidade de sementes, não foi detectada significância para nenhum dos efeitos aleatórios testados, sendo apenas o efeito fixo de local significante ( $P < 0,05$ ). Para esse caráter, o desempenho das populações foi de aproximadamente 5% superior em ambas as condições de estresse no local 1 (ambiente de baixa produtividade) comparado ao local 2. Para o caráter altura de planta, a variância aditiva devido ao grupo 1 de genitores foi o efeito mais importante em explicar a variabilidade observada. Valores elevados de CGC indicam uma transmissão efetiva de genes dos genitores para as progênes e permitem a predição adequada da performance das progênes biparentais. De fato, esse caráter apresentou a maior razão de Baker (0,78 e 0,84 para o Man.1 e Man.2, respectivamente). Valores da razão próximos a unidade indicam uma predominância de efeitos aditivos sobre os não aditivos na expressão do caráter (Baker, 1978). Isso significa maior previsibilidade da performance da progênie. Em adição, o efeito do estresse provocou pequenas diferenças na razão de Baker nos caracteres estudados, com exceção da produtividade e densidade de sementes. Para a densidade, o método de avaliação utilizado mostrou-se não ser efetivo em detectar as diferenças sutis existentes entre os genótipos. No caso da produtividade, a condução dos ensaios na presença da ferrugem levou a um aumento na importância dos efeitos aditivos na expressão do caráter em cerca de 32%. Esse resultado demonstra a importância de se estimar parâmetros genéticos em condições de estresse contrastantes, a depender do objetivo do programa de melhoramento, pois a eficiência da seleção em gerar ganho genético tende a oscilar entre os níveis de exposição ao estresse.

As estimativas de herdabilidade no sentido amplo ( $H^2$ ) oscilaram de altas para o caráter altura de planta e peso e volume de cem sementes a baixa para densidade e valor agrônômico (Figura 7). Para a produtividade de sementes, os valores obtidos de  $H^2$  foram medianos, sendo 0,64 na ausência da ferrugem e 0,58 na presença, uma diferença de aproximadamente 9%. Em termos gerais, a precisão experimental alcançada pela análise em dois estágios foi satisfatória, favorecendo estimativas acuradas dos efeitos genéticos devido a CGC e CEC. Quanto a estes, a análise dialélica para o índice de tolerância a estresses (STI) da variável produtividade de sementes (dados não mostrados) revelou resultado similar ao observado na Figura 7 para produtividade na condição de estresse, i.e., a variância genética aditiva (do grupo 1) foi o componente mais importante ( $P < 0,05$ ; LRT) na expressão da tolerância ao fungo *P. pachyrhizi*. Isso demonstra a natureza quantitativa do mecanismo, em que o efeito de múltiplos genes

somados confere diferentes níveis de tolerância. Estudos visando estimar as capacidades combinatórias de genótipos de soja em resposta a ferrugem estão disponíveis (Maphosa et al., 2012; Martins e Juliatti, 2014), porém, com foco no controle genético da esporulação e severidade da doença, o que constitui resistência quantitativa e não tolerância. Em adição, a predominância da variância devido a CGC sobre CEC sugere a possibilidade de ganhos satisfatórios com a seleção recorrente para o mecanismo (Gowda et al., 2012).

Os efeitos das capacidades gerais de combinação preditas para cada um dos 16 genitores e para os sete caracteres mensurados são facilmente visualizados na Figura 8. Os gráficos de lagarta (*caterpillar plots*) mostram os efeitos de CGC de cada genitor preditos a partir dos experimentos conduzidos em cada uma das condições de estresse. Em adição, os efeitos estão ranqueados do menor para o maior valor de CGC na presença da doença. Ao conhecimento dos autores, essa estratégia de visualização dos efeitos das capacidades combinatórias é inédita na literatura, permitindo combinar várias informações relevantes e facilitar o entendimento dos resultados pelos leitores. Inicialmente, nota-se que, especialmente para aqueles caracteres que apresentaram alta herdabilidade, os valores de CGC preditos pelo modelo apresentam alta similaridade entre as duas condições de estresse, i.e., a magnitude do valor predito de CGC na presença da ferrugem (C/F) foi similar àquela predita na ausência (S/F). De fato, a correlação de Pearson entre os valores preditos em 'C/F'  $\times$  'S/F' foi de 0,79\*\* para a produtividade, 0,94\*\* para peso de cem sementes, 0,90\*\* para volume de cem sementes, 0,96\*\* para ciclo e 0,99\*\* para altura de plantas. Para os caracteres valor agrônômico e densidade, as correlações não foram significativas devido a inexistência de variância aditiva significativa (Figura 7). Isso demonstra que, exceto para a produtividade, ganho genético similar na melhoria dos caracteres pode ser auferido a partir da avaliação e seleção em apenas uma das condições de estresse, não sendo necessário dispêndio extra de recursos para a avaliação nos dois cenários de exposição ao patógeno. No caso particular da produtividade, embora a correlação seja alta, há uma diferença considerável no ranqueamento dos melhores combinadores para cada um dos manejos. Nesse caso, reitera-se a necessidade da avaliação da produtividade contrastando para a ocorrência da doença. Além disso, efeitos não aditivos foram detectados em um manejo, porém não no outro.

Os genitores do grupo 2, codificados pelos números 30 e 31, apresentaram os maiores valores de CGC para produtividade, adicionando cerca de 200 kg ha<sup>-1</sup> nos cruzamentos em que participaram. Obviamente, a magnitude desse valor não é tão relevante quanto ao fato de o sinal ser positivo e as magnitudes dos efeitos serem as maiores entre todos os genitores. Isso porque, as produtividades oscilam consideravelmente entre anos e o ano agrícola de 2015/16 não foi caracterizado por altas produtividades. Na situação oposta, encontram-se os genitores 36, 34 e 35, os quais impactaram negativamente a performance das populações biparentais derivadas. Os genitores do grupo 2 foram selecionados por apresentar desempenho similar na presença e ausência da doença, mas isso não necessariamente significa que suas progênes serão altamente produtivas; podem inclusive ser tolerantes, porém pouco produtivas. De maneira a averiguar a capacidade dos genitores em gerar populações tolerantes e, ao mesmo tempo, produtivas, foi executada a análise dialélica do índice STI para produtividade (Figura 7, gráfico em azul). Esse índice, com ampla utilização em pesquisas com estresses abióticos, permite a identificação de

genótipos que reúnem tolerância e alta produtividade, sendo desejável valores altos do índice (Fernandez, 1992). A partir da análise do referido gráfico, fica evidente que os genitores 30 e 31 apresentaram estimativas positivas e estatisticamente diferentes de zero, sendo considerados os genitores ideais do universo amostrado na presente pesquisa para constituir populações biparentais com alta probabilidade de sucesso na extração de linhagens elite tolerantes ao patógeno *P. pachyrhizii*.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) é computada pela simples soma das integrais da severidade da doença nos tecidos entre dois tempos (Shaner, 1977). É um caráter frequentemente utilizado para combinar múltiplas observações do progresso da doença em um único valor (Simko e Piepho, 2012). A fonte de variação  $CGC_{grupo2}$  foi a única cuja variância captada foi estatisticamente diferente de zero pelo teste de LRT ( $P < 0,05$ ). Os efeitos de CGC preditos estão ilustrados na Figura 8 e revelaram os genitores 24 e 34 como aqueles com menor CGC, i.e., progênie oriundas do cruzamento com esses genitores e quando sujeitas a ocorrência da ferrugem, tendem a evidenciar menor exteriorização de sintomas nos tecidos. A habilidade de reduzir a severidade da ferrugem nos cruzamentos em que participam não está atrelada ao menor ciclo das progênie, pois ambos os genitores apresentam CGC positiva para duração do ciclo, sendo o genitor 34 o mais tardio do universo de genitores amostrados para o desenvolvimento dessa pesquisa. Se apenas a tolerância estivesse presente no germoplasma avaliado, não seria esperado efeito significativo da fonte de variação CGC para AACPD, uma vez que os sintomas e sinais da doença, em plantas tolerantes, são esperados serem similares àqueles observados em um genótipo suscetível (Schafer, 1971). Esse resultado pode constituir um indício da existência de resistência parcial (quantitativa) no germoplasma avaliado. Na literatura, é comum o uso da AACPD para detectar diferenças na severidade da ferrugem entre genótipos de soja em estudos de resistência parcial (Pham et al., 2010; Vuong et al., 2016). O genitor 35, por outro lado, apresentou o maior efeito de CGC predito para AACPD e baixos valores para produtividade, peso de cem sementes e do índice STI para produtividade, não sendo recomendado seu uso em futuros cruzamentos.

O ranqueamento dos genitores para os caracteres peso e volume de cem sementes foi aproximadamente o mesmo entre os manejos da doença. Para esses caracteres, o genitor 36 apresentou o maior valor de CGC, seguido do genitor 23, 31, 29 e assim por diante como mostra a Figura 8. O genótipo 31, além de ser um excelente combinador para a produtividade, também apresenta a capacidade de estreitar o ciclo das progênie derivadas e com efeito nulo na altura de plantas, o que é interessante, uma vez que a média observada na ausência da doença desse último caráter foi de 81,86 cm e de 86,08 cm na presença, valores considerados adequados para genótipos comerciais. Ainda sobre a altura de plantas, os genitores 24 e 25 tiveram efeito positivo de CGC predito em aproximadamente 28 e 24 cm, respectivamente. Como consequência, foram os genitores que, quando cruzados, resultaram nos maiores escores de acamamento (1,83 e 1,40; dados não mostrados). Genótipos altos e passíveis de acamamento dificultam práticas de manejo em condições de lavoura. Além disso, o controle de doenças via aplicações de fungicidas fica prejudicado pela dificuldade de penetração do produto no terço inferior do dossel. Assim, esses dois genótipos também não são recomendados para futuros cruzamentos.

A capacidade específica de combinação (CEC) representa os desvios na performance esperada considerando a média populacional ( $\mu$ ) e a soma dos efeitos de CGC dos genitores (Falconer e Mackay, 1996). Os valores de CEC para cada nível de cruzamento disponível estão ilustrados na Figura 9. Da mesma forma como discutido anteriormente para os efeitos de CGC, os efeitos de CEC preditos em cada condição de estresse apresentam similaridade. As correlações entre esses efeitos foram de 0,53 para produtividade, 0,66 para valor agrônômico, 0,86 para peso de cem sementes, 0,77 para volume de cem sementes, 0,85 para ciclo e 0,79 para altura de plantas, sendo todas significativas ( $P < 0,01$ ). Essas correlações foram levemente inferiores as observadas para os efeitos de CGC. Isso mostra que há um efeito de interação mais acentuado entre CEC  $\times$  estresse por ferrugem. Mesmo assim, a intensidade das correlações observadas é suficiente para prever o sinal e a importância, em termos de magnitude do efeito, da CEC de um cruzamento que foi avaliado na presença da doença quanto a sua performance na ausência do estresse e vice-versa. Os erros padrões das previsões mostram que grande parte das estimativas de CEC não diferem de zero, com exceções de cruzamentos localizados em ambas as extremidades das “lagartas” (Figura 9). Os erros padrões associados as previsões dos efeitos foram menores para o peso de cem sementes, indicando ótima precisão experimental na avaliação do caráter, e maiores para o valor agrônômico, sinalizando situação contrária. De fato, a avaliação do valor agrônômico nas populações apresentou baixa precisão, também confirmada pelas herdabilidades média a baixa (Figura 7 e Tabela 2). Isso provavelmente foi resultado da composição genética contrastante entre os indivíduos dentro de cada parcela, dificultando a avaliação do caráter.

Voltando na Figura 8, é possível estimar qual é o valor reprodutivo (*breeding value*) de um determinado cruzamento apenas somando os valores de CGC de cada um dos genitores, por exemplo, o valor reprodutivo esperado do cruzamento entre o genitor 30 e o genitor 27 no ambiente aonde a doença esteve presente é igual a  $\approx 200$  ( $1,1E-04 + 200$ ) e de  $\approx 201$  ( $72,05 + 129,5$ ) na condição sem estresse. Esses valores somados aos respectivos interceptos, resultam em 1952 e 2371 kg ha<sup>-1</sup> na presença e ausência da doença, respectivamente. O valor genético (*genetic value*), por sua vez, é também obtido de maneira simples somando o efeito de CEC (Figura 9) do cruzamento ao valor reprodutivo anteriormente calculado. Dessa maneira, o valor genético do cruzamento mencionado é de 294 e 308, que somados aos respectivos interceptos resultam em 2045 e 2479 kg ha<sup>-1</sup> na presença e ausência da doença, respectivamente. Em adição, com as estimativas de GCA dos 16 genitores, é possível estimar qual seria o valor reprodutivo de um cruzamento que não fora realizado, devido as características inerentes ao esquema de dialelos parciais. Por exemplo, o cruzamento entre os genitores 30 e 31 apresentaria elevada probabilidade de gerar uma população de média produtiva alta nas duas condições de estresse e, conseqüentemente, alta probabilidade de serem extraídas linhas elite tolerantes à ferrugem da soja. Em adição, com exceção dos genitores 36, 34, 35 e 21 que apresentam baixa CGC para produtividade e os genitores 25 e 26 que resultam em progênies de elevada altura de planta (Figura 8), o restante dos genitores que, quando cruzados resultaram em alta CEC, constituem as combinações desejáveis visando alta performance produtividade e tolerância. Por fim, a sobreposição dos erros de predição entre a estimativa de CEC na ausência e na presença da doença sugere uma tendência de similaridade estatística entre as estimativas.

As gerações precoces das progênies  $F_5$  avaliadas nesta pesquisa foram estudadas por Rocha et al. (2018). Algumas das informações obtidas aqui foram comparadas com aquelas apresentadas pelos autores no estudo publicado. Inicialmente, as estimativas de CGC para produtividade na ausência da ferrugem computadas pelos autores na geração  $F_2$  apresentaram correlação de 0,61 ( $P < 0,05$ ) com as estimativas aqui obtidas. É importante salientar que a presente pesquisa explora a interação  $G \times E$  e, no caso do referido estudo, apenas um local foi utilizado, o que traz consequências às correlações. As associações entre as estimativas de CGC se comportaram de maneira similar nos demais caracteres. Por outro lado, não houveram correlações significativas entre as estimativas de CEC obtidas pelos autores na geração  $F_2$  e as obtidas neste estudo em  $F_5$ . Isso deve-se a alta heterozigose presente na geração  $F_2$  (50% dos loci) e, conseqüentemente, elevada variância de dominância ( $\sigma_D^2$ ). Essas relações de dominância desaparecem à medida que as gerações de autofecundação avançam em direção a homozigose, sendo o principal motivo para a ausência de correlações significativas. Essa é a causa primária da ineficiência da seleção precoce para caracteres quantitativos. Em adição, os autores também identificaram os genitores 30 e 31 como promissores para a utilização em cruzamentos objetivando a alta performance produtiva. O genitor 24 também é sugerido pelos autores por apresentar elevada CGC para produtividade. Porém, os resultados da presente pesquisa indicam a existência de alta CGC desse genótipo para altura de planta, o que exige cautela na sua recomendação em futuros cruzamentos. Se este for utilizado, é recomendada a seleção de plantas de menor porte afim de evitar problemas relacionados ao acamamento. Por fim, resultados parcialmente similares foram obtidos entre os dois estudos por meio de procedimentos estatísticos diferentes.

### 4.3. Investigação preliminar da performance das linhagens e estudos de tolerância

As plantas selecionadas na condição de estresse no ano agrícola de 2015/16 passaram por uma triagem na qual, de maneira balanceada, as 12 plantas que produziram as maiores massas de sementes constituíram as novas linhagens  $F_{5,6}$ , testadas no ano subsequente. Durante a condução dos experimentos contendo as 768 linhagens, as condições ambientais foram favoráveis e permitiram a obtenção de altas produtividades. Em adição, a ocorrência da ferrugem asiática da soja atingiu níveis elevados, permitindo a caracterização das linhagens quanto a tolerância ao estresse. Na análise desses experimentos, o uso do modelo estatístico contabilizando a variabilidade espacial foi importante, devido as dimensões acentuadas dos experimentos.

Inicialmente, a Figura 10 permite explorar a diferença na performance total das plantas selecionadas em cada local e a performance das linhagens  $F_{5,6}$  derivadas nas duas condições de estresse biótico. Nota-se que, a diferença na média de produtividade de sementes por planta foi de aproximadamente 30% e que a seleção realizada no local 2 reuniu as plantas com média superior. Além disso, o gráfico box plot mostra uma grande quantidade de plantas cuja produtividade excedeu 20 gramas quando a seleção foi realizada no local 2 em comparação às plantas selecionadas no local 1. Todavia, a seleção no ambiente de média alta não foi traduzida em linhagens derivadas com média superior àquelas

selecionadas no ambiente de menor média. De fato, para o experimento com as linhagens conduzido no ambiente sem ferrugem, a maior média (4.314,98 kg ha<sup>-1</sup>) foi observada para as linhagens fruto da seleção no local 1 e foi estatisticamente diferente da média das linhagens selecionadas no local 2 (4.062,77 kg ha<sup>-1</sup>). É possível que esse resultado seja reflexo da seleção e da experimentação terem sido realizadas no mesmo local, explorando de maneira intensa a interação G × E. Por outro lado, no experimento aonde a ferrugem ocorreu livremente, não houve diferença significativa.

Os resultados das análises espaciais dos experimentos das linhagens F<sub>5:6</sub> conduzidos no ano agrícola de 2016/17 (vide Figura 2 para mais detalhes) são apresentados na Tabela 3. A eficiência do modelo aqui utilizado, denominado SpATS (*Spatial analysis of field trials with splines*), em explicar as tendências espaciais e prever os valores fenotípicos ajustados foi demonstrado por Velazco et al. (2017) a partir de dados de experimentos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] conduzidos em delineamento com as entradas parcialmente replicadas (*p-rep designs*). Na Tabela 3, o sinal genético, representado por  $c_g$ , foi a principal fonte de variação no campo experimental e em ambas as condições de estresse. A variação espacial foi mais intensa no experimento com a presença de ferrugem, necessitando de mais parâmetros para modelar as tendências espaciais e, também, os valores para herdabilidade generalizada ( $H_g^2$ ) foram negativamente impactados em dez dos 15 caracteres. Para os caracteres denominados gerais presentes na Tabela 3, a  $H_g^2$  foi, em média, 11% maior no experimento conduzido na ausência da doença. Especificamente para a produtividade de sementes, esse valor foi 40% superior. A modesta magnitude de  $H_g^2$  para a produtividade na condição estressada é principalmente resultado da menor  $ED_g$  (dimensão espacial efetiva genética). Isso significa que a presença da ferrugem encolheu a variabilidade fenotípica de origem genética para esse caráter, o que estabelece dificuldades no processo de seleção dos melhores candidatos. O sinal genético para a produtividade foi aproximadamente 1,7 vezes maior na ausência do estresse. De acordo com Rosielle e Hamblin (1981), correlação positiva entre a tolerância e a produtividade pode ser obtida se a condição de maior variância genética no ambiente estressado, em comparação a variância no ambiente sem estresse, for atendida. Em situações reais, essa condição dificilmente será satisfeita, como mostram os dados aqui discutidos. Em outras palavras, a simples seleção dos genótipos mais produtivos na condição de estresse apresenta pouca probabilidade de sucesso. No estudo teórico, Rosielle e Hamblin (1981) mostraram que existe correlação negativa entre tolerância e produtividade quando a variância genética é menor no ambiente estressado e, portanto, a seleção na condição de estresse irá implicar em média produtiva reduzida na ausência do estresse. O efeito negativo da ferrugem na  $H_g^2$  também foi observado em outros dois caracteres importantes associados a produtividade, sendo eles o número de dias até R7 e período de enchimento de grãos. Assim, em termos probabilísticos, é pouco provável que a seleção unicamente na condição de estresse irá resultar em ganho genético superior à seleção praticada na ausência da doença. Desse modo, se o objetivo do programa de melhoramento é o incremento simultâneo da produtividade e da tolerância, há a necessidade de avaliações contrastando a exposição ao estresse.

Os valores de  $H_g^2$  para os parâmetros de conformação de sementes apresentaram resultados interessantes para a circularidade (Tabela 3). Embora caracteres indicativos de tamanho e conformação de sementes tenham sua expressão basicamente controlada por efeitos genéticos (Hu et al., 2013), os valores de circularidade variaram consideravelmente ao longo do layout experimental, apresentando o maior valor de  $ED_k$  (parâmetros ajustados) nas duas condições de estresse e baixa  $H_g^2$ . Em trigo (*Triticum aestivum* L.), Rodríguez-Álvarez et al. (2018) observaram que a produtividade foi o caráter com a maior variabilidade espacial e dias para o espigamento o caráter com a menor dependência espacial. No presente estudo, a produtividade apresentou baixa dependência espacial comparada aos demais caracteres ( $ED_k$  total de 12,30 e 8,40 na ausência e presença da doença, respectivamente). Note que, com exceção da produtividade, peso de cem sementes e DS, a presença da doença elevou substancialmente a dependência espacial. Esse aumento variou de 9,20% para a razão comprimento/largura de semente até valores extremamente elevados de 179% para o período de enchimento de grãos, 260% para valor agrônomico e 767,44% para o ciclo. Em adição, o experimento na presença da doença exibiu alta complexidade na estrutura da superfície espacial e o componente  $f_{u,v}(u, v)$  (i.e., interação *smooth-by-smooth*) capturou a maior parte da variação no campo. Utilizando o modelo SpATS, Rodríguez-Álvarez et al. (2018) também reportaram a existência de dependência espacial maior e mais complexa em experimento de trigo conduzido com baixa oferta hídrica comparado a condição de oferta plena de água. Em adição, as correlações entre os valores de produtividade ajustados pelo modelo espacial e os dados originais foram de 0,93 ( $P < 0,01$ ) e 0,84 ( $P < 0,01$ ) na ausência e na presença da ferrugem, respectivamente, sugerindo que os fatores espaciais alteraram substancialmente as respostas na presença do estresse. Dito isso, o presente estudo demonstra a clara necessidade da modelagem espacial em experimentos de soja conduzidos sob a condição de estresse pela ferrugem.

Considerando a testemunha BRS 133, cultivar registrada em 30 de setembro de 1998 (MAPA, 2019), i.e., melhorada anteriormente ao surgimento da ferrugem asiática da soja no Brasil, que data do início dos anos 2000, como um padrão de suscetibilidade e computando as médias das linhagens de cada um dos 64 cruzamentos avaliados em 2016/17, verifica-se que houveram cruzamentos com produtividade de até 13% ( $27 \times 33$ ) acima da cultivar BRS 133 ( $3134,72 \text{ kg ha}^{-1}$ ) na presença da doença. Com relação a IAC 100 ( $2968,04 \text{ kg ha}^{-1}$ ), outra testemunha registrada em 1998, o cruzamento  $27 \times 33$  foi 19% superior. Se o cálculo for feito a partir do desempenho individual das linhagens, então são observados genótipos com produtividade de até 60% acima da testemunha IAC 100. Todavia, como as linhagens não possuem repetições no experimento, conclusões individuais requerem cautela. Produtividade de genótipos tolerantes entre 22 a 60% acima de testemunhas suscetíveis foram reportadas por Tschanz e Tsai (1983) e por pesquisadores do Centro Mundial de Pesquisa com Legumes (AVRDC, 1992). Para o experimento com repetições das linhagens selecionadas  $F_{5:7}$  (APÊNDICE C), nota-se que a performance média das testemunhas foi 18,50% inferior à média das linhagens. Em adição, 22 linhagens apresentaram performance produtiva superior ao genitor 27, que apresentou a maior produtividade dentre os 16

genitores, sinalizando que houve um avanço no sentido de melhorar a performance dos novos materiais selecionados.

As correlações entre a performance média das linhagens de cada cruzamento com os valores genéticos (G.V. – *genetic values*) e reprodutivos (B.V. – *breeding values*) preditos a partir da análise genético-estatística da geração  $F_5$  estão ilustradas na Figura 11. A subfigura A.1 ilustra a condução dos experimentos adjacentes diferindo apenas para a ocorrência do estresse. Na subfigura A.2 é possível observar as saídas gráficas das análises espaciais dos experimentos em blocos aumentados. Os resultados dessa figura estão expressos de forma numérica na Tabela 3. Na subfigura B.1, é possível observar que não houve correlações significativas entre G.V. e B.V. com as produtividades per se dos cruzamentos avaliadas no ano agrícola de 2016/17. Por outro lado, as correlações foram significativas com a produtividade avaliada no ano agrícola 2017/18, exceto para o G.V. predito na ausência do estresse. O fato de a correlação ter sido positiva no ano agrícola de 2017/18 é provavelmente decorrente do uso de repetições no experimento. Esse resultado é um dos motivos do porquê não se recomenda a seleção para produtividade em linhas de progênies em experimentos não replicados em fases iniciais (planta → linha). Em outra espécie autógama, Gowda et al. (2012) verificaram a possibilidade de predições acuradas da performance do híbridos baseado na CGC dos genitores. Para os caracteres de alta herdabilidade: peso de cem sementes, ciclo e altura de plantas; as correlações foram todas significativas e com magnitudes similares entre as condições de exposição ao estresse. Curiosamente, a adição dos efeitos não aditivos melhorou substancialmente as correlações computadas para os caracteres peso de cem sementes e duração do ciclo. Esse resultado, somado ao fato de que esses caracteres são pouco afetados pelo design experimental e o tamanho de parcelas, permite inferir que, de fato, existem efeitos não aditivos controlando a expressão dos caracteres em gerações avançadas e que contabiliza-los pode conduzir a resultados benéficos. Devido a geração avançada de autofecundação, é esperado que esses efeitos decoram de interações epistáticas. Genes codificam componentes de redes coevoluídas e interconectadas e, assim, o efeito do genótipo no fenótipo também depende das interações conhecidas como epistasia (Sackton e Hartl, 2016). A influência de interações gênicas (epistasia) do tipo aditivo × aditivo (AA) foram reportados em soja controlando caracteres como produtividade (Toledo et al., 2000; Barona et al., 2012), taxa de acúmulo de óleo nas sementes (Jiang et al., 2011), caracteres relacionados as vagens (Yang et al., 2013) e conteúdo de isoflavonas (Gutierrez-Gonzalez et al., 2009). Barona et al. (2012) sugerem a seleção para produtividade em gerações avançadas de endogamia ( $F_5$  ou  $F_6$ ) de maneira a explorar os efeitos benéficos da epistasia aditiva do tipo aditiva × aditiva.

O impacto diferencial da ferrugem sobre a performance das linhagens  $F_{5;6}$  de soja para um conjunto de oito caracteres agrônômicos é apresentado na Figura 12. Para cada caráter, obtiveram-se dois vetores  $\mathbf{y}$ , cada qual contendo os BLUPs preditos em cada manejo da doença. Esses valores foram então plotados em gráficos de dispersão acrescidos dos erros padrões de predição. As barras dos erros denotam a precisão da estimativa do BLUP. Quanto menor essa barra, mais preciso é o valor predito. Inicialmente, nota-se que, com exceção do caráter acamamento, todos os demais apresentaram distribuição normal nos dois manejos de estresse verificada por meio dos histogramas. Além disso, a média geral das linhagens no

Man.1 diferiu estatisticamente da média observada no Man.2 para todos os caracteres, mas em especial para a produtividade (i.e., 90,80% da nuvem de pontos está localizada acima da linha diagonal de 45°), peso de cem sementes (97%), dias para a maturação (95,70%) e dias para o estágio R7 (88,40%). Para o restante dos caracteres, foi observado que 62,20%, 77,60%, 65,40% e 74% das linhagens apresentaram performance superior no manejo livre do estresse causado pela ferrugem para os caracteres valor agrônômico, enchimento de grãos, altura de plantas e acamamento, respectivamente. Em adição, o tamanho das barras referentes aos erros de predição são reflexos da magnitude dos efeitos residuais não captados pelos parâmetros definidos no modelo e condizem com as estimativas de herdabilidade verificadas na Tabela 3.

A produtividade média das linhagens F<sub>5:6</sub> na ausência da ferrugem foi de 4.189 kg ha<sup>-1</sup>, o que representa 27,30% a mais em relação a média das mesmas linhagens avaliadas na condição de estresse. Mesmo que 90,80% da nuvem de pontos estivesse acima da linha diagonal de 45°, i.e., o desempenho dessas 697 linhagens foi maior na ausência do estresse, 9,20% (71 linhagens) tiveram desempenho superior na presença do estresse. Se considerarmos as dimensões do erro padrão e as linhagens significativamente mais produtivas na condição de estresse como sendo aquelas em que as barras do erro padrão não tocam a linha diagonal, apenas 12 genótipos atendem ao critério. Duas possíveis hipóteses são levantadas, a primeira é de que houveram problemas entre as operações de colheita e avaliação desses materiais e que, nesse caso, têm um efeito intensificada já que não existem repetições. A segunda hipótese está relacionada a sobrecompensação (*overcompensation*), fenômeno frequentemente observado em plantas experimentando algum nível de herbivoria, no qual plantas atacadas apresentam incremento na habilidade reprodutiva (*fitness*) comparadas a plantas relacionadas não atacadas (Agrawal, 2000; Poveda et al., 2018). Essa seria uma situação de máxima tolerância e já foi reportado em plantas para outros patossistemas (Korves e Bergelson, 2004). Todavia, os experimentos aqui delineados não apresentam recursos suficientes para concluir acerca da existência de sobrecompensação, necessitando estudos desenhados especificamente para tal averiguação.

A Figura 13 traz os gráficos de dispersão para os caracteres mensurados via fenotipagem de alto rendimento das sementes. Nota-se que todos os caracteres apresentaram distribuição normal nos dois manejos e que a média entre manejos diferiu significativamente ( $P < 0,001$ ). Em ordem decrescente, a proporção da nuvem de pontos localizada acima da linha diagonal de 45° foi de 85,70% para circularidade, 70,20% para comprimento de semente, 68,50% para área, 64,60% para perímetro, 63,50% para largura e 58,50% para a razão comprimento/largura. O caráter DS foi o único do universo de caracteres avaliados que teve a expressão maximizada na presença da ferrugem, com 68,50% dos pontos localizados abaixo da linha de 45°. Para o entendimento desse resultado é importante recorrer as Figura 14 e Figura 15. Note que, na presença da ferrugem, há um aumento em DS e as sementes tornam-se menos circulares (*poorly rounded*) (Figura 14). Esse resultado é confirmado pela correlação negativa de elevada magnitude entre DS e circularidade (Figura 15). Portanto, além do efeito em diminuir o tamanho, a ferrugem asiática da soja também impacta a conformação de sementes. Ao entendimento dos autores, esse é o primeiro relato do

efeito da ferrugem em modificar a conformação de sementes de soja. Embora o efeito da ferrugem tenha conduzido a diferenças estatísticas significativas entre as médias de cada caráter avaliado nos dois manejos da doença, sutis diferenças entre as médias foram detectadas pela estratégia de fenotipagem de alto rendimento, as quais provavelmente não seriam identificadas por meio de estratégias convencionais de avaliação. Além disso, é importante destacar que cada ponto nos gráficos de dispersão é a média de cem sementes avaliadas individualmente. Tamanho volume de informação só é possível através de fenotipagem de alto rendimento.

A diferença para o peso de cem sementes entre os dois manejos da doença ( $\approx 16\%$ ) foi maior do que a diferença captada na fenotipagem de alto rendimento das sementes para o caráter área de semente ( $\approx 3\%$ ). Provavelmente, o impacto da ferrugem em reduzir a magnitude do peso de cem sementes se deva primariamente pela redução na espessura da semente, característica que não é capturada nas avaliações 2D das imagens, do que a redução da área projetada pela semente. Também, sementes de soja apresentam um aspecto geralmente “ovalado”, fazendo com que se depositem em uma superfície no sentido da menor altura. Embora a diferença entre as médias de área de sementes tenha sido de apenas 3%, a habilidade de ranquear os genótipos do maior tamanho de sementes ao menor é similar ao peso de cem sementes (correlação de Spearman de 0,86 e 0,88 na ausência e presença da ferrugem, respectivamente).

O formato das sementes é uma das características descritoras requeridas para o registro e proteção de cultivares de soja no Brasil e é avaliado manualmente segundo uma adaptação do trabalho publicado por Nelson e Wang (1989). Esse tipo de avaliação pode ser favorecido pelo uso de imagens digitais da amostra, gerando medidas mais precisas e de um número maior de sementes. Os sete caracteres de tamanho e formato de sementes foram normalmente distribuídos como mostrado na Figura 13. Subamostras de 20 sementes das observações encontradas nas caudas da curva de distribuição contínua são mostradas na Figura 14. Uma das hipóteses suplementares da pesquisa era de que o efeito da ferrugem na variabilidade de atributos de tamanho e formato das sementes fosse positivo, especialmente em genótipos de hábito de crescimento indeterminado. Nesses genótipos, as sementes apresentam tempos de exposição ao estresse diferenciais ao longo do dossel. Por outro lado, a Figura 14 (gráficos de barras) mostra que o desvio padrão computado para cada um dos sete caracteres de tamanho e conformação de sementes foi praticamente o mesmo entre os manejos da doença, desqualificando a hipótese.

#### **4.3.1. Efeito do estresse pela ferrugem nas correlações**

O estudo das correlações entre todos os caracteres e índices mensurados nas linhagens  $F_{5:6}$  está disponível na Figura 15. Inicialmente, nota-se uma alta associação entre a performance das linhagens avaliadas no Man.1 e Man.2 para 13 caracteres (diagonal em rosa), com exceção da produtividade e circularidade das sementes que apresentaram baixa correlação, dos índices STI, YSI que utilizam dados de ambos os manejos no cômputo e da AACPD que foi avaliada apenas no Man.2 e, por isso, apresentam correlação igual a unidade. Em relação a produtividade, foram identificadas correlações de alta magnitude com o caráter valor agrônômico em ambos os manejos da doença ( $\rho \geq 0,50$ ;  $P > 0,01$ ). O valor

agronômico refere-se a um escore generalista dos atributos de qualidade que compõe um genótipo no campo, sendo um escore igual a cinco (máximo) aquele em que o material genético avaliado se assemelha a uma cultivar ideal. É frequentemente utilizado por melhoristas na triagem de genótipos candidatos e que irão avançar ao longo das fases do programa de melhoramento, sendo uma métrica do “olho do melhorista”, expressão rotineiramente empregada pelos profissionais de melhoramento.

A duração do enchimento de grãos (EG) foi outro caráter positivamente associado a produtividade, principalmente no ambiente estressado [ $P < 0,05$ ] (Figura 15). Também, a correlação entre as médias das linhagens pertencentes a cada cruzamento para o enchimento de grãos  $\times$  produtividade foi igual a 0,35 [ $P < 0,05$ ] (dados não mostrados). O comprimento do período de enchimento de grãos é um importante determinante da produtividade de culturas nas quais o interesse encontra-se nas sementes, incluindo a soja (Egli, 1998). Eventos de estresse durante esse período têm potencial de causar reduções significativas na produtividade e no tamanho das sementes (Breedan e Egli, 2003). Board et al. (2010) simularam níveis de desfolha durante o período de enchimento de grãos de cultivares de soja com o intuito de reproduzir o progresso da ferrugem asiática no dossel. Os autores concluíram que a redução da produtividade pela desfolha está intimamente associada a menor porcentagem de radiação solar interceptada e que durante o período de R5 a R6, a redução significativa da produtividade só foi observada quando a desfolha foi suficiente para diminuir em 18 a 23% a interceptação da radiação. Por fim, os autores concluíram que as perdas em produtividade foram máximas quando altos níveis de desfolha ocorreram no início do enchimento de grãos e que o impacto foi gradualmente diminuído a medida em que o estresse ocorreu mais tarde.

A inexistência de correlação entre a produtividade mensurada no experimento protegido da ferrugem e no experimento com a presença da doença remete a existência de uma elevada interação genótipos  $\times$  manejos da ferrugem. Resultado similar foi relatado por Tschanz et al. (1986) no qual salientam que a seleção de linhagens com alta produtividade em condições protegidas da ferrugem pode não garantir alta produtividade na situação oposta. Em adição, os autores salientam que a seleção para alta produtividade na presença da ferrugem não pode prevenir a posterior identificação de linhagens de alta produtividade em baixa pressão ou ausência da doença.

Na presença do estresse, os caracteres relacionados ao tamanho e a conformação das sementes tenderam a apresentar correlações de magnitude superior com a produtividade do que aquelas observadas na ausência, especialmente para a largura de semente [W] (Figura 15). O caráter W foi levemente mais associada com o peso de cem sementes (PCS) em comparação ao comprimento (L). Resultado similar foi reportado por Wang et al. (2011) em estudo avaliando a aparência das sementes de 235 acessos chineses de soja. A média desses acessos foi de 7,80 mm, 5,40 mm e 13,10 g para L, W e PCS, respectivamente, enquanto que no presente estudo foram obtidas médias de 7,70 mm, 6,52 mm e 16,50 gramas, respectivamente, na ausência de estresse, i.e., sementes de comprimento semelhante, porém, mais largas e pesadas. De fato, no presente estudo, W mostrou-se levemente mais correlacionado com PCS do que L. Os caracteres indicativos de tamanho de sementes (PCS, AS, PL, L e W) foram todos altamente

correlacionados entre si nas duas condições de estresse. Portanto, em caso de necessidade de substituição do caráter PCS, sugere-se o uso de W. A existência de alta correlação entre os caracteres mencionados é também reportada na literatura (Niu et al., 2013; Hu et al., 2013).

Os caracteres dias da emergência a maturação (DEM), EG e dias para o estágio de R7 (DR7), componentes da duração do ciclo fenológico, também se mostraram altamente correlacionados (Figura 15). Os três caracteres foram correlacionados negativamente com a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), i.e., quanto maior a severidade da ferrugem e sua evolução no decorrer do tempo, maior a redução em dias no comprimento dos estádios fenológicos. Isso tem impacto negativo na produtividade, como mostra a correlação entre AACPD  $\times$  PS na presença do estresse. A existência de correlação negativa e de magnitude similar entre AACPD e produtividade ( $\rho = -0,30$ ,  $P < 0,0001$ ) foi reportada em experimentos de soja conduzidos em três países por Mueller et al. (2009). Ressalta-se que, caso não houvesse tolerância no germoplasma avaliado, seria esperada uma alta correlação entre produtividade  $\times$  AACPD. Em adição, as correlações negativas entre AACPD e os caracteres DEM, EG e DR7 na ausência do estresse, de fato mostram que os genótipos de ciclo tardio são os mais propensos a apresentarem severidade elevada devido ao maior período de exposição. Isso anulou a correlação entre DEM  $\times$  PS na condição de estresse que era positiva na ausência da ferrugem. Portanto, a correlação entre EG e PS em ambas as condições de estresse fomenta a importância da utilização da duração no período de granação como um caráter chave para a seleção de genótipos de soja produtivos na presença da ferrugem. A importância desse resultado é ainda maximizada pela correlação positiva entre EG e o índice de tolerância a estresses (STI) para a produtividade. Esse índice mede a habilidade de um genótipo em ser tolerante e ao mesmo tempo apresentar alta produtividade na ausência do estresse (Fernandez, 1992). Esse índice tem sido utilizado em soja em estudos com estresses abióticos (Mengistu et al., 2018) e bióticos devido a insetos (Rocha et al., 2014).

O segundo índice testado, estabilidade da produtividade (YSI), foi negativamente correlacionado com a produtividade na ausência da doença, i.e., a medida que se eleva a produtividade no ambiente estressado em comparação ao não estressado, há uma forte tendência de redução da produtividade nessa última condição (Figura 15). Obviamente, essa correlação passa a ter sinal positivo no ambiente com a presença da ferrugem, i.e., genótipos que apresentam tendência de performar de maneira similar entre as duas condições de estresse são os mais produtivos na presença do estresse. Portanto, esse índice não é interessante para o melhoramento visando produtividade e tolerância simultaneamente. Como a severidade de epidemias não é constante ao longo dos anos, há a necessidade de que genótipos sejam tolerantes em situações de alta pressão da doença, mas que apresentem o menor custo de alocação possível, de maneira que possam performar de forma satisfatória em anos agrícolas de ausência ou menor pressão da doença. Nesse sentido, a seleção baseada no índice STI é mais adequada, visto que esse índice apresenta correlações positivas com a produtividade em ambas as condições de estresse. Além disso, o índice está associado positivamente ao VA e ao EG e negativamente a AACPD, AP e ao ACM.

Os caracteres ACM e altura de plantas AP foram altamente correlacionados entre si e também apresentaram um padrão semelhante de correlações com os demais caracteres (Figura 15). Ambos os

caracteres foram correlacionados com L e não com W e, portanto, positivamente correlacionados com LWR. Esse resultado mostra que genótipos altos e, assim, passíveis de acamamento, apresentam sementes mais compridas. Em estudos de mapeamento associativo e mapeamento de QTL (*quantitative traits loci*), resultados mostram a existência de QTLs controlando o comprimento de sementes de soja posicionados na mesma região cromossômica que os caracteres altura de planta e acamamento (Mansur et al., 1993; Zhang et al., 2004). A ocorrência de acamamento conduz a modificações na conformação de sementes. Essa afirmação também é comprovada pela correlação positiva entre ACM e DS. Desta forma, a ocorrência de acamamento tende a resultar em sementes visualmente semelhantes as mostradas na Figura 14 para alto DS. Por fim, as correlações entre o grupo de caracteres determinantes do tamanho de semente com o grupo de caracteres determinantes da conformação foram baixas comparadas as correlações dentro do primeiro grupo. De acordo com Hu et al. (2013), esses dois grupos de caracteres são controlados por arquiteturas genéticas distintas.

Finalmente, o caráter avaliado referente ao volume de folhas da parcela (EAF) foi correlacionado com o índice STI para produtividade (dados não mostrados). A correlação observada foi igual a 0,40 ( $P < 0,01$ ). Como destacam Ney et al. (2013) em revisão sobre a arquitetura das culturas e a tolerância a doenças causadas por fungos e herbivoria, os diferentes mecanismos associados a tolerância a estresses bióticos operam em três níveis (órgão, planta e cultivo). Ao nível de planta, a tolerância pode ocorrer devido a maior relação fonte  $\times$  dreno, i.e., alto índice de área foliar por unidade de grão. Em outras palavras, plantas com maior biomassa tendem a acumular mais reservas que, por sua vez, podem ser remobilizadas para as sementes à medida que o fungo inicia o processo de infecção e a doença avança. Além disso, um maior índice de área foliar permite com que os primeiros ciclos infectivos tenham menor impacto na capacidade de interceptação de radiação comparado a genótipos com pouca área foliar, i.e., existe um efeito de plasticidade. De fato, EAF teve correlação de -0,33 ( $P < 0,01$ ) com a severidade da doença (segunda avaliação; dia anterior a avaliação de EAF), mas essa correlação foi praticamente inexistente para a terceira e quarta avaliações de severidade. Isso é um indicativo de que genótipos com maior área EAF conseguiram sustentar por mais tempo uma porção considerável do tecido foliar sadio, favorecendo a produtividade na presença da doença.

#### 4.3.2. Caracterização da tolerância na interação soja $\times$ *P. pachyrhizi*

Altos níveis de tolerância em detrimento da habilidade reprodutiva (*fitness*) na ausência do estresse, também referido como custo de alocação (Stowe et al., 2000) tem sido reportado na literatura para situações de interação planta  $\times$  patógeno (Simms e Triplett, 1994). De maneira a verificar a existência de custo de alocação na interação soja  $\times$  *P. pachyrhizi*, foi correlacionada a tolerância estimada para cada genótipo com a performance na ausência do estresse (Figura 16). Em adição, o conjunto de genótipos foi subdividido em três classes de acordo com o ciclo (DEM), objetivando minimizar o impacto da exposição diferenciada ao estresse na correlação (Figura 16A). Nota-se que, com o aumento do ciclo, a correlação entre a tolerância e a performance na ausência da doença se torna mais negativa, mudando de -0,81 ( $P <$

0,01) nos genótipos precoces para -0,92 ( $P < 0,01$ ) naqueles de ciclo tardio. Para as linhagens precoces, a diferença média entre a performance produtiva na ausência e na presença do estresse foi de -841,43 kg ha<sup>-1</sup>, passando para -1.141,69 kg ha<sup>-1</sup> nas linhagens de ciclo médio e -1.526,29 kg ha<sup>-1</sup> nos genótipos tardios. Isso demonstra que a diminuição no tempo de exposição ao estresse é uma importante estratégia de manejo da doença. Todavia, como revelam os dados, há uma relação tênue entre ciclo e a produtividade que deve ser contabilizada pelo melhorista, em que genótipos com ciclo maior tendem a ser mais produtivos. Neste estudo, o conjunto de linhagens de ciclo tardio produziu 14,40% a mais em comparação ao conjunto de linhagens de ciclo precoce.

Na Figura 16B, foi explorada a existência do alto grau de parentesco [irmãos germanos;  $\theta_{XY} = 1/4$ ] entre as linhagens derivadas de cada cruzamento biparental para contornar o problema estatístico da dependência entre os vetores sendo correlacionados na Figura 16A. O efeito da amostragem mendeliana (*mendelian sampling*) nesse caso foi diluído pelo cômputo das médias e permitiu a realização das análises de correlação entre a tolerância  $\times$  a performance na ausência do estresse para um universo de 64 cruzamentos. Os resultados da análise confirmam a relação negativa e significativa ( $P < 0,01$ ) entre a performance na ausência do estresse e a tolerância. Em outras palavras, genótipos altamente produtivos na ausência do estresse não necessariamente são os mais produtivos na presença. De fato, os dados mostram que essa associação segue sentidos opostos (Figura 16). Isso indica a existência de custo de alocação na interação soja  $\times$  *P. pachyrhizii*. De acordo com Raberg et al. (2009), o custo de alocação é esperado simplesmente porque existe um requerimento de energia para sustentar os mecanismos responsáveis pela tolerância. Do ponto de vista evolucionário, é esperada a existência de custos ao hospedeiro atrelados a tolerância, caso contrário, alelos que aumentam a tolerância seriam rapidamente fixados na população (Tiffin, 2000). A existência de custo de alocação também foi observada em *Arabidopsis lyrata* para tolerância a geada (Wos e Willi, 2015), em *Ipomoea purpure* para tolerância ao fungo *Colletotrichum dematium* (Simms e Triplett, 1994). Por outro lado, em pesquisa avaliando a interação entre a planta *Mimulus guttatus*  $\times$  vírus do mosaico do pepino, Carr et al. (2006) relatam a existência de correlação positiva, em que indivíduos com alta performance na ausência do estresse são os que melhor performam na presença, indicando que a seleção irá favorecer os mesmos genótipos independentemente se estão ou não infectados, no caso de estresse por patógenos. Portanto, os dois cenários estão presentes na natureza, mas os resultados aqui apresentados demonstram que a interação soja  $\times$  *P. pachyrhizii* produz custos ao hospedeiro.

Na existência de custo de alocação, selecionar para alta produtividade na presença do estresse irá implicar em baixa produtividade em ambientes não estressados. Entretanto, o conjunto de resultados abordados nesse estudo aponta para a existência de variabilidade genética suficiente para o melhoramento simultâneo da produtividade e da tolerância. Para provar isso, foi realizada a correlação entre a tolerância e a performance na ausência do estresse utilizando apenas os dados das linhagens derivadas de cruzamentos com os genitores 30 e 31, identificados na sessão 4.2 como bons combinadores em gerar progênies tolerantes e com alta produtividade. A correlação média baixou de aproximadamente -0,49 ( $P < 0,01$ ) para 0,31<sup>ns</sup>. Também, foi computada a correlação com os dados remanescentes, i.e., após retiradas as linhagens

nas quais um dos pais era o genitor 30 ou o 31. Nesse novo cenário, a correlação subiu para 0,54 ( $P < 0,01$ ). Esses resultados mostram ser possível o melhoramento para tolerância aliado a alta produtividade na ausência da ferrugem desde que seja realizada a triagem dos genitores, buscando aqueles com alto efeito de CGC para o índice STI.

A Figura 16B traz ainda resultados para a AACPD média das linhagens que compõem cada cruzamento. Notam-se alguns pontos tendendo a cor azul, o que é um indicativo da menor ocorrência de sintomas da ferrugem. Os cruzamentos envolvendo os genitores 28 e 34 são aqueles em que a tendência ao azul é mais forte. O genitor 34 apresentou um dos menores efeitos de CGC para o caráter AACPD (Figura 8). Esses resultados também revelam a provável existência de resistência quantitativa no germoplasma avaliado. Na natureza, é esperado que genótipos resistentes experienciem pouca seleção para o aumento da tolerância e genótipos com alta tolerância experienciem baixa seleção para resistência (Carr et al., 2006). Isso conduz a uma correlação genética negativa entre tolerância e resistência. Por fim, a Figura 16B também traz resultados de tolerância para o caráter peso de cem sementes. Nota-se que a medida em que a produtividade na ausência do estresse (eixo x) aumenta, a quantidade de círculos de menor diâmetro expande, indicando baixa tolerância nesses cruzamentos. De fato, a correlação entre a produtividade na ausência do estresse e a tolerância para o caráter peso de cem sementes foi de -0,47 ( $P < 0,01$ ). Esse resultado também sustenta a hipótese de que, no contexto geral do germoplasma avaliado, genótipos tolerantes à ferrugem mostram desempenho baixo na ausência do estresse.

#### 4.4. Performance dos genitores e interação genótipos $\times$ ambientes

Os genitores acrescidos das testemunhas foram avaliados num total de oito ambientes (combinação de local, ano e estresse por ferrugem). Os ambientes codificados como E1, E3, E5 e E7 foram aqueles em que houve a proteção das plantas contra a ferrugem, enquanto E2, E4, E6 e E8 foram os ambientes com condições plenas para o desenvolvimento da doença. Para cada um dos ambientes, foram testadas as significâncias dos efeitos de bloco e genótipo via LRT (Tabela 4 e Tabela 5). Inicialmente, nota-se que o efeito de bloco foi poucas vezes significativo para os caracteres agrônômicos (Tabela 4), porém, com significância mais frequente para os caracteres de semente avaliados via fenotipagem de alto rendimento (Tabela 5). A produtividade foi  $\approx 16\%$  superior na média dos experimentos protegidos. Esse valor é aproximadamente o mesmo reportado anteriormente para a diferença na performance produtiva média entre os experimentos contendo as populações na condição protegida e não protegida. A precisão experimental para a produtividade, medida por meio do coeficiente de variação ( $CV_e$ ), oscilou entre 14,45% (E4) até 27,82% (E2). A precisão experimental dos caracteres mensurados via fenotipagem de alto rendimento foi alta, com valores de  $CV_e$  abaixo de 10%. O ganho em precisão experimental é uma das principais vantagens da fenotipagem de alto rendimento além, é claro, do ganho em escala. Também, para 83% dos casos (caráter  $\times$  efeito de genótipo), houveram diferenças entre os genitores, atestadas pelas significâncias dos efeitos genotípicos do modelo ajustado (Tabela 4 e Tabela 5).

Como mostrado na Figura 15, a inexistência de correlação significativa entre  $PS_{\text{sem-ferrugem}} \times PS_{\text{com-ferrugem}}$  remete a uma acentuada interação genótipos  $\times$  condições de estresse. Assim, em avaliações de experimentos conduzidos em multi-ambiente, é importante tratar os ambientes caracterizados pela presença do estresse diferentemente daqueles em que a doença não se desenvolveu. No presente estudo, os oito ambientes de teste foram agrupados de acordo com uma variável categórica que linca cada ambiente ao seu respectivo bloco de ambientes, caracterizados pela ausência (grupo 1) e ocorrência (grupo 2) da ferrugem. Assim, procedeu-se com a análise GGB biplot (genótipo + genótipo  $\times$  bloco de ambientes) de acordo com a metodologia proposta por Laffont et al. (2013) para situações em que ambientes estão estruturados em blocos (e.g., regiões e anos). As Figura 17 e Figura 18 trazem os resultados das análises GGB biplot para o conjunto de caracteres agrônômicos e de sementes, avaliados via fenotipagem de alto rendimento, respectivamente. Inicialmente, nota-se que houve uma sobreposição acentuada entre os locais de teste dos dois blocos de ambientes para 10 dos 12 caracteres, com exceção de CS e DS (Figura 18). Para esses dois caracteres, parte da variação fenotípica capturada pelos dois primeiros componentes principais refere-se ao efeito da interação GB (vide gráfico de mosaico anexo às respectivas subfiguras). Os altos níveis de sobreposição são reflexo do fato de que a maior parte da variação fenotípica capturada pelos dois primeiros componentes principais tenha sido devido ao efeito de genótipo (G). Isso significa uma constância de desempenho dos genótipos ao longo dos ambientes ou, pelo menos, baixa ocorrência de interação do tipo cruzada. Exemplos claros disso podem ser observados para os caracteres PCS e DEM (Figura 17). Para esses dois caracteres, praticamente toda a variação fenotípica capturada deve-se a G e existe consistência de performance ao longo dos ambientes (vide mapa de calor anexo a cada uma das subfiguras), e.g., o genitor 28 e a testemunha 3 apresentam baixos valores de PCS ao longo de todos os ambientes. Segundo Laffont et al. (2013), o cosseno do ângulo formado entre os vetores de dois blocos de ambiente aproxima-se da correlação entre os efeitos G+GB nestes dois blocos. Portanto, verifica-se que as correlações oscilaram entre  $\approx 0,99$  para DEM a  $\approx 0,64$  [ $\cos(50^\circ)$ ] para CS. Para a produtividade, a correlação foi de  $\approx 0,95$  [ $\cos(18^\circ)$ ] indicando boa previsibilidade da performance dos genótipos entre as condições de estresse (Yan, 2015). Esse resultado diverge daquele reportado no início desse parágrafo, em que não houve correlação entre  $PS_{\text{sem-ferrugem}} \times PS_{\text{com-ferrugem}}$  nos experimentos em que foram testadas as 768 linhagens  $F_{5,6}$ . Nesses experimentos,  $PS_{\text{sem-ferrugem}}$  foi mensurado no ambiente E5, enquanto  $PS_{\text{com-ferrugem}}$  foi avaliada em E6. Como mostra o gráfico biplot e o mapa de calor para PS na Figura 17, esses dois ambientes foram extremamente dissimilares, com E5 apresentando alta variância para PS, enquanto que E6 (com ferrugem) mal diferenciou os genótipos. Esse resultado confirma a necessidade da avaliação da tolerância ao patógeno *P. pachyrhizij* em multi-ambiente.

O ambiente E5 apresentou a maior produtividade média ( $4.393 \text{ kg ha}^{-1}$ ) no universo de ambientes amostrados (Figura 17 e Tabela 4). Esse ambiente foi onde também se conseguiu detectar maiores diferenças entre o valor agrônômico dos indivíduos, ao passo que no ambiente E2, no qual a média produtiva foi baixa ( $1.738 \text{ kg ha}^{-1}$ ), não foi detectada significância para o efeito de genótipo (Tabela 4). Esse resultado sugere que a seleção apenas na condição de estresse deve ser pensada com cautela, uma vez que a produtividade tende a ser baixa e a detecção de diferenças entre os indivíduos fica

comprometida. Esse resultado também é atestado de acordo com outra propriedade da análise GGB biplot, na qual o comprimento do vetor do bloco de ambientes aproxima-se do desvio padrão do efeito de G+GB (Laffont et al., 2013). Assim, nota-se que, para a produtividade, o comprimento do vetor referente ao bloco de ambientes em que não houve estresse pelo patógeno é pelo menos o dobro do bloco em que houve o estresse. Como a variância genética é o numerador na equação do ganho genético ao longo do tempo (equação do melhorista) [Eq.1], espera-se que a seleção na ausência do estresse resulte em maior progresso comparada com a seleção praticada exclusivamente na presença do estresse. Os caracteres DS e ACM também apresentaram vetores de tamanhos desiguais. Para o restante dos caracteres, o comprimento dos vetores de blocos de ambientes foi semelhante, indicando que a variância capturada em ambas as condições de estresse foi análoga.

Se uma reta for posicionada exatamente em cima do vetor do bloco de ambientes e linhas perpendiculares forem projetadas dessa reta em direção aos genótipos, obtém-se então o ranqueamento dos genótipos em relação a performance naquele bloco de ambientes (Laffont et al., 2013). Para a produtividade, os genitores 24 e 33 apresentaram a melhor performance em ambas as condições de estresse (Figura 17). Para a duração do ciclo, o genitor 34 foi o que apresentou o maior número de dias entre a emergência e o estágio de R8. O genótipo 24 destacou-se com a maior altura de planta e, conseqüentemente, foi aquele que apresentou maiores problemas relacionados ao acamamento. Para a circularidade, nota-se que as primeiras posições do ranque são ocupadas por diferentes genótipos a depender da exposição ao estresse. Na presença da doença, os genótipos 28 e 35 foram os que apresentaram sementes mais próximas ao formato esférico, enquanto que na ausência da doença, as duas primeiras posições foram ocupadas pelos genótipos 29 e 26, o que indica a presença de interação cruzada. Cenário similar foi verificado para o caráter DS. Esse resultado confirma o efeito da ferrugem da soja em modificar a conformação das sementes. O efeito de estresse por seca modificando parâmetros de forma de sementes de soja foi reportado por Vieira et al. (1991). Utilizando imagens digitais e o mesmo software empregado na presente pesquisa, Jamil et al. (2017) observaram efeito significativo do estresse causado pelo calor na conformação de sementes de trigo.

Os ambientes são conectados aos seus respectivos blocos de ambientes por meio dos vetores residuais  $\tilde{r}_{jk}^s$  [linhas tênues projetadas] (Figura 17 e Figura 18). O comprimento do vetor residual  $\tilde{r}_{jk}^s$  de um dado ambiente se aproxima do desvio padrão dos resíduos da ANOVA naquele ambiente (Laffont et al., 2013). Se o comprimento desses vetores for pequeno comparado ao comprimento do vetor do bloco de ambientes, então existe uma alta correlação positiva entre os ambientes presentes nesse bloco. De maneira contrária, vetores  $\tilde{r}_{jk}^s$  altamente dispersos em torno do vetor do bloco de ambientes implica em baixa correlação (Laffont et al., 2013; Yan, 2015). Portanto, é evidente a baixa correlação entre os ambientes componentes do bloco sem o estresse por ferrugem para os caracteres PS, VA e ACM e correlação moderada para CS e DS. Isso era de certa forma esperado pois os efeitos de anos e locais estão contabilizados na variação entre ambientes, sendo importantes fontes de variação para caracteres de soja (Sudaric et al., 2006; Lee et al., 2003). Por outro lado, no bloco de ambientes caracterizado pela presença

da doença, houve correlação positiva entre os ambientes para todos os caracteres. Por fim, para todos os caracteres avaliados, a porcentagem da soma total de quadrados foi alta, i.e., 68% para CS e acima de 82% para os demais caracteres, revelando um bom ajuste dos dados às dimensões 2D dos biplots.

Como um dos objetivos primários desta pesquisa é o entendimento da tolerância genética ao fungo causador da ferrugem asiática da soja, foram calculados os índices de tolerância a estresses (STI) para a produtividade (PS-STI) e para o peso de cem sementes (PCS-STI) dos 18 genótipos avaliados [16 genitores + duas testemunhas] (Figura 19A). Nessa análise, E1 a E4 são combinações de anos agrícolas e locais de teste, já que o efeito do estresse foi utilizado para o cômputo do STI de cada genótipo. Inicialmente, nota-se que os dois primeiros componentes principais foram responsáveis pela captação de 80,40% da soma de quadrados total para a produtividade e de 96,30% para o peso de cem sementes, revelando um ajuste adequado dos dados as duas dimensões dos biplots. Foi detectado um efeito acentuado da interação  $G \times E$  na expressão da tolerância para produtividade no conjunto de genótipos avaliados. Isso é quantificado pela participação expressiva da matriz **GB** na explicação da porcentagem da soma de quadrados total capturada pelos componentes principais um e dois (Figura 19A.1, gráfico de mosaico).

Nos gráficos de média  $\times$  estabilidade plotados (Figura 19A.1 e A.2), as linhas pontilhadas que projetam os genótipos perpendicularmente ao eixo que passa pela origem do biplot e a média dos ambientes (círculo) denominado de eixo do ambiente médio (ATA) indica a estabilidade dos genótipos (Yan e Kang, 2002). Dessa forma, o ranque dos genótipos quanto a estabilidade produtiva foi  $30 > 21 > 29 > 22 > 32 > 23 > T2 > 34 > 26 > 31 > 35 > 36 > 33 > 28 > T3 > 25 > 27 > 24$  (dos mais para os menos estáveis). Com relação ao ranqueamento do mais para o menos tolerante baseado no índice STI, têm-se o genitor 24 como o mais tolerante, seguido do  $36 > 33 > 28 > 27 > 31 > 30 > 26 > 34 > T2 > 25 > 22 > 32 > 23 > 21 > T3 > 35 > 29$ , sendo do 24 ao 30, os genótipos localizados acima da média geral. Comparando esses resultados da performance per se dos genitores para tolerância com as CGC preditas para o índice STI da produtividade (Figura 8) nota-se que, com exceção do genitor 36, os genitores evidenciando performance per se acima da média (Figura 19A.1) são também aqueles com CGC nula ou positiva para tolerância (Figura 8). O genitor 36 foi o terceiro mais produtivo em ambas as condições de estresse (Figura 17) e o segundo mais tolerante, além de apresentar baixa interação  $G \times E$  (Figura 19A) o que faz dele um ótimo candidato para o uso em cruzamentos. Todavia, não foi isso que se observou através da análise dialélica para PS-STI (Figura 8). Esse genitor apresentou o menor efeito de CGC predita para tolerância (-0,21), além de apresentar CGC negativa para a produtividade nas duas condições de estresse. Esse resultado demonstra que a performance per se para tolerância não necessariamente implica em alta habilidade de transmitir essa característica aos descendentes.

A tolerância dos genitores e testemunhas, medida por meio do caráter peso de cem sementes, está disponível na Figura 19A.2. Nota-se que o primeiro componente principal capturou 90,72% da soma de quadrados total, sendo constituído em  $\approx 100\%$  pelo efeito de G. O componente principal dois capturou 5,56% da soma de quadrados e foi constituído em  $\approx 100\%$  pelo efeito da interação  $G \times E$ . Nota-se, portanto, que o efeito da interação  $G \times E$  é múltiplas vezes menos importante para a tolerância do peso

de cem sementes em comparação com a produtividade. Novamente, os genitores 30 e 31 apresentaram performance acima da média e o genótipo 31 foi ranqueado na segunda posição.

Como discutido na sessão 4.2, o teste LRT revelou diferença significativa do caráter AACPD para a fonte de variação  $CGC_{\text{grupo2}}$ , o que é um indício da existência de mecanismos capazes de limitar o desenvolvimento do patógeno nos tecidos no germoplasma pesquisado; característica da resistência quantitativa. Esse mecanismo confere um nível parcial de resistência a planta, reduzindo a multiplicação do patógeno, colonização da planta e/ou a severidade dos sintomas, sendo usualmente controlado por vários genes (Pilet-Nayel et al., 2017). Na Figura 19B, o gráfico de funil mostra a AACPD média dos genitores e testemunhas obtidas a partir de avaliações de severidade em dois locais e dois anos agrícolas. Inicialmente, nota-se que todos os genótipos exteriorizaram sintomas da ferrugem em quantidade suficiente para atestar a inexistência de resistência qualitativa. Nesse gráfico, o genitor 34 apresentou o menor valor de AACPD, sendo apenas 34,90% do total de AACPD computado para o genitor 35. Para os genitores 30 e 31, identificados nessa pesquisa como os mais promissores para constituírem cruzamentos visando tolerância e alta produtividade, foram computados valores de AACPD iguais a 212,17 e 349,97, respectivamente, indicando a ocorrência de alta severidade da doença, especialmente para o segundo. Na última avaliação, esses genótipos apresentaram severidade média de 36 e 62%, respectivamente, de acordo com a escala diagramática proposta por Godoy et al. (2006), o que indica uma alta quantidade de estruturas do patógeno nos tecidos (vide ANEXO B). A Figura 19C apresenta os valores médios de AACPD de 12 linhagens  $F_{5,6}$  de soja extraídas de populações  $F_5$  oriundas dos 64 cruzamentos biparentais. Nessa figura, é possível perceber que o genótipo 31, quando cruzado, resulta em linhagens sujeitas a maior severidade da doença. Em geral, esses resultados mostram que a tolerância tem um papel importante em modular os fenótipos no germoplasma avaliado e que existe algum nível de resistência parcial, provavelmente resultado das constantes seleções na condição de estresse ao longo dos ciclos e que resultou na concentração de alelos favoráveis para o mecanismo.

A Figura 20 permite caracterizar a existência de dois tipos de tolerância. Na primeira delas, aqui denominada de tolerância estática, um dado genótipo possui a habilidade de performar de maneira similar à medida que a exposição ao estresse acontece. No conjunto de genitores avaliados, esse tipo de tolerância é verificado, por exemplo, para o genitor 23. O outro tipo refere-se a tolerância dinâmica, em que um dado genótipo apresenta alta performance na presença do estresse, porém, continua a responder aos estímulos ambientais à medida que o estresse é removido do meio. Esse tipo de tolerância pode ser verificado nos genitores 24 e 33. A tolerância dinâmica é facilmente medida pelo índice STI. Do ponto de vista agrônomo, a tolerância dinâmica é mais interessante justamente pela capacidade que a cultivar apresentará em responder aos estímulos ambientais. Assim, o ranque dos genitores com STI acima da média para a produtividade é: 24 > 36 > 33 > 30 > 28 > 27. Nota-se que esse ranque é ligeiramente diferente, i.e., com algumas trocas de postos, comparado ao ranque mostrado na Figura 19A.1. Isso deve-se as heterogeneidades computadas no modelo de análise multi-ambiente ajustado, cujas previsões resultantes são exibidas na Figura 20. De acordo com Isik et al. (2017a) contabilizar as heterogeneidades

melhora a acurácia e pode melhorar as predições de genótipos por meio de maiores pesos dados as informações obtidas daqueles ambientes com baixa variância residual.

Em se tratando da tolerância dinâmica, nenhum genótipo foi estatisticamente tolerante para os caracteres peso de cem sementes, dias da emergência a maturação e largura de semente (Figura 20). Nota-se ainda que o efeito do patógeno em reduzir o ciclo foi similar para todos os genitores, sendo eles precoces ou tardios. Para a altura de planta, quatro genitores evidenciaram menores valores do caráter quando expostos ao estresse. Para os demais genitores, o efeito da ferrugem não promoveu alterações significativas. Por fim, é importante salientar que pelo fato de serem utilizados quatro ambientes para as predições mostradas na Figura 20, é esperado que qualquer efeito de confundimento de área contido no efeito de estresse tenda a nulidade e as diferenças na performance de um dado genótipo avaliado nas duas condições de manejo deva-se exclusivamente ao impacto da doença.

#### 4.5. Considerações finais e implicações para o melhoramento da soja

O incremento nos níveis de tolerância a *P. pachyrhizii* em cultivares comerciais pode constituir uma alternativa importante na ampliação da estabilidade fenotípica dos genótipos ao longo dos ambientes e anos de cultivo. Katerji et al., (2000) observaram que genótipos com alta tolerância a estresses foram caracterizados com alta estabilidade fenotípica, mesmo quando uma ampla gama de ambientes contemplando condições com e sem estresse foram amostradas. Em adição, há necessidade de testes visando avaliar se o melhoramento para tolerância a *P. pachyrhizii* pode ter consequências positivas na capacidade de resiliência a outros tipos de estresses, tanto bióticos como abióticos.

A estratégia utilizada de experimentos adjacentes diferindo para o nível de estresse, embora possa adicionar um efeito de confundimento devido a área, permite a estimação satisfatória da tolerância intrínseca de cada genótipo, especialmente para situações nas quais grandes quantidades de indivíduos são testados. Para uma estimativa acurada da tolerância, cuidados devem ser tomados de maneira tal que a porção de área ocupada por experimento seja a mais similar possível, permitindo apenas que o efeito do estresse oscile entre experimentos adjacentes. Para experimentos menores de até algumas poucas dezenas de genótipos, o uso de parcelas subdivididas pode ser vantajoso desde que os manejos com fungicidas não interfiram nas parcelas circunvizinhas.

A fenotipagem de alto rendimento de sementes mostrou-se útil na diferenciação de genótipos e geração de informações relevantes. Sua utilização em programas de melhoramento, na visão dos autores, está condicionada, porém, no ganho de escala. Isso é possível através do uso de plataformas que permitem a avaliação de grandes quantidades de amostras e em tempo real, a exemplo das soluções apresentadas por Marschalek et al. (2017) e Clohessy et al. (2018). Além das aplicações em estudos de resposta de genótipos a estresses, essas plataformas podem beneficiar indústrias de sementes, otimizando as análises e facilitando as classificações de lotes.

É importante destacar que parcelas pequenas (*miniplots*) como aquelas aqui utilizadas, podem trazer algum nível de viés considerável, especialmente para estimativas da produtividade, dificultando

conclusões pontuais, e.g., indicação do melhor genótipo em um dado experimento. Todavia, devido ao grande número de genótipos testados em programas de melhoramento e situações em que existem poucas sementes, dificilmente encontram-se alternativas para evitá-las. Como mostrado ao longo desse estudo, importantes informações podem ser extraídas desde que sejam atendidos alguns requerimentos de qualidade, e.g., estande ideal e correção estatística para eventuais falhas, além de repetições (máximo possível). Em adição, é importante destacar que os impactos negativos da ferrugem nos caracteres mensurados podem não refletir o real potencial de danos da doença pois o germoplasma testado encontra-se em processo de melhoramento para a tolerância genética.

Baseado nos estudos e experiências com o desenvolvimento da presente pesquisa, é possível inferir que, por meio do melhoramento genético, é pouco provável que se obtenham genótipos elite puramente tolerantes após alguns ciclos de seleção. Ao invés disso, é bastante provável que a seleção em busca de ganho genético na presença do estresse favoreça também o incremento na habilidade da planta em restringir o desenvolvimento do patógeno nos tecidos, característica da resistência quantitativa. Essa hipótese deve ser testada em futuras pesquisas.

É esperado que todos os genótipos, inclusive as cultivares comerciais, apresentem algum nível de tolerância a *P. pachyrhizii*, mesmo aqueles que não foram melhorados diretamente para tal. Assim, programas de melhoramento podem executar testes em condições similares as aqui utilizadas (presença e ausência da doença) de forma a acessar o nível de tolerância de cada genótipo anteriormente ao seu lançamento, podendo constituir um critério extra no momento do posicionamento da cultivar ao longo das regiões produtoras e épocas de semeadura. Em adição, os genótipos identificados com um nível satisfatório de tolerância, bem como as linhagens melhoradas para tolerar à ferrugem, constituem uma alternativa promissora para o cultivo da soja orgânica, presente em algumas regiões do Brasil. Nesse sistema de cultivo, os agricultores geralmente encontram dificuldades em manejar a ferrugem asiática, conduzindo a perdas significativas. Atualmente, menos de 0,10% da soja produzida no planeta é oriunda de sistemas de cultivo orgânico (Hartman et al., 2016). No entanto, mudanças nos hábitos alimentares tem aumentado consideravelmente a demanda pelo produto. Em adição, além de tolerante, o germoplasma aqui avaliado é convencional e, portanto, se adequa aos sistemas de produção orgânica.

Os próximos passos dessa pesquisa incluem a condução de experimentos em multi-locais (+anos) para a identificação das melhores linhagens. Essas serão recombinadas visando dar continuidade ao programa de seleção recorrente para a maximização da tolerância a *P. pachyrhizii*, concentrando alelos favoráveis para a característica. Também, são indicados futuros estudos objetivando avaliar os aspectos econômicos da tolerância como, por exemplo, a identificação da alocação ótima de recursos, i.e., o ponto em que a economia com o menor uso de fungicidas e a redução do número de aplicações (menor custo com operações agrícolas) devido ao uso de genótipos tolerantes ultrapassa o lucro obtido com o uso de genótipos susceptíveis aliado a aplicações de fungicidas. Por fim, a partir dos resultados aqui apresentados, futuros estudos devem incluir informações genômicas, buscando compreender a arquitetura genética da tolerância ao fungo *P. pachyrhizii*. Juntos, os resultados da presente pesquisa revelam oportunidades para o

melhoramento visando a tolerância ao fungo *P. pachyrhizi*, constituindo mais uma ferramenta para o manejo dessa importante doença.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados da pesquisa permitiram as seguintes principais conclusões:

- i. A tolerância ao fungo *P. pachyrhizii* apresenta indícios de natureza quantitativa e está associada a custos ao hospedeiro, porém, existe variabilidade genética suficiente para combinar genótipos tolerantes na presença do estresse e responsivos na inexistência (i.e., tolerância dinâmica);
- ii. A probabilidade de obter descendentes de alta performance produtiva e com tolerância dinâmica pode ser maximizada pelo uso em cruzamentos dos genitores USP 04-17.011 (id. 30) e USP 231-2228-01 (id. 31), identificados com alta habilidade combinatória para essas características;
- iii. A seleção para um maior período de enchimento de grãos e alto valor agrônômico tende a auxiliar na identificação de genótipos tolerantes, particularmente para a tolerância mensurada pelo índice de tolerância a estresses (STI);
- iv. A presença da ferrugem asiática nos experimentos maximiza a complexidade da variação espacial e encolhe a relação sinal genético/ruído (*signal-to-noise ratio*), diminuindo a herdabilidade. Logo, a seleção unicamente na presença da doença tende a produzir resultados inferiores ao longo do tempo;
- v. A presença substancial da interação genótipos  $\times$  ambientes ( $G \times E$ ) conduz à necessidade de experimentos multi-ambientes para a avaliação acurada da tolerância para produtividade de sementes. Para os demais caracteres, a interação  $G \times E$  é baixa e as correlações entre as informações coletadas na presença e ausência da doença são altas, sugerindo que as avaliações devam ser concentradas em um ou poucos ambientes.



## REFERÊNCIAS

- Agrawal, A.A. 2000. Overcompensation of plants in response to herbivory and the by-product benefits of mutualism. **Trends in Plant Science** 5(7): 309–313. doi: 10.1016/S1360-1385(00)01679-4.
- Ahmadi, M., E. Majidi Heravan, S.Y. Sadeghian, M. Mesbah e F. Darvish. 2011. Drought tolerance variability in S1 pollinator lines developed from a sugar beet open population. **Euphytica** 178(3): 339–349. doi: 10.1007/s10681-010-0307-8.
- Akamatsu, H., N. Yamanaka, Y. Yamaoka, R.M. Soares, W. Morel, A.J.G. Ivancovich, A.N. Bogado, M. Kato, J.T. Yorinori e K. Suenaga. 2013. Pathogenic diversity of soybean rust in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of General Plant Pathology** 79(1): 28–40. doi: 10.1007/s10327-012-0421-7.
- Alza, J.O. e J.M. Fernandez-Martinez. 1997. Genetic analysis of yield and related traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in dryland and irrigated environments. **Euphytica** 95(2): 243–251. doi: 10.1023/A:1003056500991.
- Arahana, V.S., G.L. Graef, J.E. Specht, J.R. Steadman e K.M. Eskridge. 2001. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science** 41(1): 180–188. doi: 10.2135/cropsci2001.411180x.
- Araujo, M.M. de e N.A. Vello. 2010. Characterization of soybean genotypes for Asian soybean rust reaction. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 10(3): 197–203. doi: 10.1590/S1984-70332010000300003.
- Araus, J.L., S.C. Kefauver, M. Zaman-Allah, M.S. Olsen e J.E. Cairns. 2018. Translating high-throughput phenotyping into genetic gain. **Trends in Plant Science** 23(5): 451–466. doi: 10.1016/j.tplants.2018.02.001.
- AVRDC. 1992. **Annotated bibliography of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)**. Asian Vegetable Research and Development Center, Taiwan. 160p.
- Baker, R.J. 1978. Issues in diallel analysis. **Crop Science** 18(4): 533–536. doi: 10.2135/cropsci1978.0011183X001800040001x.
- Bao, Y., J.E. Kurle, G. Anderson e N.D. Young. 2015. Association mapping and genomic prediction for resistance to sudden death syndrome in early maturing soybean germplasm. **Molecular Breeding** 35(6). doi: 10.1007/s11032-015-0324-3.
- Barona, M.A.A., J.M. Colombari Filho, V. da S. Santos e I.O. Geraldi. 2012. Epistatic effects on grain yield of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 12(4): 231–236. doi: 10.1590/S1984-70332012000400001.
- Bernard, R.L. 1972. Two genes affecting stem termination in soybeans. **Crop Science** 12(2): 235–239. doi: 10.2135/cropsci1972.0011183X001200020028x.
- Bernardo, R.N. 2010. **Breeding for quantitative traits in plants**. 2nd ed. Stemma Press, Woodbury, Minn. 369p.

- Bingham, I.J. e C.F.E. Topp. 2009. Potential contribution of selected canopy traits to the tolerance of foliar disease by spring barley. **Plant Pathology** 58(6): 1010–1020. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02137.x.
- del Blanco, I.A., J. Hegarty, L.W. Gallagher, B.W. Falk, G. Brown-Guedira, E. Pellerin e J. Dubcovsky. 2014. Mapping of QTL for tolerance to in two-rowed spring barley. **Crop Science** 54(4): 1468–1475. doi: 10.2135/cropsci2013.11.0781.
- Board, J.E., S. Kumudini, J. Omielan, E. Prior e C.S. Kahlon. 2010. Yield response of soybean to partial and total defoliation during the seed-filling period. **Crop Science** 50(2): 703–712. doi: 10.2135/cropsci2009.03.0128.
- Borges, A., A. González-Reymundez, O. Ernst, M. Cadenazzi, J. Terra e L. Gutiérrez. 2019. Can spatial modeling substitute for experimental design in agricultural experiments? **Crop Science** 59(1): 44–53. doi: 10.2135/cropsci2018.03.0177.
- Bornhofen, E., M.H. Todeschini, M.G. Stoco, A. Madureira, V.S. Marchioro, L. Storck e G. Benin. 2018. Wheat yield improvements in Brazil: Roles of genetics and environment. **Crop Science** 58(3): 1082–1093. doi: 10.2135/cropsci2017.06.0358.
- Borsato, R., R. Loyola e P. Lemes. 2015. **Ecorregiões do Brasil: prioridades terrestres e marinhas**. 1º ed Instituto LIFE, Curitiba. 397p.
- Bouslama, M. e W.T. Schapaugh. 1984. Stress tolerance in soybeans. I. Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. **Crop Science** 24(5): 933–937. doi: 10.2135/cropsci1984.0011183X002400050026x.
- Brevedan, R.E. e D.B. Egli. 2003. Short periods of water stress during seed filling, leaf senescence, and yield of soybean. **Crop Science** 43(6): 2083–2088. doi: 10.2135/cropsci2003.2083.
- Bromfield, K.R. 1984. **Soybean rust**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. Monograph, 11. 65p.
- Bromfield, K.R. e E.E. Hartwig. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. **Crop Science** 20(2): 254–255. doi: 10.2135/cropsci1980.0011183X002000020026x.
- Bromfield, K.R. e J.S. Melching. 1982. Sources of specific resistance to soybean rust. **Phytopathology** 72: 706–706.
- Brunner, F., S. Rosahl, J. Lee, J.J. Rudd, C. Geiler, S. Kauppinen, G. Rasmussen, D. Scheel e T. Nürnberger. 2002. Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. **The EMBO Journal** 21(24): 6681–6688. doi: 10.1093/emboj/cdf667.
- Burgueño, J., A. Cadena, J. Crossa, M. Banziger, A.R. Gilmour e B. Cullis. 2000. **User's guide for spatial analysis of field variety trials using ASReml**. CIMMYT, Mexico, D.F. 54p.
- Calvo, É.S., R.A.S. Kühn, A. Garcia, A. Harada e D.M. Hiromoto. 2008. Two major recessive soybean genes conferring soybean rust resistance. **Crop Science** 48(4): 1350–1354. doi: 10.2135/cropsci2007.10.0589.

- Carr, D.E., J.F. Murphy e M.D. Eubanks. 2006. Genetic variation and covariation for resistance and tolerance to *Cucumber mosaic virus* in *Mimulus guttatus* (Phrymaceae): A test for costs and constraints. **Heredity** 96(1): 29–38. doi: 10.1038/sj.hdy.6800743.
- Carter, T.E., R.L. Nelson, C.H. Sneller e Z. Cui. 2004. Genetic diversity in soybean. p. 303–416. *In* **Soybeans: improvement, production, and uses**. Agronomy Monograph. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI.
- Cervantes, E., J.J. Martín e E. Saadaoui. 2016. Updated methods for seed shape analysis. **Scientifica** 2016: 1–10. doi: 10.1155/2016/5691825.
- Chakraborty, N., J. Curley, R.D. Frederick, D.L. Hyten, R.L. Nelson, G.L. Hartman e B.W. Diers. 2009. Mapping and confirmation of a new allele at *Rpp1* from soybean PI 594538A conferring RB lesion-type resistance to soybean rust. **Crop Science** 49(3): 783–790. doi: 10.2135/cropsci2008.06.0335.
- Childs, S.P., Z.R. King, D.R. Walker, D.K. Harris, K.F. Pedley, J.W. Buck, H.R. Boerma e Z. Li. 2018. Discovery of a seventh *Rpp* soybean rust resistance locus in soybean accession PI 605823. **Theoretical and Applied Genetics** 131(1): 27–41. doi: 10.1007/s00122-017-2983-4.
- Choi, H.W. e D.F. Klessig. 2016. DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. **BMC Plant Biology** 16: 232. doi: 10.1186/s12870-016-0921-2.
- Clohessy, J.W., D. Pauli, K.M. Kreher, E.S. Buckler V, P.R. Armstrong, T. Wu, O.A. Hoekenga, J.-L. Jannink, M.E. Sorrells e M.A. Gore. 2018. A low-cost automated system for high-throughput phenotyping of single oat seeds. **The Plant Phenome Journal** 1(1): 1–13. doi: 10.2135/tppj2018.07.0005.
- Cobb, N.A. 1894. **Contributions to an economic knowledge of Australian rusts (Uredineae) : Improving wheat by selection**. C. Potter, govt. printer, Sydney. 14p.
- Cober, E.R., H.D. Voldeng e J.A. Frégeau-Reid. 1997. Heritability of seed shape and seed size in soybean. **Crop Science** 37(6): 1767–1769. doi: 10.2135/cropsci1997.0011183X003700060017x.
- Collard, B.C.Y. e D.J. Mackill. 2008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 363(1491): 557–572. doi: 10.1098/rstb.2007.2170.
- CONAB. 2018. **Séries históricas de área plantada, produtividade e produção da soja**. <https://www.conab.gov.br/> (acesso em 30 de outubro de 2018).
- Consórcio Antiferrugem. 2019. **Consórcio Antiferrugem: parceria público-privada no combate à ferrugem asiática da soja**. <http://www.consorcioantiferrugem.net/#/numeros> (acesso em 28 de janeiro de 2019).
- Cooper, M., F.A. van Eeuwijk, G.L. Hammer, D.W. Podlich e C. Messina. 2009. Modeling QTL for complex traits: Detection and context for plant breeding. **Current Opinion in Plant Biology** 12(2): 231–240. doi: 10.1016/j.pbi.2009.01.006.

- Crain, J., S. Mondal, J. Rutkoski, R.P. Singh e J. Poland. 2018. Combining high-throughput phenotyping and genomic information to increase prediction and selection accuracy in wheat breeding. **The Plant Genome** 11(1): 1–14. doi: 10.3835/plantgenome2017.05.0043.
- Cruz, T.V. da, C.P. Peixoto, M.C. Martins, F.F. Laranjeira, P.V.L. Lopes, N.S. Andrade e C.A. da S. Ledo. 2012. Perdas causadas pela ferrugem asiática em cultivares de soja semeadas em diferentes épocas, no Oeste da Bahia. **Tropical Plant Pathology** 37(4): 255–265. doi: 10.1590/S1982-56762012000400004.
- Cullis, B.R., A.C. Gleeson e F.M. Thomson. 1992. The response to selection of different procedures for the analysis of early generation variety trials. **The Journal of Agricultural Science** 118(2): 141–148. doi: 10.1017/S0021859600068714.
- Cullis, B.R., W.J. Lill, J.A. Fisher, B.J. Read e A.C. Gleeson. 1989. A new procedure for the analysis of early generation variety trials. **Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)** 38(2): 361–375. doi: 10.2307/2348066.
- De Bruin, J.L. e P. Pedersen. 2008. Yield improvement and stability for soybean cultivars with resistance to Ichinohe. **Agronomy Journal** 100(5): 1354. doi: 10.2134/agronj2007.0412.
- Dhillon, B.S. 1978. Partial diallel cross in multi-environment. **Biometrical Journal** 20(3): 279–283. doi: 10.1002/bimj.4710200309.
- Dierckx, P. 1993. **Curve and surface fitting with splines**. Oxford University Press, Inc., New York, NY, USA. 285p.
- Dodds, P. e P. Thrall. 2009. Recognition events and host–pathogen co-evolution in gene-for-gene resistance to flax rust. **Functional plant biology** 36(5): 395–408. doi: 10.1071/FP08320.
- Doeschl-Wilson, A.B., B. Villanueva e I. Kyriazakis. 2012. The first step toward genetic selection for host tolerance to infectious pathogens: obtaining the tolerance phenotype through group estimates. **Frontiers in Genetics** 3(265). doi: 10.3389/fgene.2012.00265.
- Easlou, H.M. e A.J. Bloom. 2014. Easy leaf area: automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. **Applications in Plant Sciences** 2(7): 1400033. doi: 10.3732/apps.1400033.
- Edwards, H.H. e M.R. Bonde. 2011. Penetration and establishment of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean leaves as observed by transmission electron microscopy. **Phytopathology** 101(7): 894–900. doi: 10.1094/PHYTO-09-10-0248.
- Egli, D.B. 1998. **Seed biology and the yield of grain crops**. CAB International, Wallingford, Oxon; New York. 192p.
- Eilers, P.H.C. e B.D. Marx. 2003. Multivariate calibration with temperature interaction using two-dimensional penalized signal regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 66(2): 159–174. doi: 10.1016/S0169-7439(03)00029-7.
- EMBRAPA. 2013. **Tecnologias para produção de soja - região central do Brasil 2014**. 1º ed Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Londrina, PR. 265p.

- Falconer, D.S. e T.F.C. Mackay. 1996. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed., [16. print.]. Pearson, Prentice Hall, Harlow. 480p.
- FAOSTAT. 2018. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. <http://www.fao.org/faostat/en/> (acesso em 30 de outubro de 2018).
- Federer, W.T. 1956. Augmented (or Hoonuiaku) designs. **Hawaiian Planters Record** 55(2): 191–208.
- Fehr, W.R. e C.E. Caviness. 1977. **Stages of soybean development**. Special Report. 87. Ames, IA. 12p.
- de Felipe, M., J.A. Gerde e J.L. Rotundo. 2016. Soybean genetic gain in maturity groups III to V in Argentina from 1980 to 2015. **Crop Science** 56(6): 3066–3077. doi: 10.2135/cropsci2016.04.0214.
- Fernandez, G. 1992. Effective selection criteria for assessing stress tolerance. p. 257–270. *In* **Proceedings of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and Other Food Crops in Temperature and Water Stress**. Public Tainan, Taiwan.
- Ferro, C., C. Hill, M. Milles e G. Hartman. 2004. Soybean partial resistance and tolerance to *Phytophthora sojae*. **Phytopathology** 94(6): S29–S30.
- Flor, H.H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Review of Phytopathology** 9(1): 275–296. doi: 10.1146/annurev.py.09.090171.001423.
- Fox, C.M., T.R. Cary, A.L. Colgrove, E.D. Nafziger, J.S. Haudenschild, G.L. Hartman, J.E. Specht e B.W. Diers. 2013. Estimating soybean genetic gain for yield in the northern United States—influence of cropping history. **Crop Science** 53(6): 2473–2482. doi: 10.2135/cropsci2012.12.0687.
- Frutos, E., M.P. Galindo e V. Leiva. 2014. An interactive biplot implementation in R for modeling genotype-by-environment interaction. **Stochastic Environmental Research and Risk Assessment** 28(7): 1629–1641. doi: 10.1007/s00477-013-0821-z.
- Gao, L., F. Roux e J. Bergelson. 2009. Quantitative fitness effects of infection in a gene-for-gene system. **New Phytologist** 184(2): 485–494. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02959.x.
- Garcia, A., É.S. Calvo, R.A. de Souza Kühnl, A. Harada, D.M. Hiromoto e L.G.E. Vieira. 2008. Molecular mapping of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) resistance genes: Discovery of a novel locus and alleles. **Theoretical and Applied Genetics** 117(4): 545. doi: 10.1007/s00122-008-0798-z.
- Gavioli, E.A. 2013. Explanations for the rise of soybean in Brazil. *In* Board, J. (org.), **A comprehensive survey of international soybean research - genetics, physiology, agronomy and nitrogen relationships**. InTech, Rijeka. 25p.
- Gilmour, A.R., B.R. Cullis, A.P. Verbyla e A.P. Verbyla. 1997. Accounting for natural and extraneous variation in the analysis of field experiments. **Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics** 2(3): 269–293. doi: 10.2307/1400446.
- Gilmour, A.R., B.J. Gogel, B.R. Cullis, S.J. Welham e R. Thompson. 2014. **ASReml user guide release 4.1 structural specification**. Hemel Hempstead, HP1 1ES, UK. 358p.

- Gisi, U., K.M. Chin, G. Knapova, R. Küng Färber, U. Mohr, S. Parisi, H. Sierotzki e U. Steinfield. 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. **Crop Protection** 19(8–10): 863–872. doi: 10.1016/S0261-2194(00)00114-9.
- Gleeson, A.C. 1997. Spatial analysis. p. 68–85. *In* Kempton, R.A., Fox, P.N., Cerezo, M. (orgs.), **Statistical methods for plant variety evaluation**. Plant Breeding Series 3 Statistical Methods for Plant Variety Evaluation. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Godoy, C.V., A. de F. Bueno e D.L.P. Gazziero. 2015. Brazilian soybean pest management and threats to its sustainability. **Outlooks on Pest Management** 26(3): 113-117. doi: 10.1564/v26\_jun\_06.
- Godoy, C.V., L.J. Koga e M.G. Canteri. 2006. Diagrammatic scale for assessment of soybean rust severity. **Fitopatologia Brasileira** 31(1): 63–68. doi: 10.1590/S0100-41582006000100011.
- Godoy, C.V., C.D.S. Seixas, R.M. Soares, F.C. Marcelino-Guimarães, M.C. Meyer e L.M. Costamilan. 2016. Asian soybean rust in Brazil: Past, present, and future. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 51(5): 407–421. doi: 10.1590/S0100-204X2016000500002.
- Godoy, C.V., C.M. Utiamada, M.C. Meyer, H.D. Campos, I. de O.N. Lopes, C.A. Forcelini e C.B. Pimenta. 2017. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. (Circular Técnica 129). Portal Embrapa. Embrapa, Londrina, Paraná. 10p.
- Goellner, K., M. Loehrer, C. Langenbach, U. Conrath, E. Koch e U. Schaffrath. 2010. *Phakopsora pachyrhizi*, the causal agent of Asian soybean rust. **Molecular Plant Pathology** 11(2): 169–177. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00589.x.
- Gowda, M., B. Das, D. Makumbi, R. Babu, K. Semagn, G. Mahuku, M.S. Olsen, J.M. Bright, Y. Beyene e B.M. Prasanna. 2015. Genome-wide association and genomic prediction of resistance to maize lethal necrosis disease in tropical maize germplasm. **Theoretical and Applied Genetics** 128(10): 1957–1968. doi: 10.1007/s00122-015-2559-0.
- Gowda, M., C.F.H. Longin, V. Lein, e J.C. Reif. 2012. Relevance of specific versus general combining ability in winter wheat. **Crop Science** 52(6): 2494–2500. doi: 10.2135/cropsci2012.04.0245.
- Griggs, W. 2013. **Penalized spline regression and its applications**. 51p. <https://www.whitman.edu/Documents/Academics/Mathematics/Griggs.pdf> (acesso em 3 de abril de 2019).
- Gururani, M.A., J. Venkatesh, C.P. Upadhyaya, A. Nookaraju, S.K. Pandey e S.W. Park. 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 78: 51–65. doi: 10.1016/j.pmpp.2012.01.002.
- Gutierrez-Gonzalez, J.J., X. Wu, J. Zhang, J.-D. Lee, M. Ellersieck, J.G. Shannon, O. Yu, H.T. Nguyen e D.A. Sleper. 2009. Genetic control of soybean seed isoflavone content: importance of statistical model and epistasis in complex traits. **Theoretical and Applied Genetics** 119(6): 1069–1083. doi: 10.1007/s00122-009-1109-z.

- Hanson, W.D., A.H. Probst e B.E. Caldwell. 1967. Evaluation of a population of soybean genotypes with implications for improving self-pollinated crops. **Crop Science** 7(2): 99–103. doi: 10.2135/cropsci1967.0011183X000700020003x.
- Harris, D.K., H. Abdel-Haleem, J.W. Buck, D.V. Phillips, Z. Li e H.R. Boerma. 2015. Soybean quantitative trait loci conditioning soybean rust-induced canopy damage. **Crop Science** 55(6): 2589–2597. doi: 10.2135/cropsci2015.01.0058.
- Hartman, G.L. 1991. Soybean rust development and the quantitative relationship between rust severity and soybean yield. **Plant Disease** 75(6): 596–600. doi: 10.1094/PD-75-0596.
- Hartman, G.L. 1995. Highlights of soybean rust research at the Asian Vegetable Research and Development Center. p. 19–28. *In* **Proceedings of the soybean rust workshop**. College of Agricultural, Consumer, and Environmental Sciences, National Soybean Research Laboratory, Urbana, IL.
- Hartman, G., M. Pawlowski, T. Herman e D. Eastburn. 2016. Organically grown soybean production in the USA: Constraints and management of pathogens and insect pests. **Agronomy** 6(1): 16. doi: 10.3390/agronomy6010016.
- Hartmann, A., T. Czauderna, R. Hoffmann, N. Stein e F. Schreiber. 2011. HTPHeno: An image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. **BMC Bioinformatics** 12(1): 148. doi: 10.1186/1471-2105-12-148.
- Hartwig, E.E. 1986. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. **Crop Science** 26(6): 1135–1136. doi: 10.2135/cropsci1986.0011183X002600060010x.
- Hartwig, E.E. e K.R. Bromfield. 1983. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. **Crop Science** 23(2): 237–239. doi: 10.2135/cropsci1983.0011183X002300020012x.
- Hartwig, E.E. e R.A.S. Kiihl. 1979. Identification and utilization of a delayed flowering character in soybeans for short-day conditions. **Field Crops Research** 2: 145–151. doi: 10.1016/0378-4290(79)90017-0.
- Hennings, V. 1903. A few new Japanese Uredinaceae. **Hedwigia** 42: 107–108.
- Herridge, D.F., M.B. Peoples e R.M. Boddey. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil** 311(1–2): 1–18. doi: 10.1007/s11104-008-9668-3.
- Hirooka, T. e H. Ishii. 2013. Chemical control of plant diseases. **Journal of General Plant Pathology** 79(6): 390–401. doi: 10.1007/s10327-013-0470-6.
- Holland, J.B. 2010. Epistasis and plant breeding. p. 27–92. *In* Janick, J. (org.), **Plant Breeding Reviews**. John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK.
- Hossain, Md.M. e N. Yamanaka. 2018. Pathogenic variation of Asian soybean rust pathogen in Bangladesh. **Journal of General Plant Pathology** 85: 90–100. doi: 10.1007/s10327-018-0825-0.
- Hu, Z., H. Zhang, G. Kan, D. Ma, D. Zhang, G. Shi, D. Hong, G. Zhang e D. Yu. 2013. Determination of the genetic architecture of seed size and shape via linkage and

- association analysis in soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Genetica** 141(4–6): 247–254. doi: 10.1007/s10709-013-9723-8.
- Hyten, D.L., Q. Song, Y. Zhu, I.-Y. Choi, R.L. Nelson, J.M. Costa, J.E. Specht, R.C. Shoemaker e P.B. Cregan. 2006. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 103(45): 16666–16671. doi: 10.1073/pnas.0604379103.
- IEAg. 2015. **O futuro da soja no Brasil: Impactos socioeconômicos da ferrugem asiática na cadeia da soja nos próximos 10 anos**. Associação Brasileira do Agronegócio (ABAG). 28p.
- Isard, S.A., N.S. Dufault, M.R. Miles, G.L. Hartman, J.M. Russo, E.D. De Wolf e W. Morel. 2006. The effect of solar irradiance on the mortality of *Phakopsora pachyrhizii* urediniospores. **Plant Disease** 90(7): 941–945. doi: 10.1094/PD-90-0941.
- Isik, F., J. Holland e C. Maltecca. 2017a. Multi Environmental Trials. p. 227–262. In **Genetic data analysis for plant and animal breeding**. Springer International Publishing, Cham.
- Isik, F., J. Holland e C. Maltecca. 2017b. Genetic Values. p. 141–163. In **Genetic data analysis for plant and animal breeding**. Springer International Publishing, Cham.
- Jamil, M., A. Ali, A. Ghafoor, K.F. Akbar, A.A. Napar, N.H. Naveed, N.A. Yasin, A. Gul e A. Mujeed-Kazi. 2017. Digital image analysis of seed shape influenced by heat stress in diverse bread wheat germplasm. **Pakistan Journal of Botany** 49(4): 1279–1284.
- Jarvie, J.A. e P.E. Shanahan. 2009. Assessing tolerance to soybean rust in selected genotypes. **Field Crops Research** 114(3): 419–425. doi: 10.1016/j.fcr.2009.09.015.
- Jiang, Z., B. Zhang, W. Teng, Y. Han, X. Zhao, D. Sun, Z. Zhang e W. Li. 2011. Impact of epistasis and QTL  $\times$  environmental interaction on the oil filling rate of soybean seed at different developmental stages. **Euphytica** 177(3): 431–442. doi: 10.1007/s10681-010-0290-0.
- Jin, J., X. Liu, G. Wang, L. Mi, Z. Shen, X. Chen e S.J. Herbert. 2010. Agronomic and physiological contributions to the yield improvement of soybean cultivars released from 1950 to 2006 in Northeast China. **Field Crops Research** 115(1): 116–123. doi: 10.1016/j.fcr.2009.10.016.
- Jones, J.D.G. e J.L. Dangl. 2006. The plant immune system. **Nature** 444(7117): 323–329. doi: 10.1038/nature05286.
- Jordan, S.A., D.J. Mailhot, A.J. Gevens, J.J. Marois, D.L. Wright, C.L. Harmon e P.F. Harmon. 2010. Characterization of kudzu (*Pueraria* spp.) resistance to *Phakopsora pachyrhizii*, the causal agent of soybean rust. **Phytopathology** 100(9): 941–948. doi: 10.1094/PHYTO-100-9-0941.
- Juliatti, F.C., L.C. Polloni, T.M. Prado, N.R.S. Zacarias, E.A. Silva e B.C.M. Juliatti. 2017. Sensitivity of two isolates of *Phakopsora pachyrhizii* to dithiocarmamate, chloronitric, triazoles, strobilurins, and carboxamides fungicides. **Bioscience Journal** 33(4): 933–943. doi: 10.14393/BJ-v33n4a2017-38357.

- Jun, T.-H., K. Freewalt, A.P. Michel, e R. Mian. 2014. Identification of novel QTL for leaf traits in soybean. **Plant Breeding** 133(1): 61–66. doi: 10.1111/pbr.12107.
- Kaster, M. e J.R.B. Farias. 2012. **Regionalização dos testes de Valor de Cultivo e Uso e da indicação de cultivares de soja - terceira aproximação**. Embrapa Soja, Londrina. 1ed. 69p.
- Katerji, N., J.W. van Hoorn, A. Hamdy e M. Mastrorilli. 2000. Salt tolerance classification of crops according to soil salinity and to water stress day index. **Agricultural Water Management** 43(1): 99–109. doi: 10.1016/S0378-3774(99)00048-7.
- Kawashima, C.G., G.A. Guimarães, S.R. Nogueira, D. MacLean, D.R. Cook, B. Steuernagel, J. Baek, C. Bouyioukos, B. do V.A. Melo, G. Tristão, J.C. de Oliveira, G. Rauscher, S. Mittal, L. Panichelli, K. Bacot, E. Johnson, G. Iyer, G. Tabor, B.B.H. Wulff, E. Ward, G.J. Rairdan, K.E. Broglie, G. Wu, H.P. van Esse, J.D.G. Jones e S.H. Brommonschenkel. 2016. A Pigeonpea gene confers resistance to Asian soybean rust in soybean. **Nature Biotechnology** 34(6): 661–665. doi: 10.1038/nbt.3554.
- Kawuki, R.S., P. Tukamuhabwa e E. Adipala. 2004. Soybean rust severity, rate of rust development, and tolerance as influenced by maturity period and season. **Crop Protection** 23(5): 447–455. doi: 10.1016/j.cropro.2003.09.016.
- Keep, N.R., W.T. Schapaugh, P.V.V. Prasad e J.E. Boyer. 2016. Changes in physiological traits in soybean with breeding advancements. **Crop Science** 56(1): 122–131. doi: 10.2135/cropsci2013.07.0499.
- Kefauver, S.C., G. El-Haddad, O. Vergara-Diaz, e J.L. Araus. 2015. RGB picture vegetation indexes for high-throughput phenotyping platforms (HTPPs). p. 96370J. *In* Neale, C.M.U., Maltese, A. (orgs.), **Remote Sensing for Agriculture**. Toulouse, France.
- Kempthorne, O. e R.N. Curnow. 1961. The partial diallel cross. **Biometrics** 17(2): 229–250. doi: 10.2307/2527989.
- Kempton, R.A. e A.C. Gleeson. 1997. Unreplicated trials. p. 86–100. *In* Kempton, R.A., Fox, P.N., Cerezo, M. (orgs.), **Statistical methods for plant variety evaluation**. Plant Breeding Series 3. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Kendrick, M.D., D.K. Harris, B.-K. Ha, D.L. Hyten, P.B. Cregan, R.D. Frederick, H.R. Boerma e K.F. Pedley. 2011. Identification of a second Asian soybean rust resistance gene in Hyuuga soybean. **Phytopathology** 101(5): 535–543. doi: 10.1094/PHYTO-09-10-0257.
- Kim, M.-J., G.-H. Lim, E.-S. Kim, C.-B. Ko, K.-Y. Yang, J.-A. Jeong, M.-C. Lee e C.S. Kim. 2007. Abiotic and biotic stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing the multiprotein bridging factor 1a (MBF1a) transcriptional coactivator gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 354(2): 440–446. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.212.
- Kim, K.-S., J.R. Unfried, D.L. Hyten, R.D. Frederick, G.L. Hartman, R.L. Nelson, Q. Song e B.W. Diers. 2012a. Molecular mapping of soybean rust resistance in soybean accession PI 561356 and SNP haplotype analysis of the *Rpp1* region in diverse germplasm. **Theoretical and Applied Genetics** 125(6): 1339–1352. doi: 10.1007/s00122-012-1932-5.

- Kim, M.Y., K. Van, Y.J. Kang, K.H. Kim e S.-H. Lee. 2012b. Tracing soybean domestication history: From nucleotide to genome. **Breeding Science** 61(5): 445–452. doi: 10.1270/jsbbs.61.445.
- King, Z.R., S.P. Childs, D.K. Harris, K.F. Pedley, J.W. Buck, H.R. Boerma e Z. Li. 2017. A new soybean rust resistance allele from PI 423972 at the *Rpp4* locus. **Molecular Breeding** 37(5). doi: 10.1007/s11032-017-0658-0.
- King, Z.R., D.K. Harris, K.F. Pedley, Q. Song, D. Wang, Z. Wen, J.W. Buck, Z. Li e H. Roger Boerma. 2016. A novel *Phakopsora pachyrhizi* resistance allele (*Rpp*) contributed by PI 567068A. **Theoretical and Applied Genetics** 129(3): 517–534. doi: 10.1007/s00122-015-2645-3.
- Klosowski, A.C., L. Brahm, G. Stammler e L.L.M. De Mio. 2016a. Competitive fitness of *Phakopsora pachyrhizi* isolates with mutations in the *CYP51* and *CYTB* genes. **Phytopathology** 106(11): 1278–1284. doi: 10.1094/PHYTO-01-16-0008-R.
- Klosowski, A.C., L.L. May De Mio, S. Miessner, R. Rodrigues e G. Stammler. 2016b. Detection of the F129L mutation in the cytochrome *b* gene in *Phakopsora pachyrhizi*: F129L mutation in the *CYTB* gene in *P. pachyrhizi*. **Pest Management Science** 72(6): 1211–1215. doi: 10.1002/ps.4099.
- Koester, R.P., J.A. Skoneczka, T.R. Cary, B.W. Diers e E.A. Ainsworth. 2014. Historical gains in soybean (*Glycine max* Merr.) seed yield are driven by linear increases in light interception, energy conversion, and partitioning efficiencies. **Journal of Experimental Botany** 65(12): 3311–3321. doi: 10.1093/jxb/eru187.
- Korves, T. e J. Bergelson. 2004. A novel cost of *R* gene resistance in the presence of disease. **The American Naturalist** 163(4): 489–504. doi: 10.1086/382552.
- Koskela, T., S. Puustinen, V. Salonen e P. Mutikainen. 2002. Resistance and tolerance in a host plant-holoparasitic plant interaction: genetic variation and costs. **Evolution** 56(5): 899–908. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb01403.x.
- Kover, P.X. e B.A. Schaal. 2002. Genetic variation for disease resistance and tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99(17): 11270–11274. doi: 10.1073/pnas.102288999.
- Kumudini, S., C.V. Godoy, J.E. Board, J. Omielan e M. Tollenaar. 2008. Mechanisms involved in soybean rust-induced yield reduction. **Crop Science** 48(6): 2334–2342. doi: 10.2135/cropsci2008.01.0009.
- Kumudini, S., C.V. Godoy, B. Kennedy, E. Prior, J. Omielan, H.R. Boerma e D. Hershman. 2010. Role of host-plant resistance and disease development stage on leaf photosynthetic competence of soybean rust Infected leaves. **Crop Science** 50(6): 2533–2542. doi: 10.2135/cropsci2010.01.0003.
- Kunjjeti, S.G., G. Iyer, E. Johnson, E. Li, K.E. Broglie, G. Rauscher e G.J. Rairdan. 2016. Identification of *Phakopsora pachyrhizi* candidate effectors with virulence activity in a distantly related pathosystem. **Frontiers in Plant Science** 7: 269. doi: 10.3389/fpls.2016.00269.

- Lado, B., I. Matus, A. Rodríguez, L. Inostroza, J. Poland, F. Belzile, A. del Pozo, M. Quincke, M. Castro e J. von Zitzewitz. 2013. Increased genomic prediction accuracy in wheat breeding through spatial adjustment of field trial data. **G3: Genes | Genomes | Genetics** 3(12): 2105–2114. doi: 10.1534/g3.113.007807.
- Laffont, J.-L., K. Wright e M. Hanafi. 2013. Genotype plus genotype  $\times$  block of environments biplots. **Crop Science** 53(6): 2332–2341. doi: 10.2135/cropsci2013.03.0178.
- Lam, H.-M., X. Xu, X. Liu, W. Chen, G. Yang, F.-L. Wong, M.-W. Li, W. He, N. Qin, B. Wang, J. Li, M. Jian, J. Wang, G. Shao, J. Wang, S.S.-M. Sun e G. Zhang. 2010. Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. **Nature Genetics** 42(12): 1053–1059. doi: 10.1038/ng.715.
- Lange, C.E. e L.C. Federizzi. 2009. Estimation of soybean genetic progress in the South of Brazil using multi-environmental yield trials. **Scientia Agricola** 66(3): 309–316. doi: 10.1590/S0103-90162009000300005.
- Le Bot, J., V. Serra, J. Fabre, X. Draye, S. Adamowicz e L. Pagès. 2010. DART: A software to analyse root system architecture and development from captured images. **Plant and Soil** 326(1–2): 261–273. doi: 10.1007/s11104-009-0005-2.
- LEB-ESALQ. 2019. **Série de dados climatológicos do Campus Luiz de Queiroz de Piracicaba, SP**. <http://www.leb.esalq.usp.br/posto/> (acesso em 9 de fevereiro de 2019).
- Lee, G.-A., G.W. Crawford, L. Liu, Y. Sasaki e X. Chen. 2011. Archaeological soybean (*Glycine max*) in East Asia: Does size matter? **PLoS ONE** 6(11): e26720. doi: 10.1371/journal.pone.0026720.
- Lee, D.-J., M. Durbán e P. Eilers. 2013. Efficient two-dimensional smoothing with P-spline ANOVA mixed models and nested bases. **Computational Statistics & Data Analysis** 61: 22–37. doi: 10.1016/j.csda.2012.11.013.
- Lee, S.J., W. Yan, J.K. Ahn e I.M. Chung. 2003. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Research** 81(2): 181–192. doi: 10.1016/S0378-4290(02)00220-4.
- Lewers, K.S. e R.G. Palmer. 1997. Recurrent selection in soybean. p. 275–313. *In* **Plant Breeding Reviews**. John Wiley & Sons, Ltd, Hoboken, New Jersey, United States.
- Li, H. e J.W. Burton. 2002. Selecting increased seed density to increase indirectly soybean seed protein concentration. **Crop Science** 42(2): 393–398. doi: 10.2135/cropsci2002.3930.
- Li, S., J.R. Smith, J.D. Ray e R.D. Frederick. 2012. Identification of a new soybean rust resistance gene in PI 567102B. **Theoretical and Applied Genetics** 125(1): 133–142. doi: 10.1007/s00122-012-1821-y.
- Lobet, G., X. Draye e C. Périlleux. 2013. An online database for plant image analysis software tools. **Plant Methods** 9(1): 38. doi: 10.1186/1746-4811-9-38.
- Loehrer, M., C. Langenbach, K. Goellner, U. Conrath e U. Schaffrath. 2008. Characterization of nonhost resistance of *Arabidopsis* to the Asian soybean rust. **Molecular plant-microbe interactions** 21(11): 1421–1430. doi: 10.1094/MPMI-21-11-1421.

- Loehrer, M., A. Vogel, B. Huettel, R. Reinhardt, V. Benes, S. Duplessis, B. Usadel e U. Schaffrath. 2014. On the current status of *Phakopsora pachyrhizi* genome sequencing. **Frontiers in Plant Science** 5(377). doi: 10.3389/fpls.2014.00377.
- Lu, S., X. Zhao, Y. Hu, S. Liu, H. Nan, X. Li, C. Fang, D. Cao, X. Shi, L. Kong, T. Su, F. Zhang, S. Li, Z. Wang, X. Yuan, E.R. Cober, J.L. Weller, B. Liu, X. Hou, Z. Tian e F. Kong. 2017. Natural variation at the soybean *J* locus improves adaptation to the tropics and enhances yield. **Nature Genetics** 49(5): 773–779. doi: 10.1038/ng.3819.
- Lynch, M., e B. Walsh. 1998. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sinauer, Sunderland, Mass. 980p.
- Maldonado dos Santos, J.V., B. Valliyodan, T. Joshi, S.M. Khan, Y. Liu, J. Wang, T.D. Vuong, M.F. de Oliveira, F.C. Marcelino-Guimarães, D. Xu, H.T. Nguyen e R.V. Abdelnoor. 2016. Evaluation of genetic variation among Brazilian soybean cultivars through genome resequencing. **BMC Genomics** 17(1). doi: 10.1186/s12864-016-2431-x.
- Mansur, L.M., K.G. Lark, H. Kross e A. Oliveira. 1993. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological, and seed traits of soybean (*Glycine max* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 86(8): 907–913. doi: 10.1007/BF00211040.
- MAPA. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: CultivarWeb. **Informações sobre cultivares registradas**. Registro Nacional de Cultivares - RNC. [http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares\\_registradas.php](http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php) (acesso em 22 de janeiro de 2019).
- Maphosa, M., H. Talwana, P. Gibson e P. Tukamuhabwa. 2012. Combining ability for resistance to soybean rust in F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> soybean populations. **Field Crops Research** 130: 1–7. doi: 10.1016/j.fcr.2012.02.004.
- Marschalek, R., M.C. Silva, S.B. dos Santos, J.R. Manke, C. Biegging, G. Porto, E. Wickert e A. de Andrade. 2017. Image - Rice Grain Scanner: A three-dimensional fully automated assessment of grain size and quality traits. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 17(1): 89–97. doi: 10.1590/1984-70332017v17n1s15.
- Martins, J.A.S. e F.C. Juliatti. 2014. Genetic control of partial resistance to Asian soybean rust. **Acta Scientiarum. Agronomy** 36(1): 11–17. doi: 10.4025/actasciagron.v36i1.16919.
- Matei, G., G. Benin, L.G. Woyann, S.C. Dalló, A.S. Milioli e A.D. Zdziarski. 2017. Agronomic performance of modern soybean cultivars in multi-environment trials. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 52(7): 500–511. doi: 10.1590/s0100-204x2017000700004.
- McLean, R. e D.E. Byth. 1976. Resistance of soybean to rust in Australia. **Australian Plant Pathology Society Newsletter** 5(3): 34–36. doi: 10.1071/APP9760034a.
- McLean, R. e D. Byth. 1980. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. **Australian Journal of Agricultural Research** 31(5): 951 - 956. doi: 10.1071/AR9800951.
- Melo, C.L.P. de, A.D. Roese e A.C.P. Goulart. 2015. Tolerância de genótipos de soja à ferrugem asiática. **Ciência Rural** 45(8): 1353–1360. doi: 10.1590/0103-8478cr20141309.

- Mengistu, A., J.D. Ray, J.R. Smith, P.R. Arelli, N. Bellaloui, P. Chen, G. Shannon e D. Boykin. 2018. Effect of charcoal rot on selected putative drought tolerant soybean genotypes and yield. **Crop Protection** 105: 90–101. doi: 10.1016/j.cropro.2017.11.012.
- Meuwissen, T.H., B.J. Hayes e M.E. Goddard. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics** 157(4): 1819–1829.
- Mickelbart, M.V., P.M. Hasegawa e J. Bailey-Serres. 2015. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. **Nature Reviews Genetics** 16(4): 237–251. doi: 10.1038/nrg3901.
- Mikaberidze, A. e B.A. McDonald. 2018. Measuring tolerance to a major fungal pathogen in elite wheat cultivars. **bioRxiv**: 354357. doi: 10.1101/354357.
- Mikel, M.A., B.W. Diers, R.L. Nelson e H.H. Smith. 2010. Genetic diversity and agronomic improvement of North American soybean germplasm. **Crop Science** 50(4): 1219–1229. doi: 10.2135/cropsci2009.08.0456.
- Miles, M.R., M.R. Bonde, S.E. Nester, D.K. Berner, R.D. Frederick e G.L. Hartman. 2011. Characterizing resistance to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Plant Disease** 95(5): 577–581. doi: 10.1094/PDIS-06-10-0450.
- Monteros, M.J., A.M. Missaoui, D.V. Phillips, D.R. Walker e H.R. Boerma. 2007. Mapping and confirmation of the ‘Hyuuga’ red-brown lesion resistance gene for Asian soybean rust. **Crop Science** 47(2): 829–834. doi: 10.2135/cropsci06.07.0462.
- Moore, C.R., D.S. Gronwall, N.D. Miller e E.P. Spalding. 2013. Mapping quantitative trait loci affecting *Arabidopsis thaliana* seed morphology features extracted computationally from images. **G3: Genes | Genomes | Genetics** 3(1): 109–118. doi: 10.1534/g3.112.003806.
- Moreau, L., H. Monod, A. Charcosset e A. Gallais. 1999. Marker-assisted selection with spatial analysis of unreplicated field trials. **Theoretical and Applied Genetics** 98(2): 234–242. doi: 10.1007/s001220051063.
- Morrison, M.J., H.D. Voldeng e E.R. Cober. 1999. Physiological changes from 58 years of genetic improvement of short-season soybean cultivars in Canada. **Agronomy Journal** 91(4): 685–689. doi: 10.2134/agronj1999.914685x.
- Mueller, T.A., M.R. Miles, W. Morel, J.J. Marois, D.L. Wright, R.C. Kemerait, C. Levy e G.L. Hartman. 2009. Effect of fungicide and timing of application on soybean rust severity and yield. **Plant Disease** 93(3): 243–248. doi: 10.1094/PDIS-93-3-0243.
- Murithi, H.M., J.S. Haudenschild, F. Beed, G. Mahuku, M.H.A.J. Joosten e G.L. Hartman. 2017. Virulence diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from East Africa compared to a geographically diverse collection. **Plant Disease** 101(7): 1194–1200. doi: 10.1094/PDIS-10-16-1470-RE.
- Musoli, P.C., C. Cilas, D. Pot, A. Nabaggala, S. Nakendo, J. Pande, A. Charrier, T. Leroy e D. Bieysse. 2013. Inheritance of resistance to coffee wilt disease (*Fusarium xylarioides* Steyaert) in Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre) and breeding perspectives. **Tree Genetics & Genomes** 9(2): 351–360. doi: 10.1007/s11295-012-0557-9.

- Nelson, R.L. e P. Wang. 1989. Variation and evaluation of seed shape in soybean. **Crop Science** 29(1): 147–150. doi: 10.2135/cropsci1989.0011183X002900010033x.
- Ney, B., M.O. Bancal, P. Bancal, I.J. Bingham, J. Foulkes, D. Gouache, N. Paveley e J. Smith. 2013. Crop architecture and crop tolerance to fungal diseases and insect herbivory. Mechanisms to limit crop losses. **European Journal of Plant Pathology** 135(3): 561–580. doi: 10.1007/s10658-012-0125-z.
- Niu, Y., Y. Xu, X.-F. Liu, S.-X. Yang, S.-P. Wei, F.-T. Xie e Y.-M. Zhang. 2013. Association mapping for seed size and shape traits in soybean cultivars. **Molecular Breeding** 31(4): 785–794. doi: 10.1007/s11032-012-9833-5.
- Oakey, H., A. Verbyla, W. Pitchford, B. Cullis e H. Kuchel. 2006. Joint modeling of additive and non-additive genetic line effects in single field trials. **Theoretical and Applied Genetics** 113(5): 809–819. doi: 10.1007/s00122-006-0333-z.
- Oerke, E.-C. 2006. Crop losses to pests. **The Journal of Agricultural Science** 144(1): 31–43. doi: 10.1017/S0021859605005708.
- Oliveira, I.J. de, N.A. Vello, P. de M.J. Vieira e P.T. Wysmierski. 2014. Diallel among soybean genotypes with high oil content and resistance to sudden death syndrome. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 57(2): 178–186. doi: 10.1590/S1516-89132014000200004.
- Oloka, H.K., P. Tukamuhabwa, T. Sengooba, E. Adipala e P. Kabayi. 2009. Potential for soybean rust tolerance among elite soybean lines in Uganda. **Crop Protection** 28(12): 1076–1080. doi: 10.1016/j.cropro.2009.08.008.
- Ono, Y., P. Buriticá e J.F. Hennen. 1992. Delimitation of *Phakopsora*, *Physopella* and *Cerotelium* and their species on Leguminosae. **Mycological Research** 96(10): 825–850. doi: 10.1016/S0953-7562(09)81029-0.
- Pagán, I. e F. García-Arenal. 2018. Tolerance to plant pathogens: Theory and experimental evidence. **International Journal of Molecular Sciences** 19(3): 810. doi: 10.3390/ijms19030810.
- Papadakis, J.S. 1937. **Méthode statistique pour des expériences sur champ**. 23<sup>o</sup> ed Institut d'Amélioration des Plantes à Salonique, Thessalonique.
- Park, R.F., J.J. Burdon e A. Jahoor. 1999. Evidence for somatic hybridization in nature in *Puccinia recondita* f. sp. tritici, the leaf rust pathogen of wheat. **Mycological Research** 103(6): 715–723. doi: 10.1017/S0953756298007631.
- Park, R.F. e C.R. Wellings. 2012. Somatic hybridization in the Uredinales. **Annual Review of Phytopathology** 50(1): 219–239. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095405.
- Paul, C., C.B. Hill e G.L. Hartman. 2011. Comparisons of visual rust assessments and DNA levels of *Phakopsora pachyrhizi* in soybean genotypes varying in rust resistance. **Plant Disease** 95(8): 1007–1012. doi: 10.1094/PDIS-10-10-0729.
- Payne, R.W. 2006. New and traditional methods for the analysis of unreplicated experiments. **Crop Science** 46(6): 2476–2481. doi: 10.2135/cropsci2006.04.0273.

- Pedley, K.F., A.K. Pandey, A. Ruck, L.M. Lincoln, S.A. Whitham e M.A. Graham. 2018. *Rpp1* encodes a ULP1-NBS-LRR protein that controls immunity to *Phakopsora pachyrhizi* in soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 32(1): 120–133. doi: 10.1094/MPMI-07-18-0198-FI.
- Pereira, F.A.C., N.A. Vello, G.A. de F. Rocha, C.A. Didoné. 2018. Rust effect estimation in soybean crosses for tolerance to Asian rust. **Ciência Rural** 48(3): e20170496. doi: 10.1590/0103-8478cr20170496.
- Pham, T.A., C.B. Hill, M.R. Miles, B.T. Nguyen, T.T. Vu, T.D. Vuong, T.T. VanToai, H.T. Nguyen e G.L. Hartman. 2010. Evaluation of soybean for resistance to soybean rust in Vietnam. **Field Crops Research** 117(1): 131–138. doi: 10.1016/j.fcr.2010.02.011.
- Piepho, H.-P., M.F. Nazir e M.K.N. Shah. 2016. Design and analysis of a trial to select for stress tolerance. **Communications in Biometry and Crop Science** 11(11–9): 9.
- Piepho, H.P. e E.R. Williams. 2010. Linear variance models for plant breeding trials. **Plant Breeding** 129(1): 1–8. doi: 10.1111/j.1439-0523.2009.01654.x.
- Pilet-Nayel, M.-L., B. Moury, V. Caffier, J. Montarry, M.-C. Kerlan, S. Fournet, C.-E. Durel e R. Delourme. 2017. Quantitative resistance to plant pathogens in pyramiding strategies for durable crop protection. **Frontiers in Plant Science** 8(1838). doi: 10.3389/fpls.2017.01838.
- Pinheiro, J.B., N.A. Vello, C.J. Rossetto e M.I. Zucchi. 2005. Potential of soybean genotypes as insect resistance sources. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 5(3): 294–301. doi: 10.12702/1984-7033.v05n03a06.
- Poveda, K., M.F. Díaz e A. Ramirez. 2018. Can overcompensation increase crop production? **Ecology** 99(2): 270–280. doi: 10.1002/ecy.2088.
- Qi, M., T.I. Link, M. Müller, D. Hirschburger, R.N. Pudake, K.F. Pedley, E. Braun, R.T. Voegele, T.J. Baum e S.A. Whitham. 2016. A small cysteine-rich protein from the Asian soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi*, suppresses plant immunity. **Plos Pathogens** 12(9): e1005827. doi: 10.1371/journal.ppat.1005827.
- Qin, X., F. Feng, D. Li, S.J. Herbert, Y. Liao e K.H.M. Siddique. 2017. Changes in yield and agronomic traits of soybean cultivars released in China in the last 60 years. **Crop and Pasture Science** 68(11): 973–984. doi: 10.1071/CP17002.
- R Core Team. 2018. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raberg, L., A.L. Graham e A.F. Read. 2009. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences** 364(1513): 37–49. doi: 10.1098/rstb.2008.0184.
- Rincão, M.P., M.C. da C.G. de Carvalho, L.C. Nascimento, V.S. Lopes-Caitar, K. de Carvalho, L.M. Darben, A. Yokoyama, M.F. Carazzolle, R.V. Abdelnoor e F.C. Marcelino-Guimarães. 2018. New insights into *Phakopsora pachyrhizi* infection based on transcriptome analysis in planta. **Genetics and Molecular Biology** 41(3): 671–691. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2017-0161.

- Robbins, K.R., J.E. Backlund, e K.D. Schnelle. 2012. Spatial corrections of unreplicated trials using a two-dimensional spline. **Crop Science** 52(3): 1138–1144. doi: 10.2135/cropsci2011.08.0417.
- Rocha, G.A. de F. 2016. **Potencial de cruzamentos de soja em gerações iniciais de endogamia para produtividade de grãos e reação à ferrugem**. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. URL: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-30092016-145044/pt-br.php>.
- Rocha, F. da, F. Bermudez, M.C. Ferreira, K.C. de Oliveira e J.B. Pinheiro. 2014. Effective selection criteria for assessing the resistance of stink bugs complex in soybean. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 14(3): 174–179. doi: 10.1590/1984-70332014v14n3a26.
- Rocha, G.A. de F., F.A. de C. Pereira e N.A. Vello. 2018. Potential of soybean crosses in early inbreeding generations for grain yield. **Crop Breeding and Applied Biotechnology** 18(3): 267–275. doi: 10.1590/1984-70332018v18n3a40.
- Rodríguez-Álvarez, M.X., M.P. Boer, F.A. van Eeuwijk e P.H.C. Eilers. 2018. Correcting for spatial heterogeneity in plant breeding experiments with P-splines. **Spatial Statistics** 23: 52–71. doi: 10.1016/j.spasta.2017.10.003.
- Rogers, J., P. Chen, A. Shi, B. Zhang, A. Scaboo, S.F. Smith e A. Zeng. 2015. Agronomic performance and genetic progress of selected historical soybean varieties in the Southern USA. **Plant Breeding** 134(1): 85–93. doi: 10.1111/pbr.12222.
- Rosielle, A.A. e J. Hamblin. 1981. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environment. **Crop Science** 21(6): 943–946. doi: 10.2135/cropsci1981.0011183X002100060033x.
- Roux, F., L. Gao e J. Bergelson. 2010. Impact of initial pathogen density on resistance and tolerance in a polymorphic disease resistance gene system in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** 185(1): 283–291. doi: 10.1534/genetics.109.112383.
- Rowntree, S.C., J.J. Suhre, N.H. Weidenbenner, E.W. Wilson, V.M. Davis, S.L. Naeve, S.N. Casteel, B.W. Diers, P.D. Esker, J.E. Specht e S.P. Conley. 2013. Genetic gain × management interactions in soybean: I. Planting date. **Crop Science** 53(3): 1128–1138. doi: 10.2135/cropsci2012.03.0157.
- RPSRS. 2014. **Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, safras 2013/2014 e 2014/15**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Pelotas, RS. 128p.
- Rutkoski, J., J. Poland, S. Mondal, E. Autrique, L.G. Pérez, J. Crossa, M. Reynolds e R. Singh. 2016. Canopy temperature and vegetation indices from high-throughput phenotyping improve accuracy of pedigree and genomic selection for grain yield in wheat. **G3: Genes | Genomes | Genetics** 6(9): 2799–2808. doi: 10.1534/g3.116.032888.
- Sackton, T.B. e D.L. Hartl. 2016. Genotypic context and epistasis in individuals and populations. **Cell** 166(2): 279–287. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.047.

- Salas, P., J.C. Oyarzo-Llaipen, D. Wang, K. Chase e L. Mansur. 2006. Genetic mapping of seed shape in three populations of recombinant inbred lines of soybean (*Glycine max* L. Merr.). **Theoretical and Applied Genetics** 113(8): 1459–1466. doi: 10.1007/s00122-006-0392-1.
- Samanfar, B., S.J. Molnar, M. Charette, A. Schoenrock, F. Dehne, A. Golshani, F. Belzile e E.R. Cober. 2017. Mapping and identification of a potential candidate gene for a novel maturity locus, *E10*, in soybean. **Theoretical and Applied Genetics** 130(2): 377–390. doi: 10.1007/s00122-016-2819-7.
- Sayama, T., T. Tanabata, M. Saruta, T. Yamada, T. Anai, A. Kaga e M. Ishimoto. 2017. Confirmation of the pleiotropic control of leaflet shape and number of seeds per pod by the *Lm* gene in induced soybean mutants. **Breeding Science** 67(4): 363–369. doi: 10.1270/jsbbs.16201.
- Schafer, J.F. 1971. Tolerance to plant disease. **Annual Review of Phytopathology** 9(1): 235–252. doi: 10.1146/annurev.py.09.090171.001315.
- Schmitz, H.K., C.-A. Medeiros, I.R. Craig e G. Stammler. 2014. Sensitivity of *Phakopsora pachyrhizi* towards quinone-oxidase-inhibitors and demethylation-inhibitors, and corresponding resistance mechanisms. **Pest Management Science** 70(3): 378–388. doi: 10.1002/ps.3562.
- Schmutz, J., S.B. Cannon, J. Schlueter, J. Ma, T. Mitros, W. Nelson, D.L. Hyten, Q. Song, J.J. Thelen, J. Cheng, D. Xu, U. Hellsten, G.D. May, Y. Yu, T. Sakurai, T. Umezawa, M.K. Bhattacharyya, D. Sandhu, B. Valliyodan, E. Lindquist, M. Peto, D. Grant, S. Shu, D. Goodstein, K. Barry, M. Futrell-Griggs, B. Abernathy, J. Du, Z. Tian, L. Zhu, N. Gill, T. Joshi, M. Libault, A. Sethuraman, X.-C. Zhang, K. Shinozaki, H.T. Nguyen, R.A. Wing, P. Cregan, J. Specht, J. Grimwood, D. Rokhsar, G. Stacey, R.C. Shoemaker e S.A. Jackson. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature** 463(7278): 178–183. doi: 10.1038/nature08670.
- Schneider, R.W., C.A. Hollier, H.K. Whitam, M.E. Palm, J.M. McKemy, J.R. Hernández, L. Levy e R. DeVries-Paterson. 2005. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* in the continental United States. **Plant Disease** 89(7): 774–774. doi: 10.1094/PD-89-0774A.
- Sedivy, E.J., F. Wu e Y. Hanzawa. 2017. Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases. **New Phytologist** 214(2): 539–553. doi: 10.1111/nph.14418.
- Seiler, J.P. 1975. Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology** 32(2): 151–167. doi: 10.1016/0165-1110(75)90004-4.
- Shaner, G. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology** 77(8): 1051. doi: 10.1094/Phyto-67-1051.
- Sharma, S. e M.J. Carena. 2016. Grain quality in maize (*Zea mays* L.): Breeding implications for short-season drought environments. **Euphytica** 212(2): 247–260. doi: 10.1007/s10681-016-1764-5.

- Shorthouse, D. 2010. **SimpleMapp**, an online tool to produce publication-quality point maps. URL: <https://www.simplemapp.net> (acesso em 28 de fevereiro de 2019).
- Sierotzki, H. e G. Scalliet. 2013. A review of current knowledge of resistance aspects for the next-generation succinate dehydrogenase inhibitor fungicides. **Phytopathology** 103(9): 880–887. doi: 10.1094/PHYTO-01-13-0009-RVW.
- Silva, D.C.G., N. Yamanaka, R.L. Brogin, C.A.A. Arias, A.L. Nepomuceno, A.O. Di Mauro, S.S. Pereira, L.M. Nogueira, A.L. L. Passianotto e R.V. Abdelnoor. 2008. Molecular mapping of two loci that confer resistance to Asian rust in soybean. **Theoretical and Applied Genetics** 117(1): 57–63. doi: 10.1007/s00122-008-0752-0.
- Simko, I. e H.-P. Piepho. 2012. The area under the disease progress stairs: calculation, advantage, and application. **Phytopathology** 102(4): 381–389. doi: 10.1094/PHYTO-07-11-0216.
- Simms, E.L. e J. Triplett. 1994. Costs and benefits of plant responses to disease: Resistance and tolerance. **Evolution** 48(6): 1973–1985. doi: 10.2307/2410521.
- Simões, K., A. Hawlik, A. Rehfus, F. Gava e G. Stammler. 2018. First detection of a SDH variant with reduced SDHI sensitivity in *Phakopsora pachyrhizi*. **Journal of Plant Diseases and Protection** 125(1): 21–26. doi: 10.1007/s41348-017-0117-5.
- Singh, O., C.L.L. Gowda, S.C. Sethi, T. Dasgupta, J. Kumar, e J.B. Smithson. 1993. Genetic analysis of agronomic characters in chickpea. II. Estimates of genetic variances from line × tester mating designs. **Theoretical and Applied Genetics** 85(8): 1010–1016. doi: 10.1007/BF00215041.
- Singh, S., D.J. Mackill, e A.M. Ismail. 2009. Responses of SUB1 rice introgression lines to submergence in the field: Yield and grain quality. **Field Crops Research** 113(1): 12–23. doi: 10.1016/j.fcr.2009.04.003.
- Siqueri, F.V., J.T. Yorinori, e M.M. Yuyama. 2011. Doenças da soja. p. 492. *In* **Boletim de pesquisa de soja - 2011**. 1º ed Fundação MT, Rondonópolis, Mato Grosso. 492p.
- Slaminko, T.L., M.R. Miles, R.D. Frederick, M.R. Bonde e G.L. Hartman. 2008. New legume hosts of *Phakopsora pachyrhizi* based on greenhouse evaluations. **Plant Disease** 92(5): 767–771. doi: 10.1094/PDIS-92-5-0767.
- Stekhoven, D.J. e P. Buhlmann. 2012. MissForest-non-parametric missing value imputation for mixed-type data. **Bioinformatics** 28(1): 112–118. doi: 10.1093/bioinformatics/btr597.
- Stewart, S., M. Rodríguez e N. Yamanaka. 2019. Pathotypic variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from Uruguay. **Tropical Plant Pathology**: 1–9. doi: 10.1007/s40858-018-0269-2.
- Stowe, K.A., R.J. Marquis, C.G. Hochwender e E.L. Simms. 2000. The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. **Annual Review of Ecology and Systematics** 31(1): 565–595. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.31.1.565.
- Stram, D.O. e J.W. Lee. 1994. Variance components testing in the longitudinal mixed effects model. **Biometrics** 50(4): 1171–1177.

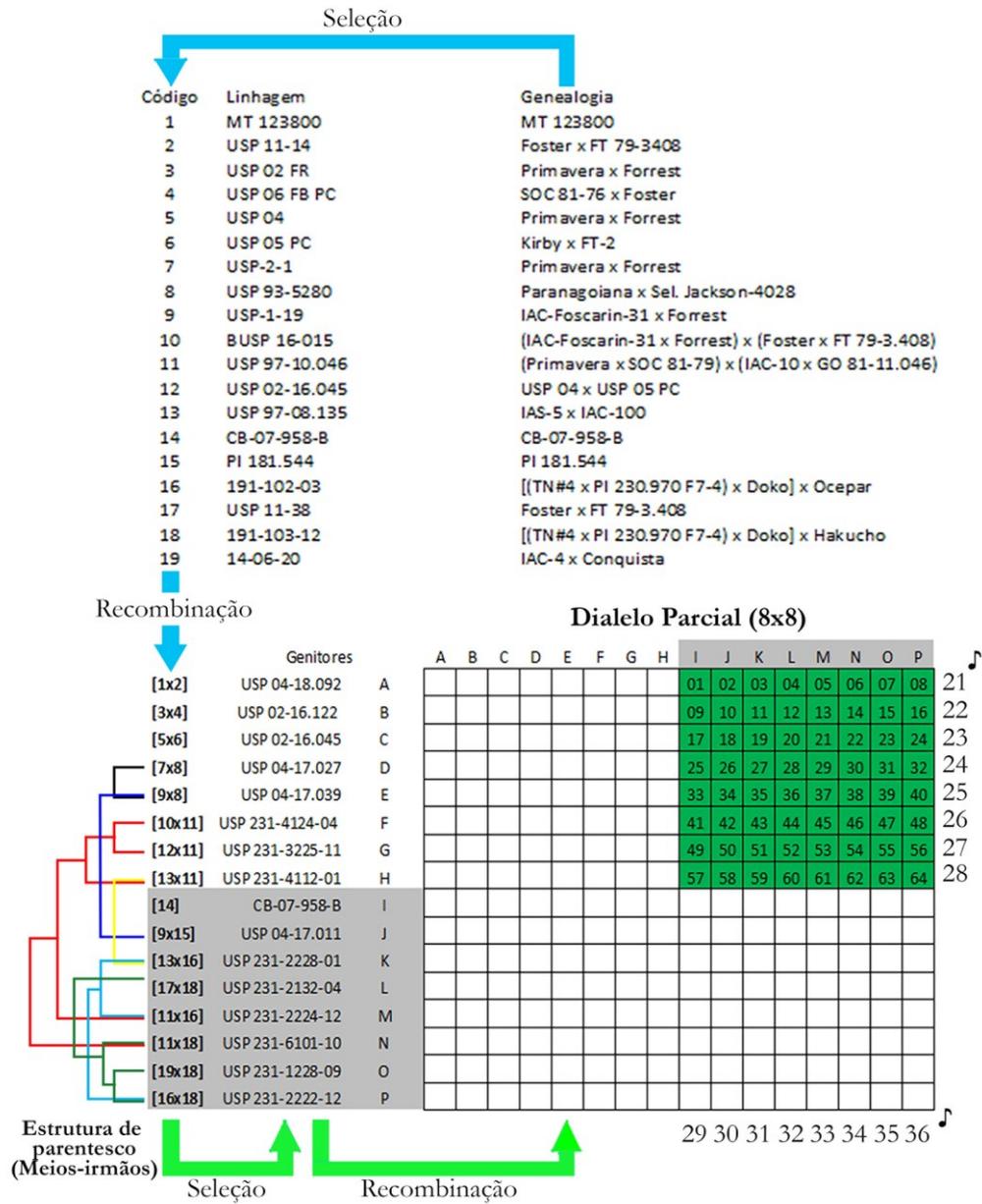
- Sudaric, A., D. Simic e M. Vratarić. 2006. Characterization of genotype by environment interactions in soybean breeding programmes of southeast Europe. **Plant Breeding** 125(2): 191–194. doi: 10.1111/j.1439-0523.2006.01185.x.
- Swoboda, C. e P. Pedersen. 2009. Effect of fungicide on soybean growth and yield. **Agronomy Journal** 101(2): 352–356. doi: 10.2134/agronj2008.0150.
- Tanabata, T., T. Shibaya, K. Hori, K. Ebana e M. Yano. 2012. SmartGrain: High-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. **Plant Physiology** 160(4): 1871–1880. doi: 10.1104/pp.112.205120.
- Teng, W., L. Feng, W. Li, D. Wu, X. Zhao, Y. Han e W. Li. 2017. Dissection of the genetic architecture for soybean seed weight across multiple environments. **Crop and Pasture Science** 68(4): 358–365. doi: 10.1071/CP16462.
- Thiry, A.A., P.N. Chavez Dulanto, M.P. Reynolds e W.J. Davies. 2016. How can we improve crop genotypes to increase stress resilience and productivity in a future climate? A new crop screening method based on productivity and resistance to abiotic stress. **Journal of Experimental Botany** 67(19): 5593–5603. doi: 10.1093/jxb/erw330.
- Tiffin, P. 2000. Are tolerance, avoidance, and antibiosis evolutionarily and ecologically equivalent responses of plants to herbivores? **The American Naturalist** 155(1): 128–138. doi: 10.1086/303301.
- Toledo, J.F.F.D., C.A.A. Arias, M.F.D. Oliveira, C. Triller e Z.D.F.S. Miranda. 2000. Genetical and environmental analyses of yield in six biparental soybean crosses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35(9): 1783–1796. doi: 10.1590/S0100-204X2000000900011.
- Torres, E.A. e I.O. Geraldi. 2007. Partial diallel analysis of agronomic characters in rice (*Oryza sativa* L.). **Genetics and Molecular Biology** 30(3): 605–613. doi: 10.1590/S1415-47572007000400018.
- Tschanz, A.T. e M.C. Tsai. 1983. Evidence of tolerance to soybean rust in soybeans. **Soybean Rust Newsletter** 6: 28–31.
- Tschanz, A.T., T.C. Wang e B.Y. Tsai. 1986. Recent advances in soybean rust research. p. 471. *In Soybean in tropical and subtropical cropping systems*. Asian Vegetable Research and Development Center, Tsukuba, Japan.
- Tukamuhabwa, P. e M. Maphosa. 2010. **State of knowledge on breeding for durable resistance to soybean rust disease in the developing world**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. 46p.
- Twizeyimana, M., P.S. Ojiambo, J.S. Haudenschild, G. Caetano-Anollés, K.F. Pedley, R. Bandyopadhyay e G.L. Hartman. 2011. Genetic structure and diversity of *Phakopsora pachyrhizi* isolates from soybean. **Plant Pathology** 60(4): 719–729. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02428.x.
- Unfried, J.R. e N.R. Braga. 2011. Os desafios da soja tropical no Brasil. p. 23 - 43 *In Boletim de pesquisa de soja 2011*. 1º ed Fundação MT, Rondonópolis, Mato Grosso. 492p.

- USDA. 2019. **World agricultural production | USDA Foreign Agricultural Service**. URL: <https://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production> (acesso 29 de janeiro de 2019).
- Vale, F.X.R.D., J.E. Parlevliet e L. Zambolim. 2001. Concepts in plant disease resistance. **Fitopatologia Brasileira** 26(3): 577–589. doi: 10.1590/S0100-41582001000300001.
- VanKirk, J.R., S.A. Isard, K.F. Cardwell e M.A. Draper. 2012. The ipmPIPE: Overview, lessons, opportunities, and challenges. **Journal of Integrated Pest Management** 3(2): 1–7. doi: 10.1603/IPM11015.
- Velazco, J.G., M.X. Rodríguez-Álvarez, M.P. Boer, D.R. Jordan, P.H.C. Eilers, M. Malosetti e F.A. van Eeuwijk. 2017. Modelling spatial trends in sorghum breeding field trials using a two-dimensional P-spline mixed model. **Theoretical and Applied Genetics** 130(7): 1375–1392. doi: 10.1007/s00122-017-2894-4.
- Vello, N.A. e F.M. Nazato. 2017. Recurrent Selection. p. 171–191. *In* Lopes da Silva, F., Borém, A., Sedyama, T., Ludke, W.H. (orgs.), **Soybean Breeding**. Springer International Publishing, Cham.
- Vencovsky, R. e C.D. Cruz. 1991. Comparação de métodos de correção do rendimento de parcelas com estandes variados. I. Dados simulados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 26(5): 647–657.
- Verbyla, A.P., B.R. Cullis, M.G. Kenward e S.J. Welham. 1999. The analysis of designed experiments and longitudinal data by using smoothing splines. **Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)** 48(3): 269–311. doi: 10.1111/1467-9876.00154.
- Vieira, R.D., D.M. TeKrony e D.B. Egli. 1991. Effect of drought stress on soybean seed germination and vigor. **Journal of Seed Technology** 15(1): 12–21.
- Vittal, R., H.-C. Yang e G.L. Hartman. 2012. Anastomosis of germ tubes and migration of nuclei in germ tube networks of the soybean rust pathogen, *Phakopsora pachyrhizi*. **European Journal of Plant Pathology** 132(2): 163–167. doi: 10.1007/s10658-011-9872-5.
- Vuong, T.D., D.R. Walker, B.T. Nguyen, T.T. Nguyen, H.X. Dinh, D.L. Hyten, P.B. Cregan, D.A. Sleper, J.D. Lee, J.G. Shannon e H.T. Nguyen. 2016. Molecular characterization of resistance to soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd. & Syd.) in soybean cultivar DT 2000 (PI 635999). **PLoS ONE** 11(12): e0164493. doi: 10.1371/journal.pone.0164493.
- Vurro, M., B. Bonciani e G. Vannacci. 2010. Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: impact on agriculture and socio-economic consequences. **Food Security** 2(2): 113–132. doi: 10.1007/s12571-010-0062-7.
- Wang, X., G. Fu, S. Yuan e H. Zhang. 2011. Genetic diversity analysis of seed appearance quality of Chinese soybean mini core collection. **Procedia Engineering** 18: 392–397. doi: 10.1016/j.proeng.2011.11.063.
- Wang, Y., Y. Gu, H. Gao, L. Qiu, R. Chang, S. Chen e C. He. 2016. Molecular and geographic evolutionary support for the essential role of *GIGANTEA* in soybean domestication of flowering time. **BMC Evolutionary Biology** 16(1). doi: 10.1186/s12862-016-0653-9.

- Wei, T. e V. Simko. 2017. **R package “corrplot”: Visualization of a correlation matrix.** Version 0.84. <https://github.com/taiyun/corrplot>.
- Weidenbenner, N.H., S.C. Rowntree, E.W. Wilson, J.J. Suhre, S.P. Conley, S.N. Casteel, V.M. Davis, B.W. Diers, P.D. Esker, J.E. Specht e S.L. Naeve. 2014. Fungicide management does not affect the rate of genetic gain in soybean. **Agronomy Journal** 106(6): 2043-2054. doi: 10.2134/agronj14.0195.
- Whan, A.P., A.B. Smith, C.R. Cavanagh, J.-P.F. Ral, L.M. Shaw, C.A. Howitt e L. Bischof. 2014. GrainScan: A low cost, fast method for grain size and color measurements. **Plant Methods** 10(1): 23. doi: 10.1186/1746-4811-10-23.
- Wickham, H. 2009. **ggplot2: Elegant graphics for data analysis.** Springer-Verlag, New York. 213p.
- Wilkinson, G.N., S.R. Eckert, T.W. Hancock e O. Mayo. 1983. Nearest Neighbour (NN) analysis of field experiments. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)** 45(2): 151–211.
- Wos, G. e Y. Willi. 2015. Temperature-stress resistance and tolerance along a latitudinal cline in north American *Arabidopsis lyrata*. **PLoS ONE** 10(6): e0131808. doi: 10.1371/journal.pone.0131808.
- Wrather, J.A., T.R. Anderson, D.M. Arsyad, Y. Tan, L.D. Ploper, A. Porta-Puglia, H.H. Ram e J.T. Yorinori. 2001. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology** 23(2): 115–121. doi: 10.1080/07060660109506918.
- Wu, X., B. Zhou, J. Zhao, N. Guo, B. Zhang, F. Yang, S. Chen, J. Gai e H. Xing. 2011. Identification of quantitative trait loci for partial resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. **Plant Breeding** 130(2): 144–149. doi: 10.1111/j.1439-0523.2010.01799.x.
- Wysmierski, P.T. e N.A. Vello. 2013. The genetic base of Brazilian soybean cultivars: evolution over time and breeding implications. **Genetics and Molecular Biology** 36(4): 547–555. doi: 10.1590/S1415-47572013005000041.
- Xavier, A., B. Hall, A.A. Hearst, K.A. Cherkauer e K.M. Rainey. 2017. Genetic architecture of phenomic-enabled canopy coverage in *Glycine max*. **Genetics** 206(2): 1081–1089. doi: 10.1534/genetics.116.198713.
- Xu, D., J. Abe, J. Gai e Y. Shimamoto. 2002. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: evidence for multiple origins of cultivated soybean. **Theoretical and Applied Genetics** 105(5): 645–653. doi: 10.1007/s00122-002-0972-7.
- Xue, A.G., S. Rioux, M.J. Morrison, Y. Chen, J. Zhang e W. Yan. 2010. Resistance and tolerance to Sclerotinia Stem Rot in selected short-season soybean cultivars in Canada. **The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology** 4(2): 48–54.
- Yan, W. 2015. Mega-environment analysis and test location evaluation based on unbalanced multiyear data. **Crop Science** 55(1): 113–122. doi: 10.2135/cropsci2014.03.0203.

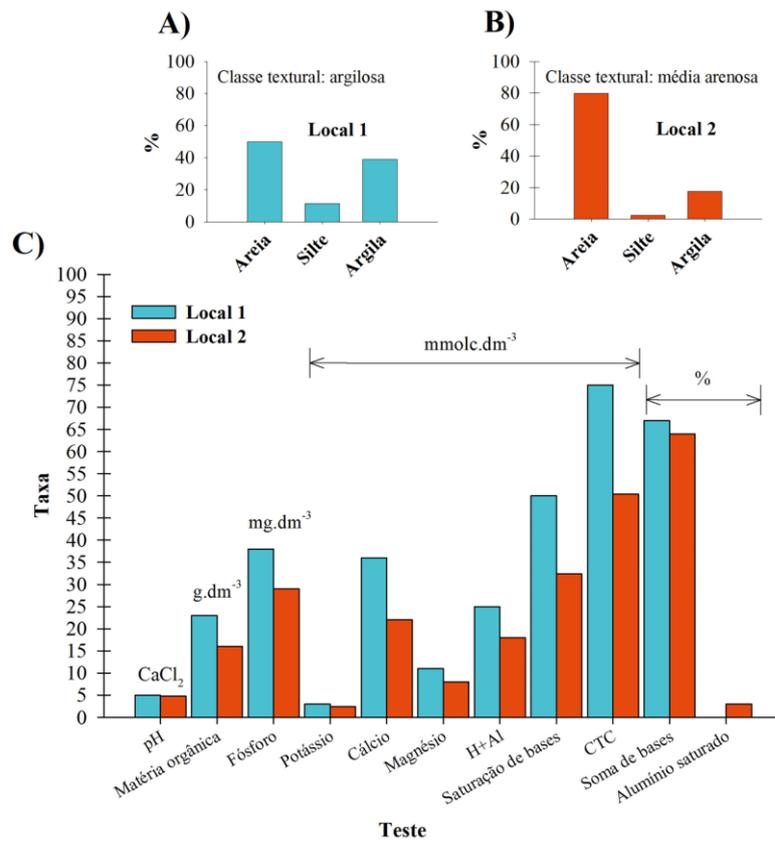
- Yan, F., S. Di, F. Rojas Rodas, T. Rodriguez Torrico, Y. Murai, T. Iwashina, T. Anai e R. Takahashi. 2014. Allelic variation of soybean flower color gene *W4* encoding dihydroflavonol 4-reductase 2. **BMC Plant Biology** 14(1): 58. doi: 10.1186/1471-2229-14-58.
- Yan, W. e M. Kang. 2002. **GGE Biplot analysis: A graphical tool for breeders, geneticists, and agronomists**. CRC Press. Boca Raton, Florida, United States. 288p.
- Yan, W. e I. Rajcan. 2002. Biplot analysis of test sites and trait relations of soybean in Ontario. **Crop Science** 42(1): 11–20. doi: 10.2135/cropsci2002.1100.
- Yang, Z., D. Xin, C. Liu, H. Jiang, X. Han, Y. Sun, Z. Qi, G. Hu e Q. Chen. 2013. Identification of QTLs for seed and pod traits in soybean and analysis for additive effects and epistatic effects of QTLs among multiple environments. **Molecular Genetics and Genomics** 288(12): 651–667. doi: 10.1007/s00438-013-0779-z.
- Yorinori, J.T., W.M. Paiva, R.D. Frederick, L.M. Costamilan, P.F. Bertagnolli, G.E. Hartman, C.V. Godoy e J. Nunes. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. **Plant Disease** 89(6): 675–677. doi: 10.1094/PD-89-0675.
- Zdziarski, A.D., M.H. Todeschini, A.S. Milioli, L.G. Woyann, A. Madureira, M.G. Stoco e G. Benin. 2018. Key soybean maturity groups to increase grain yield in Brazil. **Crop Science** 58(3): 1155–1165. doi: 10.2135/cropsci2017.09.0581.
- Zhang, X.C., M.C.M. Freire, M.H. Le, L.O.D. Oliveira, J.W. Pitkin, G. Segers, V.C. Concibido, G.J. Baley, G.L. Hartman, G. Upchurch, K.F. Pedley e G. Stacey. 2012. Genetic diversity and origins of *Phakopsora pachyrhizi* isolates in the United States. **Asian Journal of Plant Pathology** 6(3): 52–65. doi: 10.3923/ajppaj.2012.52.65.
- Zhang, W.-K., Y.-J. Wang, G.-Z. Luo, J.-S. Zhang, C.-Y. He, X.-L. Wu, J.-Y. Gai e S.-Y. Chen. 2004. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers. **Theoretical and Applied Genetics** 108(6): 1131–1139. doi: 10.1007/s00122-003-1527-2.
- Zhu, S., F.L. Kolb e H.F. Kaeppler. 2003. Molecular mapping of genomic regions underlying barley yellow dwarf tolerance in cultivated oat (*Avena sativa* L.). **Theoretical and Applied Genetics** 106(7): 1300–1306. doi: 10.1007/s00122-003-1198-z.
- Zipfel, C. e G. Felix. 2005. Plants and animals: a different taste for microbes? **Current Opinion in Plant Biology** 8(4): 353–360. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.004.

FIGURAS

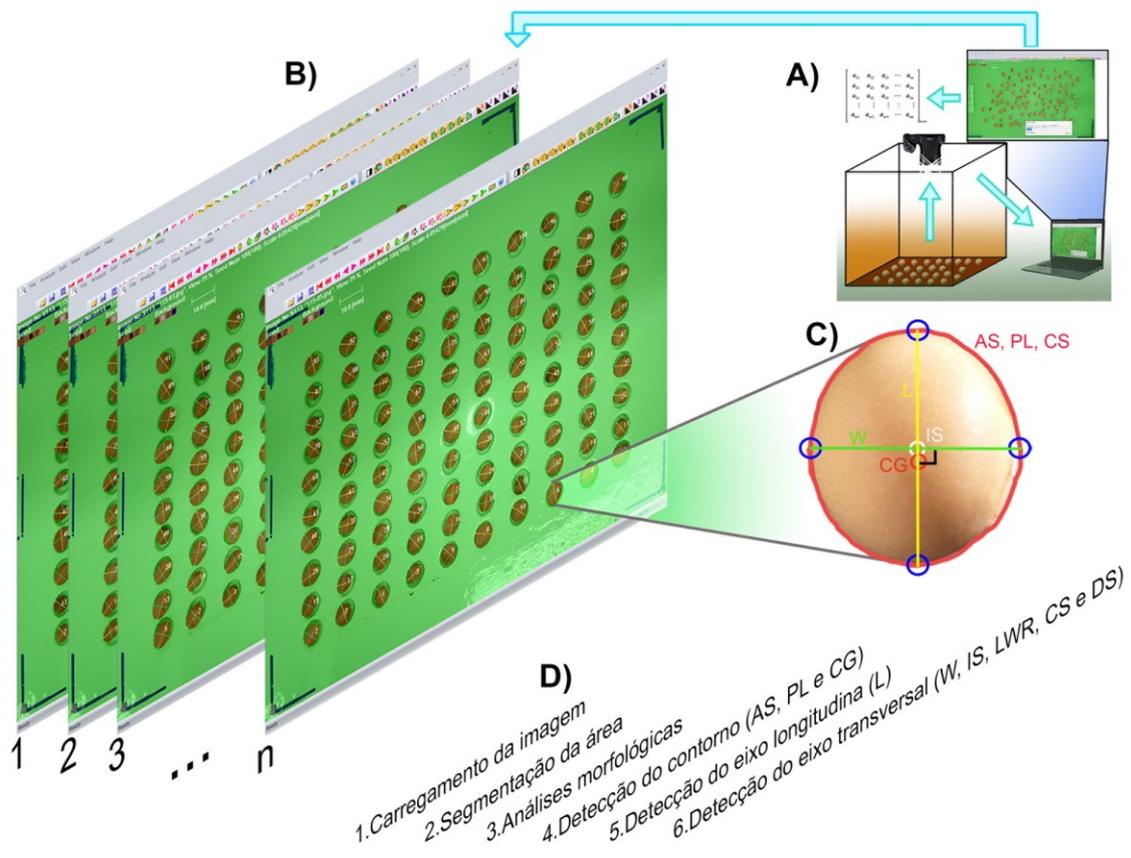


**Figura 1.** Fluxograma do programa de seleção recorrente para o desenvolvimento de genótipos elite de soja e incremento da tolerância ao fungo *P. pachyrhizii*, agente causal da ferrugem asiática. Setas na cor azul indicam as fases que compuseram o primeiro ciclo de seleção recorrente iniciada com a recombinação, seguido das avaliações e seleção das linhagens com melhor performance. Essas linhagens foram recombinadas e deram origem aos genitores do dialelo parcial, caracterizando o segundo ciclo de seleção recorrente (setas em verde). Chaves coloridas a esquerda indicam as relações de parentesco (meios-irmãos) entre os genitores do dialelo. 🎵 Códigos que referenciam os genitores ao longo das análises e discussões da presente tese.

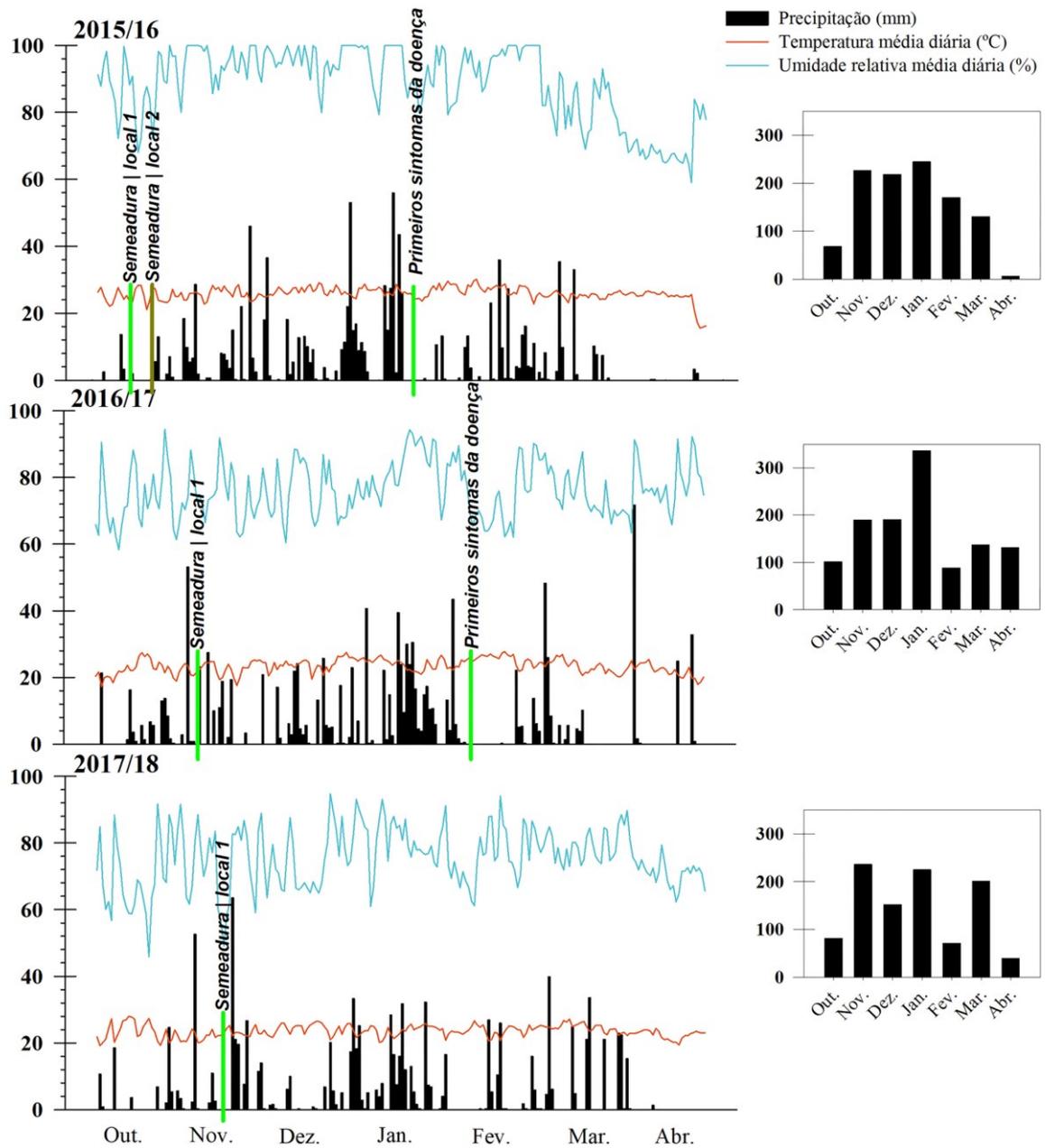




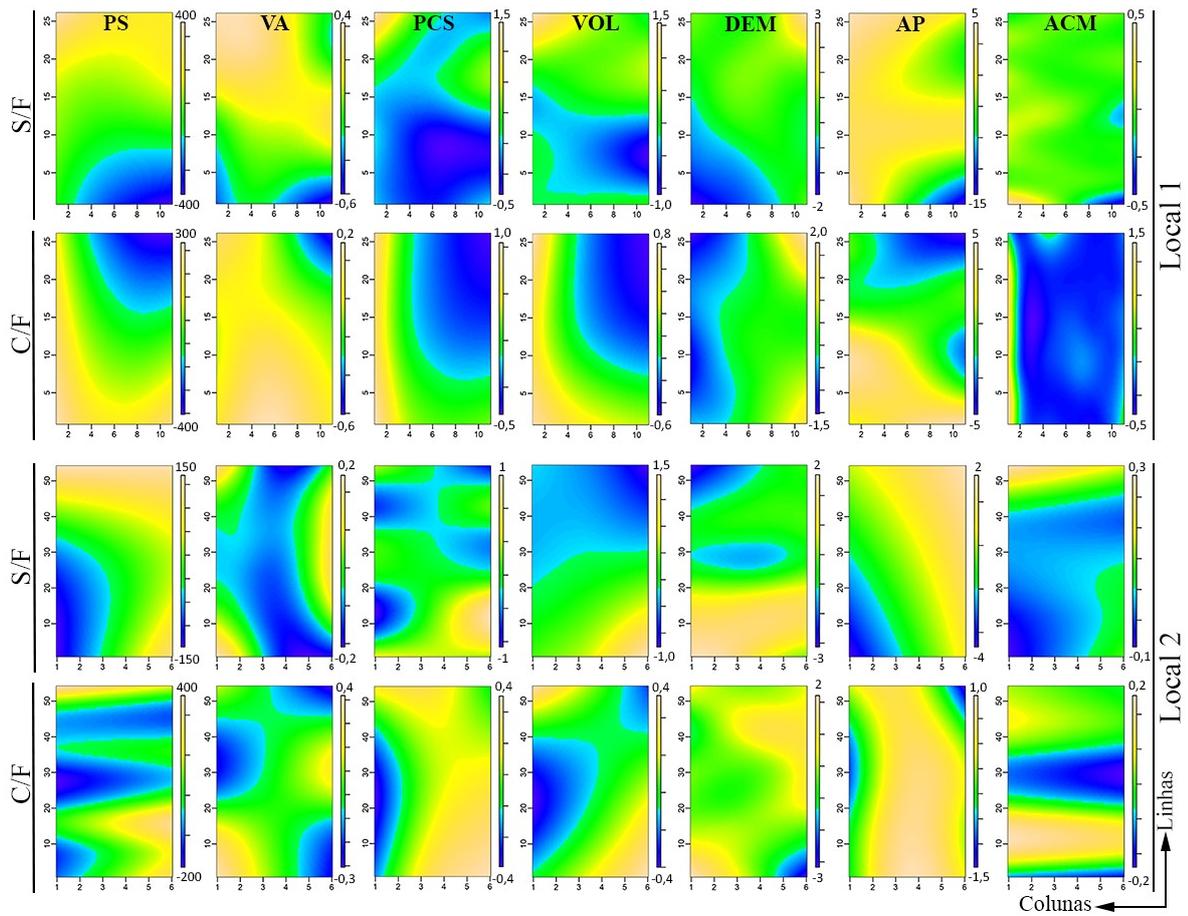
**Figura 3.** Caracterização dos solos das áreas experimentais onde foram conduzidos os experimentos de soja na presença e na ausência da ferrugem asiática. Os experimentos foram conduzidos nos anos agrícolas de 2015/16, 2016/17 e 2017/18 no local 1 (22°50'27,1"S 48°01'24,9"W) e apenas no ano agrícola 2015/16 no local 2 (22°42'15,2"S 47°38'24,6"W) [vide APÊNDICE A para posição geográfica dos locais]. As subfiguras A e B apresentam os resultados para as determinações da composição física dos solos. A subfigura C mostra os resultados para as determinações químicas. As amostras foram examinadas no Laboratório de Análises de Solos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP. pH | potencial hidrogeniônico; H+Al | hidrogênio mais alumínio; CTC | capacidade de troca de cátions.



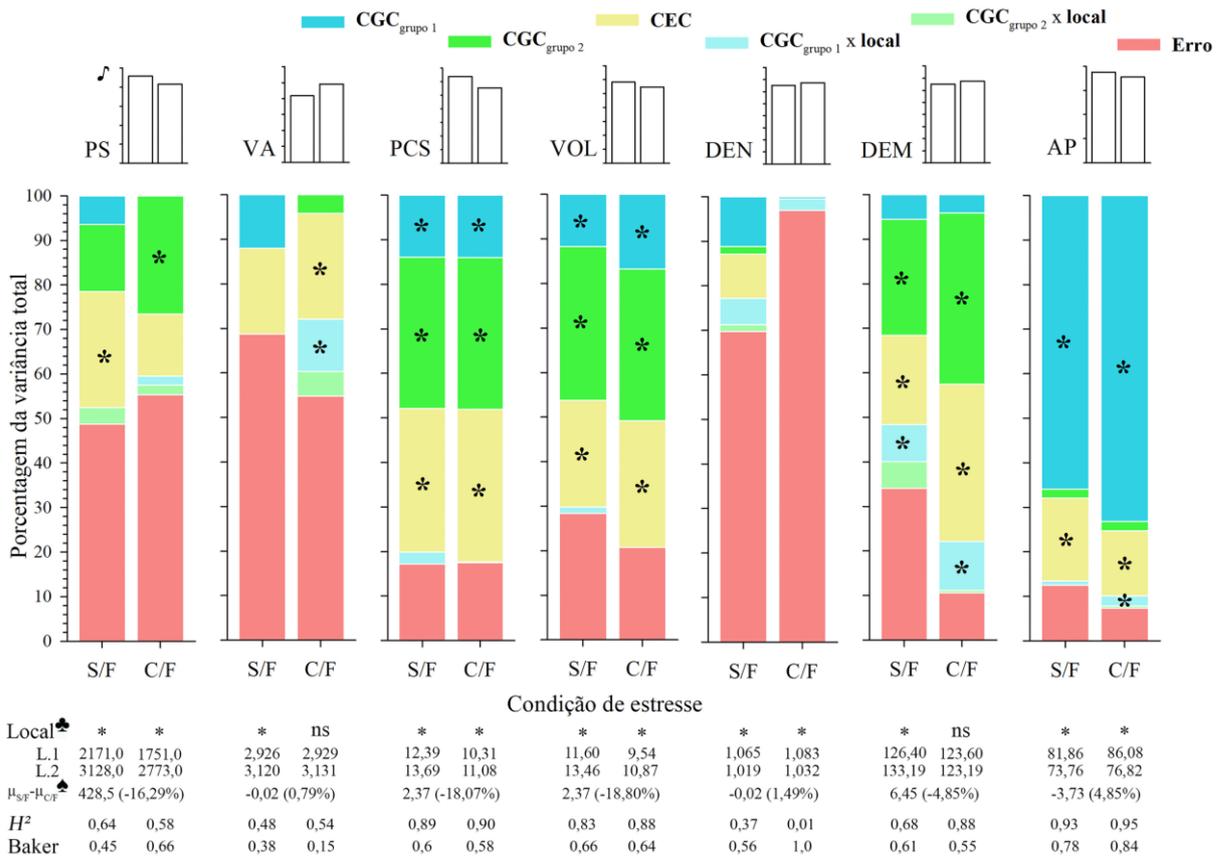
**Figura 4.** Procedimento para fenotipagem de alto rendimento de sementes usando o software SmartGrain (Tanabata et al., 2012). A mesma amostra de sementes utilizada para mensurar o peso de cem sementes foi fotografada (A), processada no software SmartGrain (B), no qual sete parâmetros de tamanho e conformação de sementes foram comutados (C). A subfigura D representa o algoritmo para a análise das imagens. C e D foram adaptados de Tanabata et al. (2012) para a análise de sementes de soja. AS | área de semente; PL | perímetro; CS | circularidade; L | comprimento; W | largura; IS | intersecção entre o segmento L e o segmento W e CG | centro de gravidade.



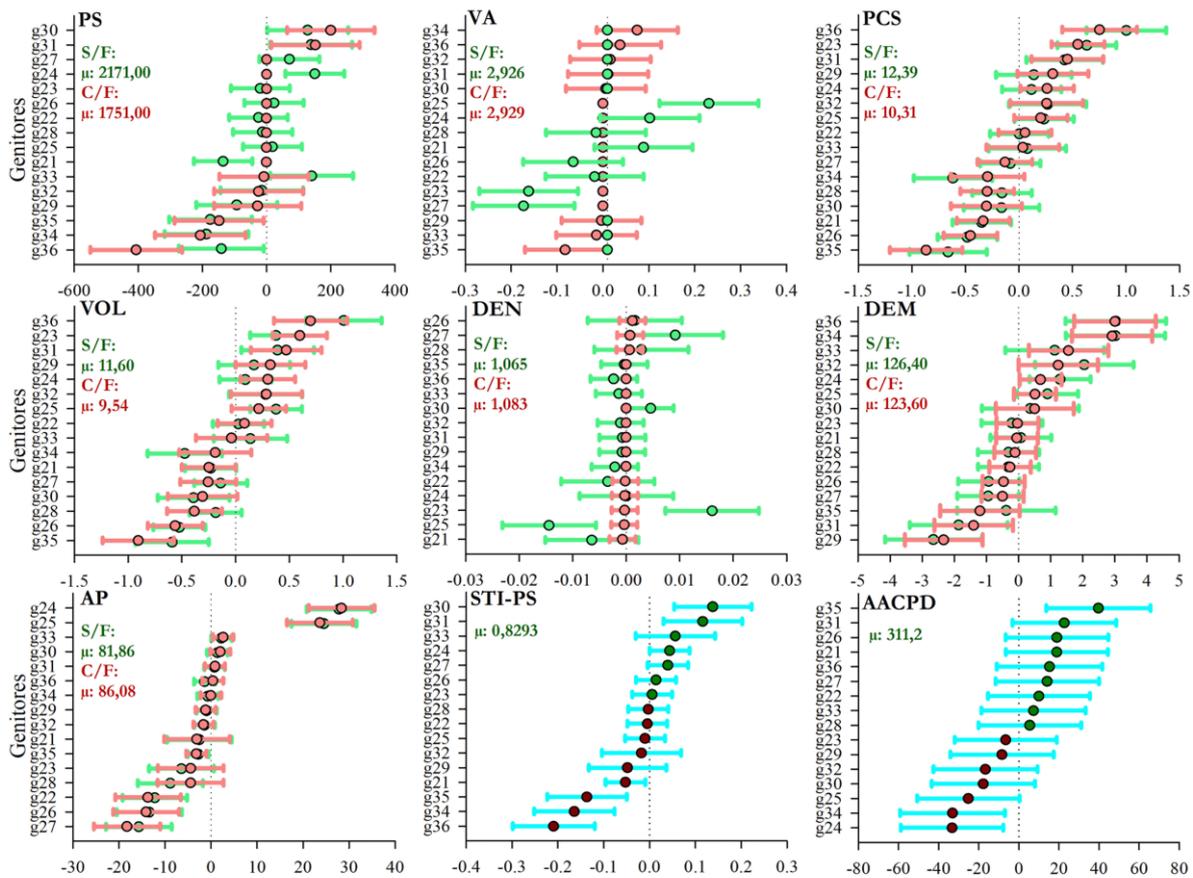
**Figura 5.** Dados climáticos diários plotados para o período de condução dos experimentos nos três anos agrícolas de testes (2015/16, 2016/17 e 2017/18). Os dados foram obtidos da estação meteorológica da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (LEB-ESALQ, 2019). Gráficos de barras menores à direita mostram a precipitação mensal acumulada para cada um dos anos agrícolas e entre os meses de outubro e abril. As coordenadas da estação são: 22°42'10.6"S, 47°37'25.0"O. Local 1| Estação Experimental de Genética – Anhumas (22°50'27.1"S 48°01'24.9"O); local 2| Estação Sede do Departamento de Genética [LGN] (22°42'15.2"S 47°38'24.6"O).



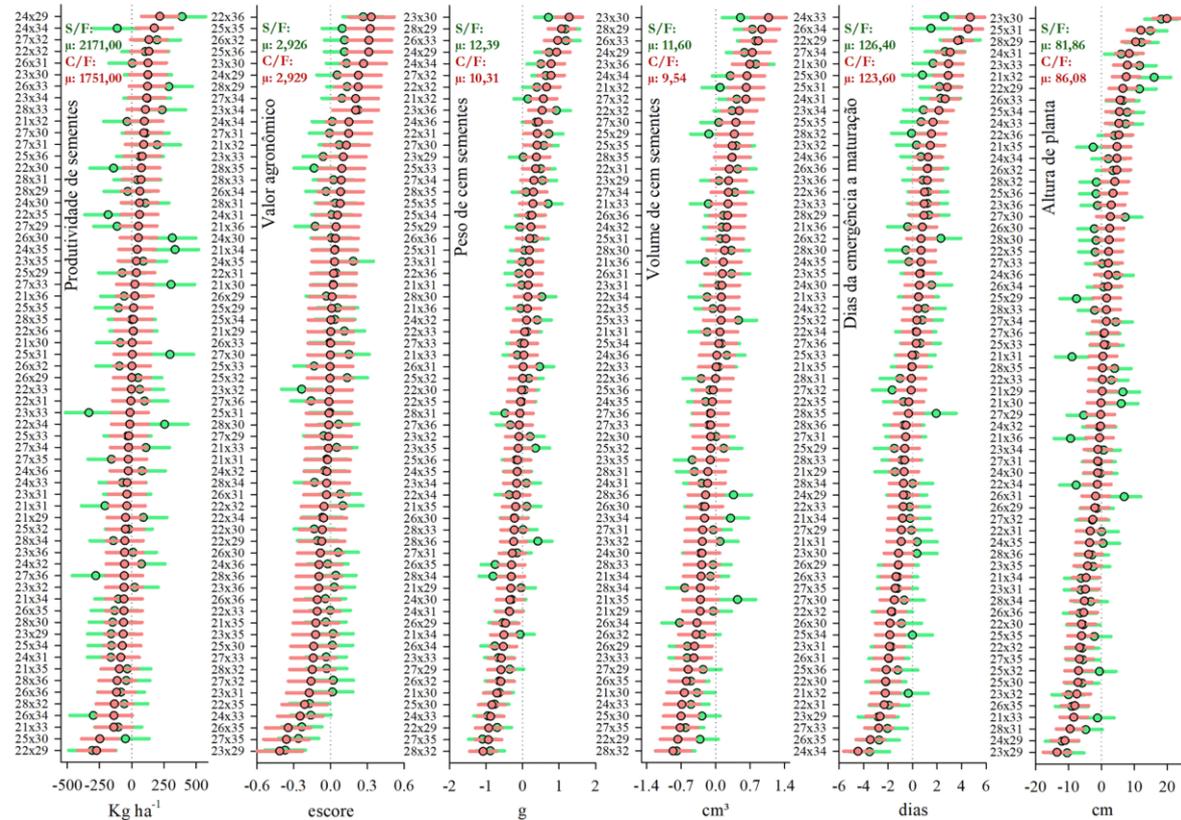
**Figura 6.** Tendências espaciais ajustadas para os quatro experimentos contendo as 64 populações F<sub>5</sub> de soja oriundas de cruzamentos biparentais. Esses experimentos foram conduzidos em dois locais (local 1 e 2) e em duas condições de estresse biótico causado pelo fungo *P. pachyrhizii*, agente causal da ferrugem asiática da soja [ausência [S/F] e presença [C/F] do estresse]. Os experimentos foram organizados lado a lado em cada local, sendo um grid de 11 colunas × 26 linhas no local 1 e 6 colunas × 54 linhas no local 2. Os modelos de análise espacial foram ajustados por meio do pacote SpATS (Rodríguez-Álvarez et al., 2018). As escalas para produtividade de sementes (PS) são expressas em kg ha<sup>-1</sup>, valor agrônômico (VA) são escores de 1 a 5, peso de cem sementes (PCS) são gramas, volume de cem sementes (VOL) são cm<sup>3</sup>, altura de planta (AP) são expressos em cm e acamamento (ACM) são escores de 1 a 5. DEM | são dias da emergência a maturação.



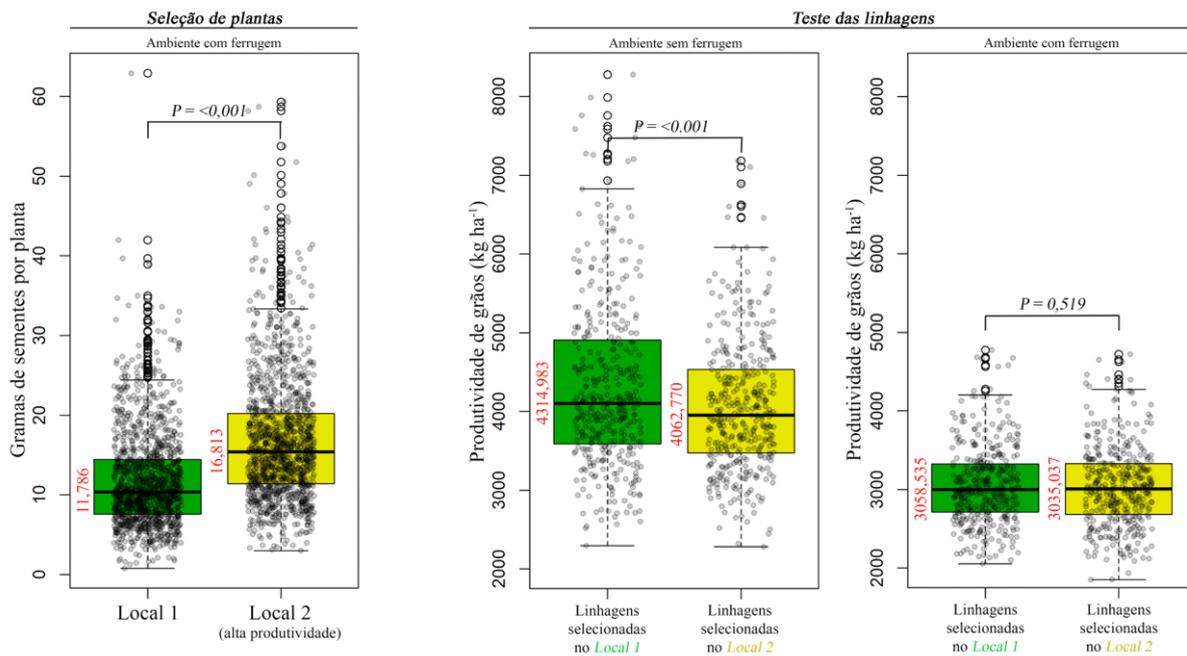
**Figura 7.** Decomposição da variação fenotípica de caracteres agronômicos de soja nos componentes: capacidade geral de combinação referente ao grupo 1 de genitores ( $CGC_{grupo1}$ ), capacidade geral de combinação referente ao grupo 2 de genitores ( $CGC_{grupo2}$ ), capacidade específica de combinação (CEC),  $CGC_{grupo1} \times local$ ,  $CGC_{grupo2} \times local$  e erro. As significâncias foram verificadas por meio de teste de razão de verossimilhança (LRT) ao nível de 5% de probabilidade de erro (\*;  $P < 0,05$ ) considerando a distribuição de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com um grau de liberdade ( $\chi^2 = 3,84$ ). ♣ Gráficos de barra sem preenchimento colorido referem-se ao total de variância fenotípica capturada pelas fontes de variação em cada manejo de estresse. ♠ A significância do efeito fixo de local foi verificada via teste de Wald, também a 5% de probabilidade (\*;  $P < 0,05$ ). ns | não significativo. ♣ Diferença entre as médias ajustadas dos experimentos sem ferrugem ( $\mu_{S/F}$ ) e com ferrugem ( $\mu_{C/F}$ ).  $H^2$  | herdabilidade no sentido amplo; PS | produtividade de sementes ( $kg\ ha^{-1}$ ); VA | valor agronômico (escores de 1 a 5); PCS | peso de cem sementes (g); VOL | volume de cem sementes ( $cm^3$ ); DEN | densidade de sementes ( $g/cm^3$ ); DEM | dias da emergência a maturação; AP | altura de plantas (cm). Razão de Baker =  $(\sigma_{CGC_{g1}}^2 + \sigma_{CGC_{g2}}^2) / (\sigma_{CGC_{g1}}^2 + \sigma_{CGC_{g2}}^2 + \sigma_{CEC}^2)$ .



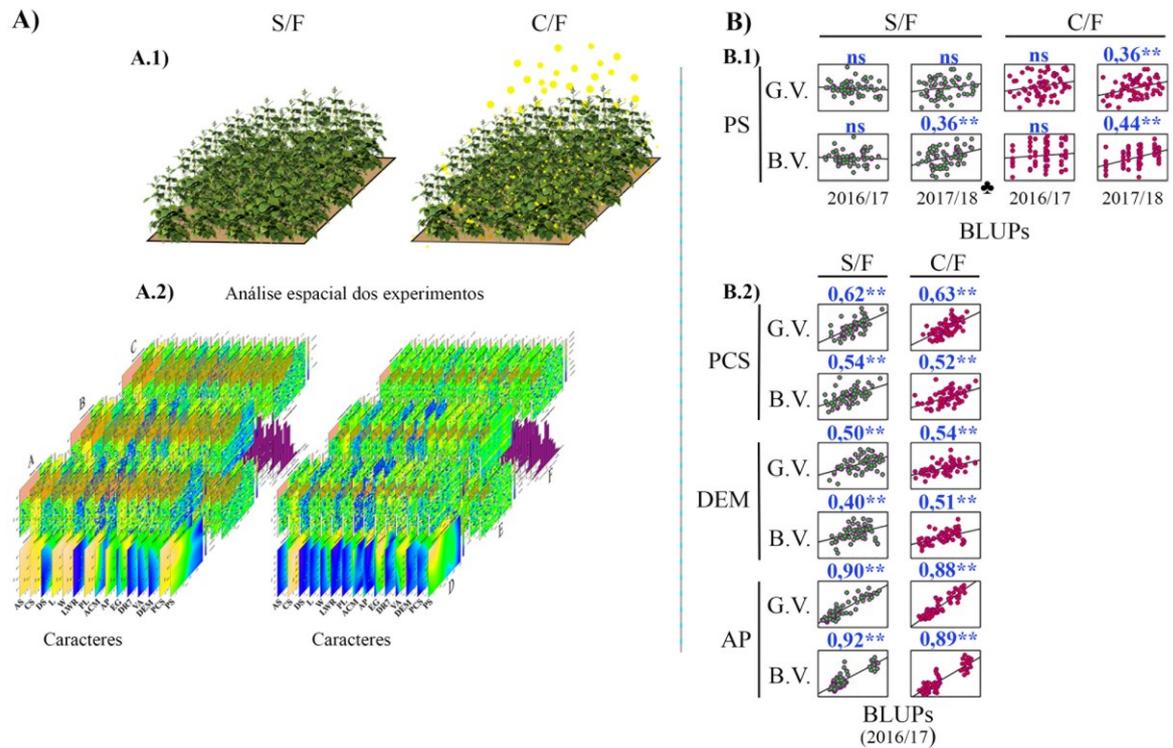
**Figura 8.** Efeitos da capacidade geral de combinação (CGC) acrescida do erro padrão (SE) para 16 genitores cruzadas em um esquema de dialelo parcial 8x8. Os genótipos codificados de 21 a 28 constituem os oito acessos do grupo 1 que foram cruzados com os genitores do grupo 2, codificados de 29 a 36. As estimativas de CGC+SE na cor vermelha foram obtidas dos experimentos conduzidos na presença do estresse biótico (C/F) causado pelo fungo *P. pachyrhizii*, agente causal da ferrugem asiática, enquanto que as estimativas de CGC+SE em verde foram obtidas dos experimentos conduzidos na ausência do estresse (S/F). STI-PS | é o índice de tolerância a estresses (STI) calculado para a produtividade de sementes (PS, kg ha<sup>-1</sup>). AACPD | é a área abaixo da curva de progresso da doença. VA | valor agrônômico (escores de 1 a 5); PCS | peso de cem sementes (g); VOL | volume de cem sementes (cm<sup>3</sup>); DEN | densidade de sementes (g/cm<sup>3</sup>); DEM | dias da emergência a maturação e AP | altura de planta (cm). μ | é o intercepto do modelo (média geral).



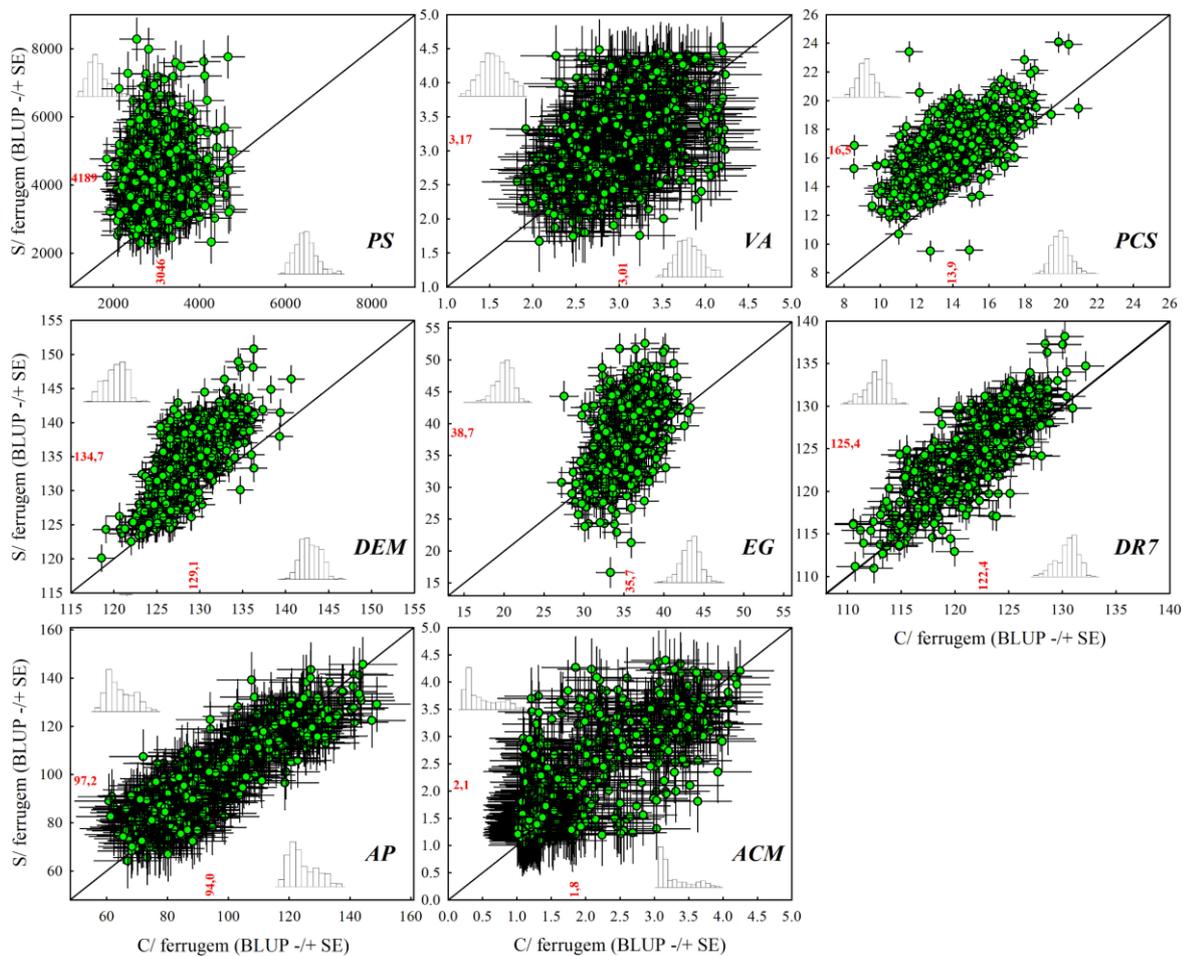
**Figura 9.** Efeitos da capacidade específica de combinação (CEC) acrescida do erro padrão (SE) para um conjunto de sete caracteres mensurados em plantas de 64 populações  $F_5$  de soja oriundos de cruzamentos em esquema de dialelo parcial  $8 \times 8$ . Os genótipos codificados de 21 a 28 constituem os oito acessos alocados no grupo 1, enquanto que, aqueles codificados de 29 a 36, correspondem aos genitores alocados no grupo 2. As estimativas de CEC+SE na cor vermelha foram obtidas dos experimentos conduzidos na presença do estresse biótico (C/F) causado pelo fungo *P. pachyrhizii*, agente causal da ferrugem asiática, enquanto as estimativas de CEC+SE em verde, foram obtidas dos experimentos conduzidos na ausência do estresse (S/F).  $\mu$  | é o intercepto do modelo (média geral).



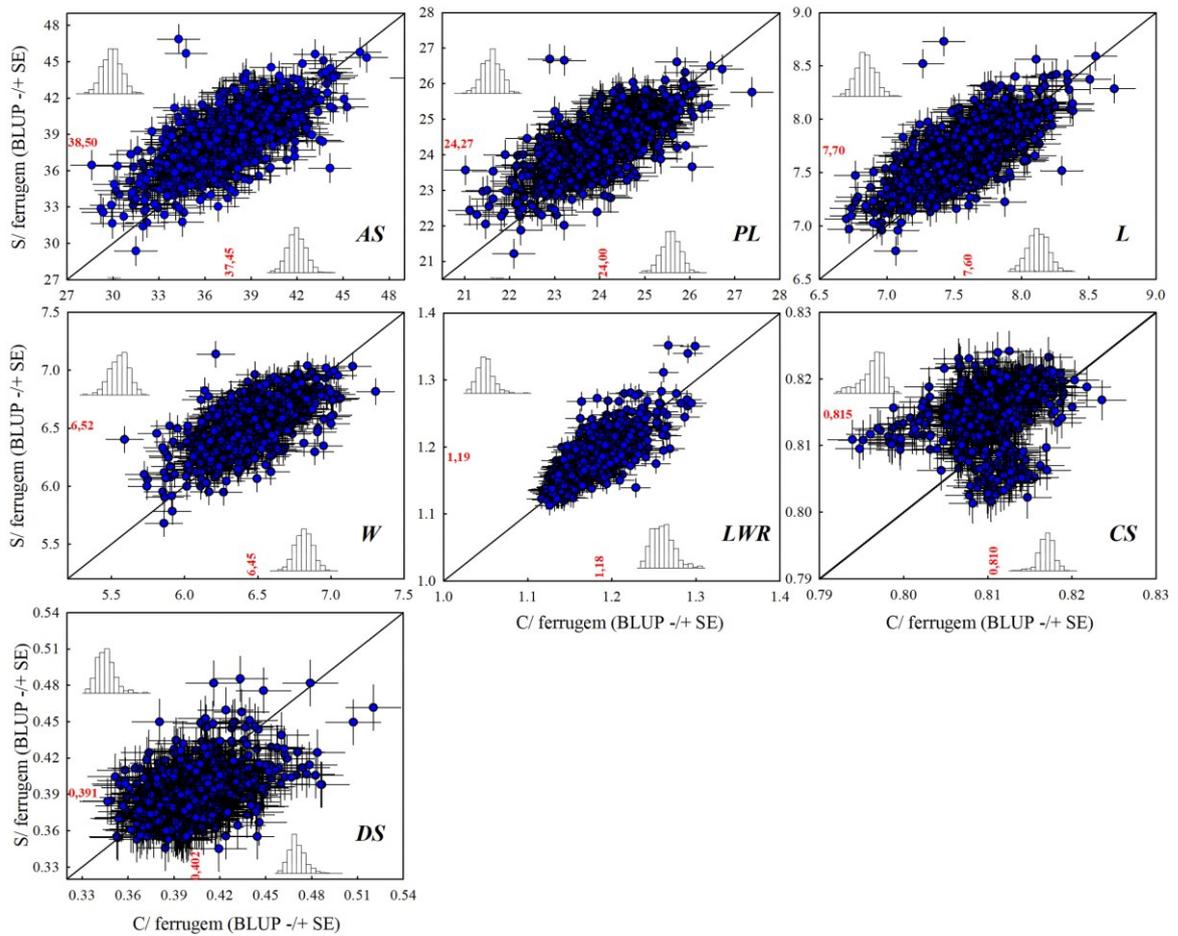
**Figura 10.** Box plots contendo os valores de massa de sementes computado de cada planta de soja selecionada em populações  $F_5$  no ano agrícola de 2015/16, sendo 1.280 plantas em cada local e 2.560 no total (gráfico a esquerda) e performance produtiva das 768 linhagens  $F_{5,6}$  testadas no ano agrícola seguinte em duas condições de estresse biótico causado pela ferrugem asiática. Os valores de produtividade de sementes das linhagens são BLUPs (melhores preditores lineares não viesados) preditos a partir do ajuste de um modelo de análise espacial. P-valores inferiores a 0,001 indicam significância ao nível de 0,1% de probabilidade de erro de acordo com o teste t-student. Para detalhes dos locais de experimentação, consultar a Figura 3 e o APÊNDICE A.



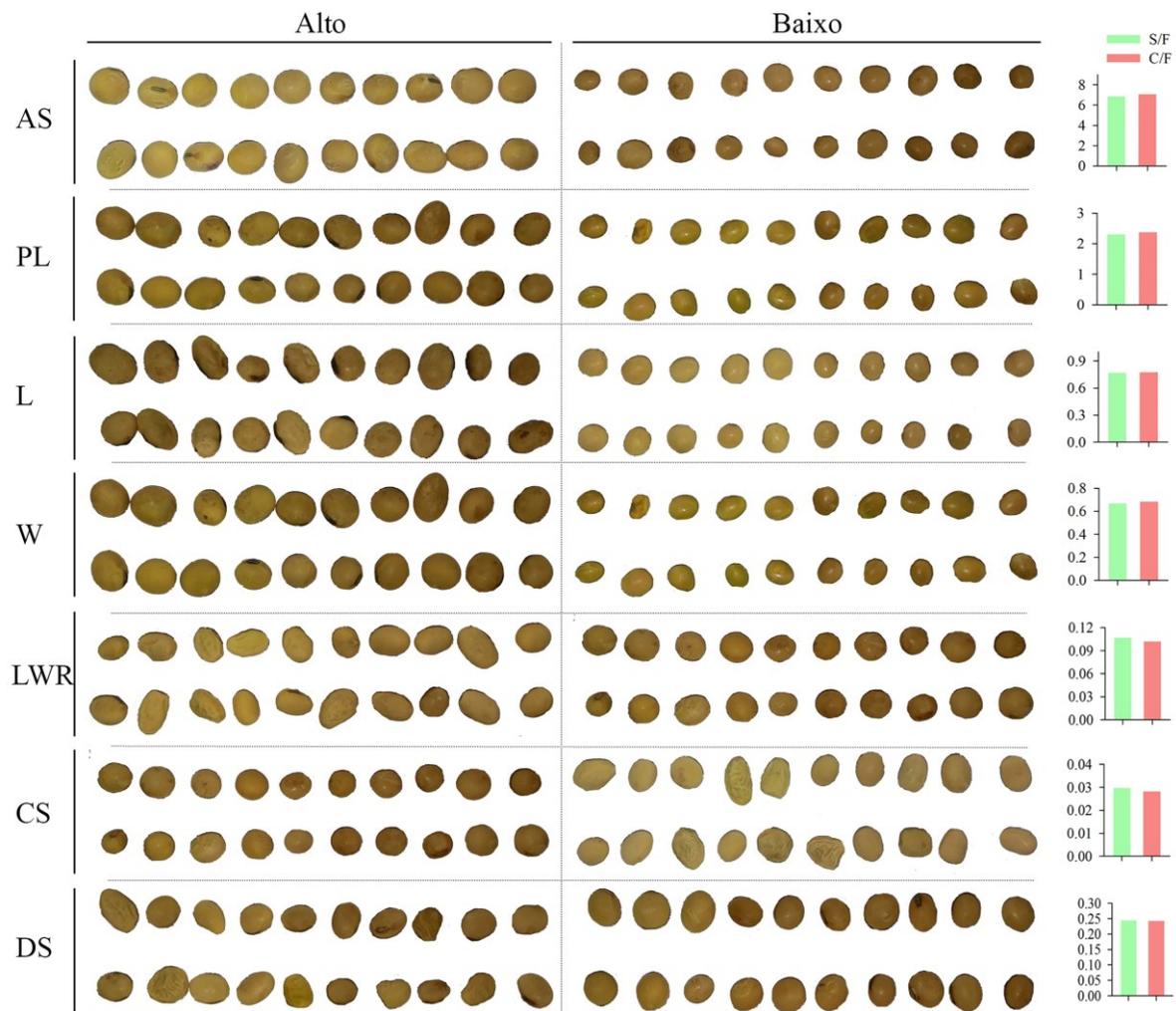
**Figura 11.** Ilustração das análises espaciais dos experimentos conduzidos no ano agrícola de 2016/17 (A), em que A.1 | ilustração dos dois experimentos contendo as 768 linhagens mais três testemunhas avaliados na ausência e na presença (pontuações em amarelo simulando esporos do fungo) da ferrugem. A.2 | resultados na forma de gráficos das análises espaciais via splines bidimensionais penalizadas (P-Spline) e modelos mistos, sendo A os gráficos referentes aos dados brutos, B: dados ajustados, C: resíduos, D: tendências espaciais ajustadas, E: valores genéticos preditos (BLUPs - melhor predictor linear não viesado) do efeito das novas entradas (linhagens) e F: o histograma de distribuição dos BLUPs. Nos gráficos de dispersão mostrados na subfigura B, são observadas as correlações entre os BLUPs das linhagens avaliadas em 2016/17 com os valores genéticos (G.V. – *genetic values*) e valores reprodutivos (B.V. – *breeding values*) computados por meio das análises estatístico-genéticas das populações F<sub>5</sub> de soja avaliadas em experimentos conduzidos no ano agrícola de 2015/16 (B). B.1 | são as correlações entre G.V. e B.V. com os BLUPs para produtividade de sementes (PS) das linhagens computados em experimentos conduzidos no ano agrícola de 2016/17 e 2017/18. B.2 | são as correlações para os caracteres peso de cem sementes (PCS), dias da emergência a maturação (DEM) e altura de planta (AP) avaliados apenas no ano agrícola de 2017/18. S/F | ausência da doença e C/F | presença da doença. ♣ Em 2017/18, apenas o caráter PS foi avaliado e somente na condição de ausência da doença. \*\* Significância ao nível de 1% de probabilidade de erro pelo teste t ( $P < 0,01$ ). ns Ausência de significância. Cada ponto nos gráficos é a média de 12 linhagens e representam um dos 64 cruzamentos biparentais.



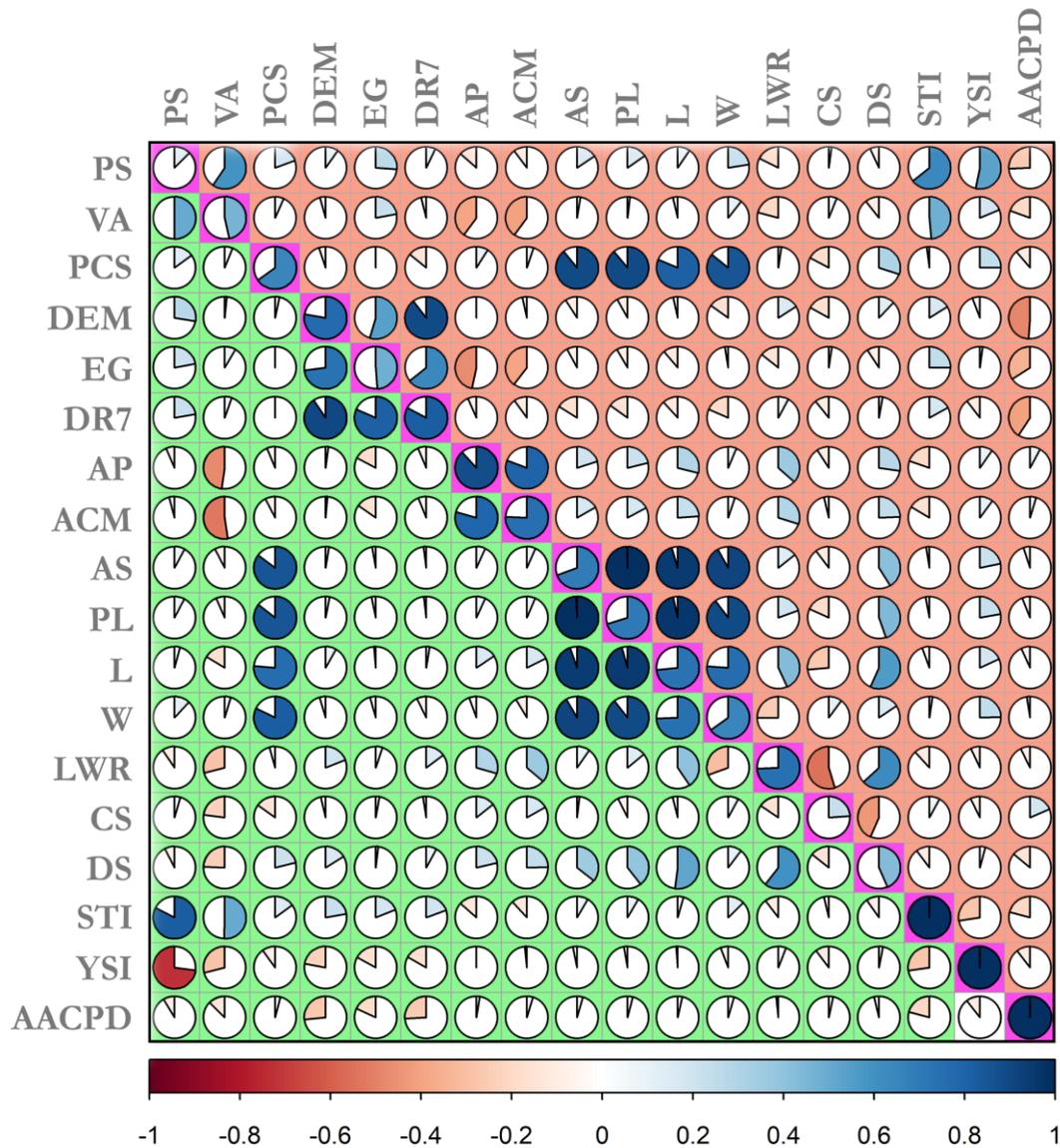
**Figura 12.** Gráficos de dispersão comparando as performances das 768 linhagens  $F_{5:6}$  de soja em duas condições de estresse provocado pelo fungo *P. pachyrhizi*, agente causal da ferrugem asiática (presença [eixo x] e ausência [eixo y] da doença) para um conjunto de oito caracteres agrônômicos. Cada ponto nos gráficos possui a informação do BLUP (melhor preditor linear não viesado) acrescido do erro de predição (SE). Números em vermelho representam a média geral dos genótipos em cada condição de estresse. Também, são mostradas as distribuições dos dados via histogramas por caráter e manejo da doença. Diferenças significativas entre as médias de cada manejo foram constatadas para os caracteres produtividade de sementes (PS), valor agrônômico (VA), peso de cem sementes (PCS), dias da emergência a maturação (DEM), enchimento de grãos (EG), dias para R7 (DR7) e altura de planta (AP) por meio de teste t-pareado e para o acamamento (ACM) via teste de Wilcoxon, ambos ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ( $P < 0,001$ ).



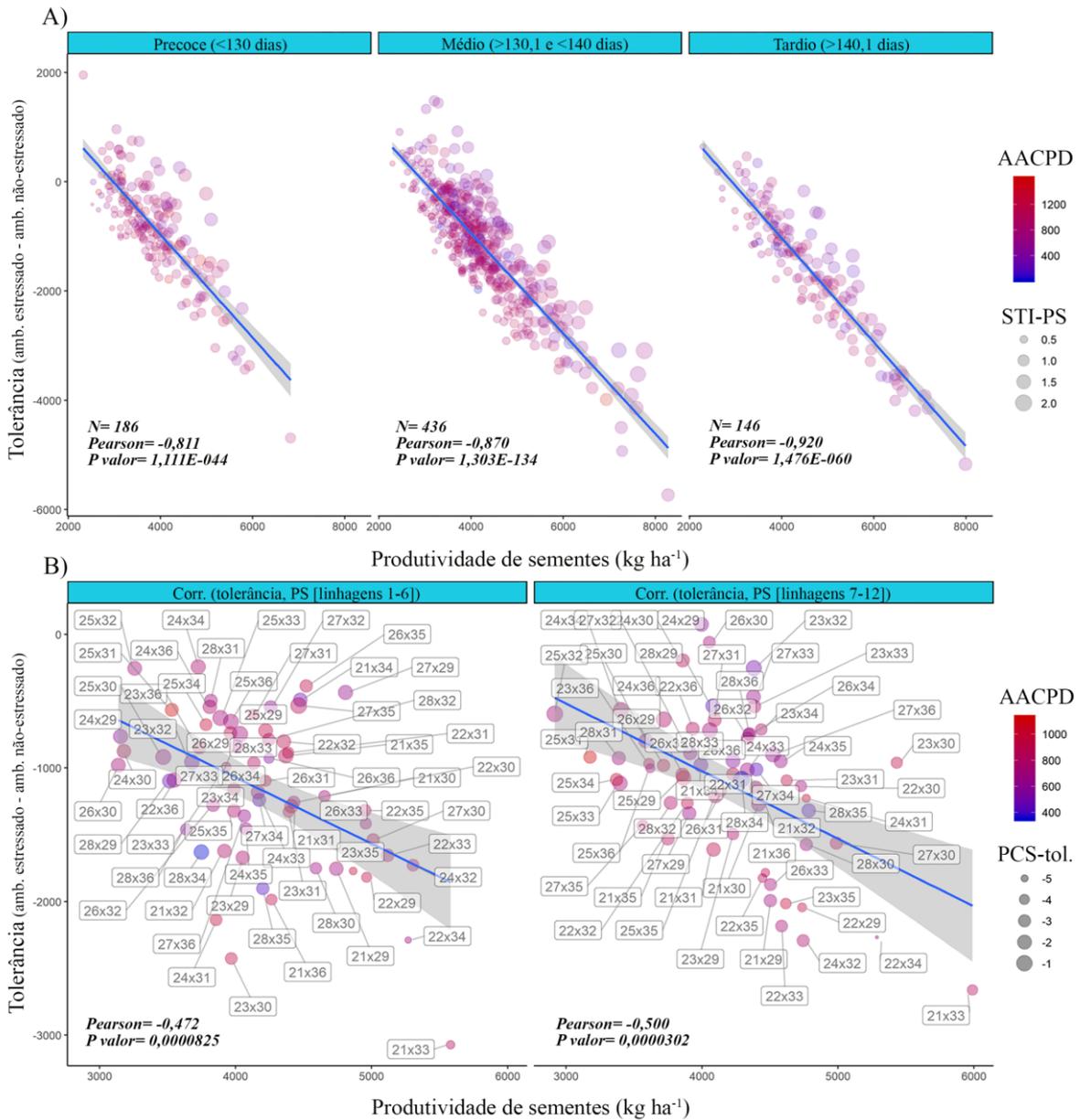
**Figura 13.** Gráficos de dispersão comparando as performances das 768 linhagens  $F_{56}$  de soja avaliadas em duas condições de estresse provocado pelo fungo *P. pachyrhizii*, agente causal da ferrugem asiática (presença [eixo x] e ausência [eixo y] da doença) para um conjunto de sete caracteres de semente mensurados por fenotipagem de alto rendimento. Cada ponto nos gráficos possui a informação do BLUP (melhor preditor linear não viesado) acrescido do erro de predição (SE). Números em vermelho representam a média geral dos genótipos em cada uma das condições de estresse. Também, são mostradas as distribuições dos dados via histogramas por caráter e manejo da doença. Diferenças significativas entre as médias de cada manejo foram constatadas para todos os caracteres por meio do teste t-pareado ao nível de 0,1% de probabilidade de erro ( $P < 0,001$ ). AS | área de semente; PL | perímetro; L | comprimento; W | largura; LWR | razão entre L e W; CS | circularidade; DS | distância entre a intersecção do segmento L e o segmento W para o centro de gravidade da semente (vide Figura 4 para mais detalhes).



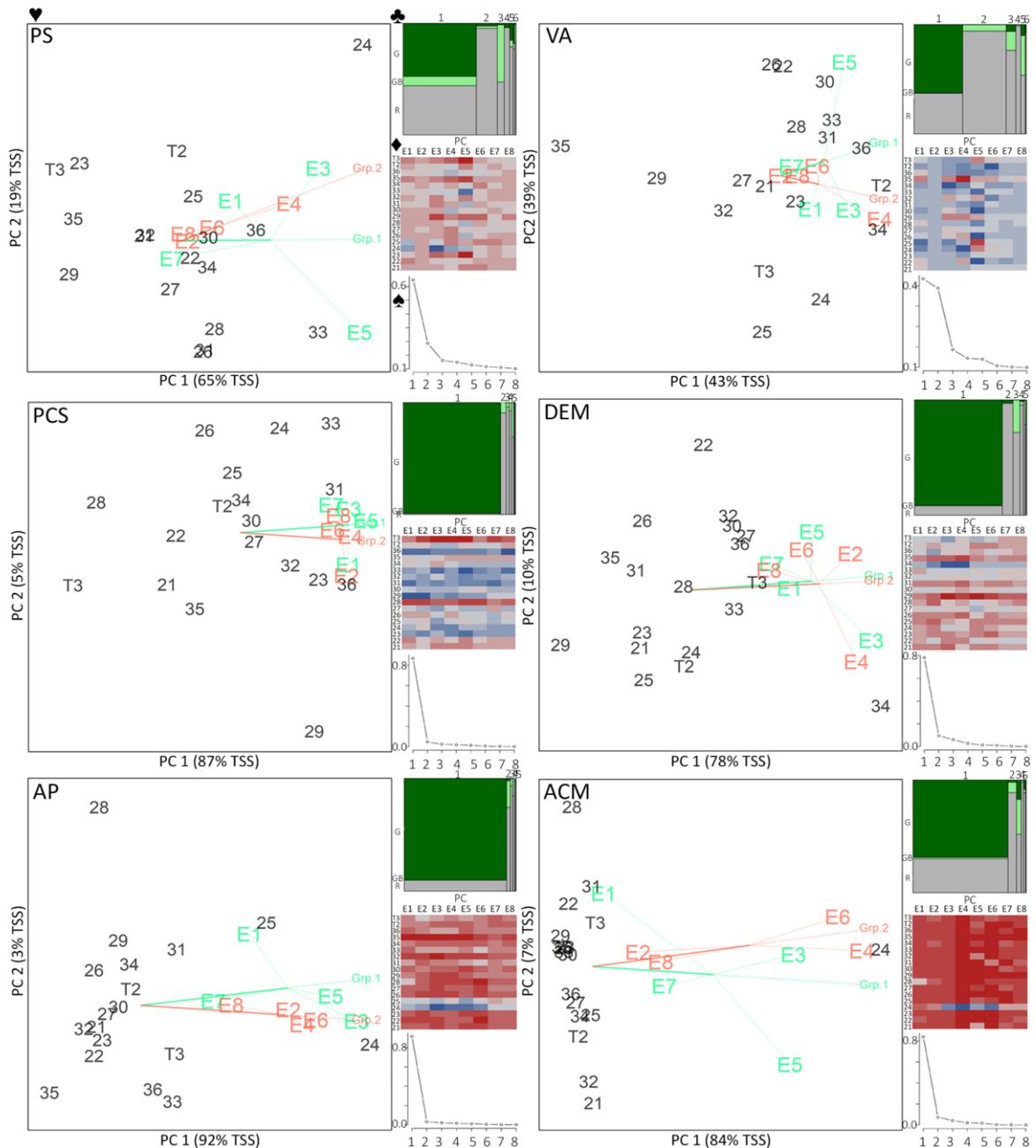
**Figura 14.** Caracterização de sementes oriundas de linhagens  $F_{5:6}$  de soja para sete caracteres mensurados por meio de fenotipagem de alto rendimento. São mostradas subamostras de 20 sementes caracterizadas por apresentarem valores altos e baixos para cada caráter avaliado. A direita, os gráficos de barras representam a magnitude do desvio padrão de cada caráter obtido em experimentos avaliados em duas condições de estresse biótico provocado pelo patógeno *P. pachyrhizii* (ausência do estresse [S/F] e presença do estresse [C/F]). Cada barra representa o desvio padrão obtido de um universo amostral de tamanho  $n= 86.400$  sementes. AS | área de semente; PL | perímetro; L | comprimento; W | largura; LWR | razão entre L e W; CS | circularidade; DS | distância entre a intersecção do segmento L e o segmento W para o centro de gravidade da semente (vide Figura 4 para mais detalhes).



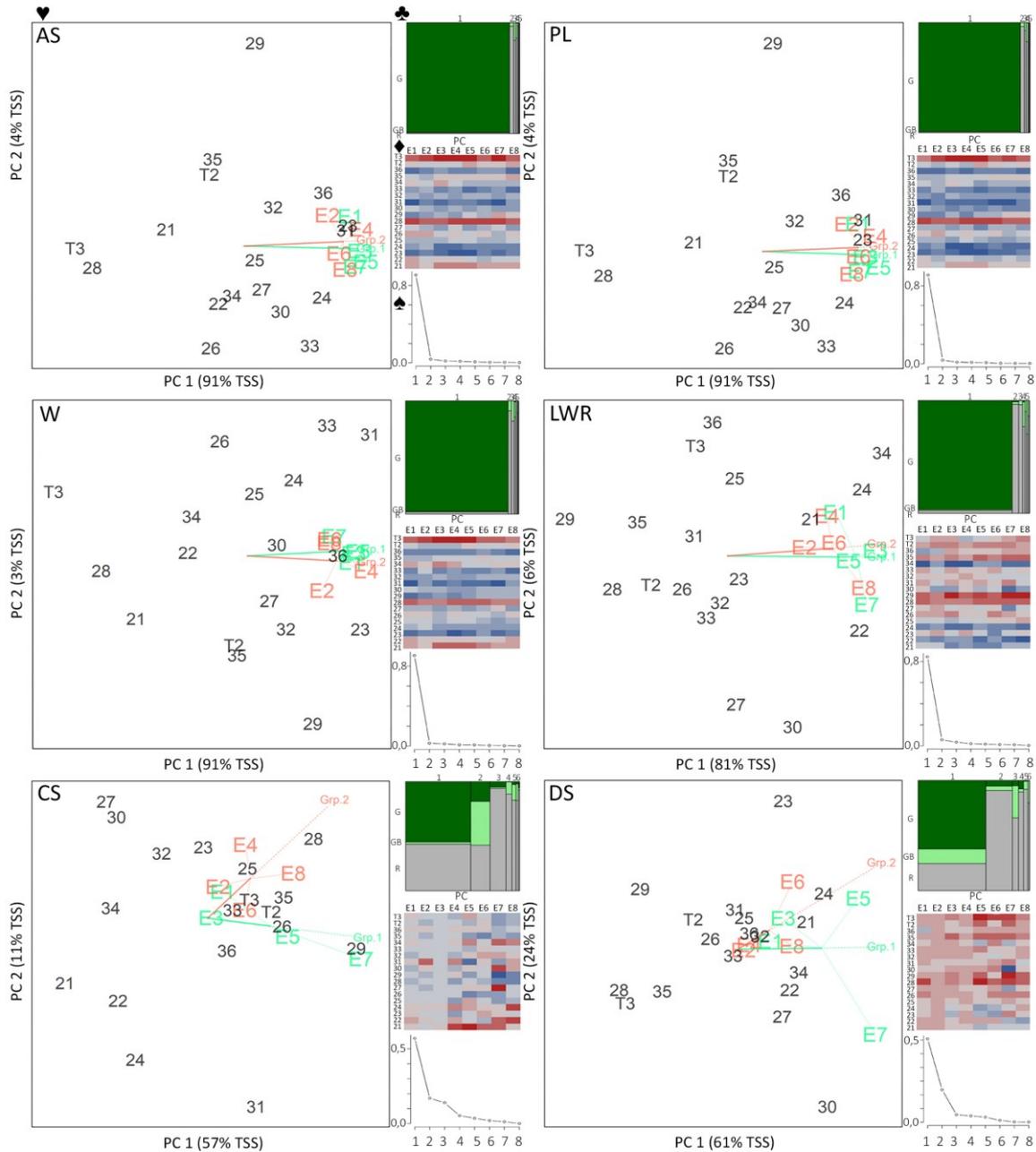
**Figura 15.** Representação gráfica da matriz de correlações de Pearson entre todas as combinações de 18 caracteres mensurados em 768 linhagens  $F_{5:6}$  de soja avaliadas em duas condições de estresse [presença (diagonal superior; vermelho) e ausência (diagonal inferior; verde)] provocado pelo fungo *P. pachyrhizii*, agente causal da ferrugem da soja. A matriz de correlações foi calculada utilizando os BLUPs (melhor preditor linear não viesado) de cada genótipo, exceto para AACPD (área abaixo da curva de progresso da doença). A diagonal na cor rosa representa a correlação da performance de um dado genótipo no ambiente sem estresse com ele próprio no ambiente estressado. PS | produtividade de sementes; VA | valor agrônômico; PCS | peso de cem sementes; DEM | dias da emergência a maturação; EG | enchimento de grãos; DR7 | dias para R7; AP | altura de planta; ACM | acamamento; AS | área de semente; PL | perímetro; L | comprimento; W | largura; LWR | razão entre L e W; CS | circularidade; DS | distância entre a intersecção do segmento L e o segmento W para o centro de gravidade da semente (vide Figura 4 para mais detalhes); STI | índice de tolerância a estresses e YSI | índice de estabilidade.



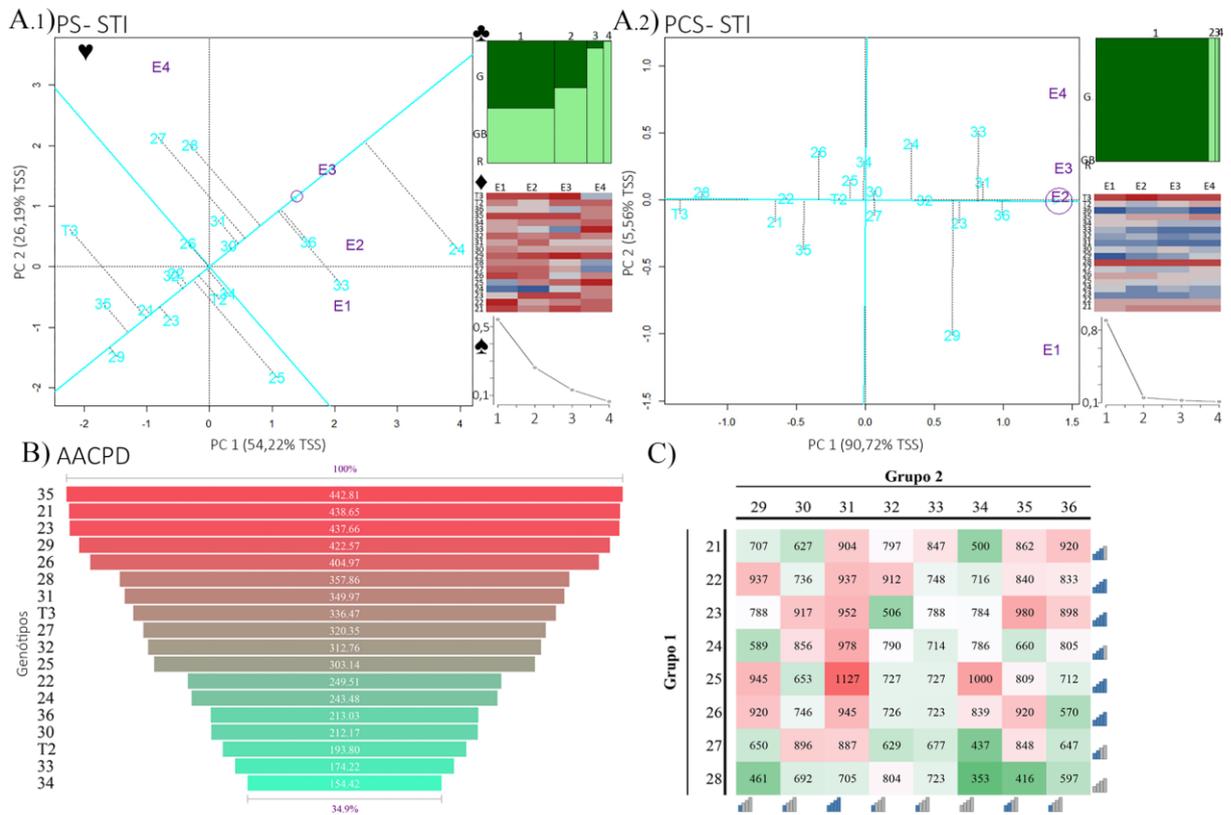
**Figura 16.** Gráficos de dispersão associando a tolerância de genótipos de soja ao fungo *P. pachyrhizii*, agente causal da ferrugem asiática, com a performance na ausência do estresse. A) Foi estimada a tolerância para as 768 linhagens F<sub>5:6</sub> (performance na presença do estresse menos a performance na ausência) e plotada contra a produtividade na ausência do estresse, dividindo o conjunto de dados de acordo três faixas de ciclo (precoce e médio e tardio). B) As 12 linhagens de cada cruzamento avaliadas na presença da doença foram divididas aleatoriamente em dois conjuntos [1-6 e 7-12], sendo um utilizado para estimar a tolerância e o outro utilizado para a correlação e vice-versa, resultando em dois gráficos nos quais são mostrados os cruzamentos nos balões. AACPD | área abaixo da curva de progresso da doença. STI-PS | índice de tolerância a estresses calculado para a produtividade de sementes. PCS-tol. | tolerância para o peso de cem sementes medido pela performance na presença da doença menos a performance na ausência.



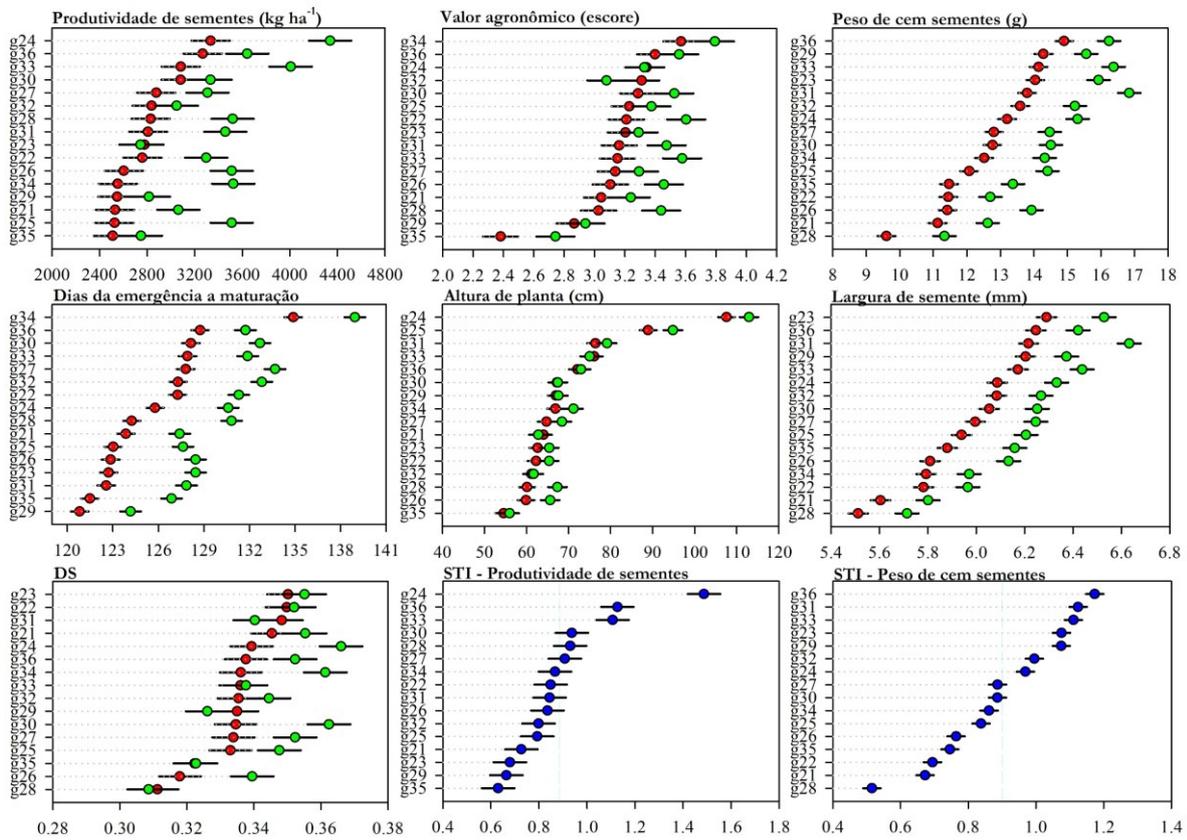
**Figura 17.** Análise GGB biplot (efeito principal de genótipo + genótipo × bloco de ambientes) com valores centrados em cada ambiente e sem escalonamento para um conjunto de 18 genótipos de soja avaliados em oito ambientes (E1 a E8). Os ambientes foram definidos como combinações de ano, local e condição de estresse causado pela doença ferrugem da soja, sendo E1, E3, E5 e E7 os ambientes livres da doença (esses ambientes são representados nos gráficos [♥] pela cor verde) que constituem o grupo 1 (Grp.1). Os demais ambientes, representados pela cor vermelha, constituem o grupo 2 (Grp.2) nos quais a doença ocasionou estresse severo. ♣ Gráfico de mosaico representando o particionamento da soma total de quadrados nos efeitos de genótipo (G), genótipo × blocos de ambientes (GB) e resíduo (R) ao longo de cada eixo GGB biplot. ♦ Mapa de calor representando a performance de cada genótipo ao longo dos ambientes de teste, sendo a cor vermelha escuro indicadora de baixos valores e azul escuro de altos. ♠ gráfico mostrando a porcentagem da variação fenotípica (TSS – total sum of squares) capturada em cada componente principal (PC). PS | produtividade de sementes (kg ha<sup>-1</sup>); VA | valor agrônomo (escores de 1 a 5); PCS | peso de cem sementes (g); DEM | dias da emergência a maturação; AP | altura de planta (cm) e ACM | acamamento (escores de 1 a 5).



**Figura 18.** Análise GGB biplot (efeito principal de genótipo + genótipo × bloco de ambientes) com valores centrados em cada ambiente e sem escalonamento para um conjunto de 18 genótipos de soja avaliados em oito ambientes (E1 a E8). Os ambientes foram definidos como combinações de ano, local e condição de estresse causado pela doença ferrugem da soja, sendo E1, E3 e E5 e E7 os ambientes livres da doença (esses ambientes são representados nos gráficos [♥] pela cor verde) que constituem o grupo 1 (Grp.1). Os demais ambientes, representados pela cor vermelha, constituem o grupo 2 (Grp.2) nos quais a doença ocasionou estresse severo. ♣ Gráfico de mosaico representando o particionamento da soma total de quadrados nos efeitos de genótipo (G), genótipo × blocos de ambientes (GB) e resíduo (R) ao longo de cada eixo GGB biplot. ♦ Mapa de calor representando a performance de cada genótipo ao longo dos ambientes de teste, sendo a cor vermelha escuro indicadora de baixo valor e azul escuro de alto. ♠ Gráfico mostrando a percentagem da variação fenotípica (TSS – *total sum of squares*) capturada em cada componente principal (PC). AS | área de semente; PL | perímetro; W | largura; LWR | razão entre L e W; CS | circularidade; DS | distância entre a intersecção do segmento L e o segmento W para o centro de gravidade da semente (vide Figura 4 para mais detalhes).



**Figura 19.** Análise biplot do tipo “performance média × estabilidade” (♥) de 18 genótipos de soja avaliados em quatro ambientes de teste [E1 a E4] (A) para os caracteres produtividade de sementes (PS) e peso de cem sementes (PCS) com relação ao índice de tolerância a estresses (STI). ♣ Gráfico de mosaico representando o particionamento da soma total de quadrados nos efeitos de genótipo (G), genótipo × ambiente (GB) e resíduo (R) ao longo de cada eixo GGE biplot. ♦ Mapa de calor representando a performance de cada genótipo ao longo dos ambientes de teste, sendo vermelha escuro indicadora de baixo valor e azul escuro de alto. ♠ Gráfico mostrando a porcentagem da variação fenotípica (TSS – total sum of squares) capturada em cada componente principal (PC). Os ambientes constituem combinações de anos e locais de cultivo. Em B está disponível um gráfico de funil para a área abaixo da curva de progresso da doença [AACPD] e em C um mapa de calor para os valores de capacidade média de combinação dos genitores para o caráter AACPD avaliados nas linhagens F<sub>5,6</sub>.



**Figura 20.** Valores genéticos preditos (BLUP – melhor preditor linear não viesado) computados para os 16 genitores de um dialéio 8×8 avaliados em quatro experimentos na presença do estresse causado pela ferrugem asiática da soja (cor vermelha) e em outros quatro experimentos conduzidos na ausência da doença (cor verde). Em cada local/ano, os experimentos com e sem o estresse foram conduzidos de maneira adjacente. DS | distância entre a intersecção do segmento L e o segmento W para o centro de gravidade da semente (vide Figura 4 para mais detalhes). STI | é o índice de tolerância a estresses.

## TABELAS

**Tabela 1.** Relação dos caracteres avaliados ao longo dos três anos agrícolas (2015/16, 2016/17 e 2017/18) por experimento (progênies F<sub>5</sub>, linhagens F<sub>5;6</sub>, linhagens F<sub>5;7</sub> e genitores) testados em duas condições de estresse causado pela ferrugem asiática da soja (com ferrugem [C/F] e ausência de ferrugem [S/F]).

Caracteres	Germoplasma avaliado													
	F <sub>5</sub>			F <sub>5;6</sub>			F <sub>5;7</sub>		Genótipos genitores					
	2015/16		2016/17		2017/18		2015/16		2016/17		2017/18			
	C/F	S/F	C/F	S/F	C/F	S/F	C/F	S/F	C/F	S/F	C/F	S/F		
1	PS	Ψ												
2	VA													
3	PCS													
4	DEM													
5	AP													
6	ACM													
7	STD													
8	SEV													
9	VOL													
10	DEN													
11	DR5													
12	DR7													
13	EAF													
14	EG													
15	AS													
16	PL													
17	L													
18	W													
19	LWR													
20	CS													
21	DS													

Ψ PS | produtividade de sementes; VA | valor agrônômico; PCS | peso de cem sementes; DEM | dias da emergência a maturação; AP | altura de planta; ACM | acamamento; STD | estande de plantas; SEV | severidade da ferrugem; VOL | volume de sementes; DEN | densidade de sementes; DR5 | dias para o estágio R5; DR7 | dias para o estágio R7; EG | período de enchimento de grãos; AS | área de semente; PL | perímetro de sementes; L | comprimento de semente; W | largura de semente; LWR | relação comprimento pela largura de semente; CS | circularidade de semente; DS | distância entre a intersecção dos segmentos L e W com o centro de gravidade da semente.

**Tabela 2.** Análises individuais de experimentos de soja conduzidos em dois locais e duas condições de estresse causado pela ferrugem asiática. São fornecidas as somas dos valores de dimensões efetivas ( $ED_k$ ) associadas às tendências espaciais ao longo da área ocupada pelo experimento e dos efeitos aleatórios de linha e coluna. A herdabilidade generalizada ( $H_g^2$ ) do efeito genotípico e o BLUP médio (melhor preditor linear não viesado) também são fornecidos.

Condição	Termos	Caracteres mensurados em populações F <sub>5</sub> de soja								
		PS	AV	PCS	VOL	DEN	DEM	AP	ACM	
Local 1	S/F*	$ED_k$	18,18	15,15	19,30	26,98	9,75	31,41	16,13	38,73
		$H_g^2$	0,67	0,38	0,80	0,65	0,00	0,89	0,94	0,66
		Média	2156,04	2,91	12,44	11,64	1,065	126,76	81,10	1,16
	C/F	$ED_k$	21,24	16,9	8,00	9,01	6,07	20,89	22,67	78,12
		$H_g^2$	0,69	0,30	0,83	0,79	0,00	0,88	0,94	0,15
		Média	1699,21	2,94	10,33	9,54	1,083	124,00	85,46	1,54
Local 2	S/F	$ED_k$	19,16	15,93	22,87	17,70	10,13	16,22	13,73	37,68
		$H_g^2$	0,73	0,67	0,83	0,71	0,00	0,94	0,96	0,88
		Média	3105,66	3,06	13,73	13,50	1,022	133,95	72,80	1,39
	C/F	$ED_k$	28,01	8,85	20,49	15,06	0,00	18,52	14,05	4,77
		$H_g^2$	0,83	0,69	0,83	0,79	0,14	0,95	0,96	0,91
		Média	2711,20	3,12	11,13	10,87	1,031	123,74	75,92	1,37
Médias	S/F	2630,85	2,99	13,09	12,57	1,043	130,35	76,95	1,27	
	C/F	2205,21	3,03	10,73	10,21	1,057	123,87	80,69	1,45	
	Local 1	1927,67	2,93	13,39	10,59	1,074	125,38	83,28	1,35	
	Local 2	2908,43	3,09	12,43	12,19	1,027	128,85	74,36	1,38	
	Geral	2418,03	3,01	11,91	11,39	1,050	127,11	78,82	1,36	

\* S/F | ausência de estresse devido à ferrugem; C/S | ambiente com plantas estressadas pela presença da ferrugem; PS | produtividade de sementes; AV | valor agrônômico; PCS | peso de cem sementes; VOL | volume de cem sementes; DEN | densidade de semente; DEM | dias da emergência a maturação; AP | altura de planta e ACM | acamamento.

**Tabela 3.** Dimensões espaciais efetivas ( $ED_k$ ) capturadas por meio do ajuste de um modelo de análise espacial para dois experimentos de soja conduzidos em blocos aumentados de forma adjacente, contrastando apenas para a exposição à ferrugem da soja (ausência<sup>1</sup> e presença<sup>2</sup> do estresse). A variação fenotípica de cada caráter foi decomposta em variações devido às tendências espaciais capturadas por cinco componentes de suavização da análise PS-ANOVA (análise de variância P-spline) acrescida dos efeitos aleatórios de linha ( $c_r$ ), coluna ( $c_c$ ) e linhagens [novas entradas] ( $c_g$ ). No ajuste do modelo, os efeitos do intercepto, blocos e das testemunhas foram considerados fixos.

Caráter	Dimensões efetivas ( $ED_k$ )										N	$H_g^2$	
	Aditividade		Interação			Total	Efeitos aleatórios			Total			
	$f_u(u)†$	$f_v(v)$	$vh_u(u)$	$uh_v(v)$	$f_{u,v}(u,v)$		$c_r$	$c_c$	$c_g$				
<i>Caracteres gerais</i>													
PS ♣	0,0 <sup>1</sup>	1,9	5,2	0,0	5,2	12,3	34,1	10,9	340,2	397,5	753	0,45	
	0,0 <sup>2</sup>	3,0	1,3	1,4	2,7	8,4	30,4	13,8	205,8	258,4	765	0,27	
VA	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	24,6	10,5	361,8	401,9	761	0,48	
	0,9	5,2	2,7	3,2	6,0	18,0	20,4	3,3	335,3	377,0	763	0,44	
PCS	0,0	5,2	1,2	1,9	3,1	11,4	2,7	0,0	650,0	664,1	760	0,86	
	2,5	0,0	2,4	0,0	2,4	7,3	8,1	8,8	633,8	658	761	0,83	
DEM	1,2	3,1	0,0	0,0	0,0	4,3	12,6	2,4	653,4	662,7	761	0,86	
	1,9	2,2	8,6	8,0	16,6	37,3	6,4	13,3	589,9	646,9	763	0,77	
EG	0,0	3,3	0,9	3,0	3,8	11,0	9,0	9,2	590,1	619,3	760	0,78	
	1,8	5,6	5,5	6,2	11,6	30,7	8,7	10,5	381,5	431,4	763	0,50	
DR7	0,0	2,9	2,1	2,7	4,9	12,6	14,5	10,2	644,2	681,5	762	0,85	
	1,0	0,0	7,3	6,8	14,2	29,3	0,0	14,6	597,1	641	763	0,78	
AP	1,9	6,8	0,2	1,9	2,1	12,9	4,0	4,9	332,7	354,5	761	0,44	
	1,5	6,8	5,9	5,7	11,6	31,5	0,0	8,7	356,6	396,8	763	0,47	
ACM	0,8	5,3	1,7	3,8	5,5	17,1	16,1	11,7	362,4	407,3	761	0,48	
	1,7	6,3	7,5	7,1	14,7	37,3	0,0	7,6	438,2	483,1	763	0,58	
<i>Parâmetros de semente avaliados por fenotipagem de alto rendimento</i>													
AS	0,0	3,3	0,0	0,6	0,6	4,3	0,3	7,8	605,1	617,7	760	0,80	
	0,0	0,8	3,2	3,4	6,5	13,9	2,4	12,7	605,1	634,1	763	0,79	
PL	0,0	3,0	0,0	0,5	0,5	4	0,9	7,7	585,2	597,8	760	0,77	
	0,0	0,7	3,6	3,8	7,4	15,5	2,2	13,5	579,4	610,6	763	0,76	
L	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	2,5	7,1	608,2	620,8	760	0,80	
	0,0	0,5	4,2	4,2	8,4	17,3	0,0	14,4	581,3	613	763	0,76	
W	0,0	3,6	0,2	1,8	2,0	7,6	0,0	9,9	557,4	574,9	760	0,73	
	0,0	1,3	2,6	3,5	6,1	13,7	9,0	14,2	563,3	600,0	763	0,74	
LWR	0,7	2,6	3,3	4,8	8,1	19,5	2,2	6,7	605,4	633,8	760	0,80	
	0,0	4,2	9,6	8,6	18,2	40,6	0,0	13,6	491,7	545,9	763	0,65	
CS	2,1	4,0	5,1	5,2	10,3	26,7	0,0	14,0	166,2	206,9	760	0,22	
	0,0	2,0	16,9	12,0	28,9	59,8	0,0	17,4	251,6	328,8	763	0,33	
DS	0,8	0,0	2,7	3,2	5,9	12,6	4,3	12,4	376,3	405,6	760	0,50	
	1,3	4,2	2,2	1,4	3,6	12,7	0,0	6,6	443,0	462,3	763	0,58	

†  $f_u(u)$  e  $f_v(v)$ , são os efeitos de suavização (*smooth effects*) de linha e coluna, respectivamente;  $vh_u(u)$  e  $uh_v(v)$ , são as tendências de interação linear-por-suave (*linear-by-smooth*);  $f_{u,v}(u,v)$ , é a interação suave-por-suave (*smooth-by-smooth*) entre as tendências de linha e coluna. ♣ PS | produtividade de sementes; VA | valor agrônômico; PCS | peso de cem sementes; DEM | dias da emergência a maturação (VE a R8); EG | enchimento de grãos (R5 a R7); DR7 | dias da emergência ao estádio R7; AP | altura de plantas; ACM | acamamento; AS | área de semente; PL | perímetro de semente; L | comprimento de semente; W | largura de semente; LWR | relação comprimento × largura; CS | circularidade; DS | distância entre IS (intersecção dos eixos de comprimento [L] e largura [W] da semente) e CG (centro de gravidade). N e  $H_g^2$  representam o número de observações e a herdabilidade generalizada, respectivamente. Os parâmetros de semente foram mensurados utilizando uma estratégia de fenotipagem de alto rendimento com imagens RGB (*red, blue e green*) por meio do software SmartGrain (Tanabata et al., 2012).

**Tabela 4.** Teste de significância dos efeitos do modelo via análise de deviance de oito caracteres agrônômicos avaliados em experimentos de soja conduzidos em oito ambientes (E1 a E8)<sup>1</sup> e contendo 18 genótipos delineados em blocos ao acaso, com três repetições.

Amb. <sup>1</sup>	F.V.	Caracteres							
		PS ♪ (kg ha <sup>-1</sup> )	VA (escore)	PCS (g)	VOL (cm <sup>3</sup> )	DEN (g/cm <sup>3</sup> )	DEM (dias)	AP (cm)	ACM (escore)
E1	B.	113633 <sup>ns</sup> ♣	3,91E-02 <sup>ns</sup>	6,66E-02 <sup>ns</sup>	2,23E-03 <sup>ns</sup>	3,41E-05 <sup>ns</sup>	0,681731 <sup>ns</sup>	20,8893 <sup>ns</sup>	1,31E-02 <sup>ns</sup>
	G.	231922*	0,1685*	3,1897*	2,6194*	8,85E-11 <sup>ns</sup>	8,3788*	156,933*	0,1021*
	CV <sub>e</sub>	21,42	20,02	9,45	10,76	2,68	1,24	20,15	291,55
	Média	2292	3,22	12,86	11,68	1,102	126,70	68,39	0,16
E2	B	34696 <sup>ns</sup>	1,41E-02 <sup>ns</sup>	8,18E-08 <sup>ns</sup>	6,65E-08 <sup>ns</sup>	3,74E-05 <sup>ns</sup>	9,03E-07 <sup>ns</sup>	7,59E-06 <sup>ns</sup>	4,91E-04 <sup>ns</sup>
	G	25844,4 <sup>ns</sup>	4,09E-07 <sup>ns</sup>	3,0123*	2,1915*	2,68E-04 <sup>ns</sup>	23,8937*	180,257*	5,71E-02 <sup>ns</sup>
	CV <sub>e</sub>	27,82	30,12	8,45	8,31	5,33	2,46	12,78	304,33
	Média	1738	2,84	10,64	9,76	1,089	121,50	67,74	0,23
E3	B	4,10E-02 <sup>ns</sup>	3,61E-02 <sup>ns</sup>	1,32E-07 <sup>ns</sup>	3,57E-02 <sup>ns</sup>	1,10E-04 <sup>ns</sup>	0,11238 <sup>ns</sup>	3,88E-06 <sup>ns</sup>	7,23E-05 <sup>ns</sup>
	G	679259*	0,218165*	3,22741*	2,31878*	2,36E-04 <sup>ns</sup>	27,9824*	321,882*	0,204703*
	CV <sub>e</sub>	21,09	13,42	8,33	9,93	6,89	2,14	11,22	20,49
	Média	3017	2,95	13,72	12,80	1,074	129,50	55,19	1,11
E4	B	0,28315 <sup>ns</sup>	3,50E-08 <sup>ns</sup>	3,24E-02 <sup>ns</sup>	2,60E-02 <sup>ns</sup>	1,84E-10 <sup>ns</sup>	0,38363 <sup>ns</sup>	3,67E-06 <sup>ns</sup>	7,93E-03 <sup>ns</sup>
	G	425560*	0,387228*	2,83644*	2,4223*	3,52E-05 <sup>ns</sup>	24,0953*	187,588*	1,9827 <sup>ns</sup>
	CV <sub>e</sub>	14,45	20,19	6,07	6,41	3,91	1,31	10,5	24,32
	Média	2912	2,91	10,96	10,09	1,088	121,20	57,02	1,16
E5	B	1,3885 <sup>ns</sup>	6,19E-02 <sup>ns</sup>	8,62E-02 <sup>ns</sup>	7,23E-02 <sup>ns</sup>	1,53E-04*	1,28E-06 <sup>ns</sup>	5,64201 <sup>ns</sup>	0,110152*
	G	1,12E+06*	0,52703*	3,75701*	3,48139*	7,28E-11 <sup>ns</sup>	18,8665*	265,181*	0,314706*
	CV <sub>e</sub>	21,20	15,71	7,26	7,86	2,55	2,64	9,37	40,21
	Média	4394	3,77	15,48	14,72	1,053	134,80	87,49	1,40
E6	B	157504 <sup>ns</sup>	3,91E-02 <sup>ns</sup>	0,507224*	0,40962 <sup>ns</sup>	7,56E-11 <sup>ns</sup>	1,95647 <sup>ns</sup>	47,5248 <sup>ns</sup>	7,80E-03 <sup>ns</sup>
	G	188198*	0,176748*	2,06123*	1,94004*	3,42E-05 <sup>ns</sup>	11,4714*	233,902*	0,328227*
	CV <sub>e</sub>	19,98	14,78	6,28	7,45	2,57	1,36	10,80	23,00
	Média	3425	3,49	13,46	12,66	1,065	130,80	78,40	1,24
E7	B	15917,4 <sup>ns</sup>	3,08E-09 <sup>ns</sup>	0,603809*	0,728661 <sup>ns</sup>	6,25E-04 <sup>ns</sup>	0,119449 <sup>ns</sup>	1,66E-06 <sup>ns</sup>	2,54E-09 <sup>ns</sup>
	G	126129 <sup>ns</sup>	2,28E-02*	2,36495*	1,65546*	5,88E-09 <sup>ns</sup>	6,34538*	45,4412*	4,92E-02*
	CV <sub>e</sub>	25,55	5,07	6,93	7,29	7,66	1,05	5,24	15,72
	Média	3443	3,44	15,54	13,72	1,136	129,80	77,25	1,01
E8	B	146159 <sup>ns</sup>	3,55E-04 <sup>ns</sup>	0,540878*	0,771526*	3,46E-04*	0,18692 <sup>ns</sup>	0,898358 <sup>ns</sup>	4,30E-03*
	G	86502,3 <sup>ns</sup>	1,61E-02*	2,61609*	2,11967*	8,52E-11 <sup>ns</sup>	6,66748*	58,2497*	3,48E-02*
	CV <sub>e</sub>	20,62	3,35	5,82	6,08	2,58	1,14	3,24	14,67
	Média	3011	3,34	15,07	13,43	1,123	127,50	74,52	0,93
Média geral		3029	3,25	13,47	12,36	1,091	127,73	70,75	0,90

♣ Os componentes de variância foram estimados via máxima verossimilhança restrita (REML) e suas significâncias foram verificadas por meio de teste de razão de verossimilhança (LRT) ao nível de 5% de probabilidade de erro (\*; P < 0,05) considerando a distribuição de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com um grau de liberdade ( $\chi^2= 3,84$ ). ♪ PS | produtividade de sementes; VA | valor agrônômico; PCS | peso de cem sementes; VOL | volume de cem sementes; DEN | densidade de sementes; DEM | dias da emergência a maturação (VE a R8); AP | altura de plantas e ACM | acamamento. B | é o efeito de bloco e G | é o efeito de genótipo. CV<sub>e</sub> é o coeficiente de variação experimental (%). ns – não significativo. Ambientes E1, E3, E5 e E7 foram livres da ferrugem da soja enquanto que em E2, E4, E6 e E8 a doença ocorreu livremente.

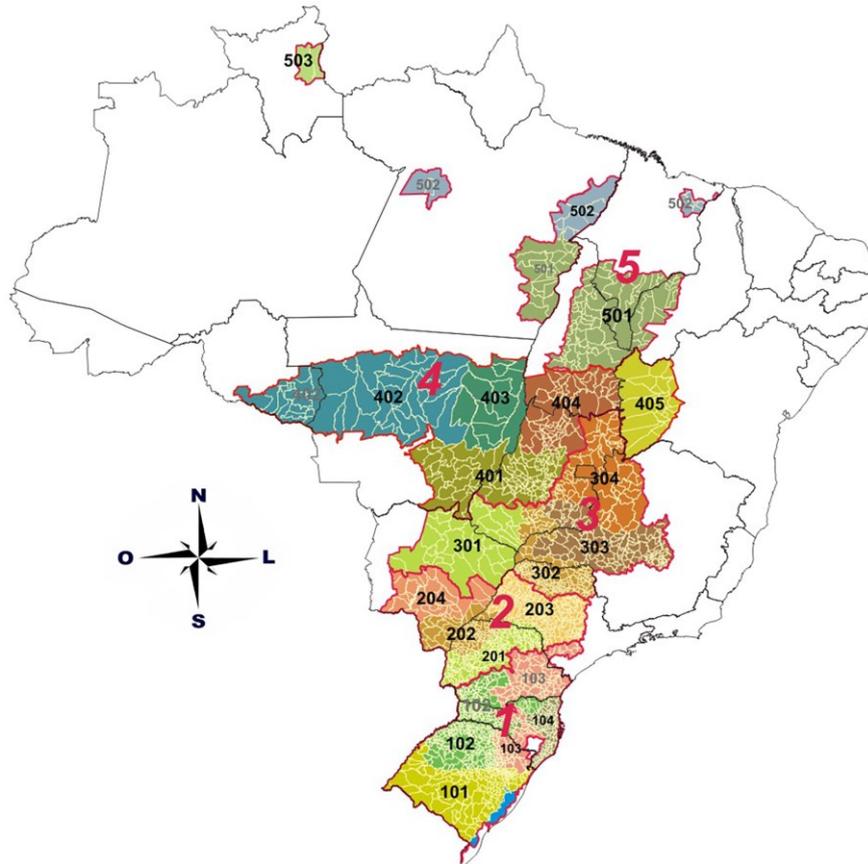
**Tabela 5.** Teste de significância dos efeitos do modelo via análise de deviance de sete caracteres determinantes do tamanho e conformação de sementes avaliados via fenotipagem de alto rendimento por meio de imagens digitais. As amostras de 100 sementes foram obtidas em experimentos de soja conduzidos em oito ambientes (E1 a E8)<sup>1</sup> e contendo 18 genótipos delineados em blocos ao acaso, com três repetições.

Amb. <sup>1</sup>	F.V.	Caracteres						
		AS <sup>♣</sup> (mm <sup>2</sup> )	PL (mm)	L (mm)	W (mm)	LWR (razão)	CS	DS (mm)
E1	B.	0,585703 <sup>ns♣</sup>	6,18E-02 <sup>ns</sup>	4,64E-03 <sup>ns</sup>	5,91E-03 <sup>ns</sup>	3,25E-11 <sup>ns</sup>	4,49E-06 <sup>ns</sup>	4,81E-11 <sup>ns</sup>
	G.	9,64593*	1,06866*	0,118537*	8,76E-02*	8,71E-04*	5,54E-06 <sup>ns</sup>	1,77E-04 <sup>ns</sup>
	CV <sub>e</sub>	5,50	2,83	3,05	2,52	1,57	0,65	7,11
	Média	33,130	21,710	6,974	6,126	1,141	0,873	0,307
E2	B	5,28E-02 <sup>ns</sup>	2,66E-03 <sup>ns</sup>	5,98E-09 <sup>ns</sup>	2,36E-03 <sup>ns</sup>	3,79E-05 <sup>ns</sup>	9,44E-12 <sup>ns</sup>	1,10E-10 <sup>ns</sup>
	G	6,98356*	0,933963*	0,107533*	6,15E-02*	6,48E-04*	8,67E-06 <sup>ns</sup>	2,66E-05 <sup>ns</sup>
	CV <sub>e</sub>	7,05	3,57	3,68	3,94	2,55	1,11	10,41
	Média	29,670	20,540	6,608	5,783	1,146	0,872	0,316
E3	B	2,97E-07 <sup>ns</sup>	3,48E-08 <sup>ns</sup>	4,03E-09 <sup>ns</sup>	2,12E-09 <sup>ns</sup>	3,19E-11 <sup>ns</sup>	2,02E-08 <sup>ns</sup>	3,46E-06 <sup>ns</sup>
	G	10,4766*	1,14108*	0,136291*	8,85E-02*	1,33E-03*	6,22E-07 <sup>ns</sup>	1,75E-04*
	CV <sub>e</sub>	4,88	2,61	2,72	2,35	1,49	0,76	6,49
	Média	35,10	22,47	7,337	6,169	1,194	0,865	0,332
E4	B	0,487642*	5,62E-02*	9,62E-03*	2,38E-03*	6,27E-05 <sup>ns</sup>	5,46E-12 <sup>ns</sup>	6,22E-11 <sup>ns</sup>
	G	9,99533*	1,25814*	0,132276*	0,103097*	7,82E-04*	1,52E-05 <sup>ns</sup>	4,80E-05 <sup>ns</sup>
	CV <sub>e</sub>	3,15	1,64	1,80	1,66	1,58	0,85	7,76
	Média	30,430	20,920	6,806	5,782	1,181	0,8649	0,3194
E5	B	0,325582 <sup>ns</sup>	3,13E-02 <sup>ns</sup>	3,36E-03 <sup>ns</sup>	2,59E-03 <sup>ns</sup>	4,93E-05 <sup>ns</sup>	5,33E-07 <sup>ns</sup>	7,38E-11 <sup>ns</sup>
	G	11,111*	1,38428*	0,154577*	9,32E-02*	9,49E-04*	1,97E-05*	6,19E-04*
	CV <sub>e</sub>	4,43	2,38	2,42	2,21	1,41	0,92	7,02
	Média	32,410	22,410	7,095	5,974	1,194	0,802	0,383
E6	B	1,1876*	0,14721*	2,00E-02*	7,11E-03*	5,66E-05 <sup>ns</sup>	1,32E-11*	9,42E-06 <sup>ns</sup>
	G	6,97112*	0,981775*	0,114121*	5,64E-02*	8,41E-04*	1,64E-05*	3,93E-04*
	CV <sub>e</sub>	4,93	2,72	2,65	2,52	1,46	1,42	8,03
	Média	30,350	21,630	6,824	5,812	1,181	0,805	0,367
E7	B	1,38022*	0,126482*	8,13E-03*	1,72E-02*	1,02E-04*	5,80E-06*	6,48E-11 <sup>ns</sup>
	G	10,2465*	1,06878*	0,139679*	6,88E-02*	1,30E-03*	2,56E-05*	8,01E-04*
	CV <sub>e</sub>	4,99	2,46	2,50	2,70	1,67	0,43	7,39
	Média	37,200	23,250	7,457	6,462	1,159	0,8565	0,3423
E8	B	1,86299*	0,191512*	2,60E-02*	9,90E-03*	5,13E-05*	2,66E-07 <sup>ns</sup>	5,32E-11 <sup>ns</sup>
	G	8,57197*	0,913802*	0,121565*	5,88E-02*	1,17E-03*	1,23E-05*	2,38E-04*
	CV <sub>e</sub>	4,64	2,42	2,63	2,13	1,29	0,37	7,02
	Média	36,350	22,960	7,343	6,418	1,147	0,859	0,327
Média geral		33,080	21,986	7,056	6,066	1,168	0,850	0,337

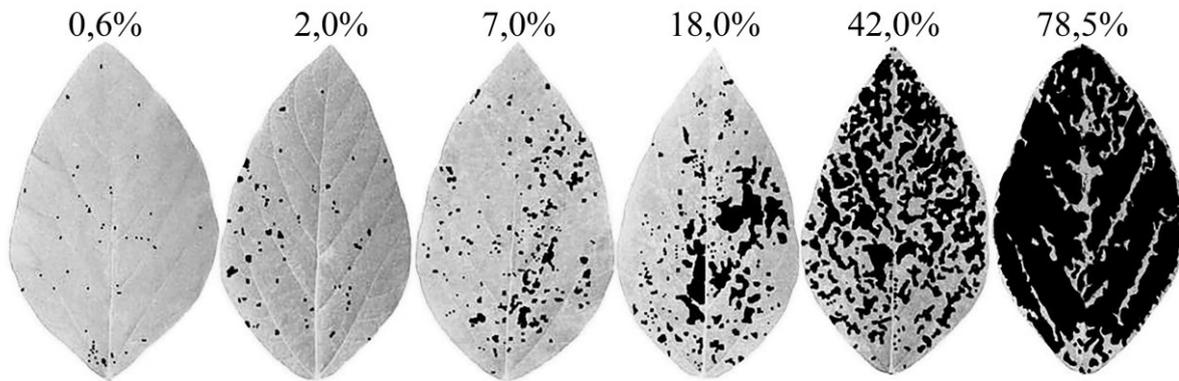
♣ Os componentes de variância foram estimados via máxima verossimilhança restrita (REML) e suas significâncias foram verificadas por meio de teste de razão de verossimilhança (LRT) ao nível de 5% de probabilidade de erro (\*;  $P < 0,05$ ) considerando a distribuição de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) com um grau de liberdade ( $\chi^2 = 3,84$ ). ♣ AS | área de semente; PL | perímetro de semente; L | comprimento de semente; W | largura de semente; LWR | relação comprimento  $\times$  largura; CS | circularidade; DS | distância entre IS (intersecção dos eixos de comprimento [L] e largura [W] da semente) e CG (centro de gravidade). B | é o efeito de bloco e G | é o efeito de genótipo. CV<sub>e</sub> é o coeficiente de variação experimental (%). <sup>ns</sup> – não significativo. Ambientes E1, E3, E5 e E7 foram livres da ferrugem da soja enquanto que em E2, E4, E6 e E8 a doença ocorreu livremente.

**ANEXOS**

**ANEXO A.** Macrorregiões sojícolas e regiões edafoclimáticas usadas para testes de valor de cultivo e uso (VCU) em soja de acordo com a terceira aproximação. São cinco macrorregiões que englobam aproximadamente todos os municípios produtores de soja do Brasil e onde são conduzidos os experimentos de competição de linhagens avançadas de soja pelos programas de melhoramento para posterior registro e proteção junto ao Registro Nacional de Cultivares (RNC) seguido da liberação para comercialização. O mapa constitui uma adaptação do trabalho publicado por Kaster e Farias (2012).

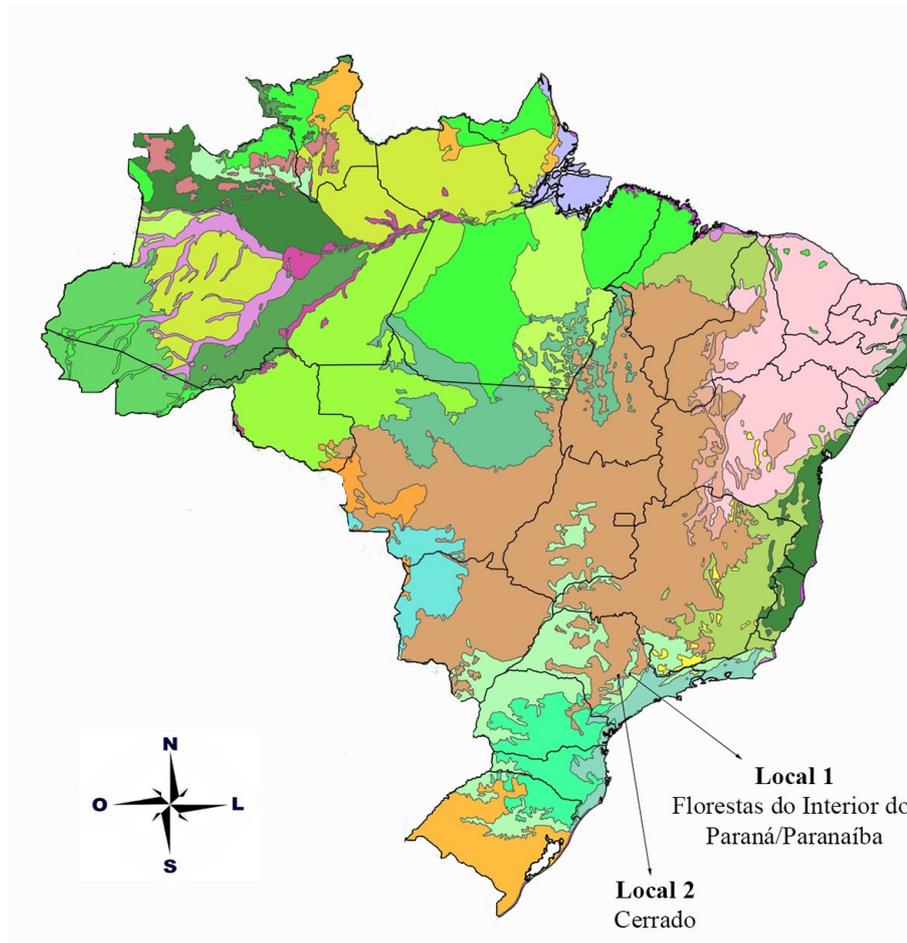


**ANEXO B.** Escala diagramática para a avaliação da severidade da ferrugem asiática da soja, causada pelo fungo biotrófico *P. pachyrhizii*. Os valores na escala referem-se a porcentagem do tecido vegetal da lâmina foliar comprometido pelos sintomas da doença. Essa escala foi proposta por Godoy et al. (2006).

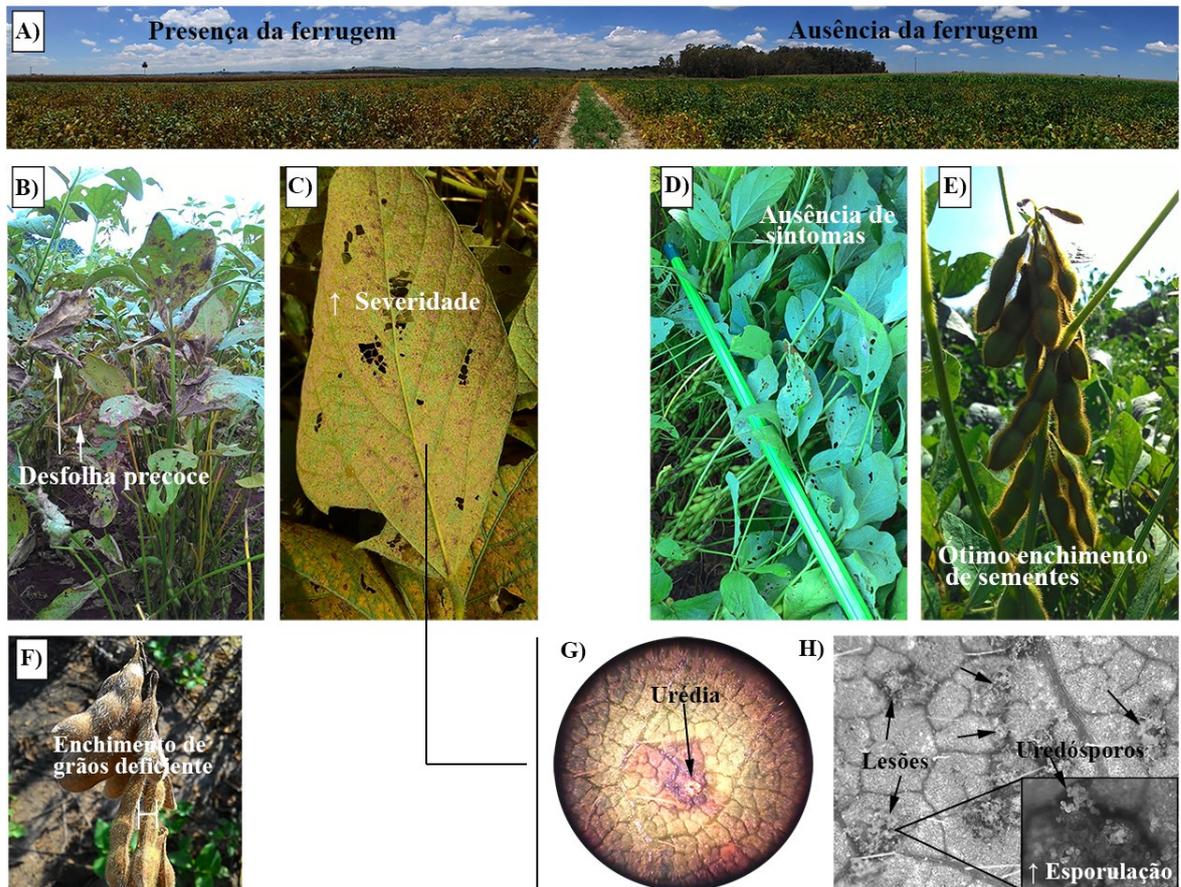


## APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Mapa mostrando as ecorregiões terrestres do Brasil, com destaque para a região Florestas do Interior do Paraná/Paranaíba onde encontra-se o local 1 de experimentação e a ecorregião Cerrado onde, por sua vez, encontra-se o local 2. O mapa foi construído usando a ferramenta de construção de mapas online “SimpleMappr” (Shorthouse, 2010). Para detalhes das ecorregiões que compõem o país, consultar Borsato et al. (2015).



**APÊNDICE B.** Imagens capturadas dos experimentos de soja conduzidos ao longo de três anos agrícolas, dois locais e duas condições de estresse por ferrugem. A | vista panorâmica dos experimentos contendo as populações F<sub>5</sub> na presença e ausência do estresse no local 2 e no ano agrícola de 2015/16 (vide APÊNDICE A para o posicionamento geográfico dos locais). B e C | detalhes de plantas evidenciando alta severidade da ferrugem no ano agrícola de 2016/17. D e E | imagens capturadas de plantas no tratamento sem estresse no ano agrícola de 2016/17. F | imagem mostrando o enchimento de sementes deficiente devido a desfolha precoce causada pela ferrugem no ano agrícola de 2016/17. G | detalhe da lesão causada pelo fungo no tecido foliar capturado por meio de uma lupa de bancada. H | imagens capturadas via estereomicroscópio Leica M165 FC de parte da lâmina de uma folha de soja exteriorizando os sintomas e sinais da doença.



**APÊNDICE C.** Gráfico de lagarta mostrando os valores genéticos preditos (BLUP – melhor preditor linear não viesado) acrescidos dos erros padrões para as 256 linhagens  $F_{5,7}$ , 16 genótipos parentais do dialelo  $8 \times 8$  e as três testemunhas espaciais de soja. Os dados provêm de experimentos conduzidos no ano agrícola de 2017/18, os quais foram implantados no local 1 (vide APÊNDICE A).

