



JESSICA GENTIL LIMA

SOYBEAN BREEDING STRATEGIES FOR RESISTANCE TO
Sclerotinia sclerotiorum

LAVRAS – MG

2019

JESSICA GENTIL LIMA

SOYBEAN BREEDING STRATEGIES FOR RESISTANCE TO
Sclerotinia sclerotiorum

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Adriano Teodoro Bruzi

LAVRAS - MG

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Lima, Jessica Gentil.

Soybean breeding strategies for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* / Jessica Gentil Lima. - 2019.

88 p. : il.

Orientador(a): Adriano Teodoro Bruzi.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.
Bibliografia.

1. Plant Breeding. 2. Glycine max (L) Merrill. 3. Genetic Resistance. I. Bruzi, Adriano Teodoro. II. Título.

JESSICA GENTIL LIMA

SOYBEAN BREEDING STRATEGIES FOR RESISTANCE TO *Sclerotinia sclerotiorum*

**ESTRATÉGIAS PARA O MELHORAMENTO DE GENÓTIPOS DE SOJA PARA
*Sclerotinia sclerotiorum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 03 de abril de 2019

Dr. Edson Ampélio Pozza UFLA

Dr. Carlos Eduardo Pulcinelli Souza Cruz

Dr. Fernando César Juliatti UFU

Dr. Luís Felipe Boaretto Souza Cruz

Dr. Adriano Teodoro Bruzi
Orientador

LAVRAS – MG

2019

A Deus.

OFEREÇO

Aos meus pais, avô e noivo,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais, Nilda e Antonio, por todo amor, carinho, apoio e incentivo durante mais essa etapa da minha vida acadêmica.

Ao meu avô, Olinto, por todo carinho, cuidado e constante interesse nas minhas atividades na UFLA.

Ao meu noivo, Plácido, por todo amor, carinho e paciência. Por todos os momentos que me trouxe mais calma e confiança. Por vibrar em todas as minhas conquistas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade e condições oferecidas durante a realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Professor Adriano Teodoro Bruzi, pela orientação, paciência, disposição, ensinamentos e confiança ao longo do doutoramento.

Aos professores da Pós- Graduação por todo conhecimento e experiência transmitidos.

À equipe dos laboratórios do Departamento de Biologia, em especial, Lamartine, Miller, Alex e Mariana, pela paciência e ajuda.

Aos amigos do GEN por tornarem a rotina mais agradável.

Aos colegas do grupo Pesquisa Soja por toda ajuda na condução dos experimentos e por todos os momentos agradáveis nesses anos.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura Ezequiel, Edézio e Antonio e do Departamento de Biologia Zélia, Rafaela, Lilian, Dona Iron, por estarem sempre dispostos a ajudar.

A todos que fizeram parte dessa conquista, muito obrigada!

Portanto, ide e ensinai.

Jesus (*MATEUS, 28:19 E 20*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	16
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Podridão branca da haste em soja.....	18
2.1.1 Importância econômica da doença.....	18
2.1.2 Características do patógeno.....	18
2.1.3 Manejo da doença.....	20
2.1.4 Resistência genética.....	21
2.2 Variabilidade genética de <i>S. sclerotiorum</i>.....	23
2.3 Procedimentos para avaliar a reação da soja a <i>S. sclerotiorum</i>.....	25
2.4 Análise dialélica para estudo de patossistemas.....	26
REFERÊNCIAS.....	28
CAPÍTULO 2 DIALLEL ANALYSIS FOR SOYBEAN RESISTANCE TO <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>.....	35
1 INTRODUCTION.....	37
2 MATERIALS AND METHODS.....	38
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	40
4 CONCLUSION.....	43
REFERENCES.....	44
CAPÍTULO 3 RESISTANCE OF SOYBEAN CULTIVARS TO <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> IN DIFFERENT PHENOLOGICAL STAGES AND DISEASE ASSESSMENT METHOD.....	46
1 INTRODUCTION.....	48
2 MATERIALS AND METHODS.....	49
2.1 Study site.....	49
2.2 Genetic treatments.....	49
2.3 Experimental design.....	50
2.4 Isolate.....	50
2.5 Straw test method.....	50
2.6 Detached leaf method.....	51
2.7 Statistical analysis.....	51
3 RESULTS.....	52
4 DISCUSSION.....	55
5 CONCLUSION.....	56
REFERENCES.....	57

CAPÍTULO 4 VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE LINHAGENS MONOASCOSPÓRICAS DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> EM SOJA.....	60
1 INTRODUÇÃO	63
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 Tratamentos genéticos	64
2.2 Avaliação da agressividade das linhagens monoascospóricas	64
2.3 Análise estatística	65
3 RESULTADOS.....	66
4 DISCUSSÃO	69
5 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
CAPÍTULO 5 POTENCIAL DE POPULAÇÃO SEGREGANTES E AVALIAÇÃO DE PROGÊNIES DE SOJA QUANTO À RESISTÊNCIA A <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	75
1 INTRODUÇÃO	78
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	78
3 RESULTADOS.....	81
4 DISCUSSÃO	84
5 CONCLUSÃO	86
REFERÊNCIAS	87

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum é o agente causal da podridão branca da haste da soja. A doença pode causar perdas significativas de rendimento sob condições ambientais favoráveis ao progresso da doença. Obter cultivares resistentes tem se mostrado difícil. Muito embora haja variabilidade no germoplasma brasileiro, ainda há muitas questões a serem elucidadas no patossistema *S. sclerotiorum* – *Glycine max* (L.) Merrill. Para isto, objetivou-se avaliar a variabilidade de diferentes isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, bem como, estudar a resistência genética de cultivares de soja ao patógeno; determinar o estágio fenológico mais indicado, na cultura da soja, para inocular *S. sclerotiorum*, bem como comparar diferentes métodos de inoculação, visando à identificação de cultivares de soja resistentes ao patógeno; verificar a existência de variabilidade patogênica entre linhagens monoascospóricas de um mesmo isolado de *S. sclerotiorum* utilizando o método *straw test* em cultivares de soja e avaliar o potencial de algumas populações segregantes, para obtenção de progênies de soja resistentes a podridão branca da haste. Para atingir esses objetivos foram conduzidos quatro trabalhos: a)- Para esclarecer a tipo de resistência genética e virulência dos isolados, 20 cultivares de soja foram inoculadas com quatro isolados: Mauá da Serra, Ingaí, Nazareno e UFLA 24, por meio da metodologia da folha destacada. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o estágio V2, com o primeiro trifólio totalmente expandido. Os isolados foram cultivados em meio de cultura por cinco dias. Cada folíolo do trifólio recebeu um disco de ágar contendo o micélio. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, e cada folíolo foi considerado uma repetição. Após 72 horas os folíolos foram avaliados por meio de uma escala de notas que variou de 0 (sem sintomas) a 5 (sintomas severos). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método dialélico (IV de Griffing), que forneceu informações sobre a resistência vertical e horizontal das cultivares, além de informações sobre a agressividade dos isolados. As cultivares BRS Baliza RR, M-SOY 8001, Emgopa 316, e M-SOY 8329 exibiram resistência horizontal e BRS Favorita RR; Emgopa 315, MG/BR 46(Conquista), 7166RSF IPRO, BRS Silvânia RR e BRS Milena apresentaram resistência específica para a maioria dos isolados. O isolado UFLA 24, juntamente com o Ingaí foram o mais eficientes em causar sintomas nas cultivares. b)- Para comparar diferentes métodos de inoculação, 20 cultivares foram inoculadas com o isolado UFLA 24 em quatro experimentos distintos. Foram três experimentos utilizando o método *straw test*: inoculação estágio V3, avaliação do comprimento da lesão três dias após inoculação; inoculação estágio R1, avaliação do comprimento da lesão sete dias após a inoculação; inoculação estágio R1, avaliação por meio de escala de notas sete dias após a inoculação. Para esses três experimentos foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. O quarto experimento foi empregado o método da folha destacada, inoculação no estágio V2, avaliação por meio de escala de notas, 72 horas após a

inoculação. O utilizado foi inteiramente casualizados com três repetições. A partir dos dados obtidos foram realizadas as análises de variância e as médias dos quatro experimentos foram comparadas. Foram utilizados um índice de coincidência e a correlação de Spearman para a comparação da classificação das cultivares frente aos quatro experimentos. Constatou-se que em relação às médias para os quatro experimentos, a cultivar EMPOPA 315 foi classificada como mais resistente ao passo que a cultivar TGM123RR foi a mais suscetível. Foi observada correlação mediana e significativa entre o método da folha destacada com o método do *straw test* em R1, independente da estratégia de avaliação (comprimento da lesão ou escala de notas) e também entre os experimentos inoculados em R1. O índice de coincidência indicou que, quando é adotado o comprimento da lesão como estratégia de avaliação, tanto inocular em estádio V3 como em R1 confere a mesma reação ao patógeno, no caso das cultivares consideradas resistentes. c)- Para verificar a existência de variabilidade patogênica entre linhagens monoascospóricas de *S. sclerotiorum*, 20 cultivares de soja e cinco linhagens monoascospóricas de *S. sclerotiorum* foram utilizados. Um experimento em casa de vegetação foi conduzido para avaliar a variabilidade da agressividade entre monoascospóricas. As plantas no estádio R1, foram inoculadas pelo método *straw test*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições no esquema fatorial. As avaliações foram realizadas aos sete, 14 e 21 dias após a inoculação com o auxílio de uma régua graduada, por meio da proporção da área lesionada. Foi estimada a área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). As monoascospóricas 7.3, 7.4 foram mais agressivas e as cultivares BRSMG 790A e BRSMG 850GRR, apresentaram resistência mais estável frente às diferentes linhagens monoascospóricas. A análise GGE biplot caracterizou as cultivares em relação ao nível de resistência e os linhagens monoascospóricas quanto à agressividade. As cultivares BRSMG 790A e BRSMG 850GRR apresentaram resistência mais estável frente as diferentes linhagens monoascospóricas. Além disso, essas duas cultivares foram agrupadas em clusters distintos, ou seja, elas possuem diferentes grupos de alelos favoráveis relacionados a resistência a podridão branca da haste. Houve variabilidade entre as linhagens monoascospóricas e estas devem ser preferidas para inoculação em programas de melhoramento que visam obter cultivares de soja resistentes a *S. sclerotiorum*. d)- Para avaliar o potencial de populações segregantes visando à obtenção de progênies de soja resistentes a podridão branca da haste, 149 progênies $F_{2:3}$ provenientes de seis populações: população 1 (BRSMG Garantia x MG/BR 46 (Conquista)); população 2 (MG/BR 46 (Conquista) x Emgopa 316); população 3 (BRSMG 68 Vencedora x Emgopa 316); população 4 (BRSMG 68 Vencedora x MG/BR 46 (Conquista)); população 5 (Emgopa 316 x BRSMG Garantia) e população 6 (BRSMG 68 Vencedora x BRSMG Garantia), juntamente com 20 testemunhas foram avaliadas em campo, na safra 2017/2018 em latice simples 13 x 13 e parcela de 1 linha de 2 metros. As progênies foram avaliadas quanto à resistência à *S. sclerotiorum* por meio do método da folha destacada, quando as plantas

atingiram o estágio V2 (primeiro trifólio totalmente expandido). O trifólio foi coletado e levado ao laboratório para instalação do experimento. Cada folíolo do trifólio recebeu um disco de micélio do isolado UFLA 24, que foi mantido sob condições controladas até o momento da avaliação, 72 horas após a inoculação. As avaliações foram por meio de escala de notas que variavam de 0 (imune) até 5 (extremamente suscetível). O experimento, em laboratório, foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo que cada folíolo do trifólio constituiu uma repetição. Os dados foram avaliados por meio de análises de variância, individual e conjunta. As progênies apresentam variabilidade com relação à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*. As progênies oriundas da população seis (BRSMG 68 - Vencedora x BRSMG Garantia) obtiveram o maior potencial para a obter linhagens de soja com certo nível de resistência a podridão branca da haste.

Palavras-chave: *Glycine max* (L.) Merrill; Melhoramento genético vegetal; Mofo branco; Resistência genética.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum, the causal agent of sclerotinia stem rot, is a devastating fungal pathogen of soybean that can cause significant yield losses to growers when environmental conditions are favorable for the disease. The development of resistant varieties has proven difficult. Although there is variability in Brazilian germplasm, there are still many issues to be elucidated in the *S. sclerotiorum* - *Glycine max* (L.) Merrill. The objectives of this study were to evaluate the variability of different isolates of *S. sclerotiorum*, as well as to study the genetic resistance of soybean cultivars to the pathogen; to determine the most appropriate phenological stage in the soybean crop to inoculate *S. sclerotiorum*, as well as to compare different inoculation methods for the identification of soybean cultivars resistant to the pathogen; to verify the existence of pathogenic variability among monoascosporic strains of a single isolate of *S. sclerotiorum* using the straw test method in soybean cultivars and to evaluate the potential of some segregant populations to obtain soybean progenies resistant to sclerotinia stem rot. To achieve these objectives, four studies were conducted: a) To clarify the type of genetic resistance and virulence of the isolates, 20 soybean cultivars were inoculated with four isolates: Mauá da Serra, Ingaí, Nazareno e UFLA 24 using the detached-leaf method. The plants were kept in a greenhouse until the V₂ stage, characterized by the first fully expanded trefoil. The isolates were grown in culture medium for five days. Each leaflet of the trefoil received an agar disk containing the mycelium. The experiment was conducted in a completely randomized design, and each leaflet was considered a replicate. After 72 hours, the leaflets were evaluated using a scoring scale ranging from 0 (no symptoms) to 5 (susceptible). Statistical analyses were performed using the diallel method (Griffing IV model), which provided information on the vertical and horizontal resistance of the cultivars, as well as the aggressiveness of the isolates. The cultivars BRS Baliza RR, M-SOY 8001, Emgopa 316 and M-SOY 8329 showed horizontal resistance; BRS Favorita RR, Emgopa 315, MG/BR 46 (Conquista), 7166RSF IPRO, BRS Silvânia RR and BRS Milena presented specific resistance to most isolates. The UFLA 24 and Ingaí isolates were the most effective at causing symptoms in the soybean cultivars. b) To compare different inoculation methods, 20 cultivars were inoculated with the UFLA 24 isolate in four different experiments. There were three experiments using the straw test method: V3 stage inoculation, evaluation by lesion length three days after inoculation; R1 stage inoculation, evaluation by lesion length seven days after inoculation; R1 stage inoculation, evaluation by scale of notes seven days after inoculation. For these three experiments we have used the completely randomized design with five replicates. The fourth experiment was used the detached leaf method, inoculation at the V2 stage, evaluation by scale of notes, 72 hours after inoculation. The design used was completely randomized with three replicates. From the obtained data were performed the analysis of variance and the means of the four experiments

were compared. A coincidence index and the Spearman correlation were used for the comparison of the classification of the cultivars against the four experiments. It was verified that in relation to the means for the four experiments, the cultivar EMPOPA 315 was classified as more resistant and the cultivar TGM123RR was the most susceptible. There was a mean and significant correlation between the detached leaf test method and the straw test method at R1, regardless of the evaluation strategy (lesion length or note scale) and also between the experiments inoculated at R1. The coincidence index indicated that when the length of the lesion is adopted as an evaluation strategy, both inoculation in stage V3 and in R1 gives the same reaction to the pathogen, in the case of cultivars considered resistant. c) - To verify the existence of pathogenic variability among *S. sclerotiorum* monoascosporic isolates, 20 soybean cultivars and five monoascosporic isolates of *S. sclerotiorum* were used. A greenhouse experiment was conducted to evaluate the variability of aggressiveness between monoascosporic isolates. Plants in the R1 stage were inoculated by the straw test method. The experiment was conducted in a completely randomized design, with three replicates in the factorial scheme. Evaluations were performed at 7, 14 and 21 days after inoculation with the aid of a graduated ruler, by means of the proportion of the injured area. The area under a disease progression curve (AUDPC) was estimated. The monoascosporic isolates 7.3, 7.4 were more aggressive and the cultivars BRSMG 790A and BRSMG 850GRR presented more stable resistance to the different monoascosporic isolates. The GGE biplot analysis characterized the cultivars in relation to the level of resistance and the monoascosporic isolates regarding the aggressiveness. The cultivars BRSMG 790A and BRSMG 850GRR showed a more stable resistance to the different monoascosporic isolates. In addition, these two cultivars were grouped into distinct clusters, that is, they have different groups of favorable alleles related to resistance to white stem rot. There was variability among the monoascosporic isolates and these should be preferred for inoculation in breeding programs that aim to obtain soybean cultivars resistant to *S. sclerotiorum*. d) - To evaluate the potential of segregating populations to obtain soybean progenies resistant to sclerotinia stem rot, 149 F_{2.3} progenies from six populations: population 1 (BRSMG Garantia x MG / BR 46 (Conquista)); population 2 (MG / BR 46 (Conquista) x Emgopa 316); population 3 (BRSMG 68 Vencedora x Emgopa 316); population 4 (BRSMG 68 Vencedora x MG / BR 46 (Conquista)); population 5 (Emgopa 316 x BRSMG Garantia) and population 6 (BRSMG 68 Vencedora x BRSMG Garantia), and 20 controls were evaluated in the field, in the 2017/2018 crop season in a simple lattice 13 x 13 and a plot of 1 line of 2 meters. The progenies were evaluated for resistance to *S. sclerotiorum* using the detached leaf method, when the plants reached the V2 stage (first fully expanded trifolium). The trifolium was collected and taken to the laboratory to install the experiment. Each leaflet of the trifolium received a mycelial disc of the UFLA 24 isolate, which was maintained under controlled conditions until the time of evaluation, 72 hours after inoculation. The evaluations

were by scale of scores ranging from 0 (no symptoms) to 5 (susceptible). The experiment in the laboratory was conducted in a completely randomized design (DIC), with each leaflet of the trefoil constituting a repetition. The data were evaluated through analysis of variance, individual and joint. Progenies show variability in relation to resistance to *S. sclerotiorum*. Progenies from population six (BRSMG 68 - Vencedora x BRSMG Garantia) obtained the greatest potential to obtain soybean strains with a certain level of resistance to sclerotinia stem rot.

Key words: *Glycine max* (L.) Merrill; Plant breeding; Sclerotinia stem rot; Genetic resistance.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

As contribuições do melhoramento genético no Brasil em várias culturas, entre elas a soja, já foram realçadas em algumas situações (SILVA et al., 2017; ZAMBIAZZI et al., 2017; GESTEIRA et al., 2018). O sucesso desses programas tem refletido, sobretudo, em aumento da produtividade. Nos últimos 40 anos, a produtividade aumentou, em média, 64% (CONAB, 2017). Apesar das conquistas, a cultura ainda é vulnerável a agentes que limitam a produtividade, entre eles, os patógenos. O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é o agente causal da podridão branca da haste em soja. Em condições favoráveis, como umidade elevada e temperaturas amenas, podem ocorrer perdas na produção em até 70%. (MEYER et al. 2016).

O manejo integrado da doença utiliza a combinação de práticas culturais, químicas e até mesmo, controle biológico. Dentre as práticas culturais estão a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, plantio direto e diminuição da densidade de semeadura (PELTIER et al., 2012). No entanto, a maioria dessas práticas é onerosa ou são desvantajosas aos produtores. Nesse contexto, a principal medida utilizada visando o controle de doenças é o uso de variedades resistentes, muito embora, ainda não existem cultivares comerciais com resistência completa à doença. Isto se deve a resistência genética complexa e de baixa herdabilidade, restrita a genótipos que apresentam apenas resistência parcial (KIM e DIERS, 2000; ARAHANA et al., 2001; GUO et al., 2008; VUONG et al., 2008; IQUIRA et al., 2015; ZHAO et al., 2015 HUZAR-NOVAKOWISKI et al., 2018).

A resistência pode ser classificada como vertical ou horizontal, de acordo com a sua eficácia contra isolados do patógeno. Além disso, é possível identificar o tipo de resistência por meio da significância da interação cultivar x isolado. Melo e Santos (1999) desenvolveram uma metodologia eficiente, capaz de fornecer informações sobre a resistência vertical e horizontal do hospedeiro, bem como a agressividade dos isolados do patógeno. Essa metodologia já foi usada em várias outras oportunidades (SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; VALDO et al., 2016; LEITE et al., 2017), no entanto, ainda não foi estudada para o patossistema *S. sclerotiorum*-*Glycine max*.

Encontrar novas fontes de resistência para podridão branca da haste exige técnicas confiáveis de inoculação e avaliação sob condições controladas. Assim, vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a resistência de genótipos de soja a *S.sclerotiorum* em laboratórios ou casas de vegetação. Entre os métodos disponíveis, os mais comuns são técnicas de inoculação que utilizam um disco de BDA (Batata-Dextrose-Ágar) com micélio em diferentes tecidos vegetais. Podem ser inoculadas folhas destacadas (WEGULO et al., 1998; KULL et al., 2003; VUONG et al., 2004; HULLER et al., 2016), caules sem ferimentos (GARCIA e JULIATTI, 2012; HULLER et al., 2016) e com ferimentos - *straw test* (TERÁN et al., 2006;

CASTRO et al., 2016; MCCAGHEY et al., 2017). Muito embora existam diversos métodos de avaliação da resistência de soja a *S. sclerotiorum* é importante buscar alternativas que melhor represente a resposta das linhagens ao patógeno. É interessante ainda, que esses métodos, além de eficientes sejam rápidos e de simples execução para que possam ser utilizados em larga escala em programas de melhoramento.

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver cultivares de soja resistentes a podridão branca da haste, utilizando o método *straw test* (AUCLAIR et. al., 2004; HULLER et al, 2016). Contudo, a variabilidade patogênica não tem sido considerada nesses estudos, haja vista o pouco conhecimento sobre a variabilidade da agressividade de *S. sclerotiorum* nas áreas produtoras de soja. Outro ponto a ser considerado, é a unidade genética utilizada nos estudos de variabilidade patogênica. Isolados a partir de escleródios tem sido a unidade genética mais utilizada nesses estudos para a caracterização de indivíduos (HAMBLETON et al. 2002; MERT-TURK et al. 2007; LITHOLDO JUNIOR et al. 2011; CLARKSON et al. 2013). No entanto, foi demonstrado que o uso de escleródios, como indivíduo, pode não ser adequado e deve ser evitado, uma vez que os escleródios podem ser formados por hifas geneticamente distintas (LEHNER et al., 2015). As linhagens monoascospóricas são as mais próximas de um indivíduo porque cada ascósporo tem dois núcleos geneticamente idênticos (WEBSTER e WEBER, 2007). Assim é oportuno quantificar esta variabilidade patogênica bem como a agressividade.

Uma alternativa interessante visando nortear os programas de melhoramento de soja para resistência a doenças concerne na obtenção de parâmetros genéticos e fenotípicos. Muito embora, alguns relatos tenham sido reportados na literatura (CASTRO et al., 2016), esta temática ainda merece destaque e novos estudos. Isto se faz necessário, uma vez que existe grande influência do germoplasma, bem como do isolado, na magnitude das estimativas.

A partir do exposto, objetivou-se: avaliar a virulência de diferentes isolados de *Sclerotinia sclerotiorum*, bem como, inferir sobre a resistência genética (vertical e horizontal) de cultivares de soja ao patógeno; determinar o estágio fenológico mais indicado, na cultura da soja, para inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*, bem como comparar diferentes métodos de inoculação, visando à identificação de cultivares de soja resistentes ao patógeno; verificar a existência de variabilidade patogênica entre linhagens monoascospóricas de um mesmo isolado de *S. sclerotiorum* utilizando o método *straw test* em cultivares de soja e avaliar o potencial de algumas populações segregantes, para obter progênes de soja resistentes a podridão branca da haste.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Podridão branca da haste em soja

2.1.1 Importância econômica da doença

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) De Bary possui ampla distribuição geográfica e uma gama diversa de hospedeiros, incluindo muitas culturas agrônômicas. O patógeno infecta mais de 400 espécies de plantas em todo o mundo e provoca podridão branca da haste na cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.). É reconhecida como importante doença que compromete a produção em países como os Estados Unidos (WRATHER et al, 2001) e Brasil (MEYER et al. 2016). Nos EUA, estima-se que as perdas anuais na produção de soja devido à essa doença tenha atingido 1,6 milhões de toneladas (KOENNING e WRATHER 2010). No Brasil, a doença é generalizada no sul, sudeste, centro-oeste e algumas áreas da região nordeste (JULIATTI et al. 2013).

A prevalência da doença no país tem aumentado consideravelmente desde 2008, com uma estimativa de 7,7 milhões de hectares infestados, o que equivale a 23% da área colhida. Em condições favoráveis, como umidade elevada e temperaturas amenas, podem ocorrer perdas na produção em até 70%. (MEYER et al. 2016).

Lehner e colaboradores (2017) realizaram uma meta-análise para avaliar a relação entre incidência da doença e produtividade de soja (35 ensaios em 14 locais ao longo de quatro safras), e demonstraram que a cada 10% de aumento na incidência do patógeno ocorre uma redução na produtividade da ordem de 172 kg/ha. O estudo considerou ainda, um cenário com 43% de incidência em 22% da área plantada e na ausência de manejo adequado, o prejuízo pode chegar a 1,47 bilhões de dólares americanos por ano no Brasil.

2.1.2 Características do patógeno

O fungo pertence à Classe dos Ascomycetes, Subclasse Discomycetes, Ordem Helotiales e à Família Sclerotiniaceae. O fungo *S. sclerotiorum* é um patógeno necrotrófico e polífago, tem como hospedeiros 75 famílias de plantas, 278 gêneros, 408 espécies e 42 subespécies (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON et al., 2006).

O patógeno produz estruturas de resistência denominadas de escleródios, que a princípio apresentam coloração branca, e após ocorrer o emaranhado de hifas, tornam-se negras e duras, podendo sobreviver no solo por um período superior a cinco anos (STEADMAN; BOLAND, 2005). A formação de escleródios é diretamente influenciada por fatores ambientais. Em geral, escleródios são produzidos após o micélio desenvolvido encontrar um ambiente de limitação nutricional (CHRISTIAS; LOCKWOOD, 1973). São formados por hifas densamente entrelaçadas revestidas por uma camada negra de melanina, que confere proteção contra condições adversas e degradação por microorganismos (HENSON; BUTLER; DAY, 1999).

Os escleródios podem apresentar duas formas de germinação: miceliogênica, formando somente hifas; ou carpogênica, produzindo apotécios que são estruturas em forma de taça nos quais são formados os ascósporos e são disseminados, principalmente, pelo vento (BOLTON et al., 2006). Sob temperatura na faixa de 10°C a 21°C e condições de alta umidade, escleródios geralmente formam apotécios (ALMEIDA et al., 2005). Por isso, esse tipo de germinação ocorre após o fechamento das entrelinhas, pois o sombreamento auxilia na manutenção de níveis elevados de umidade no solo.

A disseminação do patógeno pode ocorrer a longas distâncias através das sementes de plantas hospedeiras misturadas a escleródios ou pela presença de micélio dormente no endosperma. Pode ocorrer, ainda, disseminação de ascósporos e até mesmo pequenos escleródios pelo vento, ou aderidos ao solo em máquinas e implementos agrícolas, pela água da irrigação ou de chuvas (GORGEN, 2009).

Tendo as condições favoráveis ao seu crescimento, o patógeno é capaz de colonizar os tecidos saudáveis do hospedeiro entre 16 e 24 horas após a infecção do tecido floral senescente. O progresso da doença pode ser retardado e até mesmo paralisado em períodos de estiagem, entretanto, quando as condições de alta umidade retornam, o patógeno continua crescendo de onde parou. Mesmo quando as condições ambientais estão desfavoráveis ao fungo, este pode manter-se viável em forma de micélio em flores infectadas por até 144 horas até que as condições climáticas voltem a ser ideais para seu desenvolvimento (HARIKRISHNAN; DEL RÍO, 2006).

O processo de infecção envolve a formação de apressórios, auxiliando na adesão do fungo através da cutícula da planta. Após a adesão ocorre a formação de uma vesícula na ponta do apressório, onde há várias enzimas de degradação. Na instalação do fungo em tecidos saudáveis, ocorre liberação local de ácido oxálico, substância que desempenha vários papéis importantes no crescimento dos fungos e seu metabolismo, principalmente atuando na colonização do tecido hospedeiro e subsequente degradação das células (DUTTON; EVANS, 1996). O ácido oxálico e as enzimas pectolíticas estão associados com o progresso da doença. O ácido oxálico penetra no tecido ao redor da lesão, fornecendo ótima condição para a ação das enzimas pectolíticas (MAXWELL; LUMSDEN, 1970).

Na cultura da soja, os sintomas típicos da doença iniciam-se a partir de lesões encharcadas de onde crescem as hifas e ocorre após abundante crescimento micelial. A ação das diversas toxinas produzidas por *S. sclerotiorum* apodrecem os tecidos infectados. Pode ser observado nesse período o apodrecimento de diversas partes da planta, inclusive a haste principal ocasionando a morte da planta. Com o avanço da colonização do tecido vegetal pelo fungo, as lesões inicialmente aquosas tornam-se secas e não apresentam mais sinais externos ocorrendo assim à formação de escleródios tanto na superfície quanto no interior da haste e das vagens infectadas (GRAU; RADKE, 1984).

A cultura da soja torna-se mais vulnerável no estágio fenológico correspondente à floração plena (R2) ao início da formação dos grãos (R5) (DANIELSON et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005). Neste momento, as condições tornam-se favoráveis ao progresso da doença, já que o dossel da planta cobre as entrelinhas formando um microclima adequado com elevada umidade (cerca de 70%) e temperatura ideal (aproximadamente 20°C) para que os escleródios, presentes no solo, germinem e produzam os apotécios (LEITE, 2005; CUNHA, 2010).

2.1.3 Manejo da doença

É praticamente impossível erradicar o patógeno das áreas infestadas, mas existem várias práticas culturais que podem auxiliar no manejo integrado da doença, permitindo o cultivo com produtividade (GORGEN et al., 2010).

Apesar do uso de fungicidas ser comum para manejo de doenças, existem poucos registrados no Brasil para controlar mofo branco na soja, limitando-se a cinco ingredientes ativos: fluazinam, procimidona, tiofanato metílico, carbendazim e cloreto de benzalcônico (AGROFIT, 2013).

O tratamento de sementes com fungicidas consiste em tecnologia de baixo custo, pouco risco ambiental e, em geral, apresenta efeito significativo na produtividade (MENTEN et al., 2005). Além da aplicação em sementes, a pulverização de fungicidas tem sido o método mais usado no controle de *S. sclerotiorum* devido à falta de resistência genética das cultivares (BARDIN; HUANG, 2001). No entanto, o sucesso do controle químico da doença está diretamente relacionado com a incidência e a severidade da doença, o fungicida e a época de aplicação (deve coincidir com a liberação de ascósporos), o número de aplicações, o espaçamento, a densidade de semeadura e a cultivar (VIEIRA, 1994). Deve-se, sobremaneira, garantir a aplicação no terço inferior da planta, onde, normalmente está a maioria das lesões causadas pelo patógeno. A redução da incidência da doença pelo uso de fungicidas apresenta variação entre 0 a 60%, não sendo possível controlar totalmente a população do patógeno (ESKER et al., 2011). Dessa forma, o controle químico não deve ser utilizado isoladamente, e sim como um dos componentes do manejo integrado da doença.

Dentre as alternativas para reduzir o uso de agrotóxicos, o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo tanto aproveitar o natural, com a população já presente na área, quanto realizar a introdução de um novo agente (BETTIOL et al., 2009). Espécies de fungo do gênero *Trichoderma* são conhecidas por controlar doenças de plantas por induzir respostas de defesa da planta ou por meio do parasitismo de fungos fitopatogênicos (HARMAN, et al., 2004). Apresentam-se como agentes de biocontrole, por diversas características: rápido crescimento micelial, a alta produção de conídios, a síntese de substâncias antimicrobianas e a capacidade de

sobreviver como saprófita, simbiote ou como micoparasita (ALVARENGA et al., 2007). O gênero *Trichoderma* atua como micoparasita de *S. sclerotiorum*, capazes de colonizar micélio e escleródios, prejudicando o pleno desenvolvimento do fungo (ABDULLAH et al., 2008; HUANG; ERICKSON, 2008).

Apesar da ampla gama de hospedeiros suscetíveis a *S. sclerotiorum*, a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, principalmente gramíneas, pode auxiliar a reduzir o inóculo na área, devido a degradação natural dos escleródios por antagonistas (LEITE, 2005). Porém, essa medida pode ser ineficaz para o controlar a doença porque os escleródios sobrevivem no solo por vários anos na ausência de hospedeiro (VIEIRA, 1994). O aumento do espaçamento entre plantas e a diminuição da densidade proporcionam maior aeração evitando a formação de microclima favorável à doença, além de diminuir a possibilidade de contato entre plantas doentes com plantas saudáveis (ESKER et al., 2011; FURLAN, 2012; LEITE, 2005). O sistema de plantio direto também auxilia no controle da doença quando comparado ao plantio convencional. A presença da palhada, impede o contato da planta com o solo infestado, dificulta a formação de apotécios e dispersão de ascósporos, além de favorecer a ação de microrganismos antagonistas (PAULA JÚNIOR et al., 2010). No manejo convencional do solo, as operações de preparo do solo geralmente asseguram a presença de escleródios na superfície do solo (STEADMAN, 1983). A utilização de sementes certificadas, também é uma medida que diminuem os riscos de introdução do patógeno na área (HENNING et al., 2005).

No entanto, a principal medida utilizada para controlar doenças é o uso de cultivares resistentes. Entretanto, ainda não há disponível no mercado nacional cultivares de soja resistentes ao patógeno. Isso por que a resistência genética em relação ao hospedeiro é complexa e de baixa herdabilidade, estando restrita a genótipos apenas com resistência parcial (KIM e DIERS, 2000; ARAHANA et al., 2001; GUO et al., 2008; VUONG et al., 2008; HUZAR-NOVAKOWISKI et al., 2018).

2.1.4 Resistência genética

Em muitas situações, o melhoramento genético é o único meio de conseguir aumentos na produtividade e na qualidade e tem a vantagem de promover alterações hereditárias, ou seja, de ser possível transmitir as boas características obtidas pelo melhoramento, aos descendentes. Em muitos casos as vantagens agrônômicas podem ser perpetuadas (CARNEIRO, 2009).

O conhecimento do tipo de ação gênica que predomina no controle genético de um caráter é um fator importante, principalmente para a condução eficiente de um programa de melhoramento. Quando o controle genético é complexo, envolvendo muitos locos, ou então quando a influência de fatores ambientais sobre a expressão do caráter for pronunciada, há uma maior dificuldade em se conhecer com detalhes a natureza de ação gênica presente

(VENCOVSKY; BARRIGA, 1992).

Apesar da existência de várias ferramentas para o controle da podridão branca da haste, um alto nível de controle da doença que não dependa exclusivamente das práticas integradas de manejo, ainda são de extrema necessidade. O controle aceitável da doença ainda é limitado pela falta de resistência genética das cultivares comerciais disponíveis. Várias cultivares de soja com resistência parcial tem sido identificadas em condições controladas e no campo (GRAU et al., 1982; BOLAND and HALL, 1987; KIM and DIERS, 2000; HAN et al., 2008; HUYNH et al., 2010; LI et al., 2010; SEBASTIAN et al., 2010; BASTIEN et al., 2014; IQUIRA et al., 2015; ZHAO et al., 2015). Em cultivares parcialmente resistentes, vários QTL (*Quantitative Trait Loci*) que contribuem para a resistência à doença foram identificados. Por exemplo, três QTL's foram identificados por Kim e Diers (2000) e 28 QTL's foram identificados por Arahana et al. (2001), que individualmente explicam 4-10% da variação fenotípica. Outro estudo conduzido com Voung e colaboradores (2008) mapeou quatro QTL's que explicaram de 5,5% até 12,1% da variação do fenótipo para a doença. Guo e equipe, (2008), identificaram sete QTL's que explicaram de 6,0% a 15,7% das diferenças de fenótipos nas populações em estudo.

Outros estudos de resistência genética incluem investigações da degradação do ácido oxálico, fator de patogenicidade de *S. sclerotiorum*, que resultou no desenvolvimento da soja transgênica resistente a podridão branca da haste (DONALDSON et al., 2001; CUNHA et al., 2010). Mais recentemente identificaram que o silenciamento das NADPH oxidases, na cultura da soja, também permite uma maior resistência ao patógeno (RANJAN et al., 2018). No entanto, esses eventos de soja transgênicos ainda não são explorados comercialmente. Além disso, uma necessidade ainda persiste: como diferenciar entre genótipos que apresentam resistência fisiológica, daqueles que escaparam à pressão do patógeno. A resistência fisiológica é conferida pelos mecanismos de defesa da planta e os mecanismos de escape, pelas características relacionadas à própria planta (acamamento, arquitetura do dossel, altura da planta, período de florescimento e maturação) (MIKLAS et al. 2013). No campo, ambos os tipos de resistência contribuem para controlar a doença, contudo, em casa de vegetação ou em laboratório, apenas a resistência fisiológica pode ser identificada (VUONG et al., 2004).

Melhoramento genético para resistência à podridão branca da haste é difícil devido à resistência ser conferida por vários alelos, mecanismos de escape, mecanismos de resistência fisiológica, bem como interações genéticas e ambientais complexas. Kim e Diers (2000) identificaram três QTL's que representaram de 8% a 10% da variabilidade da severidade da doença. No entanto, dois estavam associados a mecanismos de escape, incluindo altura da planta, arquitetura e data de floração. Para determinar a resistência fisiológica à doença, QTL's tem sido mapeados em experimentos em casa de vegetação onde as plantas foram inoculadas para evitar o *screening* para os mecanismos de escape associados a ensaios de campo (ARAHANA et al., 2001; GUO et al., 2008; VUONG et al., 2008). Resistência fisiológica à

podridão branca da haste foi, até agora, limitada a apenas algumas linhagens resistentes (GRAU et al., 1982; KIM and DIERS, 2000; VUONG et al., 2008). O teste de campo para este tipo de resistência é difícil. Como as condições ambientais e a distribuição do inóculo não são uniformes, a diferença de pressão do patógeno nas áreas experimentais faz com que afirmações acerca de linhagens resistentes devam ser feitas com cautela.

Outro fato que torna difícil obter cultivares de soja resistentes a podridão branca da haste é que isolados de *S. sclerotiorum* diferem em agressividade. É importante utilizar um painel representativo de isolados, que compreenda isolados menos agressivos até aqueles de maior agressividade para a identificação de genótipos resistentes. Isto se faz necessário devido a interação isolado por linhagens que ocorre devido a habilidade dos isolados em superar os mecanismos de resistência de certos genótipos (WILLBUR et al., 2017).

2.2 Variabilidade genética de *S. sclerotiorum*

Nas últimas décadas, a estrutura populacional de *S. sclerotiorum* foi amplamente documentada a partir de diferentes culturas hospedeiras e diversas regiões do mundo. A maioria dos estudos relatou que as populações são predominantemente de estrutura clonal (Kohn, 1995; Kohli e Kohn, 1998; Carbone et al., 1999; Hambleton et al., 2002; Ekins et al., 2011). Muito embora, *S. sclerotiorum* seja capaz de reprodução heterotálica e homotálica, evidências de cruzamento de forma extensiva não foram observadas. A maioria dos relatos de evidências de cruzamento sexual foram observados em campos individuais e variavelmente ao longo dos anos (Kamvar et al. 2017). Dessa maneira, as evidências suportam a noção de que a maior parte dos ascósporos formados nos campos é proveniente da autofertilização (Kohli e Kohn, 1998). Muitos dos estudos genéticos populacionais que analisaram a estrutura populacional de *S. sclerotiorum* indicaram uma estrutura clonal. A análise genética dessas populações mostrou tipicamente que a maioria dos indivíduos representava alguns genótipos multilocus (MLGs). Diversos estudos, no entanto, relataram populações que não se ajustavam a essa expectativa, como na China (Attanayake et al. 2013), Brasil (Gomes et al. 2011), Irã (Hemmati et al. 2009), Reino Unido (Li et al. 2009), EUA (Malvárez et al. 2007) e Nova Zelândia (Carpenter et al. 1999). A causa exata de algumas populações serem clonais, enquanto outras não, ainda não está clara. Isto porque pode ser devido a eventos biológicos verdadeiros, ou amostragem, escolha de marcadores ou método de análise estatística. Assim, determinar a causa não é possível em diferentes estudos.

A maioria dos estudos populacionais de *S. sclerotiorum* foi realizada em populações dos EUA (Lehner e Mizubuti 2017). O Brasil é outro grande produtor de culturas econômicas comumente infectadas por *S. sclerotiorum*, como a soja o que a torna uma comparação ideal das populações de *S. sclerotiorum*. Acredita-se que ambientes com inverno ameno e variedade de

potenciais hospedeiros, como no Brasil, poderiam levar a uma maior diversidade entre as populações do patógeno (Malvárez et al. 2007). Embora não seja possível comparar diretamente os resultados de estudos anteriores de populações de *S. sclerotiorum* entre climas temperados e tropicais, devido às diferenças no número de estudos, tipos de marcadores moleculares que foram utilizados (Lehner e Mizubuti 2017) e diferenças na rotulagem primer. Um estudo recente de *S. sclerotiorum* coletado de campos de soja em Minas Gerais encontrou uma estrutura populacional clonal (Lehner et al. 2017). Isso é contrário a relatos anteriores no Brasil, que não identificaram populações predominantemente clonais (Gomes et al. 2011; Litholdo Júnior et al. 2011). Outro estudo identificou populações no Brasil que tinham alta diversidade genotípica, embora essas populações não apresentassem fecundação cruzada, foi hipotetizado que mutações aleatórias contribuíram para a variação genética observada (Lehner et al. 2015).

Apesar de vários estudos tratarem da diversidade genética em populações de *S. sclerotiorum*, poucos têm utilizado algum método de inoculação para avaliar essa diversidade e dessa maneira quantificar a patogenicidade dos isolados (LEHNER et al, 2016; SHARMA et al, 2018; GODOY et al, 2017). Um estudo recente foi conduzido para avaliar a variabilidade patogênica de 65 isolados de *S. sclerotiorum*, coletados de sete diferentes espécies de *Brassica*. Um teste de variabilidade patogênica foi conduzido em quatro espécies de *Brassica* diferenciadoras e mostrou que todos os isolados coletados foram patogênicos e capazes de desenvolver sintomas após a infecção. Entretanto, houve variação na agressividade dos isolados em todas as cultivares diferenciadoras. A população de isolados do patógeno foi agrupada em três subgrupos: altamente agressivos, agressivos e moderadamente agressivos (SHARMA et al, 2018).

Outro ponto a ser considerado, é a unidade genética utilizada nesses estudos de variabilidade patogênica. Isolados a partir de escleródios têm sido a unidade genética mais utilizada para quantificar a patogenicidade. No entanto, foi demonstrado que o uso de escleródios, como indivíduo, pode não ser adequado e deve ser evitado, uma vez que os escleródios podem ser formados por hifas geneticamente distintas (LEHNER et al., 2015). Dessa maneira, os isolados obtidos a partir de um único esporo, linhagens monoascospóricas, são os mais próximos de um indivíduo porque cada ascósporo tem dois núcleos geneticamente idênticos (WEBSTER e WEBER, 2007). Poucos estudos foram conduzidos utilizando linhagens monoascospóricas inoculadas em algumas culturas como feijão (LEHNER et al, 2016;) e girassol (LIU et al, 2018). Apesar disso, não se tem relatos do uso de linhagens monoascospóricas inoculadas na cultura da soja para avaliar a variabilidade patogênica de *S. sclerotiorum*.

2.3 Procedimentos para avaliar a reação da soja a *S. sclerotiorum*

A cultura da soja apresenta duas formas de resistência a *S. sclerotiorum*, o escape à doença e a resistência fisiológica. Mecanismos de escape incluem porte mais ereto da planta, dossel mais poroso e cultivares precoces para fugir das condições favoráveis ao patógeno no florescimento (MAXWELL, et.al., 2007).

Já a resistência fisiológica é controlada por fatores genéticos do hospedeiro que podem inibir a infecção ou a disseminação do patógeno nas células do hospedeiro. Portanto, prevenção pelo escape e resistência fisiológica são os métodos de controle mais econômicos e eficazes para reduzir os danos causados pela doença (MIKLAS et al., 2001).

Independentemente da reação das cultivares, a ocorrência da podridão branca da haste no campo é altamente dependente das condições ambientais, sendo um entrave para avaliar os genótipos de soja para resistência ao patógeno (HUZAR-NOVAKOWISKI et al., 2018; MCCAGHEY et al., 2017; MOELLERS et al., 2017; MIORINI et al., 2018;). O progresso do melhoramento é dificultado por essas condições ambientais e pelos mecanismos de escape da planta que mascara a expressão e detecção da resistência fisiológica em condições de campo. Assim, desenvolver um método confiável para avaliar a resistência da soja a *S. sclerotiorum* deve ser umas das prioridades dos programas de melhoramento.

Existem diversas metodologias de avaliação por meio da inoculação artificial do patógeno (CHEN et al., 2005; GARCIA; JULIATTI, 2012; HULLER, et al., 2016). A maioria desses testes depende do micélio nas avaliações e são influenciados pela variabilidade dos isolados e pela sensibilidade do patógeno em condições artificiais. Quando se utiliza micélio é importante avaliar se há variação na agressividade do isolado, sobretudo após sucessivas repicagens. Muitos problemas relacionados à avaliação e ao melhoramento para resistência a doenças podem ser, em parte, causados por não considerar a variabilidade na agressividade do patógeno (SOUZA, 2009).

O método da folha destacada é muito utilizado em diversos programas de melhoramento para as mais variadas culturas. A metodologia apresenta vantagens pela facilidade de operação e rapidez nos resultados. Foi primeiramente descrito por Tu (1985), para testar a reação de genótipos de feijoeiro a *S. sclerotiorum*. Na cultura da soja é largamente difundido, apresentando bons resultados em discriminar os genótipos quanto à reação a podridão branca da haste, bem como avaliar a agressividade de novos isolados (JULIATTI et al., 2014; JULIATTI et al., 2013; HULLER et al., 2016; MIORINI et al., 2018).

O *straw test*, ou teste do canudo, é o método mais simples de avaliação da resistência fisiológica dentro do tecido do caule principal. Este método tem se mostrado eficiente, também em programas de melhoramento de soja, para auxiliar na identificação, na caracterização e na seleção de genótipos (AUCLAIR et. al., 2004; HULLER et. al., 2016; WEI et al., 2017;

WILBUR et al., 2017). Por ser um método não destrutivo, permite o avanço de programas de melhoramento para a obtenção de progênes resistentes. O *straw test* foi descrito primeiramente para feijoeiro por Petzoldt e Dickson (1996), e adaptado para soja por Auclair e colaboradores (2004). As plantas são inoculadas aproximadamente quatro semanas após a semeadura. O inóculo do patógeno é cultivado em meio de batata-dextrose-ágar (BDA) adicionado de cloranfenicol, na proporção de 1 gota do antibiótico/100 ml de meio, à temperatura de aproximadamente 22°C, permitindo um crescimento uniforme. Para se obter ativo crescimento, é necessário multiplicar o fungo duas vezes e a inoculação deve ser realizada de três a cinco dias após a segunda multiplicação. Nessa fase, a cultura apresenta-se com aspecto cotonoso. Ponteiras tipo Eppendorf são usadas para cortar e retirar o disco de ágar da placa, de modo que o micélio fique em contato com a haste cortada do último trifólio totalmente expandido. Uma e duas semanas após a inoculação são realizadas as avaliações de acordo com a seguinte escala descritiva de notas: 1 – plantas sem lesão; 2 - lesão pouco abaixo da ponteira; 3 - lesão além da ponteira, mas não se prolonga para o primeiro nó; 4 - lesão que se estende para o primeiro nó a partir da ponteira; 5 – lesão entre o primeiro e segundo nó a partir da ponteira; 6 - lesão no segundo nó a partir da ponteira; 7 - lesão entre o segundo e o terceiro nó a partir da ponteira; 8 - lesão no terceiro nó a partir da ponteira; e 9 - lesão além do terceiro nó a partir da ponteira (AUCLAIR et al., 2004).

2.4 Análise dialélica para estudo de patossistemas

A resistência pode ser classificada como vertical ou horizontal, de acordo com a sua eficácia contra isolados do patógeno. Além disso, é possível identificar o tipo de resistência por meio da significância da interação cultivar x isolado. Isso pode ser visto quando diferentes isolados de um patógeno são inoculados em diferentes cultivares. Neste caso, uma interação altamente significativa entre cultivar x isolado sugere que a reação de cada cultivar é específica a um isolado específico, indicando que a resistência é vertical. Para interações não significativas, as cultivares se comportam de maneira semelhante a todos os isolados, neste caso, pode ser inferido que essa resistência é horizontal.

Uma melhor forma de prever a relação entre a variabilidade populacional de um patógeno e resistência genética das linhagens é essencial para aumentar a estabilidade e durabilidade dos genótipos à podridão branca da haste. Melo e Santos (1999) realizaram um estudo de simulação para prever a severidade da doença com o auxílio do modelo aditivo proposto por Parlevliet and Zadoks (1977) e fizeram as análises dos dados com o modelo IV de Griffing, usando o esquema de dialelo parcial. Este estudo identificou uma alta correlação entre capacidade geral de reação e resistência horizontal do hospedeiro e também entre capacidade geral de agressividade e virulência dos isolados. A capacidade específica de interação se mostrou um bom preditor da resistência vertical do hospedeiro e também da virulência do

patógeno. Esta metodologia já foi usada em várias outras oportunidades (SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; VALDO et al., 2016; LEITE et al., 2017), no entanto, ainda não foi estudada para o patossistema *S. sclerotiorum*-*Glycine max*.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, M.T. et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v.27, p.1354-1359, 2008.
- AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 17 out. 2018.
- ALMEIDA, A. M. R.; FERREIRA, L. P.; YORINORI, J. T.; SILVA, J. F. V.; HENNING, A. A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas, São Paulo: **Agronômica Ceres**. v. 2. p. 596-617. 2005.
- ALVARENGA, D. O., et al. **Aspectos relacionados ao controle biológico do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, , 24 p. 2007.
- ARAHANA, V. S.; GRAEF, G. L.; SPECHT, J. E.; STEADMAN, J. R.; ESKRIDGE, K. M. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**. v.41. p. 180-188. 2001.
- ATTANAYAKE, R. N. et al. Inferring outcrossing in the homothallic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* using linkage disequilibrium decay. **Heredity**, v. 113, n. 4, p. 353, 2014.
- AUCLAIR, J. et al. Genetic interactions between *Glycine max* and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant disease**, v. 88, n. 8, p. 891-895, 2004.
- BARDIN, S.D. AND HUANG, H.C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada. **Can. J. Plant Pathol.** **23**, 88–98. 2001.
- BASTIEN, M.; SONAH, H.; Belzile, F. Genome wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean with a genotyping-by sequencing approach. **The Plant Genome**. 7(1):1–13. 2014.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JUNIOR, T. J.; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 17, p. 111-147, 2009.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.16. p. 93-108. 1994.
- BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7. p. 1-16. 2006.
- CARBONE, I., ANDERSON, J.B., KOHN, L.M. Patterns of descent in clonal lineages and their multilocus fingerprints are resolved with combined gene genealogies. **Evolution** **53**, 11–21. 1999.
- CARNEIRO, F. F. **Genética da resistência do feijoeiro ao mofo-branco e uso do retrocruzamento assistido por marcadores microssatélites**. 84 p. Dissertação

(Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CARPENTER, M.A., FRAMPTON, C., STEWART, A., Genetic variation in New Zealand populations of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. 1999.

CASTRO, L. H. S. et al. Resistance of soybean genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in different incubation environments. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 4, 2016.

CLARKSON, J. P. et al. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in the UK. **Plant pathology**, v. 62, n. 2, p. 309-324, 2013.

Companhia Nacional de Abastecimento. Compêndio de Estudos Conab / Companhia Nacional de Abastecimento. – v. 10 (2017). - Brasília: Conab, 2017.

CHEN, Y.; WANG, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.89, p.1268-1272, 2005.

CHRISTIAS, C. & LOCKWOOD, J. L. (1973). Conservation of mycelial constituents in four sclerotium-forming fungi in nutrient-deprived conditions. **Phytopathology** 63, 602-605.

CUNHA, W. G. et al. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 654-660, 2010.

DANIELSON, G.A.; NELSON, B.D.; HELMS, T.C. Effect of *Sclerotinia* stem rot on yield of soybean inoculated at different growth stages. **Plant Disease**, v.88, p.297-300, 2004.

DONALDSON, Pauline A. et al. Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat gf-2.8 (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 59, n. 6, p. 297-307, 2001.

DUTTON, M.V. AND EVANS, C.S. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. **Can. J. Microbiol.** 42, 881–895. 1996.

ESKER, et al. 'Management of white mold in soybean', North Central Soybean Research Program, 1255 SW Prairie Trail Parkway, Ankeny, Iowa, 50023. 2011.

FURLAN, S. H. **Guia de identificação de doenças do feijoeiro**. Campinas: Instituto Biológico. 109 p, 2012.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, Fernando C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology, Brasília, DF**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.

GESTEIRA, Gabriel de Siqueira et al. Selection of Early Soybean Inbred Lines Using Multiple Indices. **Crop Science**, 2018.

GODOY, Claudia Vieira et al. Mycelial growth, pathogenicity, aggressiveness and apothecial development of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil and the United States in contrasting temperature regimes. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 4, p. 263-268, 2017.

- GOMES, E.V., DO NASCIMENTO, L.B., DE FREITAS, M.A., NASSER, L.C.B., PETROFEZA, S. Microsatellite markers reveal genetic variation within *Sclerotinia sclerotiorum* populations in irrigated dry bean crops in Brazil. **Journal of Phytopathology**. 2011.
- GÖRGEN, C. A. et al. Reduction of *Sclerotinia sclerotiorum* initial inoculum in soybean grown after the use of the Santa Fé system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 10, p. 1102-1108, 2010.
- GÖRGEN, C.A.; SILVEIRA NETO, A.N. da; CARNEIRO, L.C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1583-1590, 2009.
- GRAU, C. R. et al. Effects of cultivars and cultural practices on *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Plant Disease**, v. 68, n. 1, p. 56-58, 1984.
- GRAU, C. R.; RADKE, V. L.; GILLESPIE, F. L. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Diseases**, 1982.
- GUO, X. et al. Genetic mapping of QTLs underlying partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean PI 391589A and PI 391589. **Crop Science**. v. 48. p. 1129-1139. 2008.
- HAMBLETON S, WALKER C, KOHN LM. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Can J Plant Pathol** 24: 309–315. 2002.
- HAN, F., M. KATT, W. SCHUH, AND D.M. WEBB. QTL controlling *Sclerotinia* stem rot resistance in soybean. **U.S. Patent 7250,552**. 2008.
- HARIKRISHNAN, R.; DEL RÍO, L. E. Influence of temperature, relative humidity, ascospore concentration, and length of drying of colonized dry bean flowers on white mold development. **Plant Disease**, v. 90, n. 7, p. 946-950, 2006.
- HARMAN, Gary E. et al. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43, 2004.
- HEMMATI, R., JAVAN-NIKKHAH, M., LINDE, C.C. Population genetic structure of *Sclerotinia sclerotiorum* on canola in Iran. **European Journal of Plant Pathology**. 2009.
- HENNING AA, et al. Manual de identificação de doenças de soja, Londrina: **Embrapa soja**, 72 p. (Documento n.256). 2005.
- HENSON, J.M., BUTLER, M.J. AND DAY, A.W. The dark side of mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annu. Rev. Phytopathol.** 37, 447–471. 1999.
- HUANG, H.; ERICKSON, R. S. Factors affecting biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by fungal antagonists. **Journal of Phytopathology**, v.156, p.628-634, 2008.
- HULLER, G. de C. et al. Different methods of assessing susceptibility of soybean genotypes to white mold= Diferentes métodos de avaliação da suscetibilidade de genótipos de soja ao mofo branco. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, 2016.
- HUYNH, T.T.; BASTIEN, M.; IQUIRA, E. Turcotte P, Belzile F. Identification of QTLs associated with partial resistance to white mold in soybean using field-based inoculation. **Crop Sci**; 50(3):969, 2010.

HUZAR-NOVAKOWISKI, Jaqueline; DORRANCE, Anne E. Ascospore inoculum density and characterization of components of partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant disease**, v. 102, n. 7, p. 1326-1333, 2018.

IQUIRA, Elmer; HUMIRA, Sonah; FRANÇOIS, Belzile. Association mapping of QTLs for sclerotinia stem rot resistance in a collection of soybean plant introductions using a genotyping by sequencing (GBS) approach. **BMC plant biology**, v. 15, n. 1, p. 5, 2015.

JULIATTI, F. C. et al. Inoculation methods to *Sclerotinia sclerotiorum* reaction resistance on soybean. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, 2014.

JULIATTI, F. C.; SAGATA, E.; JULIATTI, B. C. M. Ranqueamento de genótipos de soja com resistência parcial por diferentes métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos à análise de correlação= Ranking of soybean genotypes with partial resistance from different inoculation methods of.. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, 2013.

KAMVAR, Zhian N. et al. Population structure and phenotypic variation of *Sclerotinia sclerotiorum* from dry bean (*Phaseolus vulgaris*) in the United States. **PeerJ**, v. 5, p. e4152, 2017.

KIM, H.S.; DIERS, B.W. Inheritance of partial resistance to sclerotinia stem rot in soybean. **Crop Science** 40, 55–61, 2000.

KOENNING, Stephen R.; WRATHER, J. Allen. Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009. **Plant Health Progress**, v. 11, n. 1, p. 5, 2010.

KOHLI Y, KOHN LM. Random association among alleles in clonal populations of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Fungal Genet Biol** 23: 139–149. 1998.

KOHN LM. The clonal dynamics in wild and agricultural plant-pathogen populations. **Can J Bot** 73: S1231–S1240. 1995.

LEHNER, M. S. et al. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais state, Brazil, at regional, local and micro-scales. **Plant Pathology**, v. 64, n. 4, p. 921-931, 2015.

LEHNER, M. S. et al. Meta-analytic modeling of the incidence-yield and incidence-sclerotial production relationship in soybean White mold epidemics. **Plant Pathology**, v. 66, n. 3, p. 460-468, Oxford, 2017.

LEHNER, M. S. et al. Similar aggressiveness of phenotypically and genotypically distinct isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 100, n. 2, p. 360-366, 2016.

LEHNER, Miller S. et al. Independently founded populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from a tropical and a temperate region have similar genetic structure. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0173915, 2017.

LEHNER, Miller S.; MIZUBUTI, Eduardo SG. Are *Sclerotinia sclerotiorum* populations from the tropics more variable than those from subtropical and temperate zones?. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 2, p. 61-69, 2017.

LEITE, Monik Evelin et al. Reaction of common bean lines derived from recurrent selection for white mold resistance and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotium* isolates. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 5, 2017.

LEITE, RMVB de C. Ocorrência de doenças causadas por *Sclerotinia sclerotium* em girassol e soja. **Embrapa Soja. Comunicado Técnico**, 2005.

LI, G. Q.; HUANG, H. C.; LAROCHE, A.; ACHARYA, S. N. Occurrence and characterization of hypovirulence in the tan sclerotial isolate S10 of *Sclerotinia sclerotium*. **Mycology Research**, v. 107, n. 11, p. 1350–1360, 2003.

LI, Z.Q., WANG, Y.C., CHEN, Y., ZHANG, J.X., FERNANDO, W.G.D. Genetic diversity and differentiation of *Sclerotinia sclerotium* populations in sunflower. **Phytoparasitica**. 2009.

LITHOLDO JÚNIOR, CG et al. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotium* in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 2, p. 868-877, 2011.

LIU, Jia et al. Mycelial compatibility group and genetic variation of sunflower *Sclerotinia sclerotium* in Northeast China. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 102, p. 185-192, 2018.

MALVÁREZ, G., et al. Populations of *Sclerotinia sclerotium* from lettuce in California and peas and lentils in Washington. **Phytopathology**, 2007.

MAXWELL, D.P. AND LUMSDEN, R.D. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotium* in infected bean and in culture. **Phytopathology**, **60**, 1395–1398. 1970.

MAXWELL, J. J. et al. Quantitative trait loci linked to white mold resistance in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. 6, p. 2285-2294, Nov./Dec. 2007.

MCCAGHEY, Megan et al. Development and evaluation of *Glycine max* germplasm lines with quantitative resistance to *Sclerotinia sclerotium*. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1495, 2017.

MELO, L. C.; SANTOS, J. B. dos. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host-pathogen interaction. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 601-608, 1999.

MENTEN, J. O. et al. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. IN: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa: UFV, DFP, cap. 12, p. 333-374. 2005.

MERT-TÜRK, F. et al. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotium* from oilseed rape in the Canakkale Province of Turkey. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 3, p. 182-187, 2007.

MEYER, M.C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotium*) em soja, na safra 2015/2016: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: **Embrapa Soja**, 5 p, (Embrapa Soja. Circular Técnica, 122), 2016.

MIKLAS, P.N.; JOHNSON, W.C.; DELORME, R.; GEPTS, P. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. **Crop Science** 41:309-315, 2001.

MIKLAS, Phillip N. et al. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, n. 3, p. 525-543, 2013.

MIORINI, Thomas JJ et al. Variation in pathogen aggression and cultivar performance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and dry bean from Brazil and the US. **PeerJ Preprints**, v. 6, p. e26622v1, 2018.

MOELLERS, Tara C. et al. Main and epistatic loci studies in soybean for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance reveal multiple modes of resistance in multi-environments. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 3554, 2017.

PAULA JÚNIOR, T. J. et al. Mofo branco. In: PRIA, M.D.; SILVA, O.C. **Cultura do feijão: doenças e controle**. Ponta Grossa: Editora UEPG, cap. 6 e 7. 2010.

PEREIRA, R. et al. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. **Genet Mol Res**, v. 14, p. 5044-5053, 2015.

PELTIER, A. J.; BRADLEY, C. A.; CHILVERS, M. I.; MALVICK, D. K.; MUELLER, D. S.; WISE, K. A.; ESKER, P. D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2012.

PETZOLDT, R.; DICKSON, D. M. H. Straw test for white mold in beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 39, p. 142- 143, 1996.

RANJAN, Ashish et al. The pathogenic development of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean requires specific host NADPH oxidases. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 3, p. 700-714, 2018.

SEBASTIAN, Scott A. et al. **Genetic loci associated with *Sclerotinia* tolerance in soybean**. U.S. Patent n. 7,790,949, 7 set. 2010.

SHARMA, Pankaj et al. Genetic diversity studies based on morphological variability, pathogenicity and molecular phylogeny of the *Sclerotinia sclerotiorum* population from Indian mustard (*Brassica juncea*). **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

SILVA, P. H. et al. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetic and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9138-9151, 2014.

SILVA, K. B. et al. Adaptability and stability of soybean cultivars for grain yield and seed quality. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1-15, 2017.

SOUZA, T. P. **Procedimentos experimentais para a avaliação da reação feijoeiro ao mofo branco**. 2009. 25 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

STEADMAN, J.R. White mold- a serious yield-limiting disease of bean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 4, p. 346-350, 1983.

STEADMAN, J.R.; BOLAND, G. White mold. In: H.F. Schwartz, J.R. Steadman, R. Hall, and R.L. Forster, editors, Compendium of bean diseases. 2nd ed. **Am. Phytopath. Soc.**, St. Paul, MN. p. 44-46, 2005.

- TERÁN, Henry et al. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **ANNUAL REPORT-BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE**, v. 49, p. 115, 2006.
- TU, J. C. Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. *Physiol. Plant Pathol.* 26: 111–117, 1985.
- VALDO, S. C. D. et al. Differential interactions between *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* and common bean. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.
- VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. 1992.
- VIEIRA, Rogério Faria. Mofo branco no feijoeiro. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 17, n. 178, p. 54-63, 1994.
- VUONG, T. D.; DIERS, B. W.; HARTMAN, G. L.; Identification of QTL for resistance to sclerotinia stem rot in soybean plant introduction 194639. **Crop Science**, v. 48. 2008.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. Introduction to fungi 3 ed. New York, **Cambridge University Press**, 2007.
- WEI, Wei et al. Genome-wide association mapping of resistance to a Brazilian isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean genotypes mostly from Brazil. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 849, 2017.
- WILLBUR, J. F. et al. Comprehensive *Sclerotinia* stem rot screening of soybean germplasm requires multiple isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant disease**, v. 101, n. 2, p. 344-353, 2017.
- WRATHER, J. A. et al. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean-producing countries in 1998. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n. 2, p. 115-121, 2001.
- ZAMBIAZZI, E. V. et al. Estimates of genetics and phenotypics parameters for the yield and quality of soybean seeds. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 16, n. 3, 2017.
- ZHAO, X. et al. Loci and candidate gene identification for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps. **The Plant Journal**, v. 82, n. 2, p. 245-255, 2015.

CAPÍTULO 2 DIALLEL ANALYSIS FOR SOYBEAN RESISTANCE TO *Sclerotinia sclerotiorum*

ABSTRACT

This study evaluated the general and specific aggressiveness capacity of *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of sclerotinia stem rot, in soybean cultivars from the Active Germplasm Bank of the Department of Agriculture of the Federal University of Lavras. Four isolates were used: Mauá da Serra, Ingaí, Nazareno and UFLA 24. Twenty soybean cultivars were used, with ten relatively resistant and ten relatively susceptible to the pathogen. For their reaction to white mold, these 20 lines were inoculated with pathogen mycelium using the detached-leaf method. The plants were kept in a greenhouse until the V₂ stage, characterized by the first fully expanded trefoil. The isolates were grown in culture medium for five days. Each leaflet of the trefoil received an agar disk containing the mycelium. The experiment was conducted in a completely randomized design, and each leaflet was considered a replicate. After 72 hours, the leaflets were evaluated using a scoring scale ranging from 0 (no symptoms) to 5 (susceptible). Statistical analyses were performed using the diallel method (Griffing IV model), which provided information on the vertical and horizontal resistance of the cultivars, as well as the aggressiveness of the isolates. The cultivars BRS Baliza RR, M-SOY 8001, Emgopa 316 and M-SOY 8329 showed horizontal resistance; BRS Favorita RR, Emgopa 315, MG/BR 46 (Conquista), 7166RSF IPRO, BRS Silvânia RR and BRS Milena presented specific resistance to most isolates. The UFLA 24 and Ingaí isolates were the most effective at causing symptoms in the soybean cultivars.

Keywords: Sclerotinia stem rot; *Glycine max* (L.) Merrill; General and specific resistance capacity.

1 INTRODUCTION

White mold is a disease caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. This fungus is a necrotrophic ascomycete that infects more than 400 species of plants, including important crops such as cotton, bean, sunflower and soybean (BOLAND; HALL, 1994). In soybeans, the disease is also called stem rot and causes significant damage to grain production and quality. Under favorable conditions, such as high humidity and mild temperatures, production losses of up to 40% may occur (PELTIER et al., 2012; HENNEBERG et al., 2012; JACCOUD FILHO et al., 2014). The fungus produces a resistance structure called a sclerotium that is able to survive in the soil for more than five years (STEADMAN & BOLAND, 2005).

In Brazil, before 2004, the disease occurred sporadically in soybean crops and did not culminate in significant production losses. However, since the 2003/2004 harvest, the disease has been increasing in incidence in many parts of the Southeast, South and Central-West Regions of the country (SILVA et al., 2009). Close to 23% of the Brazilian soybean production area is estimated to be infested by the pathogen, totaling approximately 7.7 million hectares that require the adoption of integrated disease control measures (MEYER et al., 2016).

Disease control is conducted through agricultural practices such as no-till, the use of certified seeds and rotation with nonhost crops. However, under conditions favorable to pathogen development, such practices are insufficient. Fungicide use has low efficiency since the penetration is low and the distribution uneven. This pattern occurs because when the fungicide is applied, the plant canopy is already formed, as infection begins at the plant reproductive stage. In addition, the use of fungicides is a costly strategy for producers.

Therefore, the use of resistant cultivars is the best alternative for controlling stem rot. However, genetic resistance to *S. sclerotiorum* is complex and has low heritability, with only a few cultivars showing some degree of resistance (GARCIA et al., 2015; ZHAO et al., 2015; JULIATTI et al., 2014; KIM & DIERS, 2000). In addition, plants have escape mechanisms that make it difficult to evaluate the disease in the field, such as flowering date, height and architecture (CUNHA et al., 2010).

To date, no soybean cultivars resistant to stem rot are known. Although differences in susceptibility do exist among cultivars and some inoculation methods have been described, many are impractical and have inconsistent results (CHEN & WANG, 2005; HULLER et al., 2016). Despite variability in soybean reactions to *S. sclerotiorum*, little knowledge regarding the behavior of Brazilian cultivars exists.

According to Vanderplank (1963), resistance can be classified as vertical or horizontal, according to its efficacy against pathogen isolates. In addition, the type of resistance can be identified by the statistical significance of the cultivar x isolate interaction. This situation is observed when different isolates of a pathogen are inoculated in different cultivars. Under these

conditions, a highly significant cultivar x isolate interaction suggests that the reaction of each cultivar is specific to a specific isolate, indicating that the resistance is vertical. For nonsignificant interactions, the cultivars respond similarly to all isolates, and in these cases, the existence of horizontal resistance can be inferred.

Melo and Santos (1999) developed an efficient method that is able to provide information regarding the host's vertical and horizontal resistance and the aggressiveness of the pathogen isolates. This method has been used in several studies (SILVA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; VALDO et al., 2016; LEITE et al., 2017) but has not been investigated in the *S. sclerotiorum*-*Glycine max* pathosystem.

Therefore, the objectives of the present study were to evaluate the virulence of different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and determine the genetic resistance (vertical and horizontal) of soybean cultivars to this pathogen.

2 MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted at the Laboratory of Plant Resistance to Diseases in a greenhouse of the Department of Biology, Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras - UFLA). Twenty cultivars from the UFLA Soybean Germplasm Bank were used; these cultivars were previously classified as resistant and susceptible according to Garcia and Juliatti (2012). Ten cultivars with a relatively high level of resistance and ten relatively susceptible cultivars were used (Table 1). Four isolates of *S. sclerotiorum* were also studied: three collected in the South and Campo das Vertentes Mesoregions of the state of Minas Gerais (IG, NAZ and UFLA 24) and one from the Paraná state (MS), Brazil.

Table 1. Soybean cultivars with a relatively high resistance level and susceptibility to *S. sclerotiorum*

Cultivars ¹		Origen	Cultivars ²		Origen
1	Emgopa 316	Emater-GO	11	7166RSF IPRO	GDM
2	Emgopa 315	Agencia Rural	12	BRS 213	Embrapa
3	BRS Milena	Embrapa	13	NS 7338 IPRO	Nidera
4	BRSMG 790A	Embrapa	14	BRSMG Garantia	Embrapa
5	BRSMG 850GRR	Embrapa	15	MG/BR 46 (Conquista)	Embrapa
6	BRS Baliza RR	Embrapa	16	BRS Silvânia RR	Embrapa
7	BRS Favorita RR	Embrapa	17	M-SOY 8001	D&PL Brasil
8	BRSGO Luziânia	Embrapa	18	M-SOY 6101	D&PL Brasil
9	M-SOY 8000RR	D&PL Brasil	19	M-SOY 8329	D&PL Brasil
10	BRSMG 68 (Vencedora)	Embrapa	20	TMG123RR	TMG

¹ Resistant cultivars (1 a 10); ² Susceptible cultivars (11 a 20).

The cultivars were evaluated for resistance to *S. sclerotiorum* using the detached-leaf method. For this purpose, the plants were grown in greenhouse in 500-ml pots containing substrate mixed with soil in a 2:1 ratio (two parts substrate to one part soil containing clay and sand). The trefoil of plants in stage V2 (first fully expanded trefoil) was collected and taken to the laboratory to set up the experiment. The trefoil was placed in an acrylic germination box containing a sheet of paper towel moistened with sterile distilled water. Prior to inoculation, the trefoil was sprayed with water and then received a 6-mm, 5-day-old mycelial disc of each isolate. The germination boxes containing the trefoils were incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12-hour photoperiod for 72 hours.

To obtain the mycelium, first the sclerotia were disinfected with 50% ethanol and 0.5% sodium hypochlorite diluted in sterile distilled water for 30 and 60 seconds, respectively. Subsequently, the sclerotia were rinsed in sterile distilled water and transferred to Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium. The Petri dishes were incubated at $22 \pm 3^\circ\text{C}$ under a 12-hour photoperiod for myceliogenic germination until the formation of sclerotia.

The evaluations were performed 72 hours after inoculation, based on a diagrammatic scale adapted of Garcia (2008). The cultivars were classified as 1 - immune (absence of disease), 2 - resistant (> 0 to 11%), 3 - moderately resistant (12 to 24%), 4 - less resistant (25 to 50%) and 5 - susceptible ($S > 50\%$).

The experiment was conducted in a completely randomized design with a factorial arrangement (20 plants and four isolates), and each leaflet of the trefoil constituted a replicate. The data were tested using analysis of variance and diallel analysis to determine the general and specific virulence capacity, following Melo and Santos (1999).

For the diallel analysis, a modified version of the Griffing IV method (1956) was used, in a partial diallel arrangement proposed by Geraldi and Miranda Filho (1998). One group was formed by the isolates (group I) and another by the cultivars (group II). In the isolate x cultivar interaction, the general combining ability of group I corresponds to the general reaction capacity (GRC), representing the horizontal resistance of the pathogen, which is dependent on the average performance of the cultivar with the different isolates. The general combining ability of group II corresponds to the general aggressiveness capacity (GAC) of the pathogen, which represents the average pathogenicity of each isolate in inoculations with all the cultivars. The specific interaction capacity (SIC) indicates the interaction between the components of the two groups, i.e., the pathogenicity of the pathogen and the vertical resistance of the cultivar.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The analysis of variance showed significant differences for the isolate, cultivar and isolate x cultivar sources of variation. The significant interaction indicates that the response of the cultivars to the different isolates was dissimilar. Thus, the isolates vary in their capacity to cause symptoms and in their response to these isolates; i.e., the cultivars have different resistance alleles. These results not only reinforce the need to conduct several experiments to obtain suitably accurate estimates even when inoculations are conducted under controlled conditions but also show that the experiment was conducted with good experimental accuracy, indicated by the magnitude of the coefficient of variation (CV), which was 17.14%.

The diallel analysis revealed significant differences for all the sources of variation, corroborating the results from the analysis of variance. The significance of GAC and GRC indicates a difference in aggressiveness among the pathogen isolates and the presence of variability in horizontal resistance among the cultivars. However, a significant SIC value also indicates the existence of vertical resistance (Table 2). Vertical resistance alleles are the most efficient in reducing the losses caused by stem rot in soybean. The high pathogenic variability observed in *S. sclerotiorum* (VITERI et al., 2015; WILLBUR et al., 2017; MIORINI et al., 2018) makes this type of resistance less durable. Thus, a need exists to develop cultivars with more stable resistance to this pathogen.

The occurrence of both types of resistance has been reported for *S. sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris* (SILVA et al., 2014; LEITE et al., 2017). In those studies, SIC was significant, indicating the possible participation of vertical resistance in controlling the character. However, the SIC estimates were 15 to 30 times lower than the GRC estimate. This small SIC estimate was due to a weak cultivar x isolate interaction. Therefore, these results cannot be compared to those of the present study, where such a small SIC compared to GRC magnitude was not observed (Table 2).

Table 2. Summary of the diallel analysis for the detached-leaf method data.

SV	DF	MS	F	Probability (%)
Inoculations	79	4.7063	15.6876	.** ¹
G.R.C. G-I ²	3	19.4819	64.3998	.**
G.A.C. G-II ³	19	4.0989	13.6630	.**
S.I.C. I x II ⁴	57	4.1310	13.7702	.**
Error	160			

¹ Significant at 1% probability; ² General reaction capacity of group I (isolates); ³ General aggressiveness capacity of group II (cultivars); ⁴ Specific interaction capacity between isolates and cultivars. Source: Author (2019).

The lower scores in the severity disease assessment indicated a higher level of resistance; therefore, via the GRC estimates, negative values specify the cultivars that obtained the highest level of horizontal resistance (Table 3). The BRS Baliza RR, M-SOY 8001, Emgopa 316 and M-SOY 8329 cultivars presented higher horizontal resistance levels than those of the other cultivars. Obtaining this type of resistance is a preferable strategy in breeding programs because to overcome cultivar resistance, a pathogen must possess all the virulence genes corresponding to the resistance genes of the plant.

A similar result was observed, in part, by other studies (GARCIA & JULIATTI, 2012; GARCIA et al., 2015) in which the M-SOY cultivars were considered susceptible to *S. sclerotiorum*. This difference in the resistance pattern may be due to the method that was used to inoculate the cultivars. The above-cited authors inoculated the plant *in vivo* in a greenhouse, not just the detached trefoil, as in the present study. In addition, the isolate used was also different. In the present study, the estimated GRC is derived from the interaction of one cultivar inoculated with four different isolates. This type of analysis was not performed in the cited studies, which explains the divergence in the results obtained. A nonsignificant GRC indicates the noninfluence in the cultivar of horizontal resistance against the inoculated isolates. By contrast, the cultivars that showed a significant and positive GRC were susceptible to the tested isolates.

In all, 80 combinations between cultivars and isolates were obtained for SIC, and these combinations indicate the virulence of the pathogen and the vertical resistance of the cultivar. Of these, 51 combinations were significant and represent specific interactions between the isolate and the soybean cultivar. These estimates included positive and negative values, which indicate the presence or absence of resistance to an isolate, respectively. Among the significant estimates, 26 were negative. Negative values indicate the presence of a specific resistance of a given genotype. The combinations that presented the lowest SIC values were BRS Favorita RR x MS, Emgopa 315 x UFLA 24, MG/BR 46 (Conquista) x UFLA 24, 7166RSF IPRO x MS, BRS Silvânia RR x NAZ, M-SOY 8001 x IG and BRS Milena x UFLA 24. These cultivars exhibited the highest specific resistance to these isolates (Table 3).

The GAC estimate indicates the aggressiveness of the isolates, so isolates with a higher positive estimated GAC are characterized by a greater ability to cause symptoms in the different soybean cultivars. Thus, the isolate from Ingaí and the UFLA 24 isolate, which did not differ significantly from each other by the t test, were the most aggressive. This result indicates that these isolates should be preferred for evaluating the level of resistance carried by soybean genotypes. The UFLA 24 isolate was identified as one of the most aggressive isolates in a study conducted by Abreu and Souza (2015) on bean. The isolate from Ingaí was collected in soybean production fields that have been cultivated for several years. The isolate from Nazareno, despite being the least aggressive, was highly pathogenic to the BRS Favorita RR and MG/BR 46 (Conquista) cultivars (Table 3).

Table 3. Estimated general reaction capacity (GRC) of the cultivars with the different isolates, general aggressiveness capacity (GAC) of the isolates in inoculations with all the cultivars and specific interaction capacity between the cultivars and isolates. The isolates were Mauá da Serra (MS), Ingaí (IG), Nazareno (NAZ) and UFLA 24. The data refer to the detached-leaf method.

CULT/ISOL	MS	IG	NAZ	UFLA 24	GRC
Emgopa 316	.7625*	-.7042*	.6792*	-.7375*	-.6125**
Emgopa 315	-.8208*	2.0458**	.7625*	-1.9875**	-.0292 ^{NS}
BRS Milena	.5958*	.4625*	.5125*	-1.5708**	-.4458**
BRSMG 790A	.4292 ^{NS}	.2958 ^{NS}	.0125 ^{NS}	-.7375*	-.2792*
BRSMG 850GRR	1.0958**	-.0375 ^{NS}	-.3208 ^{NS}	-.7375*	.0542 ^{NS}
BRS Baliza RR	.84583*	-.2875 ^{NS}	-.2375 ^{NS}	-.3208 ^{NS}	-.6958**
BRS Favorita RR	-2.4041**	.4625*	1.5125**	.4292 ^{NS}	1.5542**
BRSGO Luziânia	-.57084	1.6292**	-.6542*	-.4042 ^{NS}	.3875**
M-SOY 8000RR	-.90417*	-1.0375*	.0125 ^{NS}	1.9292**	.0542 ^{NS}
BRSMG 68 Vencedora)	.5958*	-.5375*	.1792 ^{NS}	-.2375 ^{NS}	-.4458**
7166RSF IPRO	-1.7375**	1.1292**	.5125*	.0958 ^{NS}	.8875**
BRS 213	.4292 ^{NS}	-.7042*	-.9875*	1.2625**	.7208**
NS 7338 IPRO	-.3208 ^{NS}	.5458*	-.4042 ^{NS}	.1792 ^{NS}	.4708**
BRSMG Garantia	1.4292**	-.0375 ^{NS}	-.3208 ^{NS}	-1.0708**	.0542 ^{NS}
MG/BR 46 (Conquista)	.5125*	.3792 ^{NS}	1.0958**	-1.9875**	-.3625**
BRS Silvânia RR	.0125 ^{NS}	-.1208 ^{NS}	-1.7375**	1.8458**	.1375 ^{NS}
M-SOY 8001	-.1542 ^{NS}	-1.6208**	-.9042*	2.6792**	-.6958**
M-SOY 6101	.3458 ^{NS}	-.7875*	.2625 ^{NS}	.1792 ^{NS}	-.1958*
M-SOY 8329	.7625*	-.3708 ^{NS}	.3458 ^{NS}	-.7375*	-.6125**
TMG123RR	-.9042*	-.7042*	-.3208 ^{NS}	1.9292**	.0542 ^{NS}
GAC	-.6792**	.4542 ^a	-.2625**	.4875 ^a	

** and * significantly different from zero to 1 and 5% of probability, respectively, by Student's t-test; a: values do not differ by Student t test. Source: Author (2019).

The four cultivars with the highest horizontal resistance were analyzed for their specific resistance to the four isolates. The BRS Baliza RR and M-SOY 8329 cultivars exhibited greater stability with regard to the reactions, while Emgopa SOY 316 and M-8001 were less stable and exhibited greater variation regarding the aggressiveness of the isolates (Figure 1).

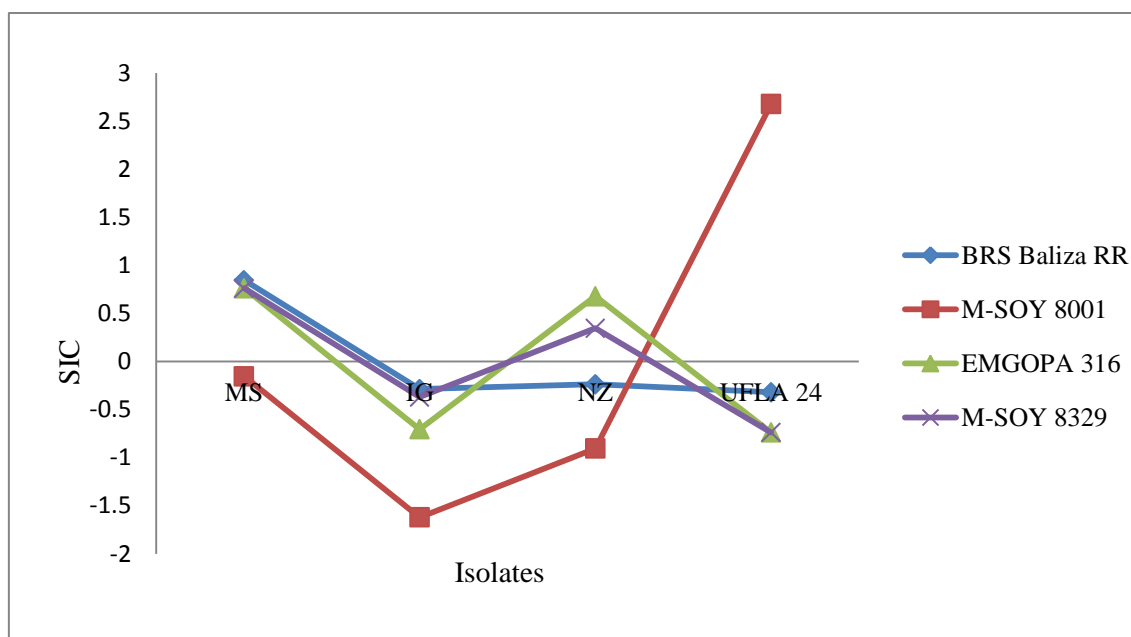


Figure 1. Specific interaction capacity (SIC) of four soybean cultivars with the highest estimated general reaction capacity (GRC), inoculated with four *S. sclerotiorum* isolates. Source: Author (2019).

4 CONCLUSION

The present study demonstrates the existence of a differential interaction among soybean cultivars and *S. sclerotiorum* isolates. For the first time, the partial diallel model was described for this pathosystem. The BRS Baliza RR, M-SOY 8001, Emgopa 316 and M-SOY 8329 cultivars showed horizontal resistance; and BRS Favorita RR, Emgopa 315, MG/BR 46 (Conquista), 7166RSF IPRO, BRS Silvânia RR and BRS Milena presented specific resistance to disease caused by most isolates. The UFLA 24 and Ingaí isolates were the most effective in causing symptoms in the cultivars.

REFERENCES

- ABREU, M.J., SOUZA, E.A. Investigation of *Sclerotinia sclerotiorum* strains variability in Brazil. **Genet. Mol. Res.** 14(2):6879-6896, 2015
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**. v.16. p. 93-108. 1994.
- CUNHA, W. G. et al. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 654-660, 2010.
- CHEN, Y.; WANG, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.89, p.1268-1272, 2005.
- GARCIA, R. A. et al. Notas Científicas Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao mofo-branco. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 50, n. 8, p. 726-729, 2015.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, Fernando C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology, Brasília, DF**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.
- GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C. Reação de genótipos de soja ao mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Tropical Plant Pathology** 33: 213 2008.
- GERALDI, I.O.; MIRANDA-FILHO, J.B. Adapted models for the analysis of combining ability of varieties in partial diallel crosses. **Rev. Bras. Genet.** 11: 431-440, 1988.
- GRIFFING, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. **Australian journal of biological sciences**, v. 9, n. 4, p. 463-493, 1956.
- HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD FILHO, D. S.; PANOBIANCO, M. Efficiency of methods to detect *Sclerotinia sclerotiorum* in commercial soybean seed lots. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 763-768, 2012.
- HULLER, G. de C. et al. Different methods of assessing susceptibility of soybean genotypes to white mold= Diferentes métodos de avaliação da suscetibilidade de genótipos de soja ao mofo branco. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, 2016.
- JACCOUD FILHO D. S. et al. Strategies to management and control of the white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in soybean crops. **Tropical Plant Pathology**, v. 39 (Supplement), p. 15-17, 2014.
- JULIATTI, F. C. et al. Métodos de inoculação e avaliação da resistência de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*= Inoculation methods to *Sclerotinia sclerotiorum* reaction resistance on soybean. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, 2014.
- KIM, H.S.; DIERS, B.W. Inheritance of partial resistance to sclerotinia stem rot in soybean. **Crop Science** 40, 55–61, 2000.
- LEITE, Monik Evelin et al. Reaction of common bean lines derived from recurrent selection for white mold resistance and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotirum* isolates. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 5, 2017.

- MELO, L. C.; SANTOS, J. B. dos. Identification of resistant genotypes considering polygenic systems in host-pathogen interaction. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 601-608, 1999.
- MEYER, M.C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2015/2016: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 5 p, (Embrapa Soja. Circular Técnica, 122), 2016.
- MIORINI, Thomas JJ et al. Variation in pathogen aggression and cultivar performance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and dry bean from Brazil and the US. **PeerJ Preprints**, v. 6, p. e26622v1, 2018.
- PELTIER, A. J.; BRADLEY, C. A.; CHILVERS, M. I.; MALVICK, D. K.; MUELLER, D. S.; WISE, K. A.; ESKER, P. D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2012.
- PEREIRA, R. et al. Aggressiveness of *Pseudocercospora griseola* strains in common bean genotypes and implications for genetic improvement. **Genet Mol Res**, v. 14, p. 5044-5053, 2015.
- SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. Manejo do mofo-branco da soja. In: MANEJO fitossanitário de cultivos agroenergéticos. Lavras: **Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, p.205-214, 2009.
- SILVA, P. H. et al. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetic and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9138-9151, 2014.
- STEADMAN, J.R.; BOLAND, G. White mold. In: H.F. Schwartz, J.R. Steadman, R. Hall, and R.L. Forster, editors, Compendium of bean diseases. 2nd ed. **Am. Phytopath. Soc.**, St. Paul, MN. p. 44-46, 2005.
- VALDO, S. C. D. et al. Differential interactions between *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* and common bean. **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.
- VITERI, Diego M. et al. Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. **Euphytica**, v. 204, n. 2, p. 457-472, 2015.
- WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. Introduction to fungi 3 ed. New York, Cambridge University Press, 2007.
- WILLBUR, J. F. et al. Comprehensive *Sclerotinia* stem rot screening of soybean germplasm requires multiple isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant disease**, v. 101, n. 2, p. 344-353, 2017.
- ZHAO, Xue et al. Loci and candidate gene identification for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps. **The Plant Journal**, v. 82, n. 2, p. 245-255, 2015.

**CAPÍTULO 3 RESISTANCE OF SOYBEAN CULTIVARS TO *Sclerotinia sclerotiorum*
IN DIFFERENT PHENOLOGICAL STAGES AND DISEASE ASSESSMENT METHOD**

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the most appropriate phenological stage in the soybean crop for inoculation of *Sclerotinia sclerotiorum* and to compare different inoculation methods for the identification of soybean cultivars resistant to the pathogen. Thus, 20 cultivars of the UFLA Soybean Germplasm Bank were inoculated with the UFLA 24 isolate in four different experiments. There were three experiments using the straw test method: V3 stage inoculation, evaluation by lesion length three days after inoculation; R1 stage inoculation, evaluation by lesion length seven days after inoculation; R1 stage inoculation, evaluation by scale of notes seven days after inoculation. For these three experiments we have used the completely randomized design with five replicates. The fourth experiment was used the detached leaf method, inoculation at the V2 stage, evaluation by scale of notes, 72 hours after inoculation. The design used was completely randomized with three replicates. From the obtained data were performed the analysis of variance and the means of the four experiments were compared. A coincidence index and the Spearman correlation were used for the comparison of the classification of the cultivars against the four experiments. It was verified that in relation to the means for the four experiments, the cultivar EMPOPA 315 was classified as more resistant and the cultivar TGM123RR was the most susceptible. There was a mean and significant correlation between the detached leaf test method and the straw test method at R1, regardless of the evaluation strategy (lesion length or note scale) and also between the experiments inoculated at R1. The coincidence index indicated that when the length of the lesion is adopted as an evaluation strategy, both inoculation in stage V3 and in R1 gives the same reaction to the pathogen, in the case of cultivars considered resistant.

Keywords: Sclerotinia Stem Rot; *Glycine max* (L) Merrill; Straw test; Detached leaf; Genetic resistance.

1 INTRODUCTION

White mold is a disease caused by the ascomycete fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, which can devastate several crops, including soybean. This disease is also called Sclerotinia stem rot and causes significant damage to the production and quality of the grains. Under favorable conditions, such as high humidity and mild temperatures, production losses can reach up to 70%. Approximately 23% of the Brazilian soybean production area is infested by the pathogen, with approximately 7.7 million hectares requiring the adoption of integrated disease control measures (MEYER et al., 2016).

The pathogen produces resistance structures called sclerotia, which can survive in the soil for more than 5 years (STEADMAN; BOLAND, 2005).

However, the disease in soybean fields is caused by ascospores that first infect delicate parts of the plant, such as the flower petal. Typical symptoms of diseased plants include necrotic leaves, bleached lesions on the stems and pods, fluffy mycelia, and black sclerotia on the leaves, stems, and pods (CHEN and WANG, 2005).

Conditions such as moist soil and flowering stage favor the development of the disease (GRAU, 1988). Irrigation, narrow space between plants, early flowering, and dense vegetation contribute to the development and dissemination of the pathogen (BOLAND and HALL, 1987; KIM and DIERS, 2000). The control of the disease by chemical methods has been difficult, since it requires several preventive and systemic treatments (MUELLER et al., 2004). In addition, chemical control has the additional risk of increasing production costs.

Nevertheless, progress in the development of resistant cultivars is very slow or nonexistent because of the quantitative nature of resistance (KIM and DIERS, 2000; ARAHANA et al., 2001; PELTIER et al. 2012) and the uncertainty in achieving the pathogen pressure necessary for field evaluations of the genotypes being tested. Thus, identifying a new source of resistance to white mold requires reliable techniques for inoculation and evaluation under controlled conditions.

Several methods have been developed to evaluate the resistance of soybean genotypes to *S. sclerotiorum* in the laboratory or greenhouse. Among the available methods, the most common are inoculation techniques that use a PDA (Potato-Dextrose-Agar) disk with mycelium in different plant tissues. Different tissues can be inoculated, including detached leaves (WEGULO et al., 1998; KULL et al., 2003; VUONG et al., 2004; HULLER et al., 2016), stems with no damage (GARCIA and JULIATTI, 2012; HULLER et al., 2016), and damaged stems (via the *straw test*) (TERÁN et al., 2006; CASTRO et al., 2016; MCCAGHEY et al., 2017).

To emphasize the importance of evaluations under controlled conditions, McCaghey et al. (2017) have developed white mold-resistant soybean strains for use as cultivars or as a source of resistance in breeding programs. For this, the seven, elite, developed strains were

reevaluated in a greenhouse using the straw test method with multiple pathogen isolates to test the durability of the physiological resistance of the genotypes.

Although several evaluation methods exist for soybean resistance to *S. sclerotiorum*, searching for alternatives that best represent the response of the lines to the pathogen is important. In addition to being efficient, these methods should be quick, easy-to-use, and appropriate for use in large-scale breeding programs.

Therefore, the aim of this study was to determine the most appropriate phenological stage in the soybean crop for inoculation of *Sclerotinia sclerotiorum* and to compare different inoculation methods for the identification of soybean cultivars resistant to the pathogen.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study site

The experiments were carried out in the Laboratory of Plant Disease Resistance and greenhouse of the Biology Department of the Federal University of Lavras (UFLA), state of Minas Gerais, Brazil.

2.2 Genetic treatments

Twenty cultivars of the UFLA Soybean Germplasm Bank, previously classified as resistant and susceptible according to Garcia and Juliatti (2012), were used. Ten cultivars with the highest level of resistance and ten susceptible cultivars were used (Table 1).

The plants were grown under greenhouse conditions in pots containing soil mixed with substrate at a 2:1 ratio (two parts of substrate to one part of material containing clay and sand).

Table 1. Soybean cultivars with a relatively high resistance level and susceptibility to *S. sclerotiorum*

Cultivars ¹		Origen	Cultivars ²		Origen
1	Emgopa 316	Emater-GO	11	7166RSF IPRO	GDM
2	Emgopa 315	Agencia Rural	12	BRS 213	Embrapa
3	BRS Milena	Embrapa	13	NS 7338 IPRO	Nidera
4	BRSMG 790A	Embrapa	14	BRSMG Garantia	Embrapa
5	BRSMG 850GRR	Embrapa	15	MG/BR 46 (Conquista)	Embrapa
6	BRS Baliza RR	Embrapa	16	BRS Silvânia RR	Embrapa
7	BRS Favorita RR	Embrapa	17	M-SOY 8001	D&PL Brasil
8	BRSGO Luziânia	Embrapa	18	M-SOY 6101	D&PL Brasil
9	M-SOY 8000RR	D&PL Brasil	19	M-SOY 8329	D&PL Brasil
10	BRSMG 68 (Vencedora)	Embrapa	20	TMG123RR	TMG

¹ Resistant cultivars (1 a 10); ² Susceptible cultivars (11 a 20).

2.3 Experimental design

Four experiments were carried out (one for each proposed inoculation and evaluation method) with 20 soybean cultivars grown in a greenhouse. The experiments were conducted in a completely randomized design, with five replicates for the straw test method and three replicates for the detached leaf method.

2.4 Isolate

The *S. sclerotiorum* isolate used for the four experiments was the UFLA 24, which originated from the fungal culture collection of the Laboratory of Plant Disease Resistance. To obtain the mycelium, the sclerotia were disinfected in 50% alcohol and 0.5% sodium hypochlorite diluted in sterile distilled water for 30 and 60 seconds, respectively. Subsequently, the sclerotia were rinsed in sterile distilled water and transferred to Petri dishes containing PDA medium. The Petri dishes were incubated at $22 \pm 3^\circ\text{C}$, with a photoperiod of 12 hours for myceliogenic germination until the formation of sclerotia. Inoculation was carried out using PDA disks of approximately 6 mm diameter, containing mycelia of the fungus at 5 days of age.

2.5 Straw test method

For this method, three experiments were carried out with inoculations at different phenological stages and with different evaluation strategies. In the first experiment, inoculation occurred in V3 (second trifoliolate leaf fully expanded) and was evaluated 3 days later by the ratio of the lesion length in the stem to the total length of the stem (measured with a graduated ruler). In the second experiment, inoculation occurred in R1 (beginning of flowering) and was

evaluated 7 days after inoculation, in the same way as the first experiment. In the third experiment, inoculation occurred at R1 (beginning of flowering) and was evaluated 7 days after inoculation, with a scale used for scoring as follows: 1 - plants with no lesions, 2 - lesion just under the straw, 3 - lesion beyond the straw, but does not extend to the first node, 4 - lesion extending to the first node from the straw, 5 - lesion between the first and second node from the straw, 6 - lesion in the second node from the straw, 7 - lesion between the second and third node from the straw, 8 - lesion at the third node from the straw, and 9 - lesion beyond the third node from the straw (AUCLAIR et al., 2004).

Five plants of each cultivar were inoculated until the preestablished phenological stage for each experiment. The apex of the main stem of the plant was removed, and a mycelial disk was placed at the site with the aid of a micropipette tip. The inoculated plants were kept in the greenhouse until the evaluations.

2.6 Detached leaf method

The fourth experiment was conducted using trifoliolate leaves from the V2 plant stage (first trifoliolate leaf fully expanded). These leaves were collected and taken to the laboratory for setting up the experiment. The trifoliolate leaves were placed in germination boxes containing paper towels moistened in sterile distilled water. Prior to inoculation, the trifoliolate leaf was sprayed with water and thereafter received a 6-mm, 5-day-old, mycelial disc. The germination boxes containing the trifoliolate leaves were incubated at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, with a photoperiod of 12 hours for 72 hours.

The evaluations were performed 72 hours after inoculation, based on a diagrammatic scale adapted of Garcia (2008). The cultivars were classified as 1 - immune (absence of disease), 2 - resistant (> 0 to 11%), 3 - moderately resistant (12 to 24%), 4 - less resistant (25 to 50%) and 5 - susceptible ($S > 50\%$).

2.7 Statistical analysis

The Scott-Knott test was performed for the analysis of variance to compare the means for the response of the soybean cultivars in the four experiments using R software. To allow a comparison between the results obtained in the different experiments, two approaches were adopted. First, a coincidence index, proposed by Hamblin and Zimmermann (1986), with 25% selection intensity, was calculated to test the coincidence of the resistant cultivars by comparing the four experiments, according to the following equation:

$$CI = \frac{A - C}{M - C} \times 100$$

where

A: number of selected superior cultivars, common to the different experiments;

C: number of randomly coincident cultivars; and

M: total number of progenies selected.

Second, the cultivars were ranked according to the reaction to the pathogen in each experiment. From these results, the Spearman correlation was estimated to measure the agreement between the classification of cultivars in the different experiments. Finally, the cultivars were classified according to the average ranking in the four experiments.

3 RESULTS

The cultivars exhibited different responses when exposed to different inoculation methods and evaluations (Table 2), demonstrating that all were efficient, directly or indirectly, in differentiating soybean cultivars in terms of susceptibility to *S. sclerotiorum*.

Regarding the experiment with detached leaves, some cultivars were extremely susceptible, such as BRS FAVORITA RR, BRS SILVÂNIA RR, and TMG123RR, whereas others showed some degree of resistance (EMGOPA 315 MG/BR 46 (CONQUITA) and BRS MILENA). For these same cultivars, the same resistance patterns were not observed in the other experiments (Table 2).

Table 2 - Results of inoculations of soybean cultivars on the *S. sclerotiorum* reaction. Inoculation in V3 and evaluation by lesion length (V3LL); inoculation in R1 and evaluation by lesion length (R1LL); inoculation in R1 evaluation by score scale (R1SC); and detached leaf (DL).

Cultivars	Methods assessed (original data collected)			
	V3LL ^{1*}	R1LL ^{1*}	R1SC ^{2*}	DL ^{2*}
Emgopa 316	31.06 b	9.21 a	1.40 a	2.33 b
Emgopa 315	10.71 a	7.20 a	1.00 a	1.67 a
BRS Milena	11.87 a	11.12 a	1.40 a	1.67 a
BRSMG 790A	13.47 a	6.96 a	1.80 a	2.67 b
BRSMG 850GRR	17.47 a	20.55 b	2.60 b	3.00 b
BRS Baliza RR	22.06 b	27.28 b	3.20 b	2.67 b
BRS Favorita RR	14.48 a	17.94 b	1.80 a	5.67 d
BRSGO Luziânia	12.01 a	21.33 b	1.80 a	3.67 c
M-SOY 8000RR	32.65 b	14.56 b	1.40 a	5.67 d
BRSMG 68 (Vencedora)	23.84 b	15.47 b	2.20 a	3.00 b
7166RSF IPRO	13.89 a	15.87 b	2.00 a	4.67 c
BRS 213	12.96 a	8.10 a	1.80 a	5.67 d
NS 7338 IPRO	20.38 b	14.30 b	2.20 a	4.33 c
BRSMG Garantia	24.64 b	3.16 a	1.60 a	2.67 b
MG/BR 46 (Conquista)	25.14 b	4.14 a	1.60 a	1.33 a
BRS Silvânia RR	20.64 b	9.90 a	2.00 a	5.67 d
M-SOY 8001	21.39 b	15.86 b	2.80 b	5.67 d
M-SOY 6101	24.75 b	13.93 b	2.20 a	3.67 c
M-SOY 8329	18.46 a	10.09 a	1.80 a	2.33 b
TMG123RR	21.22 b	26.68 b	3.00 b	5.67 d
MEANS	19.65	13.68	1.98	3.68

¹ - Data analyzed by means of lesion length (%); ² - Data analyzed by scale of notes; * Averages followed by the same letter belong to the same group by the Scott-Knott test at 5% probability. Source: Author (2019).

The rank of each cultivar varied according to each experiment (Table 3). This ranking also allowed inferences to be drawn about the consistency of the reaction of the different cultivars in the experiments. For cultivar EMGOPA 315, a more consistent response pattern to the different experiments was observed. This cultivar was classified as the most resistant by two experiments: inoculation in V3 (V3LL) and inoculation in R1 with evaluation by score scale (R1SC). This result also indicates that for this cultivar, both inoculation in stage V3 and in stage R1 gives the same reaction to the pathogen. According to the four experimental means, the

cultivar EMPOPA 315 was classified as the most resistant, whereas cultivar TGM123RR was considered the most susceptible (Table 3).

Table 3 – Ranking of the cultivars according to the straw test methods (inoculation in V3 and evaluation by lesion length - V3LL, inoculation in R1 and evaluation by lesion length - R1LL, inoculation in R1 and evaluation by score scale - R1SC) and detached leaf (DL). Ranks range from one (most resistant) to 20 (most susceptible).

CULTIVARS	V3LL	R1LL	R1SC	DL	RANKS RANGE
Empopa 315	1	4	1	2	2
BRS Milena	2	9	3	3	4
BRSMG 790A	5	3	7	6	5
MG/BR 46 (Conquista)	18	2	6	1	7
BRSMG Garantia	16	1	5	8	8
Emgopa 316	19	6	2	4	8
M-SOY 8329	9	8	11	5	8
BRS 213	4	5	10	17	9
BRS GO Luziânia	3	18	9	11	10
BRS Favorita RR	7	16	8	15	12
7166RSF IPRO	6	15	12	14	12
NS 7338 IPRO	10	11	15	13	12
BRS Silvânia RR	11	7	13	18	12
850 GRR	8	17	17	9	13
M-SOY 8000RR	20	12	4	16	13
BRSMG 68 (Vencedora)	15	13	14	10	13
M-SOY 6101	17	10	16	12	14
BRS Baliza RR	14	20	20	7	15
M-SOY 8001	13	14	18	19	16
TMG123RR	12	19	19	20	18

Source: Author (2019).

The Spearman correlations were obtained from the ranking of the cultivars to measure the agreement between the results. A moderate and significant correlation was observed between the detached leaf method and the straw test method at R1, regardless of the evaluation strategy (lesion length or score scale) and between the experiments inoculated at R1. Among the other experiments, no correlation was observed, confirming that these methods varied greatly in the severity of the symptoms caused by the pathogen to the cultivars (Table 4).

The coincidence index was calculated to determine the percentage of cultivars that would be selected as resistant, with each experiment compared pairwise. The coincidence between the experiments was moderate, which corroborates the estimated correlations. The coincidence index also indicates that, when the lesion length is adopted as evaluation strategy, both inoculation in stage V3 and in R1 give the same reaction to the pathogen in the case of cultivars considered resistant.

Table 4 - Spearman correlation coefficient for classification of the cultivars obtained according to each experiment. Straw test (inoculation in V3 and evaluation by lesion length - V3LL; inoculation in R1 and evaluation by lesion length - R1LL; inoculation in R1 and evaluation by score scale - R1SC) and detached leaf (DL) - values above the main diagonal. Coincidence index (%) between experiments for classification of resistant cultivars - values below the main diagonal.

	DL	V3LL	R1LL	R1SC
DL	-	0.07 ^{NS}	0.46*	0.53**
V3LL	40	-	-0.05 ^{NS}	0.13 ^{NS}
R1LL	40	60	-	0.65**
R1SC	60	40	40	-

* significant at 5%; ** significant at 1%, NS not significant. Source: Author (2019).

4 DISCUSSION

To circumvent the resistance conferred by the escape mechanisms of soybean to *S. sclerotiorum*, researchers have subjected the genotypes to inoculation methods that avoid the selection of plants that exclusively have the ability to escape the pathogen pressure (ARAHANA et al., 2001; GUO et al. 2008; VUONG et al. 2008). However, only a few partially resistant lines were identified. The inoculation methods that use mycelial disks include cut stem (VUONG et al., 2004, 2008), detached leaf (ARFAOUI et al., 2016, 2018; GODOY et al., 2010; HULLER et al., 2016), and straw test (CASTRO et al., 2016; MCCAGHEY et al., 2017; WILLBUR et al., 2017).

Despite the large number of studies on soybean inoculation techniques, few (WEGULO et al., 1998; HULLER et al., 2016) have focused on the comparison between these methods to determine which is the ideal stage for inoculation and which method would be able to better discriminate the reaction of plants to the pathogen.

The results of this study suggest that all methods are capable of promoting the reaction of soybean cultivars to *S. sclerotiorum*. However, even when the same two inoculation and evaluation methods (inoculation by straw test and evaluation by lesion length) are compared, but at different phenological stages, the responses of the cultivars to the pathogen varied widely. When only the overall mean lesion length was compared for these two experiments, inoculation at V3 caused more symptoms, perhaps because plant defenses, such as plant membrane thickness, waxes, translocation distance and xylem translocation rate, were not fully developed at this stage (AUGUSTO and BRENNEMAN, 2012).

Under field conditions, the colonization of plants by the mycelium of the fungus occurs at the beginning of flowering. Therefore, the plant becomes more susceptible at the beginning of stage R1 because the flowers provide the *S. sclerotiorum* ascospores an exogenous source of

energy to germinate. Additionally, at this stage, the microclimate is more favorable to the pathogen because of the higher leaf area index in the post flowering stage. In addition, greater leaf cover during canopy closure allows diseased plants to come into contact with healthy plants, which increases the disease outbreak and/or its radial spread (GARCIA and JULIATTI, 2012). Some studies have identified this stage as the most suitable for inoculations under controlled environments because it reproduces the natural conditions of infection (PELTIER et al., 2009; JULIATTI et al., 2013; HUZAR-NOVAKOWISKI and DORRANCE, 2018). However, other studies claim that the V3 stage is more appropriate because it provides results faster (CASTRO et al., 2016; WILLBUR et al., 2017). Thus, for recurrent selection programs, it would be possible to inoculate, evaluate and recombine the selected genotypes in a single crop.

The reasons for variation in the classification of cultivars according to the different methods of inoculation and evaluation for resistance to *S. sclerotiorum* under controlled environment may be due, in part, to differences in the defense mechanisms among cultivars. Some cultivars may vary in terms of defense strategies, depending on the conditions or the evaluation method employed (WEGULO et al. 1998). In this context, cultivar EMGOPA 315 showed the most consistent resistance pattern when the results of the different experiments were compared. This cultivar has already undergone different evaluations in other studies. Garcia and Juliatti (2012) identified EMGOPA 315 as resistant when subjected to different methods of inoculation, phenological stages, and time of exposure of the inoculum in the plant. For Garcia et al. (2015), the same cultivar was classified as moderately resistant in inoculation with the straw test method and by the mycelial disk placed on the leaflet.

The Spearman correlation results indicate, once again, the great variation between the different experiments. Even so, multiple inoculation and evaluation methods are recommended to successfully capture the resistance mechanisms of soybean genotypes in breeding programs (HUZAR-NOVAKOWISKI and DORRANCE, 2018).

5 CONCLUSION

This work indicates that all methods of inoculation and evaluation were efficient in causing symptoms in soybean cultivars. However, inoculating at the R1 stage ensures greater similarity to the field conditions, whereas inoculating at V3 can accelerate the stages of the breeding program.

REFERENCES

- ARAHANA, V. S.; GRAEF, G. L.; SPECHT, J. E.; STEADMAN, J. R.; ESKRIDGE, K. M. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Crop Science**, v.41, p. 180-188, 2001.
- ARFAOUI, Arbia et al. Pre-treatment with calcium enhanced defense-related genes' expression in the soybean's isoflavones pathway in response to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 93, p. 12-21, 2016.
- ARFAOUI, Arbia; EL HADRAMI, Abdelbasset; DAAYF, Fouad. Pre-treatment of soybean plants with calcium stimulates ROS responses and mitigates infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 122, p. 121-128, 2018.
- AUCLAIR, J. et al. Genetic interactions between Glycine max and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant disease**, v. 88, n. 8, p. 891-895, 2004.
- AUGUSTO, J.; BRENNEMAN, T. B. Assessing systemicity of peanut fungicides through bioassay of plant tissues with *Sclerotium rolfsii*. **Plant disease**, v. 96, n. 3, p. 330-337, 2012.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions. **Plant disease (USA)**, 1987.
- CASTRO, L. H. S. et al. Resistance of soybean genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in different incubation environments. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 4, 2016.
- CHEN, Y.; WANG, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v.89, p.1268-1272, 2005.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, Fernando C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology, Brasília, DF**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.
- GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C. Reação de genótipos de soja ao mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Tropical Plant Pathology** 33: 213 2008.
- GARCIA, Riccely Ávila et al. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao mofo-branco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 8, p. 726-729, 2015.
- GODOY, C.V.; KOGA, L.J.; OLIVEIRA, M.C.N.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L. Mycelial growth, pathogenicity, aggressiveness and apothecial development of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates from Brazil and the United States in contrasting temperature regimes. **Summa Phytopathologica**, v.43, n.4, p.263-268, 2017.
- GRAU, C. R. *Sclerotinia* stem rot of soybean. 1988.
- GUO, Xiaomei et al. Genetic mapping of QTLs underlying partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean PI 391589A and PI 391589B. **Crop Science**, v. 48, n. 3, p. 1129-1139, 2008.
- HAMBILN, J.; ZIMMERMANN, M. J. de O. Breeding common bean for yield mixtures. **Plant Breeding Reviews**, Westport, v. 4, p. 245-272, 1986.

HULLER, G. de C. et al. Diferentes métodos de avaliação da suscetibilidade de genótipos de soja ao mofo branco. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, 2016.

HUZAR-NOVAKOWISKI, Jaqueline; DORRANCE, Anne E. Ascospore inoculum density and characterization of components of partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Disease**, p. PDIS-11-17-1786-RE, 2018.

JULIATTI, Fernando Cezar; SAGATA, Erika; JULIATTI, Breno Cezar Marinho. Ranqueamento de genótipos de soja com resistência parcial por diferentes métodos de inoculação de *Sclerotinia Sclerotiorum* submetidos à análise de correlação. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, 2013.

KIM, H.S.; DIERS, B.W. Inheritance of partial resistance to sclerotinia stem rot in soybean. **Crop Science** 40, 55–61, 2000.

KULL, Linda S. et al. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, v. 87, n. 12, p. 1471-1476, 2003.

MCCAGHEY, Megan et al. Development and evaluation of glycine max germplasm lines with quantitative resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1495, 2017.

MEYER, M.C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2015/2016: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 5 p, (Embrapa Soja. Circular Técnica, 122), 2016.

MUELLER, D. S. et al. Application of thiophanate-methyl at different host growth stages for management of *Sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Protection**, v. 23, n. 10, p. 983-988, 2004.

PELTIER, A. J.; BRADLEY, C. A.; CHILVERS, M. I.; MALVICK, D. K.; MUELLER, D. S.; WISE, K. A.; ESKER, P. D. Biology, yield loss and control of *Sclerotinia* stem rot of soybean. **Journal of Integrated Pest Management**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2012.

PELTIER, A. J.; HATFIELD, R. D.; GRAU, C. R. Soybean stem lignin concentration relates to resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 93, n. 2, p. 149-154, 2009.

STEADMAN, J.R.; BOLAND, G. White mold. In: H.F. Schwartz, J.R. Steadman, R. Hall, and R.L. Forster, editors, Compendium of bean diseases. 2nd ed. **Am. Phytopath. Soc.**, St. Paul, MN. p. 44–46, 2005.

TERÁN, Henry et al. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **ANNUAL REPORT-BEAN IMPROVEMENT COOPERATIVE**, v. 49, p. 115, 2006.

VUONG, T. D., Hoffman, D. D., Diers, B. W., Miller, J. F., Steadman, J. R., and Hartman, G. L. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Sci.** 44:777-783, 2004

VUONG, T. D.; DIERS, B. W.; HARTMAN, G. L. Identification of QTL for resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean plant introduction 194639. **Crop science**, v. 48, n. 6, p. 2209-2214, 2008.

WEGULO, S. N.; YANG, X. B.; MARTINSON, C. A. Soybean cultivar responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in field and controlled environment studies. **Plant disease**, v. 82, n. 11, p. 1264-1270, 1998.

WILLBUR, J. F. et al. Comprehensive Sclerotinia stem rot screening of soybean germplasm requires multiple isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant disease**, v. 101, n. 2, p. 344-353, 2017.

**CAPÍTULO 4 VARIABILIDADE PATOGÊNICA DE LINHAGENS
MONOASCOSPÓRICAS DE *Sclerotinia sclerotiorum* EM SOJA**

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a variabilidade patogênica entre linhagens monoascospóricas de um mesmo isolado de *S. sclerotiorum* utilizando o método *straw test* em cultivares de soja. Dessa maneira, 20 cultivares do Banco de Germoplasma de Soja da UFLA e cinco linhagens monoascospóricas de *S. sclerotiorum* foram utilizados. Um experimento em casa de vegetação foi conduzido para avaliar a variabilidade da agressividade entre monoascospóricas. As plantas no estágio R1, foram inoculadas pelo método *straw test*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições no esquema fatorial. As avaliações foram realizadas aos sete, 14 e 21 dias após a inoculação com o auxílio de uma régua graduada, por meio da proporção da área lesionada. Foi estimada a Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD). As monoascospóricas 7.3, 7.4 foram mais agressivas e as cultivares BRSMG 790A e BRSMG 850GRR, apresentaram resistência mais estável frente às diferentes linhagens monoascospóricas. Houve variabilidade entre as linhagens monoascospóricas e estas devem ser preferidas para inoculação em programas de melhoramento que visam obter cultivares de soja resistentes a *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: *Glycine max*, mofo branco, *straw test*, resistência genética

ABSTRACT

This study was carried out with the objective of evaluating the pathogenic variability among *S. sclerotiorum* monoascosporic isolates using the straw test method in soybean cultivars. Thus, 20 soybean cultivars and five monoascosporic isolates of *S. sclerotiorum* were used. A greenhouse experiment was conducted to evaluate the variability of aggressiveness between monoascosporic isolates. Plants in the R1 stage were inoculated by the straw test method. The experiment was conducted in a completely randomized design, with three replicates in the factorial scheme. Evaluations were performed at 7, 14 and 21 days after inoculation with the aid of a graduated ruler, by means of the proportion of the injured area. The area under a disease progression curve (AUDPC) was estimated. The monoascosporic isolates 7.3, 7.4 were more aggressive and the cultivars BRSMG 790A and BRSMG 850GRR presented more stable resistance to the different monoascosporic isolates. The GGE biplot analysis characterized the cultivars in relation to the level of resistance and the monoascosporic isolates regarding the aggressiveness. The cultivars BRSMG 790A and BRSMG 850GRR showed a more stable resistance to the different monoascosporic isolates. In addition, these two cultivars were grouped into distinct clusters, that is, they have different groups of favorable alleles related to resistance to white stem rot. There was variability among the monoascosporic isolates and these should be preferred for inoculation in breeding programs that aim to obtain soybean cultivars resistant to *S. sclerotiorum*.

Key words: *Glycine max* (L.) Merrill; Sclerotinia stem rot; Straw test; Genetic resistance.

1 INTRODUÇÃO

Mofa branco é uma doença causada por um fungo ascomiceto *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, que pode devastar várias culturas, dentre elas a soja. O patógeno produz estruturas de resistência denominadas de escleródios, que podem sobreviver no solo por um período superior a cinco anos (STEADMAN; BOLAND, 2005). Em soja, a doença é também chamada de podridão branca da haste e causa danos significativos na produção e qualidade dos grãos. Em condições favoráveis, como umidade elevada e temperaturas amenas, podem ocorrer perdas na produção em até 70%. Estima-se que cerca de 23% da área de produção de soja brasileira esteja infestada pelo patógeno, compondo aproximadamente 7,7 milhões de hectares que necessitam da adoção de medidas integradas de controle da doença (MEYER et al., 2016).

Encontrar novas fontes de resistência para mofo branco exige técnicas confiáveis de inoculação e avaliação, bem como, o entendimento da variabilidade patogênica de *S. sclerotiorum*. O método de inoculação pode influenciar a resposta de genótipos de soja à doença (KULL et al., 2003). Uma das técnicas mais utilizadas é o *straw test*, ou teste do canudo, que foi descrito primeiramente para feijoeiro por Petzoldt e Dickson (1996), e adaptado para soja por Auclair e colaboradores (2004). No *straw test*, o fungo é inoculado dentro do tecido do caule principal e as avaliações são feitas por meio de uma escala de notas ou pelo comprimento da lesão.

Vários estudos tem sido realizados com o objetivo de encontrar cultivares de soja resistentes ao mofo branco, utilizando o método *straw test* (AUCLAIR et al., 2004; HULLER et al., 2016). Contudo, a variabilidade patogênica não tem sido considerada nesses estudos, haja vista o pouco conhecimento sobre a variabilidade da agressividade de *S. sclerotiorum* nas áreas produtoras de soja. Outro ponto a ser considerado, é a unidade genética utilizada nos estudos de variabilidade patogênica. Isolados a partir de escleródios tem sido a unidade genética mais utilizada nesses estudos para a caracterização de indivíduos (HAMBLETON et al. 2002; MERT-TURK et al. 2007; LITHOLDO JUNIOR et al. 2011; CLARKSON et al. 2013). No entanto, foi demonstrado que o uso de escleródios, como indivíduo, pode não ser adequado e deve ser evitado, uma vez que os escleródios podem ser formados por hifas geneticamente distintas (LEHNER et al., 2015). As linhagens monoascospóricas são os mais próximos de um indivíduo porque cada ascósporo tem dois núcleos geneticamente idênticos (WEBSTER e WEBER, 2007). Assim é oportuno quantificar esta variabilidade patogênica bem como a agressividade.

Logo, objetivou-se verificar a existência de variabilidade patogênica entre linhagens monoascospóricas de um mesmo isolado de *S. sclerotiorum* utilizando o método *straw test* em cultivares de soja.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tratamentos genéticos

Foram utilizadas 20 cultivares do Banco de Germoplasma de Soja da UFLA, previamente classificadas como resistentes e suscetíveis de acordo com Garcia e Juliatti (2012). Foram utilizadas dez cultivares com maior nível de resistência e dez suscetíveis (Tabela 1).

Tabela 1- Cultivares de soja com maior nível de resistência e suscetíveis a *S. sclerotiorum*

Cultivares ¹		Origem	Cultivares ²		Origem
1	Emgopa 316	Emater-GO	11	7166RSF IPRO	GDM
2	Emgopa 315	Agencia Rural	12	BRS 213	Embrapa
3	BRS Milena	Embrapa	13	NS 7338 IPRO	Nidera
4	BRSMG 790A	Embrapa	14	BRSMG Garantia	Embrapa
5	BRSMG 850GRR	Embrapa	15	MG/BR 46 (Conquista)	Embrapa
6	BRS Baliza RR	Embrapa	16	BRS Silvânia RR	Embrapa
7	BRS Favorita RR	Embrapa	17	M-SOY 8001	D&PL Brasil
8	BRSGO Luziânia	Embrapa	18	M-SOY 6101	D&PL Brasil
9	M-SOY 8000RR	D&PL Brasil	19	M-SOY 8329	D&PL Brasil
10	BRSMG 68(Vencedora)	Embrapa	20	TMG123RR	TMG

¹ Cultivares resistentes (1 a 10); ² Cultivares suscetíveis (11 a 20).

Para obter linhagens monoascospóricas de *S. sclerotiorum*, escleródios do isolado UFLA 44 foram dispostos em caixas gerbox, contendo uma mistura autoclavada de areia, terra e substrato. As caixas gerbox foram incubadas a 19 ° C / 12 h de fotoperíodo, por 40 dias, para produção de apotécio. A água foi borrifada todos os dias na mistura para manter a alta umidade necessária para a germinação carpogênica (BRANDÃO et. al., 2008). Um apotécio maduro de cada escleródio foi coletado e depositado em um eppendorf contendo água destilada. Os ascósporos foram coletados aleatoriamente por meio de um microscópio e transferidos para placas de petri contendo meio batata dextrose e ágar (BDA). Por meio dessa micromanipulação, foram obtidas cinco linhagens monoascospóricas (7.1; 7.2; 7.3; 7.4; 7.5).

2.2 Avaliação da agressividade das linhagens monoascospóricas

Para avaliar a variabilidade da severidade entre linhagens monoascospóricas foi conduzido um experimento em casa de vegetação. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos, contendo uma mistura de argila e substrato, até o estágio R1, início do florescimento. Para obtenção de micélio para a inoculação, discos de ágar colonizados com micélio de cada monoascospórica, foram transferidos para placas contendo meio BDA e estas foram mantidas a 22 ± 3°C e fotoperíodo de 12 horas por cinco dias. O método utilizado para a inoculação das

plantas foi o *straw test*, que consiste em cortar o ápice da haste principal da planta e inoculá-lo com ponteiros contendo o micélio do fungo. As ponteiros são usadas para cortar e retirar o disco de ágar da placa, de modo que o micélio fique em contato com a haste cortada (AUCLAIR, et al., 2004).

2.3 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições no esquema fatorial (20 cultivares e cinco monoascospóricas). Cada vaso, com uma planta foi considerado uma parcela.

As avaliações foram realizadas sete dias após a inoculação com o auxílio de uma régua graduada, por meio da proporção da área lesionada. Para acompanhar o progresso da doença as plantas foram avaliadas por mais duas semanas, totalizando três avaliações, aos sete, 14 e 21 dias após a inoculação. As avaliações subsequentes foram utilizadas para o cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), segundo metodologia proposta por SHANER e FINNEY (1977):

$$AACPD = \sum_{i=1}^n \left[\frac{Y_{i+1} + Y_i}{2} \cdot (T_{i+1} - T_i) \right]$$

onde:

Y_i é a severidade da doença na época de avaliação i ($i=1, \dots, n$);

Y_{i+1} é a severidade da doença na época de avaliação $i+1$;

T_i é a época da avaliação i , em número de dias após a emergência das plantas;

T_{i+1} é a época da avaliação $i+1$.

As estimativas da AACPD foram submetidas à análise de variância, de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + c_i + m_j + c.m_{ij} + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} : observação referente a cultivar i , na monoascospórica j ;

μ : média geral

c_i : efeito da cultivar i ($i = 1, 2, 3, \dots, 20$);

m_j : efeito da monoascospórica j ($j = 1, 2, 3, \dots, 5$);

$c.m_{ij}$: efeito da interação entre a cultivar i e a monoascospórica j ;

e_{ij} : erro experimental associado à observação Y_{ij} ;

Foi realizado o procedimento de análise de variância considerando as estimativas de AACPD. As médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott (1974). A classificação das cultivares foi por meio de padrões de resistência e suscetibilidade, já descritos na literatura

(GARCIA e JULIATTI, 2012; CASTRO et al., 2016). As cultivares com valores de AACPD menores que os obtidos para a cultivar Emgopa 316, foram consideradas resistentes. Ao passo que valores de AACPD maiores que os obtidos para a cultivar TMG123RR, foram consideradas suscetíveis. As cultivares posicionadas nesse intervalo, foram consideradas moderadamente resistentes. Uma análise GGE biplot também foi realizada para melhor comparar a agressividade das monoasospóricas e o comportamento das cultivares.

Foi calculado um índice de coincidência, proposto por Hamblin e Zimmermann (1986), com intensidade de seleção de 20%, para testar a coincidência das cultivares resistentes de acordo com cada linhagem monoasospórica, seguindo a equação:

$$IC = \frac{A - C}{M - C} \times 100$$

Em que:

A: número de cultivares superiores selecionadas, comuns às diferentes linhagens monoasospóricas;

C: número de cultivares coincidentes devido ao acaso;

M: número total de cultivares selecionadas.

Foi estimada a acurácia seletiva ($r_{gg'}$) pela seguinte expressão (RESENDE, 2007):

$$r_{gg'} = \sqrt{1 - \frac{1}{F}}$$

em que:

F: Valor do teste F de Snedecor para o efeito de tratamentos na análise de variância.

Foi estimada a correlação de Spearman para medir a correspondência com que as diferentes linhagens monoasospóricas classificaram as cultivares. Todas as análises foram realizadas por meio do software R (R Core Team, 2017).

3 RESULTADOS

O experimento foi conduzido com boa precisão, indicado pela magnitude do coeficiente de variação (CV) de 18,35% e alta magnitude da acurácia seletiva ($r_{gg'}$) de 0.98. A interação cultivar vs monoasospóricas e também o desdobramento dessa interação foram significativos, o que permite inferir acerca da variabilidade patogênica existente entre as diferentes linhagens monoasospóricas.

A agressividade média de cada linhagem monoasospórica, considerando todas as cultivares, foi estimada. Foi possível observar maior agressividade para as monoasospóricas 7.3 e 7.4. Por seu turno, a 7.1 foi menos eficiente em causar sintomas nas cultivares (Figura 1).

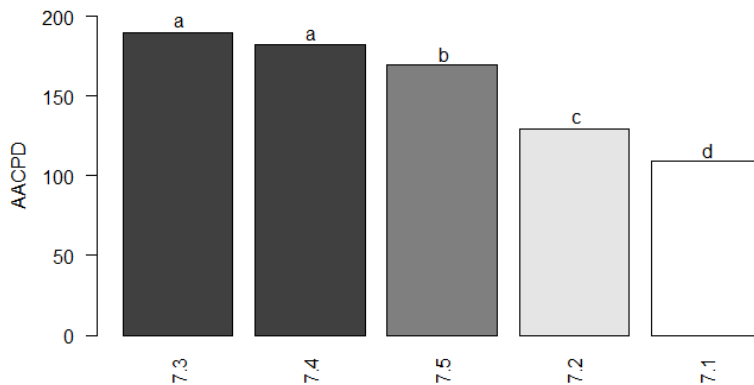
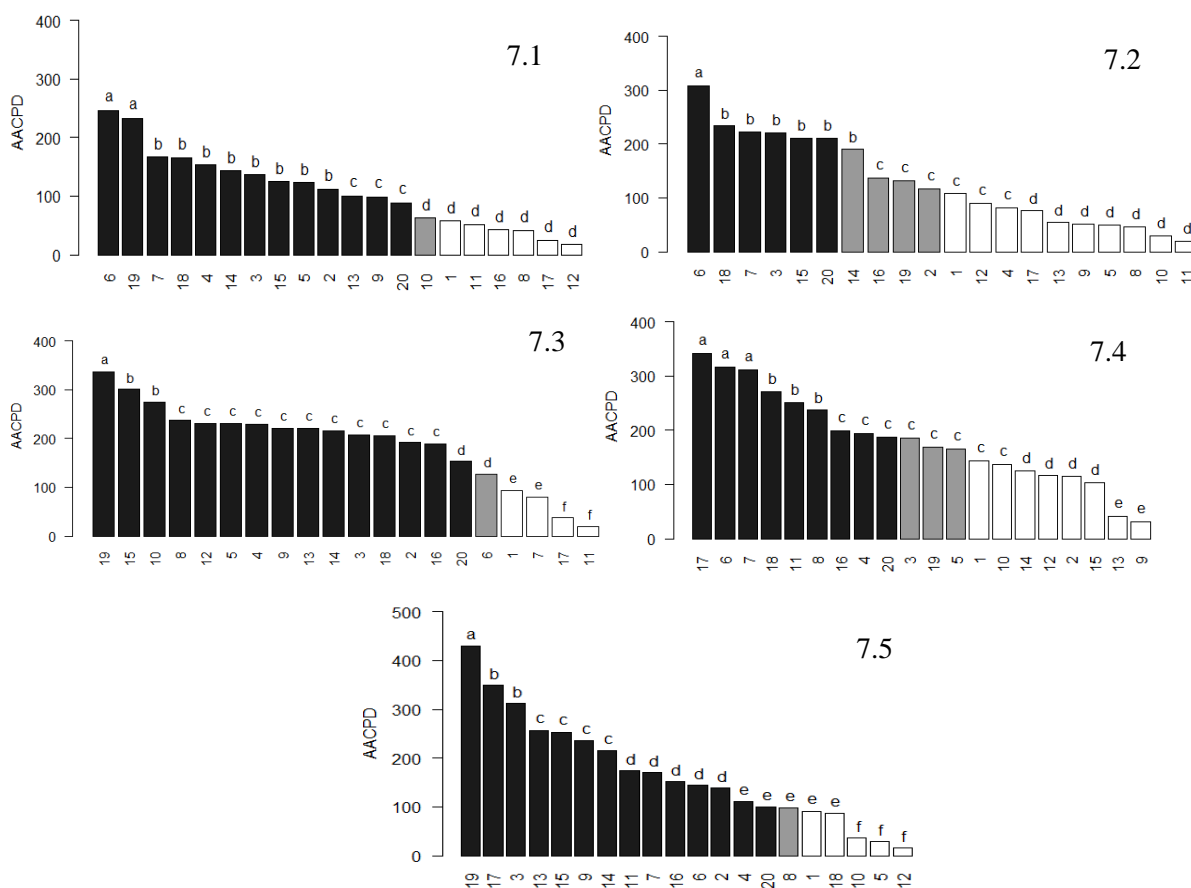


Figura 1.

Agressividade média das monoascospóricas para valores de AACPD. Médias seguidas de mesma letra pertencem ao mesmo grupo do teste de Scott-Knott (1974) ($p < 0.05$). Fonte: do



Autor (2019).

Figura 2. Desempenho das cultivares para valores médios de AACPD em cada monoascospóricas Médias seguidas de mesma letra pertencem ao mesmo grupo a 5 % de probabilidade pelo teste de Scott-Knott (1974). Suscetível ■ Moderadamente resistente ■ Resistente □. Fonte: do Autor (2019).

O comportamento das linhagens frente às diferentes linhagens monoascospóricas foi estimado no desdobramento da ANAVA (Figura 2). A monoascospórica 7.5, na média, apresentou maiores valores de AACPD, e juntamente com a 7.3, discriminou melhor as cultivares, ou seja, permitiu o agrupamento das cultivares em maior número de classes fenotípicas.

Foi possível observar também, o comportamento não coincidente das cultivares frente às diferentes inoculações (Figura 2). Nota-se que a classificação nas classes de resistência foi muito divergente. Isto indica mais uma vez a variabilidade existente entre as linhagens monoascospóricas. A correlação na classificação foi mediana e significativa apenas entre as monoascospóricas 7.1 e 7.2. Estas foram classificadas como as menos agressivas. Já entre as monoascospóricas que causaram mais sintomas, 7.3 e 7.4, a correlação foi negativa (Tabela 2). Isto evidencia que a classificação das cultivares é dependente das linhagens monoascospóricas utilizadas para inoculação. Mais uma inferência sobre a variabilidade das linhagens monoascospóricas pôde ser observada por meio do índice de coincidência (Tabela 2). Não houve coincidência entre as cultivares classificadas como resistentes quando se comparou a classificação realizada pelas monoascospóricas 7.1, 7.2 e 7.3 com a 7.4. Ao passo que, quando a comparação foi realizada para as cultivares mais suscetíveis, o índice de coincidência chegou a 75%. Assim, há dificuldade na realização de inferências acerca do nível de resistência dos genótipos de soja.

Tabela 2. Correlação de Spearman para a classificação das cultivares de acordo com a inoculação em cada monoascospórica (acima da diagonal). Índice de coincidência entre as quatro cultivares mais resistentes e as quatro mais suscetíveis, entre parênteses (abaixo da diagonal).

	7.1	7.2	7.3	7.4	7.5
7.1	-	0,62**	0,10 ^{NS}	0,10 ^{NS}	0,24 ^{NS}
7.2	0,25 (0,50)	-	-0,22 ^{NS}	0,25 ^{NS}	0,17 ^{NS}
7.3	0,25 (0,25)	0,2 (0)	-	-0,55**	-0,11 ^{NS}
7.4	0 (0,75)	0 (0,75)	0 (0)	-	-0,22 ^{NS}
7.5	0,25 (0,25)	0 (0,25)	0 (0,25)	0 (0,25)	-

** Significativo a 1% de probabilidade; ^{NS} Não significativo. Fonte: do Autor (2019).

A análise gráfica de componentes principais via GGE biplot agrupou as cultivares de acordo com um padrão de resistência para as linhagens monoascospóricas. As cultivares de um mesmo quadrante (6,7,17 e 18; 11 e 20; 1,5,8 e 16; 2,4,10 e 12; 3,13,14,15 e 19) provavelmente possuem alelos similares de resistência (Figura 3 A). O gráfico GGE biplot permitiu ainda inferências acerca de cada cultivar para a interação monoascospóricas vs cultivares. Assim, as cultivares que mais contribuíram para a interação foram 19, 6, 7, 13 e 9. As cultivares 5,8 e 4 foram as mais estáveis (Figura 3 B). A análise gráfica confirmou ainda a maior agressividade das monoascospóricas 7.3 e 7.4, bem como, o menor nível de agressividade da 7.1 (Figura 3 B).

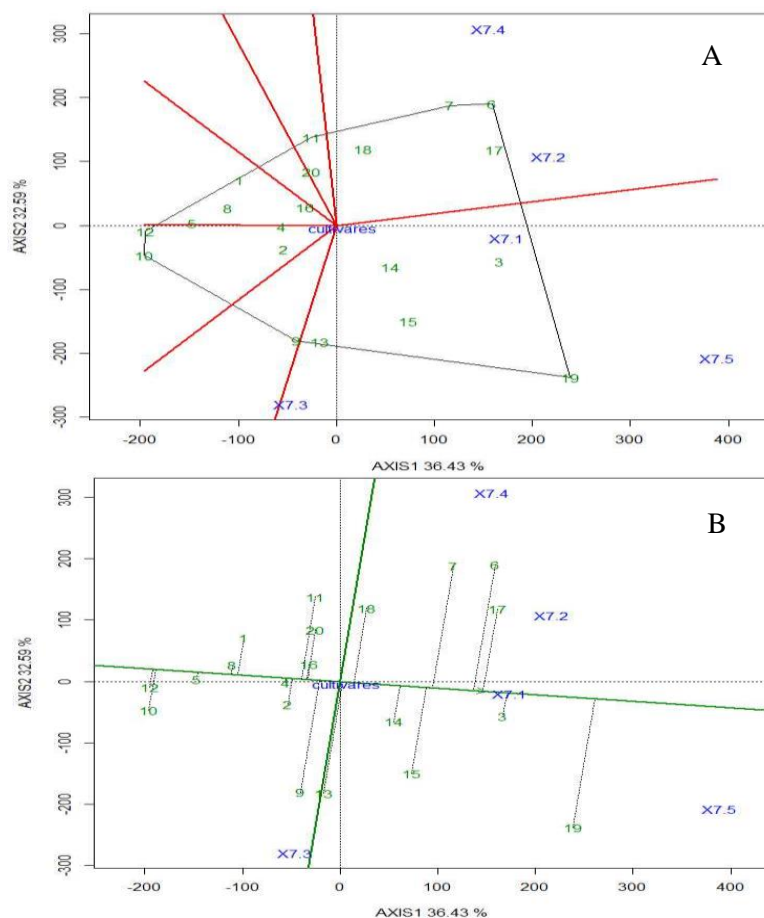


Figura 3. (a) GGE biplot para a reação de 20 cultivares de soja em cinco linhagens monoascospóricas de *S. sclerotiorum*. (b) Estabilidade das 20 cultivares de soja. Componente principal 1 (AXIS1) = 36.43% e Componente principal 2 (AXIS2) = 32.59%. Fonte: do Autor (2019).

4 DISCUSSÃO

Trabalhos que envolvem estudos sobre a agressividade de isolados de *S. sclerotiorum*, manejam um grande número de genótipos (ABREU e SOUZA 2015; LEHNER et al. 2016a; LEHNER et al. 2016b; LIU et al, 2018; SILVA et al. 2014). Contudo, esses trabalhos foram realizados, na maioria dos casos, para a cultura do feijoeiro. Não foram encontrados até o momento, estudos que verificaram a existência de variabilidade patogênica entre linhagens monoascospóricas de um mesmo isolado na cultura da soja.

É importante destacar que isolados mais agressivos permitem discriminar melhor as cultivares em relação ao nível de resistência. Dessa maneira, o isolado UFLA 44, escolhido para obtenção das linhagens monoascospóricas, já havia sido identificado como mais agressivo em trabalho realizado por Abreu e Souza (2015) na cultura do feijoeiro. As monoascospóricas 7.3, 7.4 e 7.5 foram mais eficientes em causar sintomas e podem ser utilizadas nas atividades de seleção de um programa de melhoramento para resistência ao mofo branco.

As cultivares identificadas previamente como resistentes (GARCIA e JULIATTI, 2012), não mostraram o mesmo padrão de reação. Para as inoculações em todas as linhagens monoascospóricas, pelo menos três cultivares consideradas resistentes (Tabela 1), foram classificadas como suscetíveis no presente estudo. Essa diferença no padrão de resistência pode ser devido ao método que foi empregado para inoculação das cultivares. Os autores utilizaram a metodologia da folha destacada. Além disso, a fonte do inóculo foi diferente. No estudo citado, foi utilizado isolado a partir de escleródios e neste trabalho foram utilizadas linhagens monoascospóricas. Assim, devido à mudança na classificação das cultivares de resistentes para suscetíveis, pode-se inferir que as linhagens monoascospóricas apresentaram maior agressividade que o isolado.

É comum encontrar relatos sobre a classificação não coincidente de cultivares, principalmente para a cultura do feijoeiro. Um estudo realizado em casa de vegetação para avaliar a resistência fisiológica de algumas linhagens de feijoeiro, a cultivar G122 foi utilizada como testemunha resistente ao mofo branco (LEHNER et al, 2016c). No entanto, outro trabalho, também conduzido com o objetivo de identificar genótipos com altos níveis de resistência a *S. sclerotiorum*, obteve para a cultivar G122 pior desempenho em comparação às demais testemunhas resistentes (VITERI et al. 2015).

Uma possível explicação para a divergência desses resultados seria a resistência fisiológica e os mecanismos de escape intrínsecos às próprias plantas. A resistência fisiológica é conferida pelos mecanismos de defesa da planta e os mecanismos de escape, pelas características relacionadas à arquitetura da planta (MIKLAS et al. 2013). Em condições de campo, ambos os tipos de resistência contribuem para o controle do mofo branco, contudo, em casa de vegetação ou em laboratório, apenas a resistência fisiológica pode ser identificada (VUONG et al., 2004). Dessa maneira, comparações diretas de resultados experimentais devem ser feitas com cautela, pois as cultivares utilizadas, variabilidade dos isolados, o método de inoculação e as condições ambientais dos experimentos podem afetar os resultados.

É interessante notar a correlação na classificação das cultivares por meio das diferentes linhagens monoascospóricas. Houve correlação positiva e significativa apenas para as linhagens monoascospóricas menos agressivas. Resultados semelhantes foram obtidos em outras oportunidades (WILLBUR et al, 2017). Neste estudo foram utilizadas três linhagens endogâmicas de soja, inoculadas com nove isolados de *S. sclerotiorum* (quatro mais agressivos; quatro menos agressivos e uma testemunha). Foi observado que para três das linhagens menos agressivas a classificação das linhagens foi semelhante. Ao passo que, para os isolados mais agressivos, a classificação das linhagens foi divergente. Pode-se inferir que para isolados menos agressivos, os mecanismos de resistência da planta são menos exigidos, assim a reação é semelhante. Por outro lado, à medida que a agressividade dos isolados aumenta a interação

cultivar-isolado torna-se mais pronunciada, ou seja, aumentam-se as reações que as plantas podem sofrer frente aos isolados.

A análise GGE biplot caracterizou as cultivares em relação ao nível de resistência e os linhagens monoascospóricas quanto à agressividade (YAN e FALK, 2002). Assim, uma das vantagens de utilizar gráficos biplots é a possibilidade de separar as cultivares de acordo com o padrão de resistência e assim inferir acerca dos grupos de alelos que cada cultivar possui. As cultivares BRSMG 790A e BRSMG 850GRR, consideradas resistentes em estudos anteriores, ainda apresentaram resistência mais estável frente as diferentes linhagens monoascospóricas. Além disso, essas duas cultivares foram agrupadas em clusters distintos, ou seja, elas possuem diferentes grupos de alelos favoráveis relacionados a resistência a mofo branco. Portanto, essas cultivares podem ser inter cruzadas em um programa de melhoramento para obter linhagens resistentes. O gráfico de estabilidade (Figura 3B) ainda corrobora com os dados de médias e reafirma a maior agressividade das monoascospóricas 7.3 e 7.4.

5 CONCLUSÃO

Este estudo encontrou variabilidade entre as cinco linhagens monoascospóricas de *S. sclerotiorum*. Esse resultado permite inferir que linhagens monoascospóricas são a unidade genética mais adequada a ser utilizada em programas de melhoramento que visam obter cultivares de soja resistentes a *S. sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M.J., SOUZA, E.A. Investigation of *Sclerotinia sclerotiorum* strains variability in Brazil. **Genet. Mol. Res.** 14(2):6879-6896, 2015.
- AUCLAIR, J. et al. Genetic interactions between Glycine max and *Sclerotinia sclerotiorum* using a straw inoculation method. **Plant disease**, v. 88, n. 8, p. 891-895, 2004.
- BRANDÃO, R. S.; PRADO, T. do S.; LOBO JÚNIOR, M. Inibição da germinação carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* em solos sob integração lavoura-pecuária com *Brachiaria ruziziensis*. In: **Embrapa Arroz e Feijão-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 9., 2008, Campinas. Ciência e tecnologia na cadeia produtiva do feijão. Campinas: Instituto Agronômico, 2008.
- CASTRO, L. H. S. et al. Resistance of soybean genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in different incubation environments. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 4, 2016.
- CLARKSON, J. P. et al. Population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* in crop and wild hosts in the UK. **Plant pathology**, v. 62, n. 2, p. 309-324, 2013.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, Fernando C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology, Brasília, DF**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.
- HAMBLETON, S.; WALKER, C.; KOHN, L. M. Clonal lineages of *Sclerotinia sclerotiorum* previously known from other crops predominate in 1999-2000 samples from Ontario and Quebec soybean. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, n. 3, p. 309-315, 2002.
- HAMBLIN, J.; ZIMMERMAN, M. J. O. Breeding common bean for yield mixtures. **Plant Breeding Reviews**, v. 4, p. 245-272, 1986.
- HULLER, G. de C. et al. Different methods of assessing susceptibility of soybean genotypes to white mold= Diferentes métodos de avaliação da suscetibilidade de genótipos de soja ao mofo branco. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, 2016.
- KULL, Linda S. et al. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, v. 87, n. 12, p. 1471-1476, 2003.
- LEHNER, M. S. et al. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. **Plant pathology**, v. 64, n. 4, p. 921-931, 2015.
- LEHNER, Miller S.; PAULA JÚNIOR, Trazilbo J.; MIZUBUTI, Eduardo SG. Does Hyphal-Tip Ensure the Same Allelic Composition at SSR Loci as Monosporic Isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*?. **Journal of Phytopathology**, v. 164, n. 6, p. 417-420, 2016a.
- LEHNER, M. S. et al. Similar aggressiveness of phenotypically and genotypically distinct isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 100, n. 2, p. 360-366, 2016b.
- LEHNER, Miller da Silva et al. Reaction of sources of resistance to white mold to microsatellite haplotypes of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 2, p. 184-188, 2016c.

LITHOLDO JÚNIOR, CG et al. Genetic diversity and mycelial compatibility groups of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 2, p. 868-877, 2011.

LIU, Jia et al. Mycelial compatibility group and genetic variation of sunflower *Sclerotinia sclerotiorum* in Northeast China. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 102, p. 185-192, 2018.

MERT-TÜRK, F. et al. Microsatellite and morphological markers reveal genetic variation within a population of *Sclerotinia sclerotiorum* from oilseed rape in the Canakkale Province of Turkey. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 3, p. 182-187, 2007.

MEYER, M.C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2015/2016: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 5 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 122), 2016.

MIKLAS, Phillip N. et al. Characterization of white mold disease avoidance in common bean. **European Journal of Plant Pathology**, v. 135, n. 3, p. 525-543, 2013.

PETZOLDT, R.; DICKSON, D. M. H. Straw test for white mold in beans. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 39, p. 142- 143, 1996.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RESENDE, M.D.V. de. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: EMBRAPA Florestas. 2007. 561p.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, p. 507-512, 1974.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The Effect of Nitrogen Fertilization on the Expression of Slow-Mildewing Resistance in Knox Wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SILVA, P. H. et al. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetic and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9138-9151, 2014.

STEADMAN, J.R.; BOLAND, G. White mold. In: H.F. Schwartz, J.R. Steadman, R. Hall, and R.L. Forster, editors, Compendium of bean diseases. 2nd ed. **Am. Phytopath. Soc.**, St. Paul, MN. p. 44-46, 2005.

VITERI, Diego M. et al. Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. **Euphytica**, v. 204, n. 2, p. 457-472, 2015.

VUONG, T. D., Hoffman, D. D., Diers, B. W., Miller, J. F., Steadman, J. R., and Hartman, G. L. Evaluation of soybean, dry bean, and sunflower for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Sci.** 44:777-783, 2004

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. Introduction to fungi 3 ed. New York, Cambridge University Press, 2007.

WILLBUR, J. F. et al. Comprehensive Sclerotinia stem rot screening of soybean germplasm requires multiple isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant disease**, v. 101, n. 2, p. 344-353, 2017.

YAN, Weikai; FALK, Duane E. Biplot analysis of host-by-pathogen data. **Plant Disease**, v. 86, n. 12, p. 1396-1401, 2002.

**CAPÍTULO 5 POTENCIAL DE POPULAÇÃO SEGREGANTES E AVALIAÇÃO DE
PROGÊNIES DE SOJA QUANTO À RESISTÊNCIA A *Sclerotinia sclerotiorum***

RESUMO

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de populações segregantes visando à obtenção de progênies de soja resistentes a podridão branca da haste. Dessa maneira, 149 progênies provenientes de seis populações: população 1 (BRSMG Garantia x MG/BR 46 (Conquista)); população 2 (MG/BR 46 (Conquista) x Emgopa 316); população 3 (BRSMG 68 Vencedora x Emgopa 316); população 4 (BRSMG 68 Vencedora x MG/BR 46 (Conquista)); população 5 (Emgopa 316 x BRSMG Garantia) e população 6 (BRSMG 68 Vencedora x BRSMG Garantia), juntamente com 20 testemunhas foram avaliadas em campo, na safra 2017/2018 em latice simples 13 x 13 e parcela de 1 linha de 2 metros. As progênies foram avaliadas quanto à resistência à *S. sclerotiorum* por meio do método da folha destacada, quando as plantas atingiram o estágio V2 (primeiro trifólio totalmente expandido). O trifólio foi coletado e levado ao laboratório para instalação do experimento. Cada folíolo do trifólio recebeu um disco de micélio do isolado UFLA 24, que foi mantido sob condições controladas até o momento da avaliação, 72 horas após a inoculação. As avaliações foram por meio de escala de notas que variavam de 0 (imune) até 5 (suscetível). O experimento, em laboratório, foi conduzido no delineamento inteiramente casualizados (DIC), sendo que cada folíolo do trifólio constituiu uma repetição. Os dados foram avaliados por meio de análises de variância, individual e conjunta. As progênies apresentam variabilidade com relação à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*. As progênies oriundas da população seis (BRSMG 68 - Vencedora x BRSMG Garantia) denotam o maior potencial para a obtenção de linhagens de soja com certo nível de resistência a podridão branca da haste.

Palavras-chave: *Glycine max*, mofo branco, parâmetros genéticos e fenotípicos.

ABSTRACT

To evaluate the potential of segregating populations to obtain soybean progenies resistant to sclerotinia stem rot, 149 F_{2:3} progenies from six populations: population 1 (BRSMG Garantia x MG / BR 46 (Conquista)); population 2 (MG / BR 46 (Conquista) x Emgopa 316); population 3 (BRSMG 68 Vencedora x Emgopa 316); population 4 (BRSMG 68 Vencedora x MG / BR 46 (Conquista)); population 5 (Emgopa 316 x BRSMG Garantia) and population 6 (BRSMG 68 Vencedora x BRSMG Garantia), and 20 controls were evaluated in the field, in the 2017/2018 crop season in a simple lattice 13 x 13 and a plot of 1 line of 2 meters. The progenies were evaluated for resistance to *S. sclerotiorum* using the detached leaf method, when the plants reached the V2 stage (first fully expanded trifolium). The trifolium was collected and taken to the laboratory to install the experiment. Each leaflet of the trifolium received a mycelial disc of the UFLA 24 isolate, which was maintained under controlled conditions until the time of evaluation, 72 hours after inoculation. The evaluations were by scale of scores ranging from 0 (no symptoms) to 5 (susceptible). The experiment in the laboratory was conducted in a completely randomized design (DIC), with each leaflet of the trefoil constituting a repetition. The data were evaluated through analysis of variance, individual and joint. Progenies show variability in relation to resistance to *S. sclerotiorum*. Progenies from population six (BRSMG 68 - Vencedora x BRSMG Garantia) obtained the greatest potential to obtain soybean strains with a certain level of resistance to sclerotinia stem rot.

Key words: *Glycine max* (L.) Merrill; Sclerotinia stem rot; Genetic and phenotypic parameters.

1 INTRODUÇÃO

Entre os fatores que limitam a produção de soja no Brasil e no mundo está a infecção por *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal da podridão branca da haste. O fungo é um ascomiceto necrotrófico que infecta mais de 400 espécies de plantas. Em condições favoráveis, como umidade elevada e temperaturas amenas, podem ocorrer perdas na produção em até 70%. Estima-se que cerca de 23% da área de produção de soja brasileira esteja infestada pelo patógeno, compondo aproximadamente 7,7 milhões de hectares que necessitam da adoção de medidas integradas de controle da doença (MEYER et al., 2016).

O controle da doença é realizado por meio de práticas culturais, como plantio direto, manejo da irrigação, taxa de semeadura, uso de sementes certificadas e rotação com culturas não hospedeiras. No entanto, sob condições favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, essas práticas não são suficientes. O uso de fungicidas apresenta eficiência reduzida uma vez que a penetração é baixa e a distribuição desigual. Isto ocorre por que quando da aplicação do fungicida, a planta já apresenta o dossel formado, uma vez que a infecção começa no estágio reprodutivo da planta. Além disso, o uso de fungicidas é uma estratégia onerosa para o produtor.

Portanto, o uso de cultivares resistentes torna-se a melhor alternativa para o controle da podridão branca da haste. Contudo, a resistência genética a *S. sclerotiorum* é complexa, apresenta herdabilidade baixa a média magnitude e apenas algumas poucas cultivares tem evidenciado algum grau de resistência (GARCIA et. al., 2015; ZHAO et al., 2015; JULIATTI et. al., 2014; KIM & DIERS, 2000). Além disso, as plantas apresentam mecanismos de escape que dificulta a avaliação da doença em campo, como data de florescimento, altura e arquitetura da planta (CUNHA, et.al., 2010).

Uma alternativa interessante visando nortear os programas de melhoramento de soja para resistência a doenças concerne na obtenção de parâmetros genéticos e fenotípicos. Muito embora, alguns relatos tenham sido reportados na literatura (CASTRO et al., 2016), esta temática ainda merece destaque e novos estudos. Isto se faz necessário, uma vez que existe grande influência do germoplasma, bem como do isolado, na magnitude das estimativas.

Logo, objetivou-se avaliar o potencial de populações segregantes visando obter progênies de soja resistentes a podridão branca da haste.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, e em casa de vegetação do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e em área experimental, na fazenda do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico em Agropecuária – Fazenda Muquém, Lavras- MG e no Centro de Transferência

de Tecnologia da UFLA - Fazenda Palmital no município de Ijaci, MG. Dados referentes à climatologia dos ambientes experimentais encontram-se nas figuras 1 e 2.

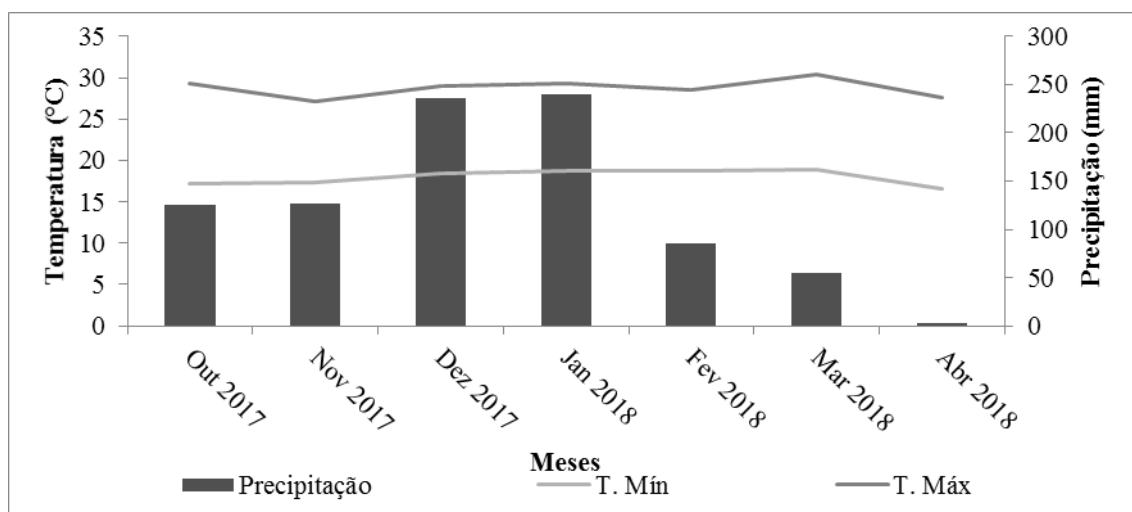


Figura 1 - Variações mensais de precipitação, temperatura máxima e temperatura mínima, no período de outubro a abril da safra 2017/2018, na cidade de Lavras -MG. Fonte: INMET (2019).

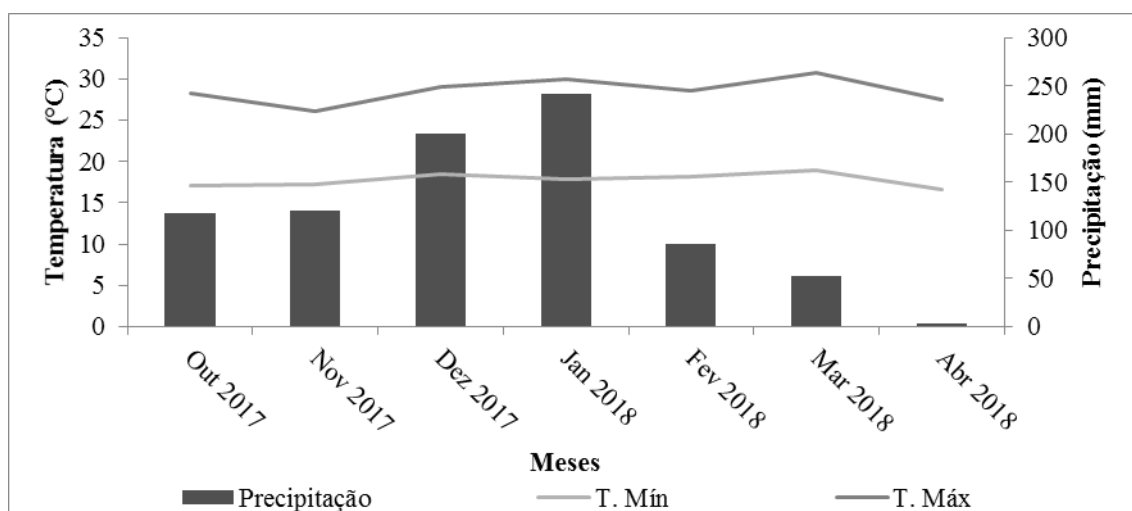


Figura 1 - Variações mensais de precipitação, temperatura máxima e temperatura mínima, no período de outubro a abril da safra 2017/2018, na cidade de Ijaci - MG. Fonte: INMET (2019).

Foram utilizadas seis populações: população 1 (BRSMG Garantia x MG/BR 46 (Conquista)); população 2 (MG/BR 46 (Conquista) x Emgopa 316); população 3 (BRSMG 68 Vencedora x Emgopa 316); população 4 (BRSMG 68 Vencedora x MG/BR 46 (Conquista)); população 5 (Emgopa 316 x BRSMG Garantia) e população 6 (BRSMG 68 Vencedora x BRSMG Garantia). Sementes de 149 progênies $F_{2,3}$ mais 20 testemunhas (Tabela 1), foram avaliadas em campo, na safra 2017/2018 em latice simples 13 x 13 e parcela de 1 linha de 2 metros.

Tabela 1- Cultivares de soja utilizadas como testemunhas.

Cultivares ¹		Origem	Cultivares ²		Origem
1	Emgopa 316	Emater-GO	11	7166RSF IPRO	GDM
2	Emgopa 315	Agencia Rural	12	BRS 213	Embrapa
3	BRS Milena	Embrapa	13	NS 7338 IPRO	Nidera
4	BRSMG 790A	Embrapa	14	BRSMG Garantia	Embrapa
5	BRSMG 850GRR	Embrapa	15	MG/BR 46 (Conquista)	Embrapa
6	BRS Baliza RR	Embrapa	16	BRS Silvânia RR	Embrapa
7	BRS Favorita RR	Embrapa	17	M-SOY 8001	D&PL Brasil
8	BRSGO Luziânia	Embrapa	18	M-SOY 6101	D&PL Brasil
9	M-SOY 8000RR	D&PL Brasil	19	M-SOY 8329	D&PL Brasil
10	BRSMG 68 Vencedora)	Embrapa	20	TMG123RR	TMG

¹ Cultivares resistentes (1 a 10); ² Cultivares suscetíveis (11 a 20) de acordo com Garcia e Juliatti (2012).

As progênies foram avaliadas quanto à resistência à *S. sclerotiorum* por meio do método da folha destacada (TU, 1985), quando as plantas atingiram o estágio V2 (primeiro trifólio totalmente expandido) (FEHR e CAVINESS, 1977). O trifólio foi coletado e levado ao laboratório para instalação do experimento. O trifólio foi colocado em caixas de gerbox contendo folha de papel toalha umedecidas em água destilada estéril. Antes da inoculação, o trifólio foi borrifado com água e a seguir recebeu um disco de micélio de 6 mm, com cinco dias de idade, do isolado UFLA 24. As caixas gerbox contendo os trifólios foram incubadas à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, durante 72 horas.

As avaliações foram realizadas 72 horas após a inoculação, utilizando escala diagramática adaptada de Garcia e Juliatti (2008). Os tratamentos foram classificados em 1 - imune (ausência da doença); 2- resistentes (0 a 11%); 3 - moderadamente resistentes (12 a 24%); 4 - pouco resistente (25 a 50%); 5 - suscetíveis ($S > 50\%$).

O experimento, em laboratório, foi conduzido no delineamento inteiramente casualizados (DIC), sendo que cada folíolo do trifólio constituiu uma repetição. Os dados foram avaliados por meio de análises de variância, individual e conjunta. Posteriormente o efeito de “Tratamentos” foi desdobrado em: Progênies, Populações, Progênies dentro de populações, Testemunhas e Progênies vs Testemunhas.

Foi estimada a acurácia seletiva ($r_{gg'}$) pela seguinte expressão (RESENDE, 2007):

$$r_{gg'} = \sqrt{1 - \frac{1}{F}}$$

em que:

F: Valor do teste F de Snedecor para o efeito de tratamentos na análise de variância.

Para estimativa da herdabilidade (h^2) para a seleção na média das progênies a partir da análise de variância, utilizou-se o seguinte estimador (RAMALHO et al., 2012):

$$h^2 = \frac{QMP - QME}{QMP}$$

Em que, QMP e QME correspondem às estimativas dos quadrados médios de progênies e do erro experimental, respectivamente, obtidas nas análises de variância dos dados.

Os erros associados à estimativa de h^2 foram estimados utilizando a expressão de Knapp et al.(1985):

$$LI = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{Q_1}{Q_2} \right) F_{1-\frac{\alpha}{2}} (GL_{erro} ; GL_{progênie}) \right]^{-1} \right\}$$

$$LS = \left\{ 1 - \left[\left(\frac{Q_1}{Q_2} \right) F_{\frac{\alpha}{2}} (GL_{erro} ; GL_{progênie}) \right]^{-1} \right\}$$

Foi estimado o ganho esperado com a seleção (GS) considerando as proporções de seleção de 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% e 30% dos tratamentos, com e sem as testemunhas, que apresentaram menores notas para agressividade da doença. Foi estimado ainda, um GS por população considerando 20% das progênies. Por fim, foi realizado um ranqueamento das progênies de acordo com a reação ao patógeno em cada local. A partir deste, foi estimada a correlação de Spearman para medir a correspondência na classificação das progênies.

3 RESULTADOS

O resumo da análise de variância conjunta das notas de severidade de *S. sclerotiorum* é apresentado na tabela 2. A estimativa da acurácia seletiva (r_{gg}) foi superior a 0,97, indicando uma alta precisão experimental na avaliação dos genótipos ao patógeno. Nota-se ainda, diferenças significativas entre os tratamentos e as médias das progênies quanto à resistência ao patógeno. Ou seja, as progênies avaliadas devem possuir diferentes alelos de resistência ou variabilidade para o caráter, condição indispensável para que haja sucesso com a seleção de genótipos resistentes. Como era esperado, foi detectada diferença significativa entre as testemunhas, pois foram escolhidas em função da divergência de reação ao patógeno.

A interação não significativa entre progênies x locais, indica que, sob condições controladas, as progênies foram consistentes nos dois locais. Os resultados mais expressivos foram as diferenças significativas entre progênies dentro de cada população, para todos os casos

e também o fato de não ter havido diferenças entre as populações. Uma possível explicação pode ser o pequeno número de populações utilizadas no trabalho.

Os resultados dos testes F da análise de variância são confirmados por meio das estimativas de herdabilidade (h^2) que foram de elevadas, variando de 63 a 79%. Veja que como a fonte de variação entre populações não foi significativa, a estimativa de h^2 é igual a zero. Como todas as populações apresentaram significância no teste F entre progênies, também apresentaram estimativas de h^2 diferentes de zero. Resultado confirmado por meio dos limites inferiores, que em todos os casos foram positivos, indicando que, com 95% de probabilidade, as estimativas devem ser diferentes de zero (Tabela 2). A variabilidade entre as progênies também pode ser comprovada por meio da distribuição de frequência (Figura 3).

Chama atenção que a menor estimativa de variância genética (σ^2_G) foi observada entre as progênies da população um, ou seja, que vieram de cruzamentos de genitores suscetíveis. Já a maior estimativa foi observada na população seis, onde um dos genitores é considerado uma fonte de resistência ao patógeno. Esses resultados também denotam a variabilidade existente entre as progênies.

Tabela 2. Resumo da análise de variância conjunta, variância genética (σ^2_G), estimativas de herdabilidade (h^2) e seus respectivos intervalos de confiança (LI: limite inferior e LS: limite superior), para as notas de severidade da podridão branca da haste.

FV	GL	QM	σ^2_G	LI (%)	h^2 (%)	LS (%)
Tratamentos	164	6,7464*	0,7887	61,3	70,1	77,3
Entre Progênies	144	6,9188*	0,8175	61,9	70,9	78,1
Entre Populações	5	2,4351 ^{NS}	0,0702	-115,5	0	86,3
Entre Progênies/Pop. 1	22	5,5230*	0,5848	37,5	63,5	82,0
Entre Progênies/Pop. 2	24	6,2261*	0,7020	45,5	67,7	83,5
Entre Progênies/Pop. 3	21	6,9130*	0,8165	49,5	70,9	85,9
Entre Progênies/Pop. 4	24	5,5350*	0,5868	38,7	63,6	81,5
Entre Progênies/Pop. 5	24	7,4898*	0,9126	54,7	73,1	86,3
Entre Progênies/Pop. 6	24	9,6827*	1,2781	65,0	79,2	89,4
Entre Testemunhas	19	6,4547*	-	-	-	-
Teste. Vs Progênies	1	8,1239*	-	-	-	-
Locais	1	0,9707 ^{NS}	-	-	-	-
Tratamentos x Locais	164	0,117 ^{NS}	-	-	-	-
Erro	328	2,0140				
rgg'		0,9733				

*Significativo a 5% de probabilidade; ^{NS} não significativo. Fonte: do Autor (2019).

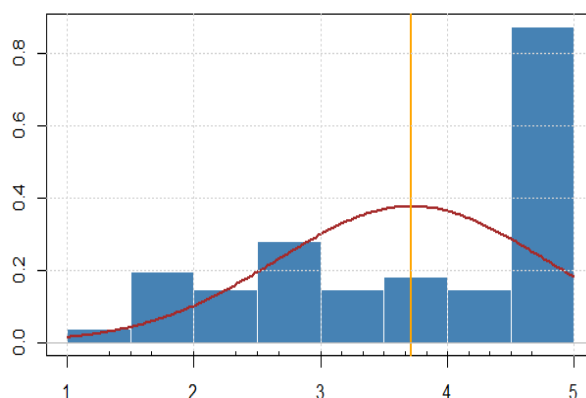


Figura 3. Distribuição de frequência para severidade da doença na média dos locais, valores em escala de notas. Fonte: do Autor (2019).

O ganho esperado com a seleção dos genótipos considerando diferentes proporções de seleção (i) foi estimado (Tabela 3). Considerando todos os tratamentos e somente as progênies, os ganhos foram menores a medida que houve um aumento de i . Note que, maiores magnitudes para o ganho esperado foram obtidas considerando apenas as progênies. Isto indica que é possível selecionar progênies mais resistentes que as testemunhas. Seguindo a mesma tendência observada para h^2 e σ_G^2 as estimativas do GS das progênies dentro de cada população também foram maiores na população seis e menores nas populações um e quatro. Deve ser enfatizado que as melhores progênies, quando se trata da avaliação em folha destacada, são as que apresentam menor valor fenotípico. Assim, quanto mais próximo de zero, mais resistentes são as progênies, por isso as estimativas de GS apresentaram magnitude negativa.

Tabela 3. Ganho esperado com a seleção dos genótipos com e sem as testemunhas e das progênies por população ($i=20\%$). Valores em escala de notas.

GS com testemunhas		GS sem testemunhas		GS por população	
i	GS	i	GS	População	GS
1%	-1,61	1%	-1,64	1	-1,00
5%	-1,44	5%	-1,49	2	-1,05
10%	-1,33	10%	-1,37	3	-1,15
15%	-1,23	15%	-1,28	4	-0,75
20%	-1,15	20%	-1,19	5	-1,24
25%	-1,07	25%	-1,10	6	-1,54
30%	-1,00	30%	-1,02	-	-

Fonte: do Autor (2019).

Os tratamentos selecionados de acordo com i , com e sem as testemunhas, estão listados na tabela 4. É possível observar que apenas quando foram selecionados 15% dos tratamentos de menores médias, uma testemunha foi listada. Esta testemunha ainda é considerada padrão de suscetibilidade (GARCIA e JULIATTI, 2012). Com i de 30%, apenas quatro testemunhas foram

selecionadas e dentre elas, uma considerada resistente. Esses resultados indicam, mais uma vez, o potencial das progênies para obtenção de linhagens resistentes à *S. sclerotiorum*.

Tabela 4. Tratamentos selecionados de acordo com as proporções de seleção (*i*), com e sem as testemunhas.

<i>i</i>	Com testemunhas	Sem testemunhas
1%	137,29.	137,29.
5%	137,29,134,44,57,106,133,18.	137,29,134,44,57,106,133,18.
10%	137,29,134,44,57,106,133,18, 41,74,96,105,120,122,124	137,29,134,44,57,106,133,18, 41,74,96,105,120,122,124.
15%	137,29,134,44,57,106,133,18,41,74,96, 105,120,122,124,135,139,144, 169 ,1,3,9.	137,29,134,44,57,106,133,18,41,74,96, 105,120,122,124,135,139,144,1,3,9,49.
20%	137,29,134,44,57,106,133,18,41,74,96,105, 96,105,120,122,124,135,139,144, 169 ,1, 3,9,49,64,115,126,149, 151,166 .	137,29,134,44,57,106,133,18,41,74,96,105, 96,105,120,122,124,135,139,144,1,3, 9,49,64,115,126,149,91,26,46.
25%	137,29,134,44,57,106,133,18,41,74,96,105, 120,122,124,135,139,144, 169 ,1,3,9,49,64, 115,126,149, 151,166,168 ,91,26,46,54,56,69.	137,29,134,44,57,106,133,18,41,74,96,105, 120,122,124,135,139,144,1,3,9,49,64,115, 126,149,91,26,46,54,56,69,71,75,79,86.
30%	137,29,134,44,57,106,133,18,41,74,96,105,120,122,124, 135,139,144, 169 ,1,3,9,49,64,115,126,149, 151,166,168 , 91,26,46,54,56,69,71,75,79,86,87,89,95,116.	137,29,134,44,57,106,133,18,41,74,96,105,120,122,124, 135,139,144,1,3,9,49,64,115,126,149,91,26,46, 54,56,69,71,75,79,86,87,89,95,116,7,35,45,78.

Testemunhas em negrito. Fonte: do Autor (2019).

Foi possível observar elevada magnitude das correlações classificatórias, ou seja, mais de 79% das progênies obtiveram a mesma classificação na comparação entre os locais e na média dos locais (Tabela 5). Confirmando que não houve interação das progênies e locais. Este resultado pode ser justificado uma vez que como a inoculação foi realizada nas folhas destacadas, houve uma padronização das condições experimentais. Assim, o ambiente em que as progênies inicialmente estavam submetidas não foi capaz de influenciar a classificação dos genótipos.

Tabela 5. Coeficientes da correlação de Spearman para os experimentos em Lavras, Ijaci e na média dos locais.

	Lavras	Ijaci	Conjunta
Lavras		0.98**	0.89**
Ijaci			0.91**
Conjunta			

** Significativo a 1% de probabilidade. Fonte: do Autor (2019).

4 DISCUSSÃO

Durante a realização de um experimento de avaliação da resistência de plantas à patógenos, a principal dificuldade é ter um ambiente de avaliação que possibilite a classificação dos genótipos. Esse ambiente de avaliação envolve a agressividade do isolado, a umidade e temperatura ambiente e os estágios de inoculação das plantas e de avaliação dos sintomas. Uma dificuldade frequentemente relatada na literatura, envolvendo *S. sclerotiorum* é a falta de

consistência na reação das cultivares, mesmo para aquelas com desempenho já conhecido, tanto na cultura da soja (VITERI et al., 2015), como para o feijoeiro (LEHNER et al, 2016). Apesar de não ser o foco do estudo, as testemunhas não apresentaram o mesmo comportamento já descrito em trabalhos anteriores (GARCIA E JULIATTI, 2012). Este fato sugere algumas hipóteses: diferenças nas condições ambientais de inoculação, diferenças na avaliação dos genótipos ou diferenças na agressividade dos isolados. Esta última merece destaque uma vez que há vários estudos que apontam variabilidade na agressividade de isolados de *S. sclerotiorum* (SILVA et al., 2014; ABREU e SOUZA, 2015; VITERI et al., 2015; WILLBUR et al., 2017 MIORINI et al., 2018).

Outra dificuldade na avaliação da severidade da doença é com relação à habilidade visual dos avaliadores em atribuir as notas. O parâmetro que melhor possibilita inferir a respeito da habilidade do avaliador é a acurácia experimental. Isto é, a coincidência na nota de severidade das mesmas progênes em repetições diferentes. Nesse trabalho, a estimativa de acurácia foi superior a 0.97, o que indica uma ótima precisão experimental (RESENDE; DUARTE, 2007). Do exposto, sob o ponto de vista da condição experimental, as progênes foram bem avaliadas, o que possibilita ter segurança nas inferências a serem feitas, a partir dos resultados obtidos.

As populações que deram origem as progênes, foram obtidas de genitores contrastantes para a reação à *S. sclerotiorum*. Assim, era esperada grande variabilidade entre as progênes. Esse fato foi comprovado por meio da magnitude dos parâmetros genéticos h^2 e σ^2_G . As estimativas de h^2 que foram de elevada magnitude, variaram de 63 a 79%. Resultados semelhantes foram obtidos para o patossistema *S. sclerotiorum*-feijão. Dias (2015) observou h^2 entre 30 e 56% ao avaliar progênes oriundas de três ciclos de seleção recorrente para mofo branco. Miklas e colaboradores (2001) e Miklas, Delorme e Riley (2003) obtiveram h^2 de 73 e 62% em avaliações em casa de vegetação e no campo, respectivamente. Leite (2014) em avaliações em condições de campo observou valores de h^2 variando entre 60 e 86%. Para a cultura da soja, Castro e equipe (2016) avaliaram 101 linhagens de soja sob condições controladas, obtiveram valores de h^2 variando de 76 a 91%.

As flutuações observadas para os parâmetros genéticos deve-se, em parte, a natureza quantitativa da resistência ao patógeno. Muitos dos alelos que controlam a resistência são responsáveis por características fenotípicas que conferem escape à doença, como por exemplo, altura de plantas e densidade da copa. Experimentos de campo para identificar resistência fisiológica são difíceis. Primeiro, nem sempre as condições ambientais são favoráveis ao desenvolvimento da doença. Segundo, a distribuição natural do inóculo não é uniforme ao longo do experimento. Terceiro, dificilmente os programas de melhoramento dispõem de uma área experimental em que é possível inocular o patógeno no campo, correndo o risco de contaminar a área por vários anos. Dessa maneira, é necessário desenvolver técnicas confiáveis de inoculação

e avaliação dos genótipos de soja, sob condições controladas para melhor elucidar a resistência fisiológica.

Na literatura são encontrados ganhos genéticos para a resistência a podridão branca da haste na cultura da soja. McCaghey e equipe (2017) relataram ganhos expressivos, dentro das populações, após três anos de avaliações para a doença, juntamente com caracteres de interesse agrônomo, como produtividade e altos teores de óleo e proteína. Este estudo demonstra ainda a importância de um trabalho integrado, que envolvam experimentos de campo, casa de vegetação e também ferramentas de biologia molecular, para desenvolver cultivares de soja resistentes à *S. sclerotiorum*.

5 CONCLUSÃO

As progênies apresentam variabilidade com relação à resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*. As progênies oriundas da população seis (BRSMG 68 - Vencedora x BRSMG Garantia) denotam o maior potencial para a obtenção de linhagens de soja com certo nível de resistência a podridão branca da haste.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M.J., SOUZA, E.A. Investigation of *Sclerotinia sclerotiorum* strains variability in Brazil. **Genet. Mol. Res.** 14(2):6879-6896, 2015
- CASTRO, L. H. S. et al. Resistance of soybean genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in different incubation environments. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 4, 2016.
- CUNHA, W. G. et al. High resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in transgenic soybean plants transformed to express an oxalate decarboxylase gene. **Plant Pathology**, v. 59, n. 4, p. 654-660, 2010.
- DIAS, J. A. Seleção recorrente em feijoeiro visando a resistência ao mofo branco. 2015. 81 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- FEHR, Walter R.; CAVINESS, Charles E. Stages of soybean development. 1977.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, Fernando C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology, Brasília, DF**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.
- GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C. Reação de genótipos de soja ao mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. **Tropical Plant Pathology** 33: 213 2008.
- GARCIA, Riccely Ávila et al. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* para triagem de cultivares de soja resistentes ao mofo-branco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 8, p. 726-729, 2015.
- JULIATTI, F. C. et al. Inoculation methods to *Sclerotinia sclerotiorum* reaction resistance on soybean. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, 2014.
- KIM, H.S.; DIERS, B.W. Inheritance of partial resistance to sclerotinia stem rot in soybean. **Crop Science** 40, 55–61, 2000.
- KNAPP, S. J.; STROUP, W. W.; ROSS, W. M. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Sci**, v. 25, p.192-194, 1985.
- LEHNER, Miller da Silva et al. Reaction of sources of resistance to white mold to microsatellite haplotypes of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 2, p. 184-188, 2016.
- LEITE, M. E. Seleção recorrente em feijoeiro visando resistência à *Sclerotinia sclerotiorum* e respostas bioquímicas associadas à defesa contra o patógeno. 2014. 153 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- MCCAGHEY, Megan et al. Development and evaluation of glycine max germplasm lines with quantitative resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 1495, 2017.
- MEYER, M.C. et al. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2015/2016: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 5 p, (Embrapa Soja. Circular Técnica, 122), 2016.

MIKLAS, Phillip N. et al. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. **Crop Science**, v. 41, n. 2, p. 309-315, 2001.

MIKLAS, Phillip N.; DELORME, Richard; RILEY, Ron. Identification of QTL conditioning resistance to white mold in snap bean. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 4, p. 564-570, 2003.

MIORINI, Thomas JJ et al. Variation in pathogen aggression and cultivar performance against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean and dry bean from Brazil and the US. **PeerJ Preprints**, v. 6, p. e26622v1, 2018.

RAMALHO, M.A.P. et al. **Aplicações da Genética Quantitativa no Melhoramento de Plantas Autógamas**.(Ed.)UFLA, 2012. 522 p.

RESENDE, M.D.V. de. **Matemática e estatística na análise de experimentos e no melhoramento genético**. Colombo: EMBRAPA Florestas. 2007. 561p.

RESENDE, M.D.V. de; DUARTE, J.B. Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.3, n. 37, p.182-194, 2007.

SILVA, P. H. et al. Reaction of common bean lines and aggressiveness of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates. **Genetic and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 9138-9151, 2014.

TU, J. C. Tolerance of white bean (*Phaseolus vulgaris*) to white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) associated with tolerance to oxalic acid. **Physiol. Plant Pathol.** 26: 111–117, 1985.

VITERI, Diego M. et al. Use of four *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different aggressiveness, three inoculations per plant, and delayed multiple evaluations to select common beans with high levels of white mold resistance. **Euphytica**, v. 204, n. 2, p. 457-472, 2015.

WILLBUR, J. F. et al. Comprehensive *Sclerotinia* stem rot screening of soybean germplasm requires multiple isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant disease**, v. 101, n. 2, p. 344-353, 2017.

YANG, Xiangdong et al. Enhanced resistance to *sclerotinia* stem rot in transgenic soybean that overexpresses a wheat oxalate oxidase. **Transgenic research**, p. 1-12, 2018.

ZHAO, X. et al. Loci and candidate gene identification for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps. **The Plant Journal**, v. 82, n. 2, p. 245-255, 2015.