

BRUNO DE ALMEIDA SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DA BASE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA PARCIAL DE
CULTIVARES DE SOJA À *Sclerotinia sclerotiorum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Felipe Lopes da Silva

Coorientadores: Renan Cardoso Lima
Rogério Faria Vieira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S676i
2022
Soares, Bruno de Almeida, 1993-
Identificação da base genética da resistência parcial de
cultivares de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*: / Bruno de
Almeida Soares. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (55 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Felipe Lopes da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Agronomia, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.730>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Soja - Seleção - Melhoramento genético. 2. Soja -
Resistência a doenças e pragas. 3. Mofo-branco. I. Silva, Felipe
Lopes da, 1981-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento. III. Título.

CDD 22. ed. 633.343

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

BRUNO DE ALMEIDA SOARES

**IDENTIFICAÇÃO DA BASE GENÉTICA DA RESISTÊNCIA PARCIAL DE
CULTIVARES DE SOJA À *Sclerotinia sclerotiorum***

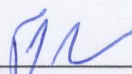
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 29 de agosto de 2022.

Assentimento:



Bruno de Almeida Soares
Autor



Felipe Lopes da Silva
Orientador

A todos os professores e amigos que contribuíram para meu aprendizado.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e pelas graças concedidas até este momento, e as que ainda estão por vir.

À minha esposa Andressa, por todo o amor, apoio e paciência durante toda a pós-graduação.

Aos meus pais Cláudio e Suelene e ao meu irmão Gabriel pelo amor incondicional, apoio e torcida durante todos os anos da minha vida.

À toda minha família, que sempre torcerem pela minha vitória.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor, amigo e orientador Dr. Felipe Lopes da Silva pela paciência, ensinamentos, entusiasmo, vibração, amizade e confiança para realização deste trabalho.

À EPAMIG SUDESTE pelo espaço concedido para realização dos trabalhos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de Doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento - 001, para realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao Programa Soja.

Ao professor Dr. Renan Cardoso Lima e Dr. Rogério Faria Vieira, pela amizade e pelos bons conselhos.

Aos amigos do Programa Soja Guilherme, Martha, Murilo, Maikon, Ramon, Isabella, Lorena Moura, Fernanda, Ciene, Dalton, Heloisa, Lucas, João Marcos, Lorena Lara, Nathan, Itamar, Bruno, Michel, Rafael, Odimar, Francisco, Cleiton e Raphael por tornar a trajetória mais leve e divertida, além de agregar muito conhecimento.

A todos os professores da graduação e da pós-graduação que fizeram parte da minha formação profissional e que ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

MUITO OBRIGADO!

“Tudo posso Naquele que me fortalece.”

(Filipenses 4:13)

RESUMO

SOARES, Bruno de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Identificação da base genética da resistência parcial de cultivares de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. Orientador: Felipe Lopes da Silva. Coorientadores: Renan Cardoso Lima e Rogério Faria Vieira.

A podridão branca da haste (PBH), causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é uma das doenças mais importantes da soja em âmbito mundial. Muitos estudos têm sido realizados para identificar genótipos com alta resistência parcial à PBH. A resistência parcial é a associação entre a resistência fisiológica atribuída a cada genótipo de soja somado aos mecanismos de escape que auxiliam a desfavorecer o patógeno. Assim, o objetivo deste trabalho foi: avaliar a resistência fisiológica no processo de germinação de plântulas de soja e durante o estágio V4; verificar os possíveis genes associados em ambos os tempos de inoculação por meio de marcadores *single nucleotide polymorphism* (SNPs) via associação genômica ampla (GWAS); checar se em ambos os tempos de inoculação, nas sementes e no estágio vegetativo, os mesmos marcadores foram identificados; e selecionar genótipos com alta resistência parcial no campo por meio dos índices de seleção multivariados MGIDI e FAI-BLUP. Foram conduzidos dois ensaios em casa de vegetação com 100 cultivares de soja e dois tratamentos de inoculação, sendo um ensaio com o tratamento denominado inoculado (presença do fungo no tegumento da semente) e um ensaio com o tratamento denominado controle (ausência do fungo no tegumento da semente); um ensaio com as mesmas 100 cultivares de soja inoculadas no estágio vegetativo V4; dois ensaios de campo com 20 cultivares inoculados com suspensão de ascósporos. Os resultados mostraram diferentes SNPs entre as avaliações no processo de germinação e as avaliações no estágio vegetativo. Genes putativos nos cromossomos 3, 6, 10 e 14 foram encontrados em nosso estudo e são passíveis de validação. Contudo, os SNPs diferentes associados a cada tempo de inoculação nos indicou uma possível mudança de resposta no processo de resistência da soja contra *S. sclerotiorum*. Nos ensaios de campo, quatro cultivares foram selecionadas tanto pelo índice MGIDI quanto pelo índice FAI-BLUP, se mostrando promissoras para cenários de baixa pressão da doença. Estes resultados fornecem informações importantes para programas de melhoramento que visam aumentar a resistência parcial da soja contra *S. sclerotiorum*.

Palavras-chave: *Glycine max*. Mofo branco. Índice de seleção. Melhoramento genético. Resistência quantitativa.

ABSTRACT

SOARES, Bruno de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2022. **Identification of genetic base of soybean cultivars partial resistance against *Sclerotinia sclerotiorum***. Adviser: Felipe Lopes da Silva. Co-advisers: Renan Cardoso Lima and Rogério Faria Vieira.

Sclerotinia stem rot (SSR), caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, is one of the most important soybean diseases worldwide. Many studies have been carried out to identify genotypes with high partial resistance to SSR. Partial resistance is the association between the physiological resistance attributed to each soybean genotype added to the escape mechanisms that help to disfavor the pathogen. Thus, the objective of this work was: to evaluate the physiological resistance in the germination process of soybean seedlings and during the V4 stage; to verify the putative genes at both inoculation times using single nucleotide polymorphism markers (SNPs) via genome-wide association (GWAS); check if at both inoculation times, in the seeds and in the vegetative stage, the same markers were identified; and to select genotypes with high partial resistance in the field using the MGIDI and FAI-BLUP multivariate selection indexes. Two trials were carried out in a greenhouse with 100 soybean cultivars and two inoculation treatments, one test with the treatment called inoculated (presence of the fungus in the seed coat) and a trial with the treatment called control (absence of the fungus in the seed coat); a trial with the same 100 soybean cultivars inoculated at the V4 vegetative stage; two field trials with 20 cultivars inoculated with ascospore suspension. The results showed different SNPs between the evaluations in the germination process and the evaluations in the vegetative stage. Putative genes on chromosomes 3, 6, 10 and 14 were found in our study and are subject to validation. However, the different SNPs associated with each inoculation time indicated a possible change in the response in the soybean resistance process against *S. sclerotiorum*. In field trials, four cultivars were selected by both the MGIDI index and the FAI-BLUP index, proving to be promising for low disease pressure scenarios. These results provide important information for breeding programs aimed at increasing soybean partial resistance against *S. sclerotiorum*.

Keywords: *Glycine max.* White mold. Selection index. Genetic breeding. Quantitative resistance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	9
2. REFERÊNCIAS	11
CAPÍTULO 1 - DIFFERENCE RESPONSE TO SOYBEAN PARTIAL RESISTANCE AGAINST <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> IN GERMINATION AND VEGETATIVE INOCULATION.....	
3. ABSTRACT	14
4. INTRODUCTION.....	14
5. MATERIAL AND METHODS	15
6. RESULTS.....	17
7. DISCUSSION	22
8. CONCLUSION	25
9. REFERENCES.....	25
CAPÍTULO 2 - SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA COM RESISTÊNCIA PARCIAL À PODRIDÃO BRANCA DA HASTE POR MEIO DE ÍNDICES MULTIVARIADOS.....	
10. RESUMO	31
11. INTRODUÇÃO.....	31
12. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Ensaio de Casa de Vegetação.....	33
Ensaio de campo.....	34
Análise estatística	36
13. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
Ensaio de casa de vegetação.....	38
Ensaio de campo.....	39
14. CONCLUSÃO.....	49
15. REFERÊNCIAS	49
16. CONCLUSÕES GERAIS	55

1. INTRODUÇÃO GERAL

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das commodities mais importantes mundialmente. Neste cenário, o Brasil tem grande importância, pois produz 123.829,5 mil toneladas, com produtividade média de 3.026 kg/ha na safra de 2021/2022 (CONAB, 2022).

O melhoramento genético possibilitou o aumento da produção da soja de forma significativa ao longo dos anos, visando principalmente o alto rendimento como característica principal (Al-khayri *et al.* 2019). Ademais, outros focos no melhoramento da soja também possibilitaram o aumento expressivo da produção e produtividade, como o melhoramento para resistência à doenças (Lin *et al.* 2022).

Várias doenças acometem a cultura da soja. Dentre elas, destaca-se a podridão branca da haste (PBH), causada pelo agente etiológico *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Este fungo possui uma ampla gama de hospedeiros, além de possuir estruturas de resistência, chamadas de escleródios, que dificultam a erradicação do patógeno de áreas já infestadas (Willbur *et al.* 2019). Além disso, trata-se de um fungo necrotrófico que lança mão de metabólitos e substâncias como o ácido oxálico para matar as células do hospedeiro e posteriormente coloniza-las (Xu *et al.* 2018). Esse processo dificulta a resposta de resistência por parte do hospedeiro e provavelmente é o principal fator responsável pela falta de imunidade à *S. sclerotiorum*.

A PBH é altamente influenciada pelo ambiente (Peltier *et al.* 2012, Willbur *et al.* 2019). O manejo da PBH é realizado então por um conjunto de estratégias que auxiliam a diminuir a ocorrência da doença como baixa população de plantas, espaçamento entre linhas adequado, bom controle de ervas daninhas, modelos preditivos de ocorrência da doença, rotação de culturas, uso de fungicidas químicos e biológicos e utilização de cultivares resistentes (Hoffman *et al.* 2002, Mueller *et al.* 2002, Rousseau *et al.* 2007, Peltier *et al.* 2012, Willbur *et al.* 2019). Entre todas essas estratégias, a utilização de cultivares com resistência parcial se destaca cada vez mais por proporcionar maiores ganhos econômicos, além de serem sustentáveis.

Entender quais genes e regiões no genoma da soja são responsáveis pela resistência à PBH é primordial para programas de melhoramento. Estudos têm mostrado que existem loci no genoma da soja responsáveis pela resistência parcial à *S. sclerotiorum* (Kim and Diers 2000, Bastien *et al.* 2014, Lou *et al.* 2015, Wu *et al.* 2016, Moellers *et al.* 2017, Wei *et al.* 2017, Boudhrioua *et al.* 2020). Esses estudos ainda mostram que tais loci tem efeitos inferiores à 20%

da expressão fenotípica dos genótipos que apresentam os alelos de resistência. Contudo, não é conhecido se a expressão de tais loci são contínuas ao longo de todo o desenvolvimento da soja.

A busca por genótipos de soja com resistência parcial de campo à PBH no campo também tem sido realizada (Hoffman *et al.* 2002, Juliatti *et al.* 2013, Willbur *et al.* 2017, Webster *et al.* 2021). Contudo, *S. sclerotiorum* é um fungo habitante de solo e a ocorrência da doença no campo normalmente se dá em reboleiras (Peltier *et al.* 2012). A dispersão desuniforme de *S. sclerotiorum* em campos experimentais pode dificultar a seleção acurada de bons genótipos, pois não há garantia da mesma quantidade de inóculo em todas as parcelas experimentais. No entanto, o uso da suspensão de ascósporos como metodologia de inoculação tem sido utilizada e pode garantir que todas as parcelas experimentais recebam a mesma quantidade de inóculo (Huzar-Novakowski and Dorrance 2018).

A seleção de genótipos com resistência parcial à PBH pode ser assistida pela seleção de características que podem auxiliar a reduzir a quantidade de doença no campo, como a altura de planta, pouco acamamento, menor fechamento de entrelinhas, entre outras características (Peltier *et al.* 2012, Willbur *et al.* 2019). Contudo, várias destas características se correlacionam positivamente com a quantidade da doença e com a produtividade, o que gera transtornos para ganhos de seleção equilibrados. Para sanar este problema, o uso de índices de seleção multivariados baseados em análises de fatores como o índice multivariado de distância genótipo-ideótipo (MGIDI) e o índice FAI-BLUP tem gerado ganhos de seleção preditos satisfatórios e equilibrados para grande parte das características em estudo (Rocha *et al.* 2018, Olivoto and Nardino 2020).

Os objetivos deste trabalho foram: verificar como é a resposta de resistência da soja em diferentes momentos de desenvolvimento e selecionar cultivares com maior resistência parcial à PBH por meio dos índices multivariados MGIDI e FAI-BLUP. Os objetivos específicos foram: (a) avaliar a reação de genótipos de soja inoculados com o fungo *S. sclerotiorum* em sementes e em fase vegetativa, (b) verificar genes putativos por GWAS para resistência parcial à SSR, (c) verificar se os genes putativos em ambos os tempos de inoculação são o mesmo na soja, (d) avaliar a eficiência da metodologia de suspensão de ascósporos, e (e) selecionar cultivares com resistência parcial à *S. sclerotiorum* para serem utilizadas em programa de melhoramento para PBH .

2. REFERÊNCIAS

- Al-khayri JM, Mohan S and Dennis J (2019) **Advances in Plant Breeding Strategies : Legumes.**
- Bastien M, Sonah H and Belzile F (2014) Genome Wide Association Mapping of Resistance in Soybean with a Genotyping-by-Sequencing Approach. **The Plant Genome 7: 0.**
- Boudhrioua C, Bastien M, Torkamaneh D and Belzile F (2020) Genome-wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean using whole-genome resequencing data. 1–9.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: Grãos – Safra 2021/22, 11º Levantamento. Volume 9, Número 11, Agosto 2022, Brasília, 110 p.
- Hoffman DD, Diers BW, Hartman GL, Nickell CD, Nelson RL, Pedersen WL, Cober ER, Graef GL, Steadman JR, Grau CR, Nelson BD, del Rio LE, Helms T, Anderson T, Poysa V, Rajcan I and Stienstra WC (2002) Selected Soybean Plant Introductions with Partial Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease 86: 971–980.**
- Huzar-Novakowiski J and Dorrance AE (2018) Ascospore Inoculum Density and Characterization of Components of Partial Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. **Plant Disease 102: 1326–1333.**
- Juliatti FC, Caires AM, Julliatti BCM and Borin MR (2013) REACTION OF TRANSGENIC AND CONVENTIONAL SOYBEAN GENOTYPES TO STEM ROT. **Bioscience Journal 29: 921–931.**
- Kim HS and Diers BW (2000) Inheritance of partial resistance to *sclerotinia* stem rot in soybean. **Crop Science 40: 55–61.**
- Lin F, Satish S, Caio C, Vieira C, Paulo M, Silva D, Rojas A, Lee D, Liu N, Mariano E, Lee PY, Dong Z, Baldin J, Leonardo P, Ploper D, Rupe J, Chen P, Wang D, Nguyen HT, Lin F, Chhapekar SS, Vieira CC, Paulo M, Silva D, Rojas A and Lee D (2022) **Breeding for disease resistance in soybean : a global perspective.** Springer Berlin Heidelberg.

- Lou Q, Chen L, Mei H, Wei H, Feng F, Wang P, Xia H, Li T and Luo L (2015) Quantitative trait locus mapping of deep rooting by linkage and association analysis in rice. **Journal of Experimental Botany** **66**: 4749–4757.
- Moellers TC, Singh A, Zhang J, Brungardt J, Kabbage M, Mueller DS, Grau CR, Ranjan A, Smith DL, Chowda-Reddy R V. and Singh AK (2017) Main and epistatic loci studies in soybean for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance reveal multiple modes of resistance in multi-environments. **Scientific Reports** **7**: 3554.
- Mueller DS, Sciences C, Dorrance AE, Hartman GL, Ars U, Bradley CA and Pedersen WL (2002) Efficacy of Fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and Their Potential for Control of *Sclerotinia* Stem Rot on Soybean. **Plant Disease** **86**.
- Olivoto T and Nardino M (2020) MGIDI: a novel multi-trait index for genotype selection in plant breeding. **bioRxiv** 2020.07.23.217778.
- Peltier AJ, Bradley CA, Chilvers MI, Malvick DK, Mueller DS, Wise KA and Esker PD (2012) Biology , Yield loss and Control of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. 1–7.
- Rocha JR do AS de C, Machado JC and Carneiro PCS (2018) Multitrait index based on factor analysis and ideotype-design: proposal and application on elephant grass breeding for bioenergy. **GCB Bioenergy** **10**: 52–60.
- Rousseau G, Rioux S and Dostaler D (2007) Effect of crop rotation and soil amendments on *Sclerotinia* stem rot on soybean in two soils.
- Webster RW, Roth MG, Reed H, Mueller B, Groves CL, McCaghey M, Chilvers MI, Mueller DS, Kabbage M and Smith DL (2021) Identification of Soybean (*Glycine max*) Check Lines for Evaluating Genetic Resistance to *Sclerotinia* Stem Rot. **Plant Disease**.
- Wei W, Mesquita ACO, Figueiró A de A, Wu X, Manjunatha S, Wickland DP, Hudson ME, Juliatti FC and Clough SJ (2017) Genome-wide association mapping of resistance to a Brazilian isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean genotypes mostly from Brazil. **BMC Genomics** **18**: 849.
- Willbur J, McCaghey M, Kabbage M and Smith DL (2019) An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. **Tropical Plant Pathology** **44**: 3–11.

- Willbur JF, Ding S, Marks ME, Lucas H, Grau CR, Groves CL, Kabbage M and Smith DL (2017) Comprehensive Sclerotinia Stem Rot Screening of Soybean Germplasm Requires Multiple Isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease** **101**: 344–353.
- Wu J, Zhao Q, Liu S, Shahid M, Lan L, Cai G, Zhang C, Fan C, Wang Y and Zhou Y (2016) Genome-wide Association Study Identifies New Loci for Resistance to Sclerotinia Stem Rot in *Brassica napus*. **Frontiers in Plant Science** **7**: 1–12.
- Xu L, Li G, Jiang D and Chen W (2018) *Sclerotinia sclerotiorum* : An Evaluation of Virulence Theories.

CAPÍTULO 1 - DIFFERENCE RESPONSE TO SOYBEAN PARTIAL RESISTANCE AGAINST *Sclerotinia sclerotiorum* IN GERMINATION AND VEGETATIVE INOCULATION

3. ABSTRACT

Sclerotinia stem rot (SSR) is an important disease in soybean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. There is a gap in understanding the response of partial resistance to SSR in different soybean phenological stages. We investigate the effects of time of inoculation on soybean genotypes for assessing their physiological resistance to SSR. In addition, the putative genes involved in the defense response against this fungus was assessed using genome-wide association studies (GWAS). The results showed that time of inoculation affected the response of genotypes in each evaluation. The GWAS showed different significant markers to the time of inoculation. Putative genes on chromosomes 3, 6, 10, and 14 were found in our study. The results indicate that there is genetic variability to SSR partial resistance response in soybean seeds and in soybean plants. However, this variability changes for both stages of evaluation, indicating one possible difference in the process of soybean partial resistance against *S. sclerotiorum*.

4. INTRODUCTION

Sclerotinia stem rot (SSR) is a disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary which can infect plants and soybean seeds causing yield loss and low quality of seeds (Hartman et al., 1998; Mueller et al., 1999). There are no soybean genotypes completely resistant to *S. sclerotiorum*. However, works have reported partial resistance of soybean genotypes when infected by the fungus in plants (Kim and Diers, 2000; McCaghey et al., 2017; Vuong et al., 2008; Willbur et al., 2019).

Seed quality is an important factor for soybean establishment (Bewley et al., 2013) as initial growth, plant uniformity and grain yield (Ebene et al., 2020) . A high infection rate of SSR in soybean seeds may affect the germination and the emergence of seedlings, causing yield loss (Hartman et al., 2016).

Infected seeds, sclerotia and ascospores are the main forms of *S. sclerotiorum* dissemination (Henneberg et al., 2012). This fungus generally infects pods during the process of colonization and the mycelium stay dormant in the seeds until favorable conditions to its development (Yang et al., 1998). When the conditions are appropriated, the mycelium grows, new sclerotia are formed and the inoculum increases in the area. The fungus may hinder germination, seedling emergence, and plant development (Carvalho et al., 2016). Therefore,

soybean genotypes with low seed transmission rate should be used for the cultivation, in addition to plants more tolerant to infection. Studies identifying the effects of this pathogen to the genetic variability of genotypes and the seed quality level to SSR are still incipient.

Molecular studies have been performed to detect markers and resistant genes for SSR. As result of these studies, Quantitative Trait Loci (QTLs) were found on several chromosomes when the plants were infected in either vegetative or reproductive stages (Bastien et al., 2014; Kandel et al., 2018; Vuong et al., 2008; Wei et al., 2017). Single Nucleotide Polymorphic markers (SNPs) have been used to make genome-wide association studies (GWAS) and identify new QTLs and genes. However, there is no study that demonstrate genetic variability between genotype for seed quality caused by *S. sclerotiorum* on seed, and there is not much knowledge about resistance in different stages of soybean for SSR. Hence, this study aimed to: (a) assess reaction of soybean genotypes inoculated with the fungus *S. sclerotioum* on seeds and on vegetative stage, (b) verify putative genes by GWAS for SSR partial resistance, and (c) check if the putative genes at both times of inoculation are the same in soybean.

5. MATERIAL AND METHODS

We conducted a trial in a laboratory in which soybean seeds were inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and a trial in a greenhouse in which the inoculation of this pathogen was performed at the V4 stage of the soybean. One-hundred soybean genotypes were evaluated. These genotypes were cultivated, and seeds were obtained in the season 2018/2019.

For the seed inoculation trial, the seeds were disinfected with sodium hypochlorite (1%) for 1-minute, rinsed for 30 seconds and dried at environmental temperature for 24 hours. Then, the seeds were inoculated using petri dishes containing mycelium of *S. sclerotiorum* in the surface of the Potato Dextrose Ágar (PDA). We used the isolate Ss - Formosa-GO which belongs to the most prevalent mycelial compatibility group in Brazil was used (Lehner et al., 2015).

The seeds were sown in trays containing the commercial substrate Tropstrato HT Hortaliça (Vida Verde, Mogi-Mirim, SP, Brazil). The set of trays was kept in a greenhouse. A randomized block design with four repetitions was used. of twenty seeds for each plot.

In both trials we evaluated germination, abnormal seedling, germination speed index (GSI), and plant dry weight. For the germination test, the seeds of each genotype were sown in 4 repetitions of 20 seeds for each repetition. To prevent the *S. sclerotinia* inoculum from meeting the seeds used for control trial, the seeds from each trial were sown in different trays.

Fourteen days after sowing, the germination percentage was evaluated by counting number of germinated seeds. Plants that with all essential structures and no abnormalities were considered germinated.

The *abnormal seedlings* were evaluated during the germination test. Fourteen days after sowing, the number of abnormal seedlings was counted. The absence of any of their essential structures as root, stem and leaves or folding, negative geotropism and signs of loss of viability, were considered abnormal.

The *GSI* was evaluated during the germination test. The number of seedlings emerged was performed daily until the 14th day after sowing. The germination speed index was calculated as proposed by Maguire (1962).

The *plant dry weight* was evaluated by standardizing the weight in milligrams of each genotype according to the number of normal seedlings that this genotype obtained.

For the plant inoculation trial, the straw test method was used (Auclair et al., 2004). In this test, soybean plants at the V4 stage were inoculated with the isolate of *S. sclerotiorum*. We evaluated the lesion length on the main stem at 3, 7, 10 and 14 days after inoculation (DAI). A randomized block design with tree repetitions of two plants per plot was used.

A genome-wide association study was performed with the mean of each genotype for all variables within each trial. All SNP markers were used to obtain the kinship matrix in the Tassel software (Bradbury et al., 2007). The population structure described by Contreras-Soto et al. (2017) was used.

We excluded SNP markers with a call rate < 0.8 and minor-allele frequency (MAF) < 0.01. In the end, we obtained 4268 SNPs for the analysis. The Compressed Mixed Linear Model (MLM) was used (Zhang et al., 2010) to obtain the association between the genomic data and the phenotype data using the software R (R Core Team, 2020). Thus, both the kinship matrix and the population structure Q matrix were used in the GWAS. The Genome Association and Prediction Integrated Tool (GAPIT) package of the R analytical platform was used. The model was:

$$y = Ws + Qm + Zu + e$$

where “y” is a vector of phenotype observations; “s” is the vector of SNP marker effect (fixed effect); “m” is the vector of population structure (fixed effect); “u” is the polygenic effect considering the additive variance (random effect); W, Q and Z are the incidence matrices for “s”, “m” and “u”, respectively; and “e” is the random error. Vectors “u” and “e” are assumed to be normally distributed with a null mean and variance:

$$V \begin{pmatrix} u \\ e \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} G & 0 \\ 0 & R \end{pmatrix}$$

where $G = \sigma^2_a K$, with σ^2_a as the additive genetic variance and K as the kinship matrix; and $R = \sigma^2_e I$ with σ^2_e as the residual variance and I as the identity matrix. We considered significant those SNPs with $-\log_{10}(\text{p-value}) > 2.5$.

ANOVA was used to evaluate the effect of genotypes. The means were grouped using the Scott-Knott test at 5% probability. The correlation analysis by Pearson was used to determine the relationship between each pair of traits using the R Core Team (2020).

These association data were used on the assignment to genes with a multi-gene approach on the NCBI soybean genome browser (Ref Seq assembly accession: GCF_000004515.5) (O'Leary et al., 2016). Soybean genes within 4000 bp upstream and 4000 bp downstream from the marker were included in the network analysis. The distance was defined according to the furthestmost genes found from the significant loci and applied to the remaining markers. The genes found were confirmed in Soybase (Grant et al., 2010), a complete data base of soybean.

6. RESULTS

For both trials (seed and plant inoculation), genotype affected germination, germination speed index and plant dry weight significantly ($p < 0.001$). However, genotype did not affect abnormal seedling ($p = 0.064$).

The germination of seeds from no inoculated seeds trial formed three groups (Figure 1a), indicating differences in initial seed quality among genotypes. To minimize this difference among genotypes, we excluded the genotypes that belonged to the lower germination group to perform the GWAS.

In the seed inoculated trial, genotypes formed four groups (Figure 1b). This result means that the fungus probably affected germination rate of genotypes. In addition, mean germination percentage in the plant inoculation trial was either equal or greater than that in the inoculated seed trial, suggesting that germination was negatively affected by the pathogen.

The genotypes differed for GSI and plant dry weight ($p < 0.001$) for the inoculated trial. There was no difference between control and inoculated trial for 12 genotypes to GSI and dry mass per plant. Seven genotypes showed GSI below 1.0 in the non-inoculated trial and 64 genotypes showed GSI below 1.0 in the inoculated trial. For individual plant dry weight, eight genotypes weighed less than 0.15 mg in the non-inoculated trial and 21 genotypes weighed less than 0.15 mg in the inoculated trial. These data show the tendency to decrease the initial growth

of seedlings in inoculated trial compared with the no inoculated trial. However, there were genotypes that remained with high GSI and dry mass per plant.

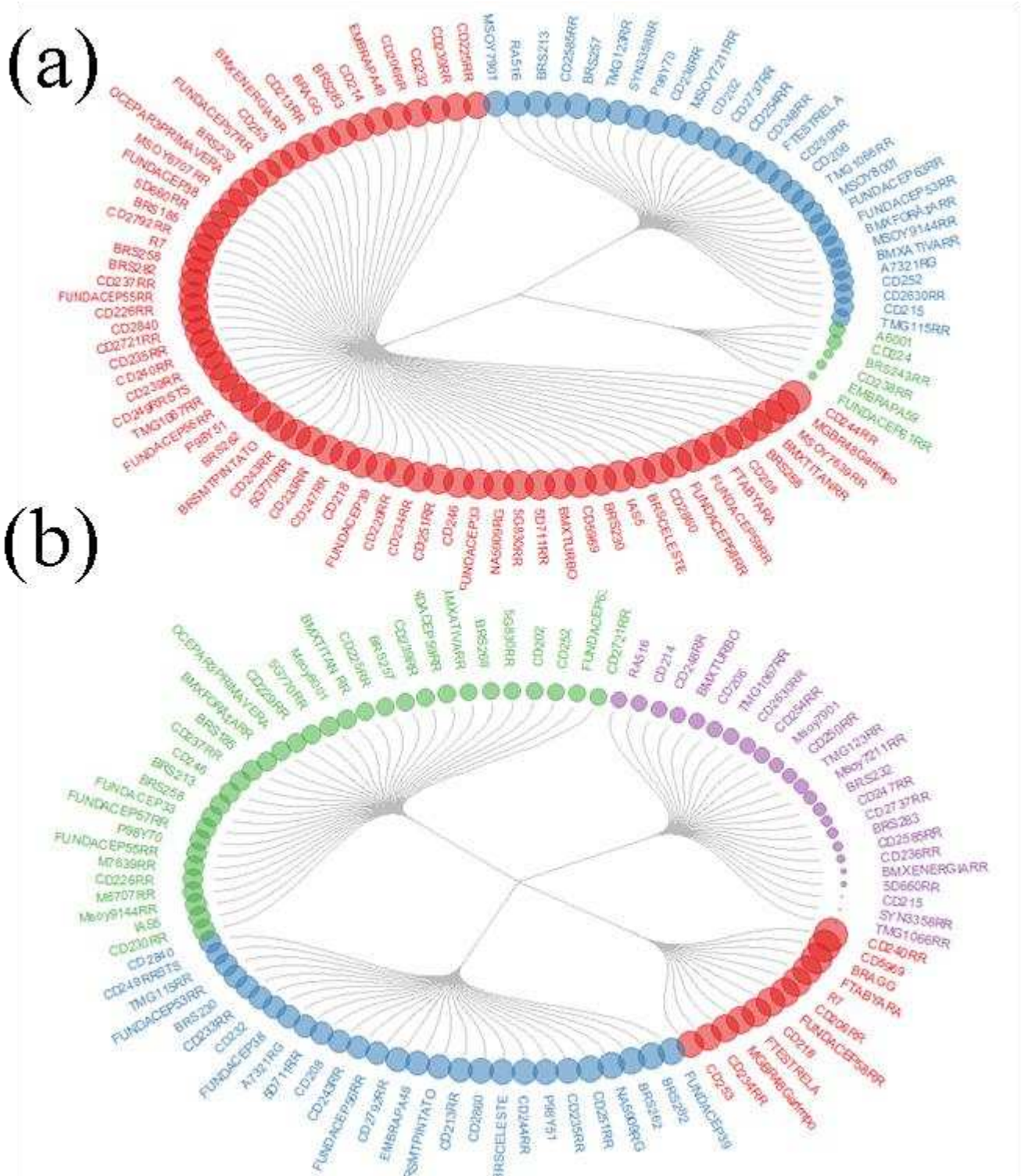


Figure 1 – Groups of germination in either (a) non-inoculated seeds and (b) seed inoculation trial. The size of each circle represents the mean for each genotype. Each color represents one group formed by the Scott Knott test at 5% of significance.

In the inoculation at the V4 stage, genotypes did not affect ($p = 0.68$) the lesion length at 3 DAI, but affected this variable at 7, 10 and 14 DAI ($p < 0.001$). Three groups of genotypes were formed for lesion length at 7 and 10 DAI, and seven groups of genotypes for lesion length at 14 DAI.

The correlation between germination and GSI was very high ($p < 0.001$) (Figure 3). Plant dry weight had a non-significant correlation with other seed traits. The correlation between lesion length at 10 and lesion length at 14 DAI was high ($p < 0.05$). Lesion length at 7 and 10 DAI had a moderate correlation ($p < 0.05$). The other correlations between seed traits (germination, GSI and plant dry weight) and lesion length at 7, 10 and 14 DAI was non-significant.

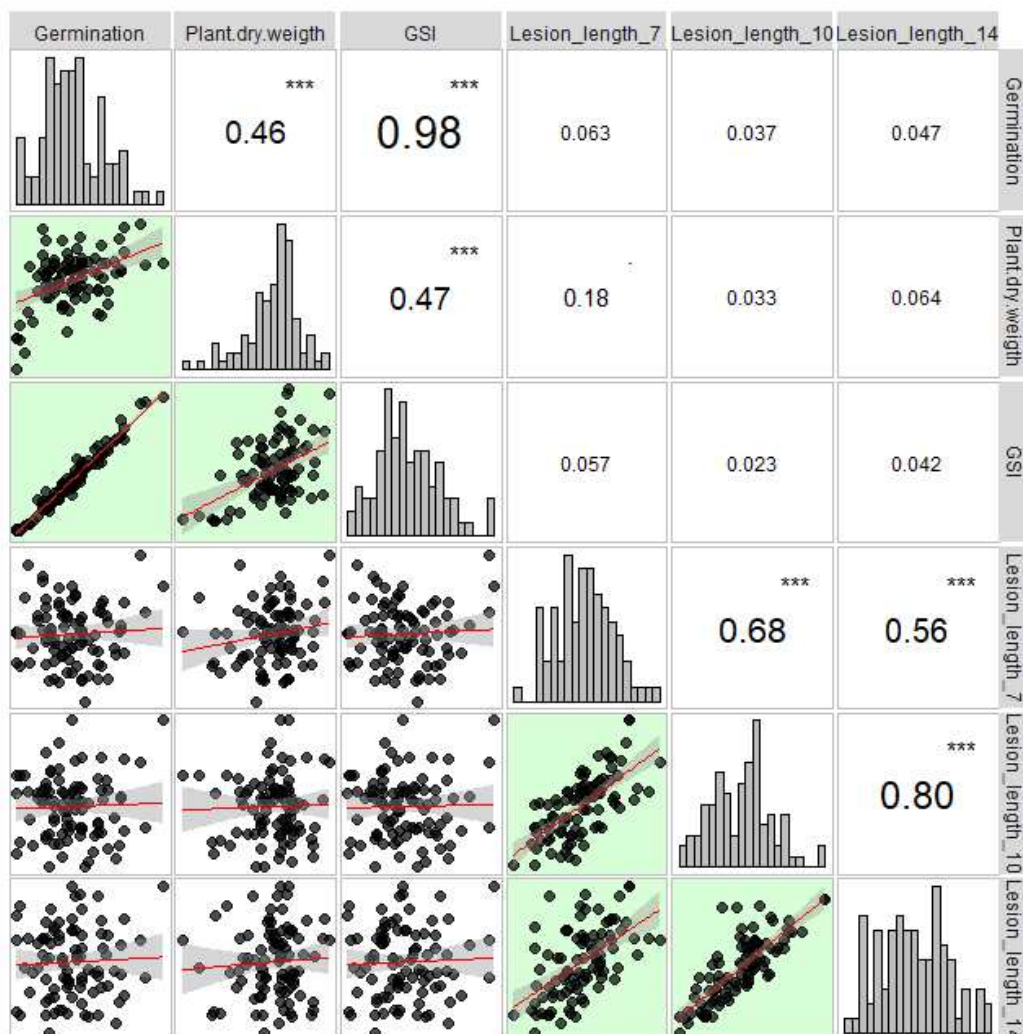


Figure 3 - Pearson correlation between each pair of six variables. The square box below the diagonal was colored to show significance ($p \leq 0.05$).

We found 10 significant SNPs for germination, three for plant dry mass and eight for GSI (Figure 4). Most significant SNPs for germination and GSI are located on chromosomes 3, 6, 12, and 14 (Figure 3). The markers located on chromosomes 6 and 14 were significant for both variables. The SNP markers for plant dry mass are located on chromosomes 3, 5 and 9.

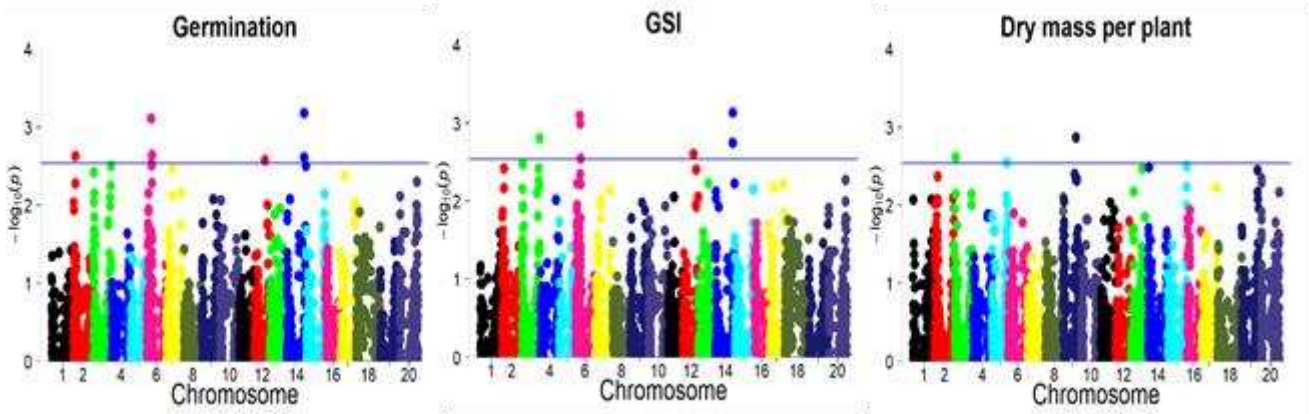


Figure 4. Manhattan plot of GWAS for germination, germination speed index (GSI) and plant dry weight. The significant SNPs associated with the trait ($p > 2.5 \times 10^{-3}$) are distinguished by the threshold line.

We identified significant SNPs on chromosomes 3, 5, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17 and 18 at the V4 stage evaluation (Figure 5). GWAS revealed several peaks of SNPs on different chromosomes in lesion length at 7, 10 and 14 DAI. We did not perform GWAS at 3 DAI because there was non-significant difference among genotypes for lesion length on this early evaluation.

The search for genes in the soybean genome revealed 13 putative genes and 1 possible transcription factor that may be related to the partial physiological resistance to SSR (Table 2). The majority putative genes that found were associated with germination and GSI. MIR1517, the transcription factor, was observed on chromosome 14 for germination and GSI.

The variation of SNP1386, SNP3723, SNP3727 was generally significantly different by the t-Student test (Table 1). These SNPs showed that the potential to increase these seed parameters is considerable. The GSI, for example, increased 60% when the change G by A

occurred on SNP1386. On the other hand, only the SNP2664 was significant for lesion length at 10 and 14 DAI, decreasing the lesion in 10 and 16 %, respectively.

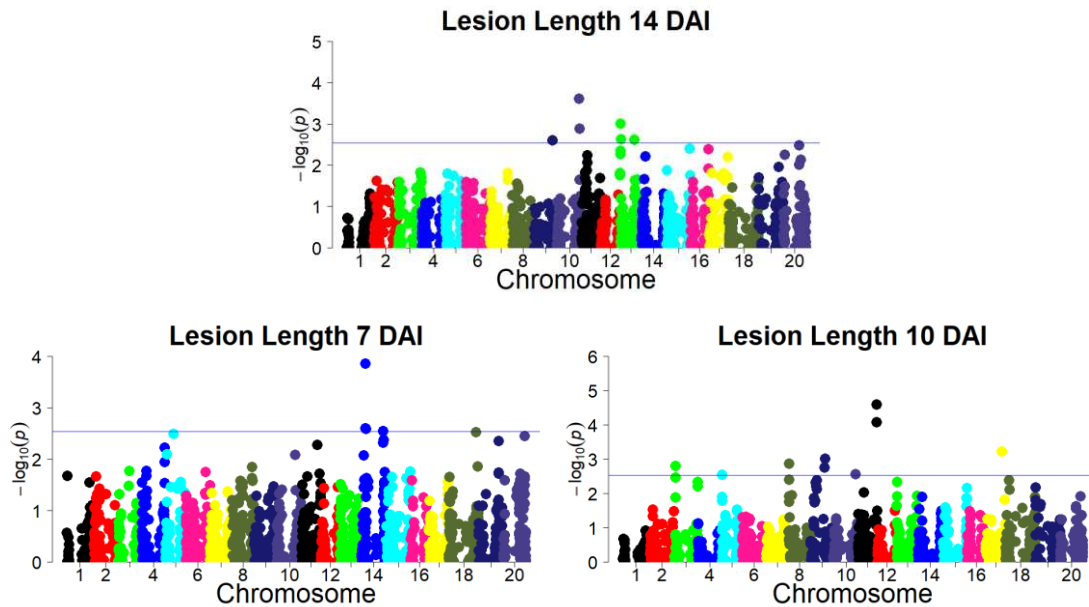


Figure 5 – Manhattan plot of GWAS for lesion length at 7, 10 and 14 days after inoculation (DAI). The significant SNPs associated with the trait ($p > 2.5 \times 10^{-3}$) are distinguished by the threshold line.

Table 1 – Average to each single nucleotide polymorphic of plant number germinated (Germination), germination speed index (GSI), lesion length at 10 days after inoculation (LL_10) and lesion length at 14 days after inoculation (LL_14)

	Chrom	Position	Allele	Trait			
				Germination	GSI	LL_10	LL_14
SNP1386	6	11948808	A	6.88 a*	1.04 a*		
			G	4.38 b	0.65 b		
SNP3723	14	44410612	C	9.75 a*	1.48 a*		
			T	5.76 b	0.87 b		
SNP3737	14	44899572	T	10.25 a*	1.50 a*		
			G	5.70 b	0.86 b		
SNP2664	10	45608453	G			22 a *	32 a *
			A			19.99 b	27 b

* Means followed by a different letter differ significantly for each allele substitution by the student's t test at $p < 0.05$.

7. DISCUSSION

In this study, we used 100 genotypes to analyze the variability of the soybean genotypes to physiological resistance to SSR. From these 100 genotypes, we used 94 to test the pathogen reaction on seed germination and vigor and to perform genome-wide association studies. Our intention was to identify variance between genotypes at different times of inoculation and to identify putative genes involved with resistance to SSR.

The variability among genotypes for seed variables inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* has not been studied yet. However, Carvalho et al. (2016) concluded that the inoculation of fungus in the seeds was efficient to evaluate difference between genotypes. Thus, we observed that the variance of some variables of germination was different in this study. On the other hand, the variability of genotypes for lesion length has been measured to evaluate SSR partial resistance (Auclair et al., 2004; Huzar-Novakowski and Dorrance, 2018; Kandel et al., 2018; Wei et al., 2017). We evaluated inoculation: in seeds and in the V4 stage. Seed variables had a different response if compared with lesion length at 7, 10 and 14 DAI.

The search for genotypes with partial physiological resistance is necessary. We observed the tendency of most genotypes to decrease germination and vigor due to fungus inoculation (Figure 1 and 2). However, the variability observed in our study indicates that it is possible to select genotypes for partial resistance to SSR, even considering the complex dependencies on the method of the fungus inoculation

Several studies showed QTLs for SSR partial resistance to SSR in soybean, mainly inoculating plants during the vegetative stage (Bastien et al., 2014; Boudhrioua et al., 2020; Kandel et al., 2018; Wei et al., 2017; Zhao et al., 2015). We performed GWAS for germination, GSI and dry mass per plant, and for lesion length at 7, 10 and 14 DAI. In total, we had 13 significant SNPs for seed variables. Germination and GSI presented SNPs in common. These results can be explained by the high correlation between these traits (Figure 3). Lesion length at 10 and 14 DAI also presented SNPs in common. The results indicated different significant SNPs for seed variables and lesion length (Figure 4 and Figure 5). Thus, there are probably different defense mechanisms to prevent infection by SSR in seed germination and vegetative response.

ABC transport family genes are responsible for the resistance and susceptibility of some plant diseases (Krattinger et al., 2009; Zaidi et al., 2018; Zhao et al., 2007). Zhao et al., (2007) suggested that genes encoding putative transporters, like the ABC transporter, are related to the response of *Brassica napus* to *S. sclerotiorum*. We found one gene of the ABC transporter

family (Glyma.06G146900.1) which may be the gene involved in the partial resistance in soybean to SSR.

R genes are responsible for the first recognition of plant cells to effectors of phytopathogens (Gururani et al., 2012; Kourelis and van der Hoorn, 2018). These genes were observed next to some SNPs in our study, such as the gene Glyma.06G171700.1. Genes annotated for leucine-rich-repeat are responsible to recognize effectors against biotroph pathogens (Moellers et al., 2017). However, these genes may be involved with pathways in hormone signaling such as salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene. Wu et al., (2016) showed a model that includes the recognition of effectors by cells components of *Brassica napus* to *S. sclerotiorum* and it is possible that this process may occur in soybean too.

RNA silencing has been studied to understand plant disease response. In RNA silencing, the regulation of gene expression is made by small non-coding RNAs. Besides that, there may be a dialog between plants and pathogens and they result in protein level gene transcripts (Rose et al., 2019). The MIR1517 was observed to some variables of seed quality in our study. The soybean resistance against *S. sclerotiorum* is recognized to be partial and the protein level gene transcripts of small RNAs may be one of the factors that helps explain the levels of soybean resistance to SSR.

We did not find relation between some genes (Glyma.06G151700, Glyma.14G177200.1, Glyma.14G177300.1 and Glyma.10G225400.1) and plant resistance to diseases. Probably, the association of SNP markers with these genes was randomized and they are not responsible for resistance. However, these genes may be part of a complex process not understood yet. Thus, additional studies should be done to elucidate genomic defense of soybean to SSR.

1

2 Table 2 – Putative genes expressed for germination (Germ), germination speed index (GSI), lesion length at 10 days after inoculation (LL10) and
 3 lesion length at 14 days after inoculation (LL14).

4

Trait	Chrom	SNP Position	Gene/TF	Description
Germ/GSI	3	46055685_T_C	Glyma.03G242500.1	TRAFFICKING PROTEIN PARTICLE COMPLEX SUBUNIT 6B
Germ/GSI	3	46055685_T_C	Glyma.03G242600.1	ACYL CARRIER PROTEIN 1, CHLOROPLASTIC-RELATED
Germ/GSI	6	11948808_G_A	Glyma.06G146900.1	ABC TRANSPORTER F FAMILY MEMBER 2-RELATED
Germ/GSI	6	12346248_C_T	Glyma.06G151800.1	Polyphosphate kinase / Polyphosphoric acid kinase
Germ/GSI	6	12346248_C_T	Glyma.06G151700	Putative 50S ribosomal protein L17
Germ/GSI	6	14238413_A_C	Glyma.06G170400.1	ACID PHOSPHATASE RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED
Germ/GSI	6	14238413_A_C	Glyma.06G170500.1	Snurportin-1 (SNUPN, RNUT1)
Germ/GSI	6	14238413_A_C	Glyma.06G170100	Probable inactive purple acid phosphatase 27
Germ/GSI	6	14321140_T_C	Glyma.06G171700.1	Protein tyrosine kinase (Pkinase_Tyr) // Leucine rich repeat (LRR_8)
Germ/GSI	6	14321140_T_C	Glyma.06G171600.1	Argininosuccinate synthase / Citrulline--aspartate ligase
Germ/GSI	14	44410612_T_C	MIR1517	microRNA MIR1517
Germ/GSI	14	44410612_T_C	Glyma.14G177300.1	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase (O-FucT)
Germ/GSI	14	44410612_T_C	Glyma.14G177200.1	THYLAKOID LUMENAL 29 KDA PROTEIN, CHLOROPLASTIC
LL10/LL14	10	45608453_A_G	Glyma.10G225400.1	fructose-1,6-bisphosphatase I

5

8. CONCLUSION

Our study indicates that the mechanism of soybean partial resistance is different in seedling's initial development and in the reaction in the vegetative stage against *S. sclerotiorum*. However, more studies should be done to elucidate the differential gene expression for soybean partial resistance to SSR.

9. REFERENCES

- Adams, P.B., Ayers, W.A., 1979. Ecology of Sclerotinia Species.
- Arahana, V.S., Graef, G.L., Specht, J.E., And, J.R.S., Eskrige, K.M., 2001. Identification of QTLs for Resistance to Sclerotinia sclerotiorum in Soybean. *Crop Sci.* 41, 180–188.
- Auclair, J., Boland, G.J., Kohn, L.M., Rajcan, I., 2004. Genetic Interactions Between Glycine max and Sclerotinia sclerotiorum Using a Straw Inoculation Method. *Plant Dis.* 88, 891–895. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.8.891>
- Bastien, M., Huynh, T.T., Giroux, G., Iquira, E., Rioux, S., Belzile, F., 2012. A reproducible assay for measuring partial resistance to Sclerotinia sclerotiorum in soybean. *Can. J. Plant Sci.* 92, 279–288. <https://doi.org/10.4141/cjps2011-101>
- Bastien, M., Sonah, H., Belzile, F., 2014. Genome Wide Association Mapping of Resistance in Soybean with a Genotyping-by-Sequencing Approach. *Plant Genome* 7, 0. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2013.10.0030>
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H., 2013. *Seeds*. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Boudhrioua, C., Bastien, M., Torkamaneh, D., Belzile, F., 2020. Genome-wide association mapping of Sclerotinia sclerotiorum resistance in soybean using whole-genome resequencing data 1–9.
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23, 2633–2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Carvalho, C. De, Souza, C.P., Forti, V.A., Ferreira, M., Junior, B., 2016. TRANSMISSION OF Sclerotinia sclerotiorum FROM SOYBEAN SEED TO SEEDLINGS. *Rev. Agric.* 91, 67–80.
- Contreras-Soto, R.I., Mora, F., de Oliveira, M.A.R., Higashi, W., Scapim, C.A., Schuster, I., 2017. A Genome-Wide Association Study for Agronomic Traits in Soybean Using SNP Markers and SNP-Based Haplotype Analysis. *PLoS One* 12, e0171105.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171105>
- Costa-neto, G., Galli, G., Carvalho, H.F., Fritsche-neto, R., 2021. EnvRtype : a software to interplay enviromics and quantitative genomics in agriculture 11. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab040>
- Fall, M.L., Boyse, J.F., Wang, D., Willbur, J.F., Smith, D.L., Chilvers, M.I., 2018. Case Study of an Epidemiological Approach Dissecting Historical Soybean Sclerotinia Stem Rot Observations and Identifying Environmental Predictors of Epidemics and Yield Loss 108, 469–478. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-16-0446-R>
- Grant, D., Nelson, R.T., Cannon, S.B., Shoemaker, R.C., 2010. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res.* 38, D843–D846. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp798>
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K., Park, S.W., 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 78, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.002>
- Hartman, G.L., Kull, L., Huang, Y.H., 1998. Occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean Fields in East-Central Illinois and Enumeration of Inocula in Soybean Seed Lots. *Plant Dis.* 82, 560–564. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.5.560>
- Hartman, G.L., Rupe, J.C., Sikora, E.J., Domier, L.L., Davis, J.A., Steffey, K.L. (Eds.), 2016. Back Matter, in: *Compendium of Soybean Diseases and Pests, Fifth Edition*. The American Phytopathological Society, pp. 174–201. <https://doi.org/10.1094/9780890544754.bm>
- Henneberg, L., Jaccoud Filho, D. de S., Ruaro, L., Panobianco, M., 2012. Efficiency of methods to detect *Sclerotinia sclerotiorum* in commercial soybean seed lots. *Rev. Bras. Sementes* 34, 61–69. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000100008>
- Huzar-Novakowiski, J., Dorrance, A.E., 2018. Ascospore Inoculum Density and Characterization of Components of Partial Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. *Plant Dis.* 102, 1326–1333. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1786-RE>
- Juliatti, F.C., Sagata, E., Juliatti, B.C.M., 2013. Ranqueamento de gen??tipos de soja com resist??ncia parcial por diferentes m??todos de inocula????o de sclerotinia sclerotiorum submetidos ?? an??lise de correla????o. *Biosci. J.* 29, 681–689.
- Kandel, R., Chen, C.Y., Grau, C.R., Dorrance, A.E., Liu, J.Q., Wang, Y., Wang, D., 2018. Soybean Resistance to White Mold : Evaluation of Soybean Germplasm Under Different Conditions and Validation of QTL. *Front. Plant Sci.* 9, 1–12.

- <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00505>
- Kim, H.S., Diers, B.W., 2000. Inheritance of partial resistance to sclerotinia stem rot in soybean. *Crop Sci.* 40, 55–61. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.40155x>
- Kolkman, J.M., Kelly, J.D., 2002. Agronomic Traits Affecting Resistance to White Mold in Common Bean. *Crop Sci.* 42, 693–699.
- Kourelis, J., van der Hoorn, R.A.L., 2018. Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *Plant Cell* 30, 285–299. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579>
- Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeyer, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L., Keller, B., 2009. A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat. *Science* (80-.). 323, 1360–1363. <https://doi.org/10.1126/science.1166453>
- Lehner, M.S., Paula Júnior, T.J., Hora Júnior, B.T., Teixeira, H., Vieira, R.F., Carneiro, J.E.S., Mizubuti, E.S.G., 2015. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. *Plant Pathol.* 64, 921–931. <https://doi.org/10.1111/ppa.12322>
- Lin, F., Satish, S., Caio, C., Vieira, C., Paulo, M., Silva, D., Rojas, A., Lee, D., Liu, N., Mariano, E., Lee, P.Y., Dong, Z., Baldin, J., Leonardo, P., Ploper, D., Rupe, J., Chen, P., Wang, D., Nguyen, H.T., Lin, F., Chhapekar, S.S., Vieira, C.C., Paulo, M., Silva, D., Rojas, A., Lee, D., 2022. Breeding for disease resistance in soybean : a global perspective, *Theoretical and Applied Genetics*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04101-3>
- McCaghey, M., Willbur, J., Ranjan, A., Grau, C.R., Chapman, S., Diers, B., Groves, C., Kabbage, M., Smith, D.L., 2017. Development and Evaluation of Glycine max Germplasm Lines with Quantitative Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Plant Sci.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01495>
- Moellers, T.C., Singh, A., Zhang, J., Brungardt, J., Kabbage, M., Mueller, D.S., Grau, C.R., Ranjan, A., Smith, D.L., Chowda-Reddy, R. V., Singh, A.K., 2017. Main and epistatic loci studies in soybean for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance reveal multiple modes of resistance in multi-environments. *Sci. Rep.* 7, 3554. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03695-9>
- Mueller, D.S., Hartman, G.L., Pedersen, W.L., 1999. Development of Sclerotia and Apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from Infected Soybean Seed and Its Control by Fungicide Seed

- Treatment. *Plant Dis.* 83, 1113–1115. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1113>
- O’Leary, N.A., Wright, M.W., Brister, J.R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C.M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V.S., Kodali, V.K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K.M., Murphy, M.R., O’Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S.H., Rausch, D., Riddick, L.D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S.S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R.E., Vatsan, A.R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M.J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T.D., Pruitt, K.D., 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Olivoto, T., Nardino, M., 2020. MGIDI: a novel multi-trait index for genotype selection in plant breeding. *bioRxiv* 2020.07.23.217778.
- Pogoda, C.S., Reinert, S., Talukder, Z.I., Attia, Z., Collier, E.C.E., Kane, N.C., Hulke, B.S., 2020. Genetic loci underlying quantitative resistance to necrotrophic pathogens *Sclerotinia* and *Diaporthe* (*Phomopsis*), and correlated resistance to both pathogens. *Theor. Appl. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03694-x>
- Rocha, J.R. do A.S. de C., Machado, J.C., Carneiro, P.C.S., 2018. Multitrait index based on factor analysis and ideotype-design: proposal and application on elephant grass breeding for bioenergy. *GCB Bioenergy* 10, 52–60. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12443>
- Rose, L.E., Overdijk, E.J.R., van Damme, M., 2019. Small RNA molecules and their role in plant disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 154, 115–128. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01614-w>
- Schwartz, H.F., Singh, S.P., 2013. Breeding Common Bean for Resistance to White Mold: A Review. *Crop Sci.* 53, 1832. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.02.0081>
- Vieira, R.F., Paula Júnior, T.J., Teixeira, H., de S. Carneiro, J.E., 2010. White Mold Management in Common Bean by Increasing Within-Row Distance Between Plants. *Plant Dis.* 94, 361–367. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0361>
- Vuong, T.D., Diers, B.W., Hartman, G.L., 2008. Identification of QTL for Resistance to *Sclerotinia* Stem Rot in Soybean Plant Introduction 194639. *Crop Sci.* 48, 2209. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.01.0019>
- Webster, R.W., Roth, M.G., Reed, H., Mueller, B., Groves, C.L., McCaghey, M., Chilvers,

- M.I., Mueller, D.S., Kabbage, M., Smith, D.L., 2021. Identification of Soybean (*Glycine max*) Check Lines for Evaluating Genetic Resistance to *Sclerotinia* Stem Rot. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2193-RE>
- Wei, W., Mesquita, A.C.O., Figueiró, A. de A., Wu, X., Manjunatha, S., Wickland, D.P., Hudson, M.E., Juliatti, F.C., Clough, S.J., 2017. Genome-wide association mapping of resistance to a Brazilian isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean genotypes mostly from Brazil. *BMC Genomics* 18, 849. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4160-1>
- Willbur, J., McCaghey, M., Kabbage, M., Smith, D.L., 2019. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Trop. Plant Pathol.* 44, 3–11. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0250-0>
- Willbur, J.F., Ding, S., Marks, M.E., Lucas, H., Grau, C.R., Groves, C.L., Kabbage, M., Smith, D.L., 2017. Comprehensive *Sclerotinia* Stem Rot Screening of Soybean Germplasm Requires Multiple Isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 101, 344–353. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1055-RE>
- Wu, J., Zhao, Q., Yang, Q., Liu, H., Li, Q., Yi, X., Cheng, Y., Guo, L., Fan, C., Zhou, Y., 2016. Comparative transcriptomic analysis uncovers the complex genetic network for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Sci. Rep.* 6, 19007. <https://doi.org/10.1038/srep19007>
- Yang, X.B., Workneh, F., Lundeen, P., 1998. First Report of *Sclerotium* Production by *Sclerotinia sclerotiorum* in Soil on Infected Soybean Seeds. *Plant Dis.* 82, 264–264. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.264B>
- Zaidi, S.S.-A., Mukhtar, M.S., Mansoor, S., 2018. Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance. *Trends Biotechnol.* 36, 898–906. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.04.005>
- Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, C., Todhunter, R.J., Tiwari, H.K., Gore, M.A., Bradbury, P.J., Yu, J., Arnett, D.K., Ordovas, J.M., Buckler, E.S., 2010. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42, 355–360. <https://doi.org/10.1038/ng.546>
- Zhao, J., Wang, J., An, L., Doerge, R.W., Chen, Z.J., Grau, C.R., Meng, J., Osborn, T.C., 2007. Analysis of gene expression profiles in response to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Planta* 227, 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0586-z>
- Zhao, X., Han, Y., Li, Y., Liu, D., Sun, M., Zhao, Y., Lv, C., Li, D., Yang, Z., Huang, L., Teng, W., Qiu, L., Zheng, H., Li, W., 2015. Loci and candidate gene identification for resistance

to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps. *Plant J.* 82, 245–255. <https://doi.org/10.1111/tpj.12810>

CAPÍTULO 2 - SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA COM RESISTÊNCIA PARCIAL À PODRIDÃO BRANCA DA HASTE POR MEIO DE ÍNDICES MULTIVARIADOS

10. RESUMO

A Podridão Branca da Haste (PBH), causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das doenças mais importantes da soja. Nós propomos a seleção de cultivares de soja com resistência parcial à PBH, utilizando os índices multivariados MGIDI e FAI-BLUP. Os ensaios de campo foram conduzidos com o delineamento em blocos casualizados, utilizando vinte cultivares: sete padrões discriminados em moderadamente resistente (MR), moderadamente suscetível (MS) e altamente suscetível, somadas a treze cultivares selecionadas de outros estudos com moderada resistência á PBH. Avaliamos oito características agronômicas nos ensaios de campo: altura de planta, fechamento de entrelinha, tipo de engalhamento, tipo de folha, dias de ciclo, incidência da doença, severidade da doença e produtividade. A inoculação das cultivares foi realizada de forma artificial, por meio de suspensão de ascósporos. A intensidade de doença nos ensaios foi baixa ou nula. Os índices MGIDI e FAI-BLUP foram eficientes na seleção de sete características avaliadas, não promovendo o objetivo de seleção apenas para dias de ciclo das cultivares. Adicionalmente, o índice FAI-BLUP promoveu ganhos de seleção preditos superiores ao índice MGIDI na ordem de 16%, 19% e 15% para produtividade, incidência e severidade, respectivamente. Os índices apresentaram coincidência de 60.4% na seleção, indicando quatro cultivares promissoras para um programa de melhoramento. Contudo, mais estudos são necessários em ambientes que promovam altos índices da doença e que possam gerar seleções mais acuradas quanto à resistência contra *S. sclerotiorum* na soja.

11. INTRODUÇÃO

A soja, *Glycine max (L.) Merrill*, é a commodity mais exportada do Brasil com produção estimada de 123.829,5 mil toneladas e produtividade média de 3.026 kg/ha na safra de 2021/2022 (CONAB, 2022). Vários fatores limitam o cultivo dessa leguminosa. Dentre eles, as doenças causam perdas em produtividade e aumento do custo de produção de lavouras. A podridão-branca-da-haste (PBH), causada pelo fungo habitante de solo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma das doenças mais destrutivas na cultura da soja no Brasil e no mundo. Esse patógeno produz estruturas de resistência, chamadas de escleródios, capazes de permanecer viáveis no solo por vários anos tornando difícil a erradicação do fungo em áreas já infestadas (Adams and Ayers, 1979; Willbur et al., 2019).

A PBH é considerada de difícil controle, principalmente em regiões do centro-sul do país que apresentam longo período de chuvas e temperaturas amenas. Essas condições associadas com características específicas de cada cultivar propiciam condições ideais para o desenvolvimento do patógeno no dossel das plantas (Paula Júnior et al., 2006).

A aplicação de fungicida é amplamente utilizada no controle da PBH. Porém, os riscos ao ambiente e a saúde humana associados ao alto custo de defensivos têm motivado a busca de formas alternativas de controle para o manejo dessa doença. Uma das opções de baixo custo e ambientalmente sustentável é a utilização da resistência genética para o manejo de *Sclerotinia sclerotiorum* (Schwartz and Singh, 2013).

O conhecimento sobre a resistência da soja ao fungo causador da PBH ainda é escasso, o que limita o desenvolvimento de programas de melhoramento que almejam alcançar genótipos com resistência parcial elevada. Entende-se por resistência parcial a associação entre resistência fisiológica e mecanismos de escape. A resistência fisiológica é promovida por reações bioquímicas envolvendo a interação planta-patógeno, enquanto os mecanismos de escape são promovidos por componentes morfológicos intrínsecos de cada genótipo da espécie hospedeira (Kim and Diers 2000, Kolkman and Kelly 2002). O efeito de genótipos x ambientes (GA) também é um fator agravante que dificulta a obtenção de linhagens com alta resistência parcial ao patógeno uma vez que os genótipos têm desempenhos diferentes em distintos ambientes. Estudos envolvendo resistência da soja à PBH têm sido realizados (Huzar-Novakowski and Dorrance, 2018; Juliatti et al., 2013; Kim and Diers, 2000; Willbur et al., 2017; Zhao et al., 2015) e, apesar dos esforços, ainda são necessárias mais informações sobre genótipos que apresentam elevada resistência parcial à *S. sclerotiorum* e que podem ser inseridas em programas de melhoramento visando altas produtividades.

Além disso, para a melhor eficiência da seleção de genótipos superiores com resistência parcial à *S. sclerotiorum* se faz necessário o uso de metodologias adequadas de inoculação que possibilitam diferenciá-los quanto aos níveis de reação à doença (Kandel et al., 2018). Muitos estudos ainda são feitos com inóculo natural em área infestada com escleródios o que propicia diferentes gradientes de pressão do patógeno e altos valores de coeficientes de variação experimental. Existem diversas metodologias de inoculação descritas para avaliação de PBH, como a metodologia do inóculo em semente, *straw test* e suspensão de ascósporos (Auclair et al., 2004; Carvalho et al., 2016; Huzar-Novakowski and Dorrance, 2018).

Dentre as metodologias de inoculação, a que utiliza a suspensão de ascósporos, descrita por Huzar-Novakowski and Dorrance (2018a), possui a vantagem de mimetizar com a forma natural de infecção do patógeno no campo, em que os ascósporos são ejetados pelos apotécios, chegam até os tecidos florais e dão sequência ao processo de infecção. Contudo, a suspensão de ascósporos ainda garante que o inóculo esteja em uma concentração específica e conhecida, além de garantir que todas as cultivares de soja recebam o inóculo do patógeno, propiciando melhores condições para avaliação e seleção das cultivares.

Diante do exposto, nosso objetivo foi selecionar cultivares de soja quanto a resistência parcial ao fungo *S. sclerotiorum*, utilizando a metodologia de suspensão por ascósporos no campo.

12. MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio de Casa de Vegetação

Foram conduzidos dois ensaios em casa de vegetação localizada na Universidade Federal de Viçosa, com sistema de aspersão e exaustores automáticos. Com estes ensaios, objetivamos classificar sete cultivares de soja adaptadas às condições de cultivo no Brasil quanto à resistência parcial à PBH para serem utilizadas nos ensaios de campo posteriormente. Utilizamos o delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições. Cada parcela experimental foi constituída de um vaso contendo Tropstrato HT Hortaliça (Vida Verde, Mogi-Mirim, SP, Brasil) e duas plantas.

As cultivares utilizadas foram Williams 82, BMX TURBO RR, BMX APOLO RR, BMX ATIVA RR, BMX VELOZ RR, NIDERA 5959 IPRO, BMX ENERGIA RR e DM 2333 RR, previamente selecionadas por apresentarem diferentes reações à *S. sclerotiorum* em pré-testes no campo (dados observados). A cultivar Williams 82 foi acrescentada nos experimentos por apresentar moderada susceptibilidade reconhecida internacionalmente (Webster et al., 2021). Foi utilizado o método *straw test* (Auclair et al., 2004) e avaliado o comprimento de lesão na haste principal aos 3, 5, 7, 10 e 13 dias após a inoculação. Após obtido os valores de comprimento de lesão, foi mensurado a área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC) a partir da seguinte fórmula:

$$AUDPC = \sum \left[\frac{(y_1 + y_2)}{2} * (t_2 - t_1) \right]$$

onde y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 .

Após a AUDPC de cada genótipo ser mensurada, os dados foram submetidos a análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

Ensaio de campo

Foram instalados dois ensaios (denominados ensaio 1 e ensaio 2) em outubro e novembro de 2019, a fim de selecionar cultivares de soja produtivos e com resistência parcial à PBH. Os ensaios foram conduzidos em delineamento em blocos casualizados (DBC), com quatro repetições em diferentes campos experimentais da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Foram avaliadas vinte cultivares de soja: sete cultivares utilizadas no estudo de casa de vegetação deste estudo e, adicionalmente, selecionamos treze cultivares de soja a partir de estudos em ambiente controlado anteriores (dados ainda não publicados). Cada parcela foi constituída de quatro linhas de dois metros de comprimento espaçadas de 0,5 metros entre fileiras. A avaliação foi feita nas duas linhas centrais de cada parcela (parcela útil). Com base nos ensaios em ambiente controlado, as cultivares foram classificadas em moderadamente resistente (MR), moderadamente suscetível (MS) e suscetível (S). Além destes, fizeram parte dos ensaios outras 13 cultivares selecionadas em estudos anteriores em casa de vegetação como MR: CD 242 RR, CD 254 RR, CD 240 RR, CD 231 RR, CD 243 RR, CD 234 RR, IGRARA 516 RR, IGRARA 626 RR, BRS 243 RR, BRS 256 RR, M 7908 RR, M 8527 RR e FUNDACEP 55 RR.

Utilizamos a metodologia de inoculação por suspensão de ascósporos (Huzar-Novakowski and Dorrance, 2018) conforme apresentado na Figura 1. Para isso, escleródios de *S. sclerotiorum* foram mantidos em estufa BOD com temperatura controlada ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) e umidade relativa acima de 80 % para germinação dos apotécios. Após os apotécios atingirem a maturidade e iniciarem a ejeção de ascósporos, foi utilizado uma bomba de vácuo para a coleta dos ascósporos diretamente em água destilada estéril. A suspensão obtida foi filtrada em membrana GS em éster de celulose, com $0.22\text{ }\mu\text{m}$ de poro e 47 mm de diâmetro. A membrana foi submetida à secagem em temperatura ambiente e os ascósporos foram armazenados em freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) por até 6 meses.

Foram feitas duas inoculações por ensaio devido a ampla variabilidade de ciclo das cultivares utilizadas e, conseqüentemente, diferentes tempos de floração. O ensaio 1 foi inoculado entre os dias 20 e 28 de novembro de 2019, enquanto o ensaio 2 foi inoculado entre os dias 10 e 18 de dezembro de 2019. A suspensão de ascósporo para a inoculação nos ensaios de campo foi preparada com concentração de 7×10^5 e 3×10^5 para a primeira e segunda

inoculação, respectivamente. Conforme Huzar-Novakowski and Dorrance, (2018) mostraram em seu estudo, a concentração da suspensão de 1×10^5 e 1×10^6 não diferiu estatisticamente sobre o índice de severidade da doença, porcentagem de eficiência da infecção e comprimento de lesão na haste principal. A inoculação foi feita após o pleno florescimento das cultivares, utilizando bomba costal de aplicação agrícola com bico de cone cheio, utilizando 125 ml de suspensão de ascósporo por parcela experimental.

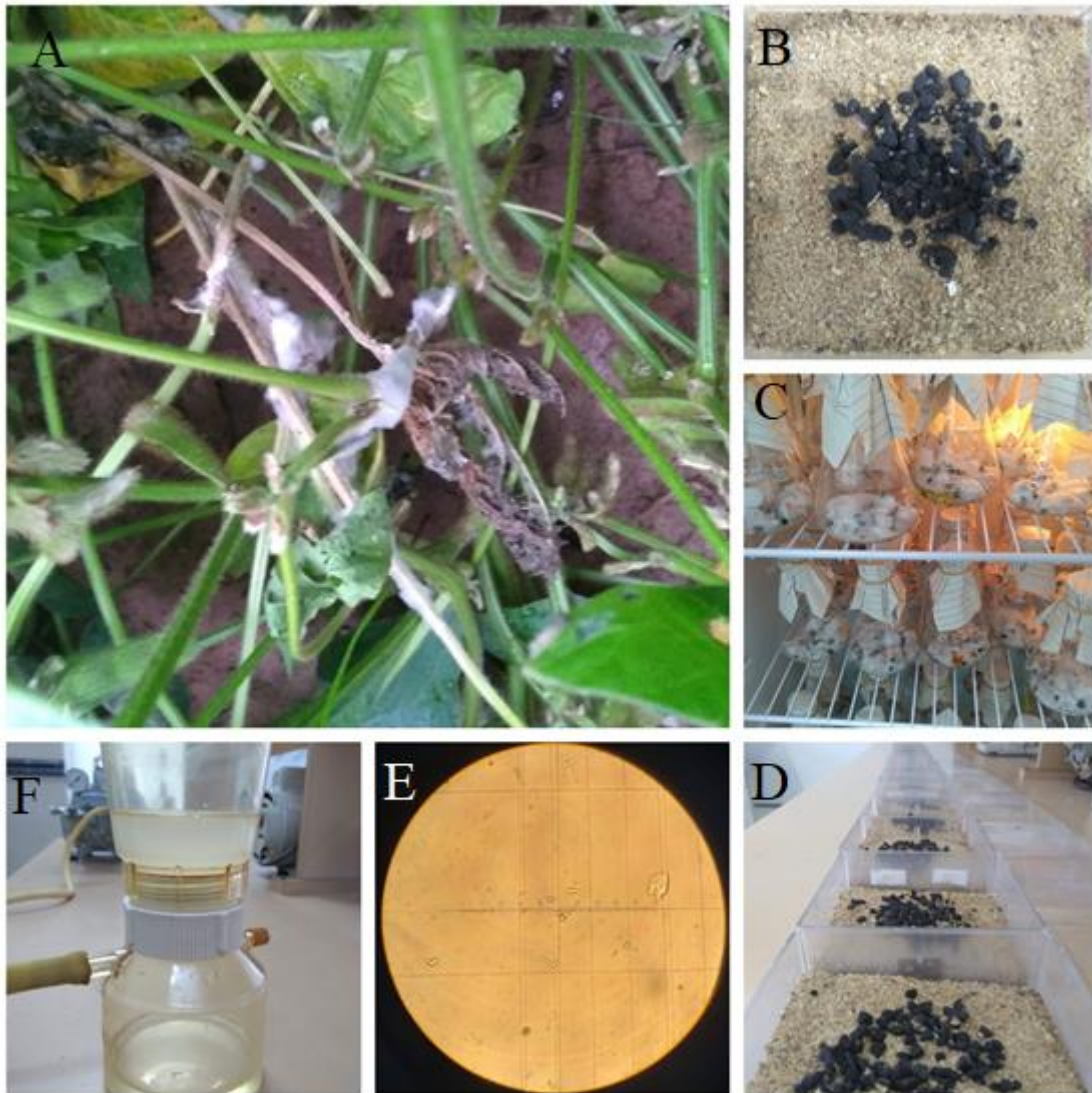


Figura 1 – Coleta e inoculação de ascósporos em soja: (A) Doença desenvolvendo no campo após a inoculação; (B) e (D) cultivo de escleródios para germinação de apotécios; (C) multiplicação de escleródios em BOD e cenoura autoclavada; (E) visão do microscópio de ascósporos com o tubo germinativo desenvolvido; (F) Porta filtro tipo sterifil para filtrar esporos coletados.

Foram avaliados a cobertura do solo pelas plantas (FEC), o tipo de folíolo lateral (TF), a altura de cada cultivar em centímetros (ALT), o ciclo em dias de cada cultivar (DIAS), o tipo

e quantidade de galhos laterais (ENG), a incidência (INC) de PBH, a severidade da doença (SEV) e a produtividade de grãos (PROD).

A FEC foi avaliada visualmente, como realizado para a cultura do feijão (Vieira et al., 2010). Para tal, as plantas foram observadas de uma extremidade da parcela (olhando para baixo) e foi estimado a proporção da superfície do solo visível entre as linhas. Caso a superfície do solo não estava visível estabelecia valor de 0% visto que as plantas cobriram todo o solo. Esta porcentagem foi transformada para notas, em que: 1 = 81 à 100% do solo visível, 2 = 61 à 80 % do solo visível, 3 = 41 a 60% do solo visível, 4 = 21 a 40 % do solo visível e 5 = 0 a 20 % do solo visível.

O TF foi avaliado com escala de notas sendo: 1 = Lanceolado estreito, 2 = Lanceolado, 3 = Triangular, 4 = Oval pontiagudo e 5 = Oval lanceolado. Utilizamos a escala de notas de 1 a 4 para avaliar o ENG, sendo: 1 = menos de duas ramificações formando ângulos maiores que 45° com a haste principal, 2 = menos de duas ramificações formando ângulos menores que 45° com a haste principal, 3 = duas ou mais ramificações formando ângulos maiores que 45° com a haste principal, 4 = duas ou mais ramificações formando ângulos menores que 45° com a haste principal.

A incidência (INC) e severidade da PBH (SEV) foram mensuradas a partir da porcentagem de número de plantas doentes e da escala de tecido infectado, respectivamente (Kolkman and Kelly, 2002). Para o cálculo do SEV, as plantas de cada parcela foram avaliadas usando uma escala de notas de 0 a 4 (Hall e Phillips, 1996), em que: 0 = planta sadia, 1 = 1 a 25% da planta com sintomas de PBH, 2 = 26 a 50% das plantas com sintomas, 3 = 51 a 75% das plantas com sintomas e 4 = acima de 76% da planta com sintomas. A SEV foi calculada para cada parcela com base na seguinte fórmula:

$$SEV = \frac{\sum(\text{Classe de severidade} \times \text{n}^\circ \text{ de plantas por classe})}{\text{Total de plantas avaliadas} \times \text{n}^\circ \text{ de classes com sintomas}} \times 100$$

A produtividade foi estimada em quilogramas por hectare, corrigindo os dados para o teor de 13% de umidade no grão. Os dados climáticos de temperaturas e precipitação foram coletados por meio do portal da NASA para a latitude e longitude específica dos ensaios, utilizando a função `get_weather()` do pacote `EnvRtype` (Costa-neto et al., 2021).

Análise estatística

Cada variável foi analisada utilizando o modelo misto em que:

$$Y = Xb + Zu + e.$$

onde Y é o vetor da variável resposta observado pelo i th genótipo e no j th bloco ($i = 1, 2, \dots, g$; $j = 1, 2, \dots, r$); $y = [y_{11}, y_{12}, \dots, y_{gr}]$, $n [= \sum_{j=1}^r (gr)]$; b é o vetor $1 \times r$ dos efeitos fixos dos blocos não conhecidos e não observados $b = [\gamma_1, \gamma_2, \dots, \gamma_r]'$; u é o vetor $1 \times g$ do efeito aleatório de genótipo não conhecido e não observado $u = [\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_g]'$; X e Z são as matrizes de incidência do efeito de bloco e de genótipo, respectivamente; e é o vetor $n \times 1$ de efeito aleatório dos erros $e = [y_{11}, y_{12}, \dots, y_{gr}]'$. Assumimos os efeitos aleatórios de u e e como normalmente e independentemente distribuídos, com média igual a 0 e matrizes de variância e covariância G e R , em que $G = \sigma_a^2 I_g$ e $R = \sigma_e^2 I_n$ seguindo as variâncias aleatórias σ_a^2 e σ_e^2 das cultivares e dos erros, respectivamente. I_g e I_n são as matrizes identidade de ordem g e n . Os componentes de variância contidos nas matrizes G e R foram estimados utilizando o método da máxima-verossimilhança restrita (REML). A análise foi feita utilizando o software R 4.2.1 com o pacote metan (Olivoto and Nardino, 2020). Também realizamos uma análise de correlação linear simples para verificar a associação entre as oito variáveis mensuradas.

Foi aplicado a seleção por meio do índice de distância multi-característico genótipo-ideótipo (MGIDI) e índice FAI-BLUP, com pressão de seleção de 30 %. Estes índices utilizam dos melhores valores lineares preditos não viesados (BLUP) para cada variável, para o fator aleatório de cultivares.

Para o índice MGIDI, a matriz contendo os BLUPs são reestruturadas para que os intervalos de valores assumam intervalos de 0 a 100. A seguir, é realizada uma análise de fatores para agrupar as variáveis correlacionadas em fatores e estimar uma pontuação fatorial para cada genótipo. Posteriormente, nosso ideótipo foi aplicado, objetivando maiores valores para ENG, ALT, FEC, e PROD e menores valores para DIAS, INC, SEV e TF. Por fim, o MGIDI foi aplicado usando a distância entre o valor do i -ésimo genótipo no j -ésimo fator e o valor do ideótipo, conforme estabelecido por Olivoto e Nardino (2020).

O índice FAI-BLUP também utiliza análise de fatores, todavia, este índice lança mão da probabilidade espacial de cada genótipo com o ideótipo, calculando a distância genótipo – ideótipo baseado na distância Euclidiana padronizada (Rocha et al., 2018).

Os ganhos de seleção (GS) pelos índices MGIDI e FAI-BLUP foram estimados utilizando as funções `mgidi()` e `fai_blup()` do pacote metan (Olivoto and Nardino, 2020). O índice de coincidência foi estimado utilizando a fórmula:

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

em que A é o número de cultivares selecionados comuns a diferentes métodos; C é o número de cultivares esperados selecionados ao acaso; e M é o número de cultivares selecionados de acordo com a intensidade de seleção.

13. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de casa de vegetação

A interação cultivares x ensaios foi significativa para os ensaios de casa de vegetação ($p = 0.004$). Assim, foi analisado o agrupamento das cultivares pelo teste de Scott Knott dentro de cada ensaio para verificar quais permaneceram estáveis (Figura 2). Os resultados dos dois ensaios mostraram três grupos de resposta da curva abaixo do progresso da doença (AUDPC). Classificamos estes grupos em moderadamente resistentes (MR), moderadamente suscetíveis (MS) e altamente suscetíveis (AS), visto que não existe genótipo de soja com resistência completa à PBH (Willbur et al., 2019). Williams 82, reconhecida por ser moderadamente suscetível à PBH, permaneceu no mesmo grupo nos dois ensaios, denominado grupo das cultivares moderadamente suscetíveis. BMX ATIVA RR e BMX VELOZ RR foram agrupadas como altamente suscetível em ambos os ensaios, enquanto BMX ENERGIA RR foi o único genótipo que permaneceu no grupo das cultivares moderadamente resistentes em ambos os ensaios por apresentar menores AUDPC.

A cultivar BMX TURBO RR flutuou entre os grupos MS e MR, enquanto a BMX APOLO RR flutuou entre os grupos AS e MS. Apenas a cultivar NS 5959 RR apresentou variação extrema permanecendo no grupo das AS e MR nos diferentes ensaios em casa de vegetação. É comum ocorrer mudança de resposta à PBH, pois se trata de uma resistência poligênica altamente influenciada pelo ambiente (Arahana et al., 2001; Webster et al., 2021; Willbur et al., 2019).

Como a soja é influenciada por fotoperíodo, diversos genótipos já testados e reconhecidos por sua resposta não se adaptam para ensaios de campo em nossos locais de avaliação, como a cultivar Williams 82 utilizada em nossos ensaios, e diversos outros genótipos utilizados em outros países. Assim, as cultivares BMX ATIVA RR e BMX VELOZ RR podem ser usados como padrões de suscetibilidade e BMX ENERGIA RR pode ser usada como padrão de resistência parcial por apresentar estabilidade em ambos os ensaios avaliados.

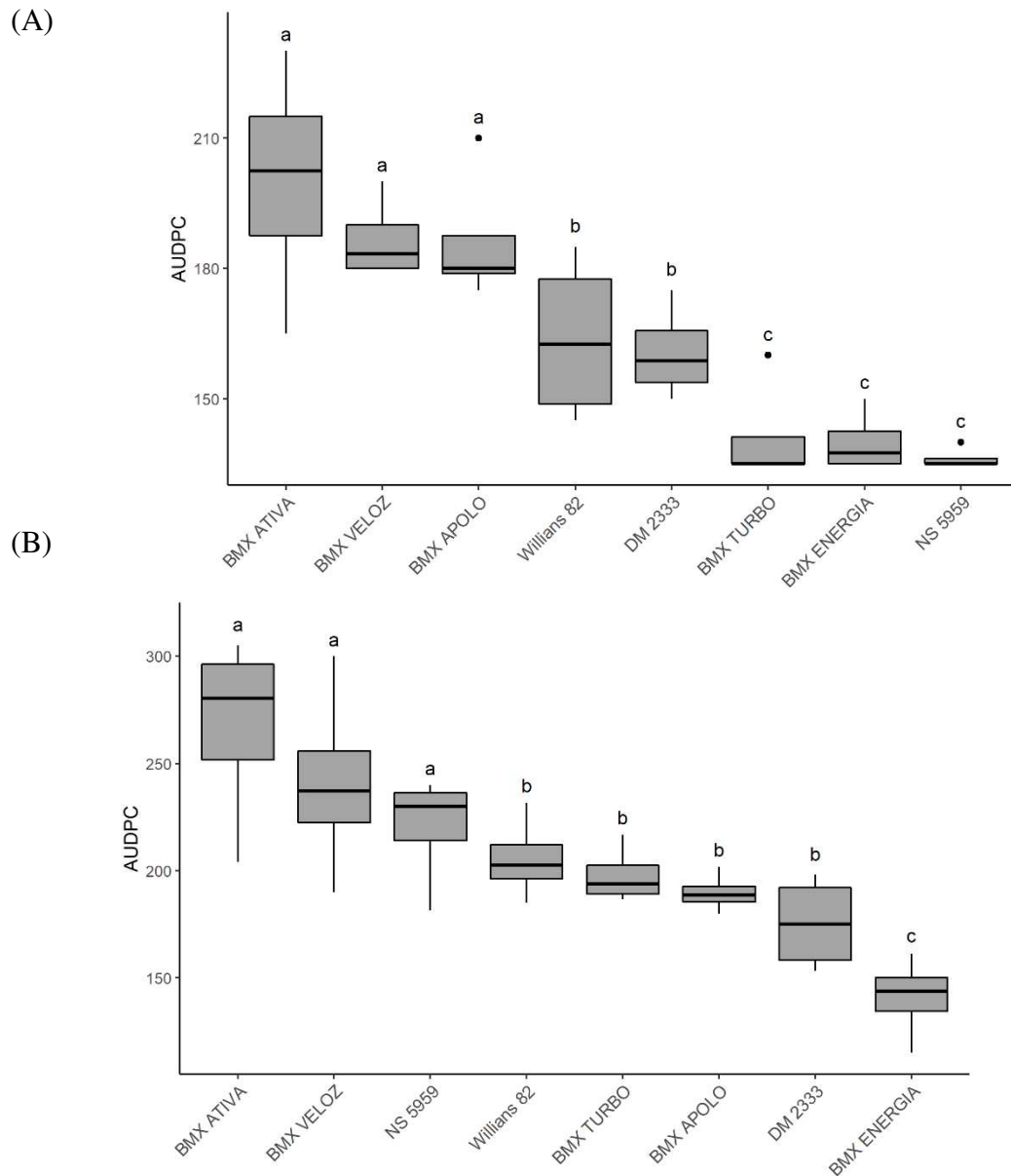


Figura 2 – Resposta da curva abaixo do progresso da doença (AUDPC) de oito cultivares de soja em dois ensaios (A) e (B) previamente selecionados para discriminar a reação quanto à resistência contra *Sclerotinia sclerotiorum*. As letras minúsculas acima de cada dispersão da cultivar representam o grupo pelo teste de Scott Knott a 5 % de probabilidade.

Ensaio de campo

Após a caracterização das cultivares em casa de vegetação procedeu-se a implantação dos ensaios a campo em que treze cultivares e os sete padrões foram avaliados quanto à resistência parcial à PBH e produtividade de grãos.

O teste de máxima verossimilhança foi altamente significativo ($p < 0.005$) para todas as características avaliadas, exceto para ENG ($p < 0.05$) (Tabela 1). As características ALT, DIAS, TF, INC e PROD apresentaram maior variância genotípica (σ_g^2) sendo o principal componente

da variância fenotípica (σ_p^2), enquanto ENG, FEC e SEV apresentaram maior variância residual (σ_r^2) o que levou a esse ser o principal componente da σ_p^2 (Figura 5). A herdabilidade no sentido amplo foi inferior a 0.5 para as características FEC, ENG e SEV e, conseqüentemente, os valores de acurácia de seleção preditos foram menores para estas características. As características TF, DIAS, ALT, INC, e PROD apresentaram herdabilidades iguais ou superiores a 0.56 com valores de acurácia de seleção maiores ou superiores a 0.91.

A resistência da soja ao fungo *S. sclerotiorum* é quantitativa (Kim and Diers 2000, Bastien *et al.* 2014, Wei *et al.* 2017, Pogoda *et al.* 2020). Segundo Lin *et al.* (2022) 14 *quantitative trait loci* (QTLs) já foram validados e mais 200 QTLs já foram descritos na literatura e são passíveis de serem validados para auxiliar melhoristas em programas visando aumento da resistência parcial da soja à PBH. A herdabilidade de INC e SEV normalmente varia entre 0.4 e 0.6 (Kandel *et al.*, 2018). Em nosso estudo, esses valores foram observados. Além disso, grande parte da herança foi atribuída à variância aditiva representada pela herdabilidade no sentido restrito (Tabela 1). Apenas ENG apresentou herdabilidade abaixo de 0.3, indicando grande influência do ambiente e pouca influência devido a herança genética. ALT e DIAS apresentaram as maiores herdabilidades, 0.9 e 0.91, respectivamente, sugerindo que são as características com maior facilidade de obter ganhos de seleção.

Tabela 1: Resumo dos parâmetros da análise de deviance e de componentes de variância das oito características mensuradas para vinte cultivares de soja no ensaio 1.

PARÂMETRO	FEC	TF	ENG	ALT	DIAS	INC	SEV	PROD
Gen_var	0,77	0,66	0,27	334,7	43,6	42,42	5,72	1423031
Gen (%)	39,11	59,64	23,75	90,05	90,73	56,87	41,27	55,88
Res_var	1,19	0,45	0,88	36,97	4,45	32,17	8,14	1123634
Res (%)	60,89	40,36	76,25	9,95	9,27	43,13	58,73	44,12
Fen_var	1,96	1,11	1,15	371,68	48,05	74,58	13,86	2546665
h ²	0,39	0,6	0,24	0,9	0,91	0,57	0,41	0,56
p-valor ^a	< 0,001	< 0,001	0,022	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

^ap-valor do teste de máximo-verossimilhança das cultivares para cada variável avaliada; FEC = Fechamento de linhas, TF = Tipo de folha, ENG = quantidade e angulação de engalhamento, ALT = altura de plantas em maturidade fisiológica, DIAS = dias até a maturidade fisiológica, INC = incidência de doença, SEV = severidade da doença, PROD = produtividade.

A média das cultivares para o ensaio 1 foi de 4 % de INC e de 2 % de SEV. Ao todo, dez cultivares apresentaram sintomas de PBH: BMX APOLO RR, BMX ATIVA RR, BMX ENERGIA RR, BRS 243 RR, CD 240 RR, CD 242 RR, CD 254 RR, IGRARA 516 RR, M

8527 RR E NS 5959. Considerando apenas as cultivares que apresentaram doença, a média de INC foi de 15 % e SEV de 8 %. A média de PROD para este ensaio foi de 3574 kg há⁻¹. Enquanto isso, as características secundárias ou que podem influenciar diretamente quantidade e severidade da doença tiveram médias de 3,48 para FEC, 3,46 para TF, 2,44 para ENG, 65.8 para ALT, e 123 para DIAS.

Não foi observado PBH no ensaio 2. A média de PROD para este ensaio foi de 3824 kg há⁻¹. FEC apresentou média de 3,75 (nota), TF média de 3,27 (nota), ENG média de 3,12 (nota), ALT média de 66,5 (centímetros) e DIAS apresentou média de 123 (dias). INC, SEV e PROD foram as características que mais diferiram as médias entre o ensaio 1 e o ensaio 2.

As condições climáticas de temperatura e precipitação durante a condução dos ensaios de campo foram representadas na Figura 3. Houve dias com temperaturas máximas maiores que 30°C apenas no período de implantação dos mesmos (Figura 1). As temperaturas máximas diárias variaram de aproximadamente 23 a 30°C no ensaio 1 e de aproximadamente 26 a 30° no ensaio 2 durante a inoculação da suspensão de ascósporos. As temperaturas mínimas diárias variaram de aproximadamente 13 a 20°C no ensaio 1 e de aproximadamente 16 a 20°C no ensaio 2 durante a inoculação da suspensão de ascósporo. Houve queda da temperatura média diária no intervalo de inoculação do ensaio 1, chegando à média de 20°C. A temperatura média diária durante o intervalo de inoculação do ensaio 2 alcançou 25°C.

Após o intervalo de inoculação no ensaio 1, houve sequência de nove dias com precipitação diária superior a 5 mm e apenas um dia com precipitação igual a zero. Durante o intervalo de inoculação do ensaio 2, houve a sequência de quatro dias com precipitação igual a zero. Após a última inoculação do ensaio 2, houve precipitação nos quatro dias subsequentes, seguido de um período sem precipitação de 8 dias seguidos (Figura 3).

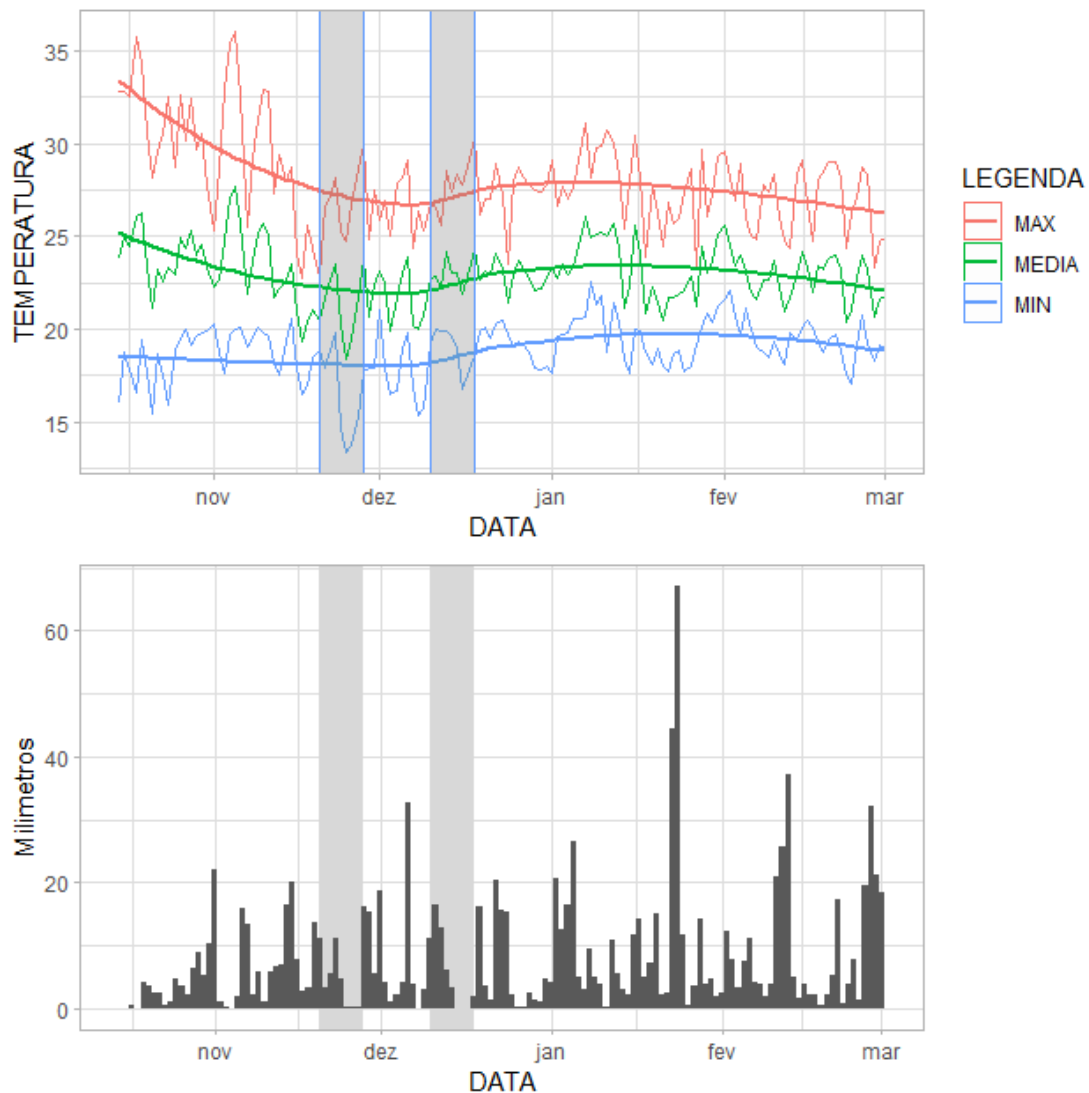


Figura 3 – Série temporal de temperaturas e precipitação entre o período de plantio e colheita dos ensaios de campo. Os retângulos representam as épocas de inoculação no ensaio 1 e no ensaio 2, nesta ordem cronológica. MAX = temperatura máxima diária, MEDIA = temperatura média diária, MIN = temperatura mínima diária. A precipitação está representada em milímetros para cada dia durante a condução dos ensaios.

O desenvolvimento de *S. sclerotiorum* é favorecido por temperaturas amenas, abaixo de 28°C, associado com altos índices de umidade contínua da superfície do tecido da planta, que normalmente ocorrem de 40 a 112 horas (Willbur et al., 2019). Em nossos ensaios, apesar das boas condições de temperatura para a ocorrência da doença, houve sequência contínua de dias com precipitação próxima de 0 mm durante o período de inoculação e pós inoculação. A falta de umidade pode ter sido um dos principais influenciadores sobre o baixo desenvolvimento da doença no ensaio 1 e desenvolvimento da PBH nulo no ensaio 2.

As características que tiveram correlação significativa com INC foram ALT ($p < 0.1$), PROD ($p < 0.1$) e SEV ($p < 0.001$). SEV também apresentou correlação significativa com ALT ($p < 0.1$). FEC, TF e ENG não apresentaram correlação significativa com INC e SEV como esperado. Já as que foram significativas com PROD foram FEC ($p < 0.01$), ALT ($p < 0.001$), ENG ($p < 0.01$), DIAS ($p < 0.05$) e INC, já citada anteriormente.

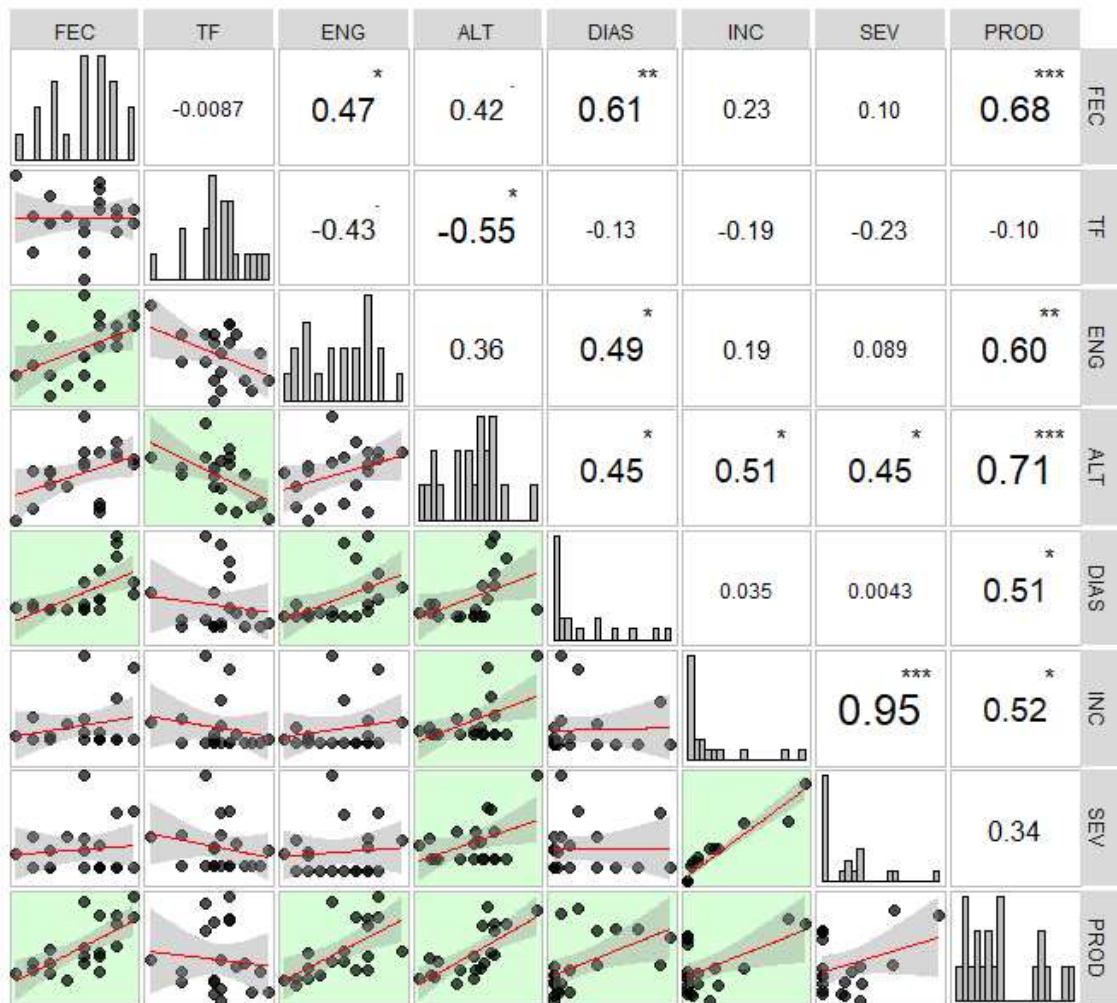


Figura 4 – Scatterplot de correlação das oito características avaliadas no ensaio 1: diagonal é o histograma de distribuição de cada característica; abaixo da diagonal é a regressão linear de cada combinação das oito características em que as coloridas de verde foram significativas; acima da diagonal é o valor do coeficiente de regressão e significância de cada regressão em que * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ e *** = $p < 0.001$. FEC = Fechamento de linhas, TF = Tipo de folha, ENG = quantidade e angulação de engalhamento, ALT = altura de plantas em maturidade fisiológica, DIAS = dias até a maturidade fisiológica, INC = incidência de doença, SEV = severidade da doença, PROD = produtividade.

Segundo Kim and Diers (2000), o índice de severidade da doença está correlacionado positivamente com altura de plantas, acamamento e maturidade relativa da soja. Essas características são consideradas como mecanismos de escape do hospedeiro que influencia

diretamente na formação de microclima favorável para o patógeno. Adicionalmente a essas características nós avaliamos também o fechamento de dossel, o tipo de folíolo lateral e o tipo de engalhamento de cada genótipo (FEC, TF e ENG). Não foi observado acamamento em nosso ensaio. A correlação entre SEV e ALT foi positiva, confirmando o que Kim and Diers (2000) observaram em seu estudo. Contudo, não observamos correlação entre SEV e FEC, SEV e TF, SEV e ENG e SEV e DIAS, que pode ter sido influenciada pelo baixo desenvolvimento da doença. Não houve correlação entre PROD e SEV, o que indica que a doença teve pouca ou nenhuma associação com o rendimento das cultivares. Além disso, PROD e INC apresentaram correlação positiva, o que não era esperado já que presença de doença normalmente estão associados a baixas produtividades (Fall et al., 2018).

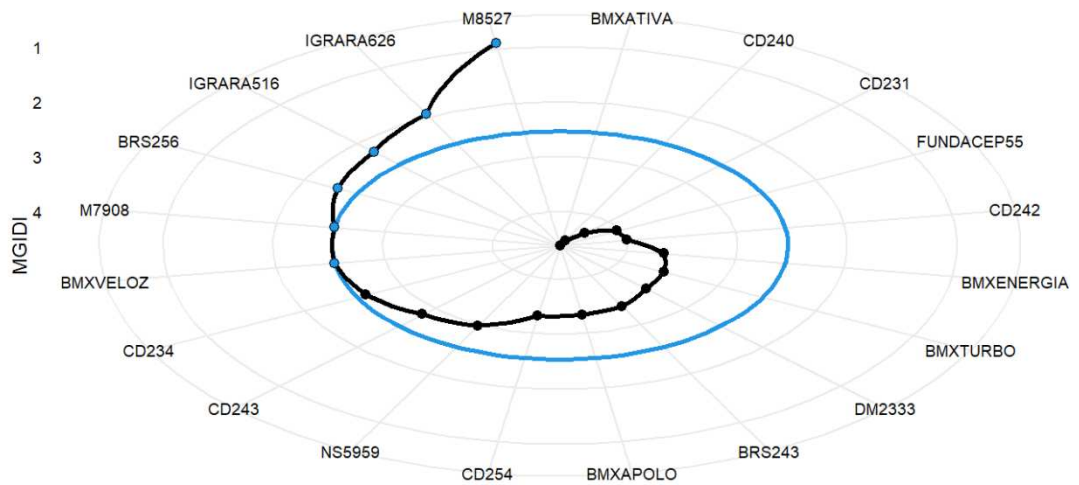
O ideótipo foi estipulado de forma a aumentar o FEC, ENG, PROD e ALT e diminuir DIAS, INC, SEV e TF. A arquitetura da planta é importante e influencia diretamente na incidência e severidade da PBH na soja (Bastien et al., 2012). Normalmente a alta densidade de folhas, o fechamento precoce da cobertura do solo, o florescimento tardio e prolongado e o altos níveis de acamamento são características que favorecem as condições climáticas propícias para o desenvolvimento de *S. sclerotiorum* (Kim and Diers 2000, Kolkman and Kelly 2002, McCaghey et al. 2017). Em nossos ensaios não houve incidência de acamamento e por isso não obtivemos respostas dessa característica em relação à incidência e a severidade de PBH.

Com base nos dados procedeu-se as análises de componentes principais com o objetivo de aplicar os índices de seleção propostos em nosso estudo. Três componentes principais foram detectados como os responsáveis por explicar 82,80% da variância total entre as oito características. Alta proporção da variabilidade de cada característica avaliada foi explicada pelos fatores retidos, devido aos altos valores de comunalidade, com média de 0.828.

Com base na análise de fatores procedeu-se a seleção via índice MGIDI, proposto por Olivoto and Nardino (2020). As cultivares selecionados pelo índice foram M 8527 RR, IGRARA 626 RR, IGRARA516 RR, BRS 256 RR, M 7908 RR e BMX VELOZ RR (Figura 6A). CD 234 ficou muito próximo do círculo azul, representado pela intensidade de seleção, indicando que devemos dar atenção a essa cultivar por mais que ele não tenha sido selecionado pelo índice MGIDI. As demais cultivares ficaram longe do círculo azul e, portanto, estão mais distantes do ideótipo desejado. As cultivares M 7908 RR e BRS 256 RR ficaram fora da linha de intensidade de seleção dentro do FA1 (Figura 6B), o que maximizou os ganhos para FEC, ENG, DIAS e PROD. Todas as seis cultivares selecionadas ficaram fora da linha de intensidade

de seleção para o FA2, que obteve maiores cargas fatoriais para INC e SEV. A intensidade de PBH em nosso experimento foi considerada baixa, o que pode explicar a contribuição de todas essas cultivares para este fator. M 8527 RR foi a cultivar que mais distanciou da linha de intensidade de seleção para o FA3, indicando que o ganho de seleção para TF e ALT foi maximizada por esse genótipo.

(A)



(B) Contribuição dos genótipos selecionados para cada fator

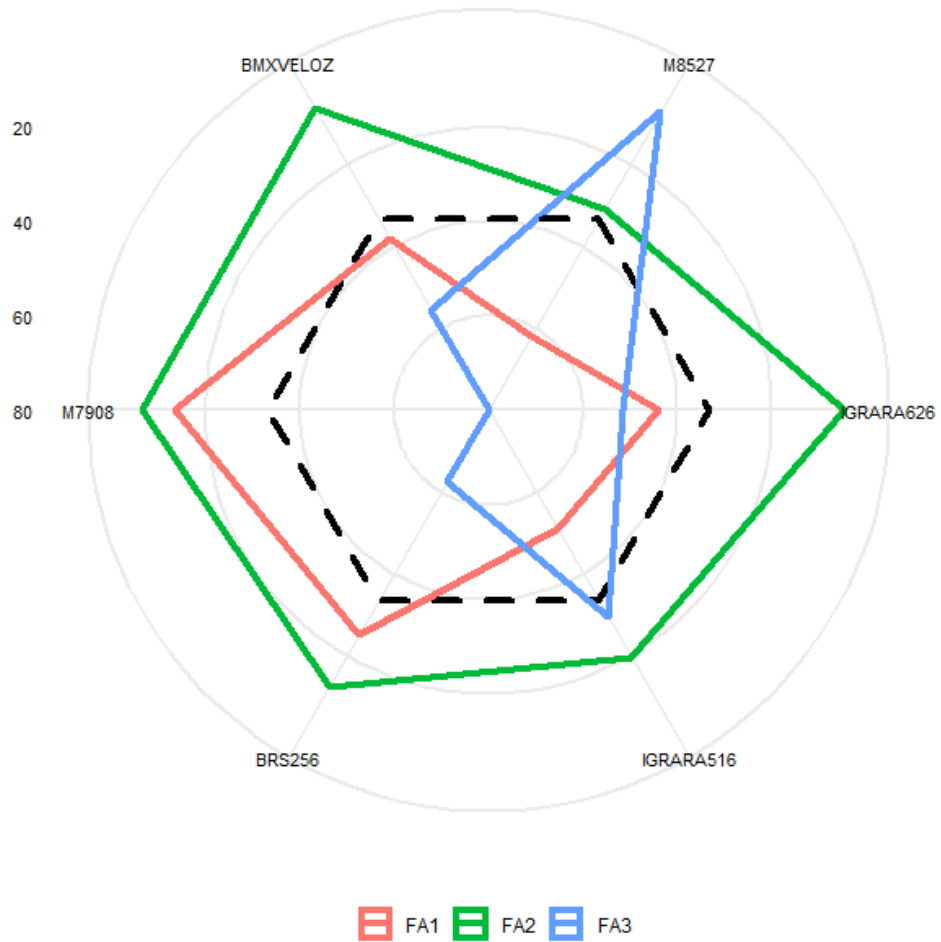


Figura 6 – Cultivares selecionadas pelo índice MGIDI no ensaio 1: (A) o círculo azul representa a intensidade de seleção e os pontos azuis representam as cultivares selecionadas e (B) a importância das cultivares para cada fator em que a linha tracejada representa a intensidade de seleção.

Assim como na seleção pelo índice MGIDI, o índice FAI-BLUP apresentou três componentes principais responsáveis por explicar aproximadamente 83% da variância de todas as características avaliadas. Por também se tratar de um índice de seleção fatorial, o FAI-BLUP reteve três fatores com cargas fatoriais altas para as mesmas características em cada fator. Desta forma, o FA1 do FAI-BLUP contribuiu majoritariamente para FEC, ENG, DIAS e PROD, o FA2 do FAI-BLUP contribuiu para INC e SEV, e o FA3 do FAI-BLUP contribuiu para TF e ALT. Pelo índice FAI-BLUP, foram selecionadas as cultivares M 8527 RR, BRS 256 RR, M 7908 RR, CD 234 RR, IGRARA 626 RR e CD 243 RR (Figura 7).

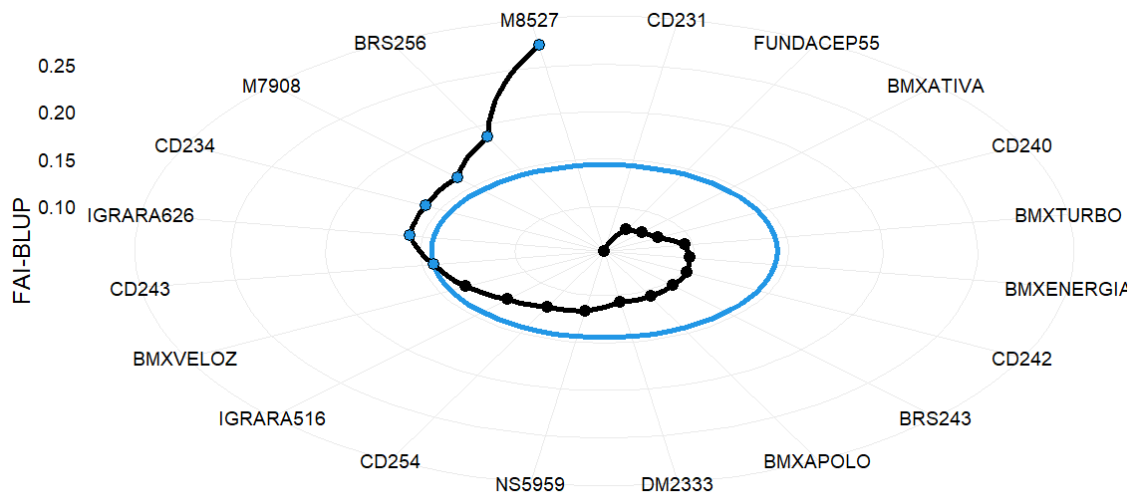


Figura 7– Cultivares selecionadas pelo índice FAI-BLUP no ensaio 1: o círculo azul representa a intensidade de seleção e os pontos azuis representam as cultivares selecionadas

O índice FAI-BLUP coincidiu a seleção em 60,8% com o índice MGIDI no ensaio 1, selecionando também as cultivares M 8527 RR, IGRARA 626 RR, BRS 256 RR e M 7908 RR (Tabela 2). Comparado ao ensaio 2, que optamos por não aplicar seleção, apenas as cultivares M8527 e IGRARA 626 foram selecionados em comum pelo índice MGIDI. As cultivares diferentes selecionadas no ensaio 2 podem maximizar o ganho desejado para FEC, ENG, DIAS e PROD neste cenário. Todavia, devido a exclusão das características INC e SEV do ensaio 2, a seleção destas cultivares diferentes poderia causar efeitos indesejáveis e, portanto, prosseguimos com a seleção apenas no ensaio 1.

Tabela 2: Índice de coincidência de seleção das cultivares no ensaio 1 e ensaio 2, para o índice MGIDI e índice FAI-BLUP

Cenário 1	Cenário 2	Índice (%)	Comum	Cultivares
mgidi_ensaio_1	fai_blup_ensaio_1	60.8	4	M8527,IGRARA626,BRS256,M7908
mgidi_ensaio_1	mgidi_ensaio_2	21.6	2	M8527,IGRARA626
mgidi_ensaio_1	fai_blup_ensaio_2	41.2	3	M8527,IGRARA626,BRS256
fai_blup_ensaio_1	mgidi_ensaio_2	21.6	2	M8527,IGRARA626
fai_blup_ensaio_1	fai_blup_ensaio_2	41.2	3	M8527,BRS256,IGRARA626
mgidi_ensaio_2	fai_blup_ensaio_2	80.4	5	M8527,IGRARA626,CD240,NS5959,BMX APOLO

Ambos os índices obtiveram ganhos preditos para sete das oito características mensuradas, não alcançando o objetivo de diminuir a característica DIAS (Tabela 3). DIAS foi a única característica com cargas fatoriais elevadas no fator 1 que dificultou reduzir a média pelas cultivares selecionadas. Contudo, nosso objetivo principal neste estudo é selecionar cultivares com maior resistência parcial à PBH. O índice MGIDI apresentou maior proporção de ganho no sentido desejado para TF e menores proporções de ganho no sentido desejado para FEC, ENG, PROD, INC, SEV e ALT comparado ao índice FAI-BLUP.

Tabela 3: Ganho genético predito utilizando os índices MGIDI e FAI-BLUP

Fator	Característica	Senso	Valor Genético	Ganho Seleção Predito (%)	
				MGIDI	FAI-BLUP
FA1	FEC	Aumentar	3.48±0.17	0.37	10.31
FA1	ENG	Aumentar	2.44±0.09	6.57	7.10
FA1	DIAS	Diminuir	123.31±1.61	1.19	4.44
FA1	PROD	Aumentar	3574.19±243.77	1.42	17.36
FA2	INC	Diminuir	3.97±1.34	-34.90	-53.96
FA2	SEV	Diminuir	2.03±0.46	-24.23	-39.64
FA3	TF	Diminuir	3.46±0.17	-19.34	-12.28
FA3	ALT	Aumentar	65.81±4.04	8.48	18.44

Em nosso estudo, selecionamos treze cultivares MR para participar dos ensaios de campo com base na resposta de ensaios feitos em ambiente controlado (dados não apresentados). Por isso, a variabilidade de ciclo das cultivares representada pela característica DIAS foi alta e pode afetar a resposta da resistência parcial à PBH, principalmente ao que se refere a mecanismos de escape. Sugerimos que ensaios de campo futuros sejam planejados com subgrupos de cultivares com grupo de maturidade fisiológica próximos. Essa estratégia pode garantir a mesma pressão da doença nos subgrupos de cultivares e levar a conclusões mais acuradas sobre a resistência parcial da soja ao fungo *S. sclerotium*.

A predição do ganho genético pelo índice FAI-BLUP apresentou maiores percentuais que o ganho genético pelo índice MGIDI. Ademais, Rocha et al., (2018) demonstraram que o índice FAI-BLUP teve potencial para gerar ganhos mais equilibrados em todas as características simultaneamente em seu estudo. Ainda assim, a coincidência de seleção das cultivares M 8527 RR, IGRARA 626 RR, BRS 256 RR e M 7908 RR por ambos os índices de seleção demonstram

o maior potencial genético dessas cultivares em relação as características avaliadas neste estudo. M 7908 RR e BRS 256 RR tiveram grande influencia sob os fatores 1 e 2 pelo índice MGIDI. Os fatores 1 e 2 calculados neste índice refletem diretamente nas características PROD, INC e SEV, características de maior interesse neste estudo.

A cultivar BMX VELOZ RR foi selecionada pelo índice MGIDI mas não pelo índice FAI-BLUP no ensaio 1 de campo. Em adição, foi apontado como altamente suscetível nos ensaios em ambiente controlado, que sugere baixa resistência fisiológica (Kolkman and Kelly, 2002). Nosso ensaio em campo demonstrou ambiente desfavorável para o desenvolvimento da doença, e conseqüentemente, uma baixa pressão de PBH sobre as cultivares testadas. Por isso, acreditamos que o genótipo CD 234 RR apresente maior pontencial do que BMX VELOZ RR, uma vez que CD 234 RR foi uma das cultivares selecionados também pelo índice FAI-BLUP. A cultivar BMX ATIVA RR classificada como AS à *Sclerotinia sclerotiorum* nos ensaios de casa de vegetação não foi selecionada no ensaio 1 de campo por não apresentar boa performance para nenhuma das características mensuradas neste estudo. Adicionalmente, BMX ENERGIA RR foi classificada como MR em casa de vegetação mas não foi selecionada por ambos os índices de seleção no ensaio 1 de campo.

14. CONCLUSÃO

Os índices de seleção MGIDI e FAI-BLUP foram eficientes e puderam contribuir para o ganho de seleção de sete características agrônômicas simultaneamente, mas principalmente para diminuir INC e SEV e aumentar PROD. O conjunto de cultivares que utilizamos não possibilitou o ganho de seleção desejado para diminuir a média de ciclo dos materiais selecionados. Contudo, estratégias de melhoramento como a seleção recorrente de linhagens associado ao uso destes índices de seleção, podem auxiliar a maximizar o ganho de seleção para todas as características avaliadas neste estudo.

15. REFERÊNCIAS

- Adams, P.B., Ayers, W.A., 1979. Ecology of *Sclerotinia* Species.
- Arahana, V.S., Graef, G.L., Specht, J.E., And, J.R.S., Eskrige, K.M., 2001. Identification of QTLs for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. *Crop Sci.* 41, 180–188.
- Auclair, J., Boland, G.J., Kohn, L.M., Rajcan, I., 2004. Genetic Interactions Between Glycine max and *Sclerotinia sclerotiorum* Using a Straw Inoculation Method. *Plant Dis.* 88, 891–895. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.8.891>

- Bastien, M., Huynh, T.T., Giroux, G., Iqura, E., Rioux, S., Belzile, F., 2012. A reproducible assay for measuring partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Can. J. Plant Sci.* 92, 279–288. <https://doi.org/10.4141/cjps2011-101>
- Bastien, M., Sonah, H., Belzile, F., 2014. Genome Wide Association Mapping of Resistance in Soybean with a Genotyping-by-Sequencing Approach. *Plant Genome* 7, 0. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2013.10.0030>
- Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M., Nonogaki, H., 2013. *Seeds*. Springer New York, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>
- Boudhrioua, C., Bastien, M., Torkamaneh, D., Belzile, F., 2020. Genome-wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean using whole-genome resequencing data 1–9.
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S., 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23, 2633–2635. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Carvalho, C. De, Souza, C.P., Forti, V.A., Ferreira, M., Junior, B., 2016. TRANSMISSION OF *Sclerotinia sclerotiorum* FROM SOYBEAN SEED TO SEEDLINGS. *Rev. Agric.* 91, 67–80.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: Grãos – Safra 2021/22, 11º Levantamento. Volume 9, Número 11, Agosto 2022, Brasília, 110 p.
- Contreras-Soto, R.I., Mora, F., de Oliveira, M.A.R., Higashi, W., Scapim, C.A., Schuster, I., 2017. A Genome-Wide Association Study for Agronomic Traits in Soybean Using SNP Markers and SNP-Based Haplotype Analysis. *PLoS One* 12, e0171105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171105>
- Costa-neto, G., Galli, G., Carvalho, H.F., Fritsche-neto, R., 2021. EnvRtype : a software to interplay enviromics and quantitative genomics in agriculture 11. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab040>
- Fall, M.L., Boyse, J.F., Wang, D., Willbur, J.F., Smith, D.L., Chilvers, M.I., 2018. Case Study of an Epidemiological Approach Dissecting Historical Soybean *Sclerotinia* Stem Rot

- Observations and Identifying Environmental Predictors of Epidemics and Yield Loss 108, 469–478. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-16-0446-R>
- Grant, D., Nelson, R.T., Cannon, S.B., Shoemaker, R.C., 2010. SoyBase, the USDA-ARS soybean genetics and genomics database. *Nucleic Acids Res.* 38, D843–D846. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp798>
- Gururani, M.A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Pandey, S.K., Park, S.W., 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 78, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.002>
- Hartman, G.L., Kull, L., Huang, Y.H., 1998. Occurrence of *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean Fields in East-Central Illinois and Enumeration of Inocula in Soybean Seed Lots. *Plant Dis.* 82, 560–564. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.5.560>
- Hartman, G.L., Rupe, J.C., Sikora, E.J., Domier, L.L., Davis, J.A., Steffey, K.L. (Eds.), 2016. Back Matter, in: *Compendium of Soybean Diseases and Pests, Fifth Edition*. The American Phytopathological Society, pp. 174–201. <https://doi.org/10.1094/9780890544754.bm>
- Henneberg, L., Jaccoud Filho, D. de S., Ruaro, L., Panobianco, M., 2012. Efficiency of methods to detect *Sclerotinia sclerotiorum* in commercial soybean seed lots. *Rev. Bras. Sementes* 34, 61–69. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000100008>
- Huzar-Novakowiski, J., Dorrance, A.E., 2018. Ascospore Inoculum Density and Characterization of Components of Partial Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean. *Plant Dis.* 102, 1326–1333. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-17-1786-RE>
- Juliatti, F.C., Sagata, E., Juliatti, B.C.M., 2013. Ranqueamento de genótipos de soja com resistência parcial por diferentes métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos à análise de correlação. *Biosci. J.* 29, 681–689.
- Kandel, R., Chen, C.Y., Grau, C.R., Dorrance, A.E., Liu, J.Q., Wang, Y., Wang, D., 2018. Soybean Resistance to White Mold : Evaluation of Soybean Germplasm Under Different Conditions and Validation of QTL. *Front. Plant Sci.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00505>
- Kim, H.S., Diers, B.W., 2000. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia stem rot* in soybean.

- Crop Sci. 40, 55–61. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.40155x>
- Kolkman, J.M., Kelly, J.D., 2002. Agronomic Traits Affecting Resistance to White Mold in Common Bean. *Crop Sci.* 42, 693–699.
- Kourelis, J., van der Hoorn, R.A.L., 2018. Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *Plant Cell* 30, 285–299. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579>
- Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L., Keller, B., 2009. A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat. *Science* (80-.). 323, 1360–1363. <https://doi.org/10.1126/science.1166453>
- Lehner, M.S., Paula Júnior, T.J., Hora Júnior, B.T., Teixeira, H., Vieira, R.F., Carneiro, J.E.S., Mizubuti, E.S.G., 2015. Low genetic variability in *Sclerotinia sclerotiorum* populations from common bean fields in Minas Gerais State, Brazil, at regional, local and micro-scales. *Plant Pathol.* 64, 921–931. <https://doi.org/10.1111/ppa.12322>
- Lin, F., Satish, S., Caio, C., Vieira, C., Paulo, M., Silva, D., Rojas, A., Lee, D., Liu, N., Mariano, E., Lee, P.Y., Dong, Z., Baldin, J., Leonardo, P., Ploper, D., Rupe, J., Chen, P., Wang, D., Nguyen, H.T., Lin, F., Chhapekar, S.S., Vieira, C.C., Paulo, M., Silva, D., Rojas, A., Lee, D., 2022. Breeding for disease resistance in soybean : a global perspective, *Theoretical and Applied Genetics*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04101-3>
- McCaghey, M., Willbur, J., Ranjan, A., Grau, C.R., Chapman, S., Diers, B., Groves, C., Kabbage, M., Smith, D.L., 2017. Development and Evaluation of Glycine max Germplasm Lines with Quantitative Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Plant Sci.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01495>
- Moellers, T.C., Singh, A., Zhang, J., Brungardt, J., Kabbage, M., Mueller, D.S., Grau, C.R., Ranjan, A., Smith, D.L., Chowda-Reddy, R. V., Singh, A.K., 2017. Main and epistatic loci studies in soybean for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance reveal multiple modes of resistance in multi-environments. *Sci. Rep.* 7, 3554. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03695-9>

- Mueller, D.S., Hartman, G.L., Pedersen, W.L., 1999. Development of Sclerotia and Apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from Infected Soybean Seed and Its Control by Fungicide Seed Treatment. *Plant Dis.* 83, 1113–1115. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1113>
- O’Leary, N.A., Wright, M.W., Brister, J.R., Ciufu, S., Haddad, D., McVeigh, R., Rajput, B., Robbertse, B., Smith-White, B., Ako-Adjei, D., Astashyn, A., Badretdin, A., Bao, Y., Blinkova, O., Brover, V., Chetvernin, V., Choi, J., Cox, E., Ermolaeva, O., Farrell, C.M., Goldfarb, T., Gupta, T., Haft, D., Hatcher, E., Hlavina, W., Joardar, V.S., Kodali, V.K., Li, W., Maglott, D., Masterson, P., McGarvey, K.M., Murphy, M.R., O’Neill, K., Pujar, S., Rangwala, S.H., Rausch, D., Riddick, L.D., Schoch, C., Shkeda, A., Storz, S.S., Sun, H., Thibaud-Nissen, F., Tolstoy, I., Tully, R.E., Vatsan, A.R., Wallin, C., Webb, D., Wu, W., Landrum, M.J., Kimchi, A., Tatusova, T., DiCuccio, M., Kitts, P., Murphy, T.D., Pruitt, K.D., 2016. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D733–D745. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1189>
- Olivoto, T., Nardino, M., 2020. MGIDI: a novel multi-trait index for genotype selection in plant breeding. *bioRxiv* 2020.07.23.217778.
- Pogoda, C.S., Reinert, S., Talukder, Z.I., Attia, Z., Collier, E.C.E., Kane, N.C., Hulke, B.S., 2020. Genetic loci underlying quantitative resistance to necrotrophic pathogens *Sclerotinia* and *Diaporthe* (*Phomopsis*), and correlated resistance to both pathogens. *Theor. Appl. Genet.* <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03694-x>
- Rocha, J.R. do A.S. de C., Machado, J.C., Carneiro, P.C.S., 2018. Multitrait index based on factor analysis and ideotype-design: proposal and application on elephant grass breeding for bioenergy. *GCB Bioenergy* 10, 52–60. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12443>
- Rose, L.E., Overdijk, E.J.R., van Damme, M., 2019. Small RNA molecules and their role in plant disease. *Eur. J. Plant Pathol.* 154, 115–128. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01614-w>
- Schwartz, H.F., Singh, S.P., 2013. Breeding Common Bean for Resistance to White Mold: A Review. *Crop Sci.* 53, 1832. <https://doi.org/10.2135/cropsci2013.02.0081>
- Vieira, R.F., Paula Júnior, T.J., Teixeira, H., de S. Carneiro, J.E., 2010. White Mold Management in Common Bean by Increasing Within-Row Distance Between Plants. *Plant*

- Dis. 94, 361–367. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-3-0361>
- Vuong, T.D., Diers, B.W., Hartman, G.L., 2008. Identification of QTL for Resistance to Sclerotinia Stem Rot in Soybean Plant Introduction 194639. *Crop Sci.* 48, 2209. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.01.0019>
- Webster, R.W., Roth, M.G., Reed, H., Mueller, B., Groves, C.L., McCaghey, M., Chilvers, M.I., Mueller, D.S., Kabbage, M., Smith, D.L., 2021. Identification of Soybean (*Glycine max*) Check Lines for Evaluating Genetic Resistance to Sclerotinia Stem Rot. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-20-2193-RE>
- Wei, W., Mesquita, A.C.O., Figueiró, A. de A., Wu, X., Manjunatha, S., Wickland, D.P., Hudson, M.E., Juliatti, F.C., Clough, S.J., 2017. Genome-wide association mapping of resistance to a Brazilian isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean genotypes mostly from Brazil. *BMC Genomics* 18, 849. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4160-1>
- Willbur, J., McCaghey, M., Kabbage, M., Smith, D.L., 2019. An overview of the *Sclerotinia sclerotiorum* pathosystem in soybean: impact, fungal biology, and current management strategies. *Trop. Plant Pathol.* 44, 3–11. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0250-0>
- Willbur, J.F., Ding, S., Marks, M.E., Lucas, H., Grau, C.R., Groves, C.L., Kabbage, M., Smith, D.L., 2017. Comprehensive Sclerotinia Stem Rot Screening of Soybean Germplasm Requires Multiple Isolates of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.* 101, 344–353. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1055-RE>
- Wu, J., Zhao, Q., Yang, Q., Liu, H., Li, Q., Yi, X., Cheng, Y., Guo, L., Fan, C., Zhou, Y., 2016. Comparative transcriptomic analysis uncovers the complex genetic network for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Sci. Rep.* 6, 19007. <https://doi.org/10.1038/srep19007>
- Yang, X.B., Workneh, F., Lundeen, P., 1998. First Report of Sclerotium Production by *Sclerotinia sclerotiorum* in Soil on Infected Soybean Seeds. *Plant Dis.* 82, 264–264. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.2.264B>
- Zaidi, S.S.-A., Mukhtar, M.S., Mansoor, S., 2018. Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance. *Trends Biotechnol.* 36, 898–906. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.04.005>

- Zhang, Z., Ersoz, E., Lai, C., Todhunter, R.J., Tiwari, H.K., Gore, M.A., Bradbury, P.J., Yu, J., Arnett, D.K., Ordovas, J.M., Buckler, E.S., 2010. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42, 355–360. <https://doi.org/10.1038/ng.546>
- Zhao, J., Wang, J., An, L., Doerge, R.W., Chen, Z.J., Grau, C.R., Meng, J., Osborn, T.C., 2007. Analysis of gene expression profiles in response to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Planta* 227, 13–24. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0586-z>
- Zhao, X., Han, Y., Li, Y., Liu, D., Sun, M., Zhao, Y., Lv, C., Li, D., Yang, Z., Huang, L., Teng, W., Qiu, L., Zheng, H., Li, W., 2015. Loci and candidate gene identification for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max* L. Merr.) via association and linkage maps. *Plant J.* 82, 245–255. <https://doi.org/10.1111/tpj.12810>

16. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho acrescenta resultados importantes sobre o conhecimento da resistência parcial da soja contra *S. sclerotiorum*. Podemos concluir que, mesmo se tratando de uma doença reconhecidamente de caráter quantitativo, a diferença dos marcadores SNPs nos diferentes tempos de inoculação pode significar diferença no processo de defesa das plantas ao longo do seu desenvolvimento. Assim, os resultados da GWAS nos levam a crer que vários conjuntos diferentes de genes de pequeno efeito atuam em cada tempo de desenvolvimento da soja.

A suspensão de ascósporo foi eficaz em reproduzir doença no campo. Contudo, devido a fatores ambientais, o desenvolvimento da doença foi prejudicado e os níveis de PBH foram considerados baixos. Mesmo em condições de baixa pressão da doença no campo, os índices de seleção multivariados MGIDI e FAI-BLUP foram eficientes em reduzir a incidência e a severidade de PBH em 19% e 15%, respectivamente, e aumentar a produtividade em 16% no diferencial de seleção. Quatro cultivares foram selecionadas por ambos os índices, se mostrando promissoras para condições de baixa pressão de PBH. Todavia, é necessário realizar mais estudos em condições de alta pressão da doença para selecionar com maior resistência parcial contra *S. sclerotiorum*.