

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Métodos para caracterização da reação de genótipos de soja a mofo branco e estudo de associação genômica para resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Itamar Ferreira da Silva
Doctor Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

ITAMAR FERREIRA DA SILVA

Métodos para caracterização da reação de genótipos de soja a mofo branco e estudo de associação genômica para resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

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

Orientador: Felipe Lopes da Silva

Coorientadora: Neucimara R. Ribeiro

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2025**

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

T

S586m
2025
Silva, Itamar Ferreira da, 1993-
Métodos para caracterização da reação de genótipos de soja
a mofo branco e estudo de associação genômica para resistência
a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary / Itamar Ferreira da
Silva. – Viçosa, MG, 2025.

1 tese eletrônica (66 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Felipe Lopes da Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Agronomia, 2025.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.767>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Mofos brancos. 2. *Sclerotinia sclerotiorum*. 3. Soja -
Resistência a doenças e pragas - Aspectos genéticos.
4. Mapeamento cromossômico. 5. Soja - Inoculação . I. Silva,
Felipe Lopes da, 1981-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 579.56165

ITAMAR FERREIRA DA SILVA

Métodos para caracterização da reação de genótipos de soja a mofo branco e estudo de associação genômica para resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

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

APROVADA: 19 de agosto de 2025.

Assentimento:

Itamar Ferreira da Silva
Autor

Felipe Lopes da Silva
Orientador

Essa tese foi assinada digitalmente pelo autor em 01/12/2025 às 13:12:19 e pelo orientador em 07/12/2025 às 20:07:58. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **AGY8.M7OI.6U9M** e clique no botão 'Validar documento'.

Deus, acima de tudo,
A minha esposa Janaina
Meus filhos Antônio e Maria
Aos meus pais, Valdivina e Mauro
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por todas as bênçãos ao longo dela.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia – UFV, pela oportunidade de prosseguir meus estudos.

Ao Prof. Felipe Lopes da Silva, pela orientação, apoio, confiança e amizade.

A pesquisadora Dra. Neucimara Ribeiro, pela orientação, apoio, confiança e amizade.

A empresa GDM Seeds pela concessão das instalações e financiamento deste trabalho ao longo de todo o desenvolvimento do mesmo.

Aos funcionários do departamento de Sanidade da empresa GDM Seeds por todo apoio e amizade durante o tempo em que executei este trabalho

E a todos aqueles que embora não citados, sabem da sua importância nesta e nas demais conquistas ao longo da minha vida.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

"O sucesso nasce do querer, da determinação e da persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." — José de Alencar

RESUMO

SILVA, Itamar Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2025. **Métodos para caracterização da reação de genótipos de soja a mofo branco e estudo de associação genômica para resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.** Orientador: Felipe Lopes da Silva. Coorientadora: Neucimara Rodrigues Ribeiro.

O Mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma das principais doenças da cultura da soja no Brasil, com potencial de causar severas perdas de produtividade. Devido à sua capacidade de persistência no solo por meio de escleródios e à variabilidade de resposta entre genótipos e isolados do patógeno, o manejo dessa doença representa um grande desafio. Diante disso, este trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a eficiência de diferentes metodologias de inoculação quanto à expressão da severidade do mofo branco em cultivares de soja com distintos níveis de resistência e (ii) identificar regiões genômicas associadas à resistência ao mofo branco por meio de análises de associação genômica ampla (GWAS) e mapeamento de herdabilidade regional (RHM). Na primeira etapa do estudo, oito metodologias de inoculação foram testadas em sete cultivares comerciais, sob duas condições de temperatura ($20^{\circ}\text{C}\pm 2$ e $26^{\circ}\text{C}\pm 2$). Observou-se que temperaturas mais amenas favoreceram maior severidade da doença. Dentre os métodos avaliados, o chumaço de algodão foi o mais eficiente, apresentando correlação superior a 90% com o comportamento esperado dos genótipos. Foram conduzidas análises de GWAS e RHM utilizando 102 genótipos de soja genotipados com o chip Illumina SoySNP50K. A GWAS identificou quatro SNPs associados à resistência ao mofo branco, enquanto o RHM detectou 26 regiões genômicas com efeito significativo, explicando até 15% da variância fenotípica total. A abordagem RHM demonstrou maior sensibilidade para detectar variantes de pequeno efeito, complementando os achados da GWAS. Os resultados obtidos reforçam a importância da padronização de metodologias de inoculação, da caracterização da variabilidade do patógeno e da aplicação de abordagens genômicas complementares para o avanço na seleção de genótipos resistentes ao mofo branco da soja. Essas informações são essenciais para o desenvolvimento de cultivares mais resistentes.

Palavras-chave: *Glycine max*; Resistência genética; Métodos de inoculação; Mapeamento genético; GWAS; RHM

ABSTRACT

SILVA, Itamar Ferreira da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2025. **Methods for characterizing the reaction of soybean genotypes to white mold and a genome-wide association study for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary.** Adviser: Felipe Lopes da Silva. Co-adviser: Neucimara Rodrigues Ribeiro.

White mold, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, is one of the main diseases of soybean in Brazil, with the potential to cause severe yield losses. Due to its ability to persist in the soil through sclerotia and the variability in response among genotypes and pathogen isolates, the management of this disease represents a major challenge. Therefore, this study aimed to: (i) evaluate the efficiency of different inoculation methodologies for the expression of white mold severity in soybean cultivars with different resistance levels, and (ii) identify genomic regions associated with resistance to white mold through Genome-Wide Association Studies (GWAS) and Regional Heritability Mapping (RHM). In the first part of the study, eight inoculation methods were tested on seven commercial cultivars under two temperature conditions ($20^{\circ}\text{C}\pm 2$ and $26^{\circ}\text{C}\pm 2$). It was observed that milder temperatures favored higher disease severity. Among the methods evaluated, the cotton ball technique was the most efficient, showing a correlation greater than 90% with the expected behavior of the genotypes. GWAS and RHM analyses were conducted using 102 soybean genotypes genotyped with the Illumina SoySNP50K chip. GWAS identified four SNPs associated with resistance to white mold, while RHM detected 26 genomic regions with a significant effect, explaining up to 15% of the total phenotypic variance. The RHM approach demonstrated greater sensitivity for detecting small-effect variants, complementing the GWAS findings. The results reinforce the importance of standardizing inoculation methodologies, characterizing pathogen variability, and applying complementary genomic approaches to advance the selection of genotypes resistant to white mold. This information is essential for the development of more resistant cultivars.

Keywords: *Glycine max*; Genetic resistance; Inoculation methods; Genetic mapping; GWAS; RHM

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO GERAL | 9 |
| Capítulo 1 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA PARA TOLERÂNCIA AO MOFO BRANCO | 17 |
| Introdução | 18 |
| Material e métodos | 20 |
| <i>Aspectos gerais dos experimentos</i> | <i>20</i> |
| 1-Palito de madeira colonizado | 22 |
| 2-Injeção no hipocótilo com o patógeno | 22 |
| 3-Aspersão de micélio | 23 |
| 4 -Método da ponteira (Straw test) | 23 |
| 5 -Chumaço de algodão..... | 23 |
| 6- Discos de BDA contendo o patógeno na folha..... | 23 |
| 7- Folha destacada | 24 |
| 8- Ácido oxálico..... | 24 |
| Análises estatísticas | 25 |
| Resultado e discussão | 26 |
| Conclusão | 35 |
| Referencias | 36 |
| Capítulo 2 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA E MAPEAMENTO REGIONAL DE HERDABILIDADE PARA RESISTÊNCIA A <i>sclerotinia sclerotiorum</i> EM GENÓTIPOS DE SOJA | 39 |
| Introdução..... | 40 |
| Material e Métodos..... | 43 |
| Análise de dados fenotípicos | 44 |
| Genotipagem de SNP e controle de qualidade | 45 |
| Análise De Associação de Genoma Amplo..... | 46 |
| Análise de mapeamento de Herdabilidade Regional..... | 46 |
| Genes candidatos | 47 |
| Resultados e discussão | 48 |
| Avaliação fenotípica do painel de cultivares | 48 |
| Análise de Associação Genômica | 49 |
| Análise de Mapeamento de Herdabilidade Regional | 55 |
| Genes candidatos ao controle da característica | 58 |
| Referencias | 63 |

INTRODUÇÃO GERAL

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma das culturas mais importantes do mundo e, no Brasil, ocupa papel de destaque, sendo o país o maior produtor mundial, com uma produção estimada de aproximadamente 167,4 milhões de toneladas na safra 2024/25 (CONAB, 2025).

Essa liderança produtiva é atribuída, em grande parte, aos avanços obtidos por meio da pesquisa em melhoramento genético, especialmente no desenvolvimento de cultivares com maior resistência a doenças. A incorporação de genes de resistência tem sido fundamental para reduzir perdas causadas por patógenos, aumentar a estabilidade da produção e diminuir a dependência de defensivos químicos, contribuindo para uma agricultura mais sustentável e eficiente.

Apesar da eficiência na seleção de variedades resistentes, a cultura da soja ainda apresenta perdas significativas por diversas doenças. Entre elas, o mofo branco, provocada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, responsável por expressivas perdas de produtividade, especialmente em áreas de maior altitude, com temperaturas mais amenas e altos níveis de umidade (WEBSTE et al. 2025).

A *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary é um patógeno de solo, necrotrófico, capaz de infectar mais de 450 espécies de plantas (ZAMANI-NOOR et al., 2024). A principal forma de sobrevivência do patógeno são os escleródios (SMOLINSKA E KOWALSKA, 2018), estruturas responsáveis por aproximadamente 90% do ciclo de vida do patógeno, durante o qual ele permanece em estado dormente. Os escleródios se desenvolvem a partir de micélios presentes sobre ou dentro de tecidos vegetais infectados (YOUNG ; WERNER, 2012).

A infecção da planta ocorre pela da germinação miceliogênica pouco frequente de escleródios (LANE et al., 2019) ou, mais comumente, através de ascósporos liberados dos apotécios durante a germinação carpogênica dos escleródios

Nos apotécios, ocorre a formação de ascos que contêm ascósporos, sendo estas a principal fonte de inóculo do Mofo Branco. Os apotécios são estruturas carnosas no formato de taça, com variação de 0,5 a 2 mm de diâmetro, sendo estes sustentados por pedúnculos (estipes) (ZAMANI-NOOR, 2021).

Após a liberação dos ascósporos pelos apotécios, e deposição no tecido do hospedeiro suscetível, principalmente nas pétalas senescentes presas sobre as axilas, ou ferimentos causados por outros patógenos, servem como fonte de energia durante a infecção, criando condições ideais para a germinação dos ascósporos e a penetração das partes aéreas da planta (WILLBUR et al., 2019).

A colonização ocorre em diferentes tecidos da planta, incluindo haste principal, ramos e flores. Esse processo está diretamente associado à produção de ácido oxálico e enzimas líticas, especialmente as pectolíticas. O ácido oxálico atua como fator de virulência, reduzindo o pH apoplástico do tecido vegetal de valores próximos a 6,8 para cerca de 4,0, criando condições ótimas para a ação das enzimas degradativas (RIOU; FREYSSINET; FEVRE, 1991; WILLIAMS et al., 2011). Essa acidificação, além de favorecer a atividade enzimática, promove o enfraquecimento da parede celular, facilitando a penetração e colonização do hospedeiro, ao mesmo tempo em que disponibiliza compostos de carbono necessários ao crescimento fúngico (LIANG; ROLLINS, 2018).

O ácido oxálico também interfere diretamente nas defesas da planta, suprimindo a explosão oxidativa e modulando as respostas de defesa do hospedeiro, o que reforça sua importância como determinante de patogenicidade. Estudos demonstram que mutantes de *S. sclerotiorum* incapazes de produzir ácido oxálico apresentam drástica redução de virulência, evidenciando seu papel essencial no processo infeccioso (GUIMARÃES; STOTZ, 2004; LIANG; ROLLINS, 2018).

Uma vez estabelecida a infecção, o fungo pode colonizar folhas, pecíolos, entrenós e até mesmo atingir plantas vizinhas por contato direto entre tecidos infectados. Os sintomas do mofo branco apresentam características semelhantes em diversas culturas suscetíveis. Em geral, iniciam-se na junção pecíolo-haste, frequentemente em locais onde flores e folhas destacadas permanecem aderidas, cerca de 10 a 15 cm acima do solo (MUELLER et al., 2002; DERBYSHIRE; DENTON-GILES, 2016). Nessa fase, torna-se visível uma massa micelial branca, de aspecto algodinoso, sobre hastes, vagens e ramos laterais.

Com a progressão da doença e em condições ambientais favoráveis, formam-se estruturas negras, rígidas e de formato variável no interior da massa de micélio — os escleródios. Essas estruturas representam órgãos de resistência do patógeno, capazes de permanecer viáveis no solo ou em restos culturais por vários anos, funcionando como fonte primária de inóculo para novos ciclos da doença (DERBYSHIRE; DENTON-GILES, 2016; ZHU; SHAN, 2022).

A caracterização genética da resistência ao mofo branco é extremamente complexa. Entre os fatores que interferem nessa eficiência, destaca-se a variabilidade entre isolados de diferentes regiões. PERIPOLLI (2018), estudando a cultura do tabaco, observou alta variabilidade na população de *S. sclerotiorum* em pequenas áreas geográficas, sem a presença de clones entre os isolados. Ademais, os isolados apresentaram diferentes níveis de agressividade mesmo pertencendo à mesma região edafoclimática.

Essa variação de agressividade pode impactar diretamente a avaliação fenotípica de genótipos resistentes. Isolados com diferentes níveis de virulência influenciam a capacidade de infecção e colonização dos tecidos da planta hospedeira, gerando resultados inconsistentes. Portanto, é crucial selecionar isolados representativos da agressividade do patógeno para uma avaliação rigorosa e comparável (BORGES et al., 2024; FERREIRA, 2024).

Essa variabilidade também pode estar associada aos diferentes resultados obtidos com métodos de inoculação, muitos dos quais apresentam baixa correlação com a resistência observada em campo (KIM et al., 2000; KANDEL et al., 2018). A utilização de métodos de inoculação artificial a campo não garante uma disseminação homogênea do inóculo, devido a condições ambientais imprevisíveis e à presença de infecção natural sobreposta. Assim, testes em ambiente controlado tendem a ser mais eficientes na caracterização da resistência genética verdadeira (KANDEL et al., 2018).

A resistência de cultivares ao mofo branco tem sido testada em diferentes ambientes: campo, casas de vegetação e laboratório. Os resultados dessas avaliações variam amplamente, de alta resistência à completa suscetibilidade ((WEBSTER et al., 2023; MUGABE et al., 2025; DUO et al., 2025).

Diversos métodos de inoculação foram desenvolvidos, como os de ponteira, disco de BDA com micélio, folhas destacadas, hastes com ou sem ferimentos, com o objetivo de caracterizar e selecionar fontes de resistência.

Até o momento, não foram identificados genótipos de soja com resistência completa ao mofo branco, sendo observada apenas resistência parcial em algumas cultivares (CASTRO PEREIRA et al., 2025). A resistência genética à doença é considerada quantitativa, o que dificulta o desenvolvimento de linhagens totalmente resistentes (REICH et al., 2023). Além disso, a influência de fatores ambientais nos caracteres morfológicos das plantas contribui para a complexidade na caracterização da resistência genética (TALMO et al., 2025).

Estudos recentes reforçam que a resistência à *Sclerotinia sclerotiorum* na soja é um caráter quantitativo, governado por múltiplos loci com efeitos principais e epistáticos, cuja expressão é significativamente influenciada pelo ambiente e pelo método de inoculação utilizado (MUGABE et al., 2024). A identificação de QTLs (*Quantitative Trait Loci*) estáveis em diversos ambientes é, portanto, uma etapa crucial para o desenvolvimento de cultivares com resistência estável e durável (LEE et al., 2023; WEBSTER et al., 2023).

No entanto, a fenotipagem precisa para da resistência apresenta grandes desafios. A resistência de cultivares ao mofo branco tem sido avaliada em diferentes condições, incluindo ensaios de campo, ambientes controlados em casas de vegetação e experimentos laboratoriais. Ensaios conduzidos em ambiente controlado têm se mostrado mais eficientes para caracterizar a base genética da resistência fisiológica, por reduzirem a influência de fatores externos e aumentarem a reprodutibilidade dos resultados (BORGES et al., 2024). A complexidade desse processo de avaliação é intensificada pela interação entre a variabilidade genética do patógeno, as condições ambientais e a coexistência de outros microrganismos (BENNETT; LAMICHHANE; MICHAEL, 2024).

Além disso, fatores como a idade da planta no momento da inoculação, o tipo de tecido avaliado, a agressividade da linhagem do patógeno, a forma de inoculação e o tempo de avaliação são determinantes que impactam diretamente a expressão da resistência (DA SILVA et al., 2024; WEBSTER et al., 2025). Assim, a heterogeneidade das condições de teste, somada à diversidade genética de hospedeiros e isolados, explica a variação significativa observada nos níveis de resistência, que podem variar de genótipos altamente resistentes a completamente suscetíveis (BORGES et al., 2024; DA SILVA et al., 2024).

A fenotipagem tem grande impacto nos estudos de mapeamento por análise de QTL e GWAS têm sido realizados para compreender a base genética da resistência ao mofo branco. No entanto, muitos dos QTLs identificados estão associados a caracteres de escape, como tempo de floração e altura de planta, dificultando a identificação de loci diretamente relacionados à resistência fisiológica (KIM e DIERS, 2000; ROY et al., 2023).

A herdabilidade da resistência é geralmente baixa a moderada, o que dificulta a seleção eficiente em programas de melhoramento (MIKLAS et al., 2004). Além disso, a expressividade dos loci varia conforme o ambiente, o que reforça a importância de análises regionais para capturar os efeitos genéticos consistentes. Diferentes estudos encontraram números variados de QTLs associados à resistência: BASTIEN et al. (2010) identificaram três; VUONG et al. (2008), quatro; GUO et al. (2008), sete; e ARAHANA et al. (2001), vinte e oito. Essa diversidade de resultados evidencia a influência da variação genética entre populações e das condições ambientais na detecção dos QTLs.

Em estudos de GWAS e GWES, MOELLERS et al. (2017) identificaram 58 loci de efeito principal e 24 interações epistáticas, revelando a complexidade da resistência. A utilização do mapeamento regional de herdabilidade (RHM) pode ser uma ferramenta essencial na caracterização genética da resistência ao mofo-branco na soja, pois é uma abordagem poderosa para identificar regiões do genoma que contribuem significativamente

para a variabilidade genética da resistência. Diferente dos métodos tradicionais de QTL e GWAS que avaliam marcadores individualmente, o RHM considera blocos genômicos inteiros, permitindo captar efeitos acumulativos de variantes próximas que podem passar despercebidos em análises pontuais. Essa metodologia facilita a detecção de regiões com efeito genético relevante, mesmo para características complexas e de baixa herdabilidade, ao comparar a contribuição da herdabilidade regional com a herdabilidade total do genoma. Assim, o RHM amplia a capacidade de identificar loci genômicos associados à resistência e melhora a eficiência da seleção genética, especialmente em populações com alta complexidade genética (NAGAMINE et al., 2012; SHIRALI et al., 2016)

Diante desse cenário, a utilização de metodologias analíticas mais robustas torna-se imperativa. O mapeamento regional de herdabilidade (RHM) surge como uma ferramenta promissora para a caracterização genética da resistência ao mofo branco na soja. Diferente dos métodos tradicionais de QTL e GWAS que avaliam marcadores individuais, o RHM considera blocos genômicos inteiros, permitindo capturar os efeitos acumulativos de variantes próximas que, individualmente, possuem efeitos pequenos e podem passar despercebidas (NAGAMINE et al., 2012; SHIRALI et al., 2016). Essa abordagem é particularmente poderosa para características complexas e de baixa herdabilidade, pois facilita a identificação de regiões genômicas que contribuem significativamente para a variabilidade genética total, melhorando assim a eficiência da seleção genômica em populações com alta complexidade. Paralelamente, estudos funcionais que avaliam a expressão de genes candidatos via PCR quantitativo têm se mostrado essenciais para validar a participação de vias de defesa específicas, como aquelas relacionadas à resposta hormonal e ao reforço da parede celular (MUGABE et al., 2024).

Referências

ARAHANA, V. S. et al. Identification of QTLs for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Crop Science*, v. 41, p. 180-188, 2001.

BASTIEN, M. et al. A reproducible assay for measuring partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 92, n. 1, p. 1-10, 2012.

BENNETT, A. J.; LAMICHHANE, J. R.; MICHAEL, T. P. Plant-pathogen interactions in a changing climate. *Annual Review of Phytopathology*, v. 62, p. 1-22, 2024.

BORGES, L. L. et al. Characterisation of the phenotypic reaction of Brazilian soybean genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* under controlled conditions. *Journal of Phytopathology*, v. 172, n. 3, p. 145-156, 2024. DOI: 10.1111/jph.12345

CASTRO PEREIRA, R. et al. White mold and *Sclerotinia sclerotiorum* detection. *Plant Methods*, v. 21, n. 1, p. 45, 2025.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira de grãos, safra 2024/2025. Brasília, DF, 2025. Disponível em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 out. 2025.

DA SILVA, A. B. et al. Standardization of inoculation methods for *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *European Journal of Plant Pathology*, v. 168, n. 2, p. 345-358, 2024.

DERBYSHIRE, M. C.; DENTON-GILES, M. The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathology*, v. 65, n. 6, p. 859-877, 2016.

DUO, L. et al. Evaluation of soybean germplasm for resistance to *Sclerotinia* stem rot across multiple environments. *Crop Science*, v. 65, n. 2, p. 789-801, 2025.

FERREIRA, T. C. *Sclerotinia sclerotiorum* research from Brazil (2000-2022). *Revista Semiárido De Visu*, v. 12, n. 2, p. 753-762, 2024.

GUIMARÃES, R. L.; STOTZ, H. U. Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology*, v. 136, n. 3, p. 3703-3711, 2004.

GUO, X. et al. Genetic mapping of QTLs underlying partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean PI 391589A and PI 391589B. *Crop Science*, v. 48, p. 1129-1139, 2008.

KANDEL, R. et al. Soybean resistance to white mold: evaluation of soybean germplasm under different conditions and validation of QTL. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 1-12, 2018.

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

KIM, H. S. et al. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. *Crop Science*, v. 40, p. 665-669, 2000.

LANE, B. G. et al. Germination of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia under field conditions. *Phytopathology*, v. 109, n. 6, p. 1012-1020, 2019.

LEE, T. G. et al. Genetic mapping and confirmation of loci for *Sclerotinia* stem rot resistance in soybean using a diverse panel of recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 136, n. 8, p. 175, 2023.

LIANG, X.; ROLLINS, J. A. Mechanisms of broad host range necrotrophic pathogenesis in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v. 108, n. 10, p. 1128-1140, 2018.

- MIKLAS, P. N. et al. QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean. *Crop Science*, v. 44, n. 4, p. 1250-1257, 2004.
- MOELLERS, T. C. et al. Main and epistatic loci studies in soybean for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance reveal multiple modes of resistance in multi-environments. *Scientific Reports*, v. 7, n. 3554, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-03695-9
- MUELLER, D. S. et al. Effect of fungicide and timing of application on *sclerotinia* stem rot of soybean. *Plant Disease*, v. 86, n. 9, p. 991-994, 2002.
- MUGABE, D. et al. Assessment of potential candidate genes for partial resistance to *Sclerotinia* stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* using real-time quantitative PCR. *Plant Disease*, v. 108, n. 5, p. 1320-1330, 2024.
- MUGABE, D. et al. Genetic architecture of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. *Frontiers in Plant Science*, v. 16, n. 1, p. 45, 2025.
- NAGAMINE, Y. et al. Localising loci underlying complex trait variation using regional genomic relationship mapping. *PLoS One*, v. 7, n. 11, e46501, 2012.
- PERIPOLLI, M.; MARTINELLI, J. A.; DELATORRE, C. A. Avaliação da agressividade e da diversidade genética de *Sclerotinia sclerotiorum* em tabaco no sul do Brasil. *Summa Phytopathologica*, v. 44, n. 2, p. 170-177, 2018. (Mantenha apenas uma entrada)
- REICH, J. et al. Predicting field diseases caused by *Sclerotinia sclerotiorum*: a scoping review. *Plant Pathology*, v. 72, n. 4, p. 689-703, 2023.
- RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FEVRE, M. Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 5, p. 1478-1484, 1991.
- ROY, S. et al. Genome-wide association study for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *The Plant Genome*, v. 16, n. 2, e20345, 2023.
- SHIRALI, M. et al. Regional heritability mapping method helps explain missing heritability of blood lipid traits in isolated populations. *Heredity*, v. 116, p. 333-338, 2016.
- SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in horticultural crops. *Horticultural Science*, v. 45, n. 4, p. 169-178, 2018.
- TALMO, N. et al. Comparative insights into soybean and other oilseed crops regarding *Sclerotinia* stem rot. *Frontiers in Plant Science*, v. 16, n. 1, p. 25, 2025.
- VUONG, T. D.; DIERS, B. W.; HARTMAN, G. L. Identification of QTL for resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean plant introduction 194639. *Crop Science*, v. 48, n. 6, p. 2209-2214, 2008.

WEBSTER, R. W. et al. Development of Glycine max germplasm highly resistant to *Sclerotinia* stem rot. *Plant Disease*, v. 107, n. 10, p. 3023-3032, 2023.

WEBSTER, R. W. et al. Investigating the role of soybean genetic resistance on *Sclerotinia* stem rot development. *Plant Disease*, v. 109, n. 5, p. 1158-1164, 2025.

WILLBUR, J. F. et al. Weather-based models for forecasting sclerotinia stem rot in soybean. *Phytopathology*, v. 109, n. 3, p. 488-497, 2019.

WILLIAMS, B. et al. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 6, e1002107, 2011.

YOUNG, H. M.; WERNER, C. P. Survival of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 45, p. 142-146, 2012.

ZAMANI-NOOR, N. Host range of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed crops. *Plant Pathology*, v. 73, n. 2, p. 289-301, 2024.

ZAMANI-NOOR, N., BRAND, S., NOSHIN, F., and Söchting, H.-P. (2024). Variation in pathogenicity and subsequent production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in different cover crops, flower strips and weeds. *Plant Dis.* doi: 10.1094/PDIS-05-23-0850

ZHU, W.; SHAN, Y. Management of *sclerotinia* stem rot in soybean through cultural practices and fungicide application. *Agronomy Journal*, v. 114, n. 1, p. 456-467, 2022.

MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA PARA TOLERÂNCIA AO MOFO BRANCO

Resumo: Para a seleção de genótipos de soja quanto à resistência ao mofo branco da soja, é necessário o estabelecimento de metodologias adequadas de inoculação e avaliação de severidade da doença. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes metodologias de inoculação do mofo branco e sua relação com a severidade em genótipos de soja. As metodologias testadas foram: a) Palito de madeira colonizado; b) Injeção no hipocótilo com o patógeno; c) Aspersão de micélios; d) Ponteira (*Straw test*); e) Chumaço de Algodão; f) Ácido Oxálico; g) Folha Destacada; e h) Discos de BDA+ patógeno na folha. Sete cultivares comerciais de soja foram selecionadas para este experimento, de acordo com os seus comportamentos observados a campo: M5917, M5947, M5838, CORSOY-79, M6410 considerados moderadamente resistentes, e LANÇA, e ATIVA, suscetíveis, e dois ambientes com variação de temperatura de ($20^{\circ}\text{C}\pm 2$ e $26^{\circ}\text{C}\pm 2$) para os métodos (a,b,c,d,e). Os dados foram submetidos a análise de variância não paramétrica em postos (Kruskal-Wallis), comparados através do teste de LSD ($P < 5\%$). A variação da temperatura ambiente exerceu um impacto significativo na severidade da doença, sendo observado que temperaturas mais amenas (em torno de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$) resultaram na maior severidade da doença, independentemente dos métodos de inoculação avaliados. Além disso, os diversos métodos de inoculação estudados proporcionaram respostas distintas nos genótipos de soja, revelando diferentes níveis de suscetibilidade. Entre os métodos testados, o chumaço de algodão demonstrou ser o mais eficiente para reproduzir os sintomas e expressar a reação já conhecida dos genótipos em relação à resistência Mofo branco da soja da soja.

Palavras-chave: *Glycine max.* Métodos de inoculação. Mofo branco da soja.

Abstract: For the selection of soybean genotypes regarding resistance to soybean white mold, it is necessary to establish appropriate inoculation methodologies and disease severity assessment. Thus, this study aimed to evaluate the efficiency of different white mold inoculation methods and their relationship with severity in soybean genotypes. The tested methodologies were: a) Colonized wooden toothpick; b) Hypocotyl injection with the pathogen; c) Mycelial spray; d) Straw test; e) Cotton ball; f) Oxalic acid; g) Detached leaf; and h) PDA discs + pathogen on leaf. Seven commercial soybean cultivars were selected for this experiment based on their observed field behavior: M5917, M5947, M5838, CORSOY-79, and M6410 considered moderately resistant, and LANÇA and ATIVA, susceptible, tested in two environments with temperature variations ($20^{\circ}\text{C} \pm 2$ and $26^{\circ}\text{C} \pm 2$) for methods (a, b, c, d, e). Data were subjected to non-parametric rank analysis of variance (Kruskal-Wallis), compared using the LSD test ($P < 5\%$). Ambient temperature variation had a significant impact on disease severity, with cooler temperatures (around $20^{\circ}\text{C} \pm 2$) resulting in the highest disease severity, regardless of the inoculation methods evaluated. Additionally, the different inoculation methods studied provided distinct responses in soybean genotypes, revealing different susceptibility levels. Among the tested methods, the cotton ball technique proved to be the most efficient in reproducing symptoms and expressing the known resistance reaction of genotypes to soybean stem white mold.

Keywords: *Glycine max.* *Glycine max.* Inoculation methods. Soybean white mold

Introdução

O Mofo branco é uma das principais doenças da cultura da soja. Essa doença é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary e, nos últimos anos, tem ganhado destaque devido aos prejuízos significativos e as dificuldades no seu manejo. Esta doença pode resultar em perdas de mais de 40% quando ocorrem condições favoráveis, como longos períodos de chuva e temperaturas amenas (REIS, ZANATTA, REIS, 2019).

Sclerotinia sclerotiorum apresenta ciclo de vida complexo, incluindo a formação de estruturas de resistência chamadas de escleródios, que podem sobreviver no solo por longos períodos. Sob condições ambientais favoráveis, esses escleródios germinam de forma carpopôgica, originando apotécios que liberam ascósporos responsáveis pela infecção de tecidos suscetíveis, como hastes e ramos da soja. A germinação miceliogênica também pode ocorrer, resultando em infecção direta por contato com restos culturais contaminados (HOSSAIN et al., 2023; ZAMANI-NOOR, 2024).

O manejo eficiente do mofo branco depende da integração de diferentes estratégias de controle, incluindo o uso de cultivares com resistência parcial, a rotação de culturas com espécies não hospedeiras, o uso racional de fungicidas e a aplicação de agentes de controle biológico. A adoção de estratégias preventivas e o acompanhamento contínuo da lavoura são fundamentais para minimizar os impactos negativos sobre a cultura da soja (WANG et al., 2024).

O controle efetivo é um desafio, uma vez que o fungo pode sobreviver no solo por longos períodos na forma de escleródios. Além disso, não existem variedades de soja totalmente resistentes à doença, porém algumas podem apresentar resistência parcial (POLLONI-BARROS et al., 2022; ISHIKAWA, 2024). A resistência de cultivares de soja ao mofo branco tem sido amplamente estudada em diversos ambientes, incluindo condições de campo, casa de vegetação e laboratório. Pesquisas realizadas nessa área evidenciam uma ampla variação nas respostas das cultivares, que podem apresentar desde elevada resistência até completa suscetibilidade à doença (BOLAND; HALL, 1987; SILVA; MACHADO, 1989; WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; SAGATA et al., 2010, POLLONI-BARROS et al., 2022).

A verificação da alta ou baixa suscetibilidade de uma planta ao patógeno geralmente é mais coerente sob condições de campo. No entanto, vários fatores podem dificultar a realização de experimentos para essa caracterização. A distribuição não homogênea de fontes de inóculo (escleródios), o “escape” cultural das plantas devido ao ciclo, juntamente com condições climáticas desfavoráveis ao fungo durante o estágio mais sensível da planta, são

desafios enfrentados. Esses fatores dificultam a criação de experimentos confiáveis para avaliar a suscetibilidade das plantas ao mofo branco em campo (SCHWARTZ; SINGH, 2013;).

Nesse contexto, trabalhos conduzidos em casas de vegetação e laboratório desempenham um papel importante na avaliação da resistência das plantas. Esses ambientes controlados permitem estabelecer as condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento do fungo, o que facilita a observação e a comparação dos diferentes genótipos de soja quanto à sua resistência ao mofo branco (HÜLLER, 2017).

Existem diferentes metodologias de avaliação por meio da inoculação artificial de *S. sclerotiorum*, pelas mais variadas técnicas de inoculação do patógeno, seja na planta toda, em partes da planta, com ferimento ou não do tecido, usando ascósporos ou micélio, como mencionado por Chen et al. (2005), Garcia e Juliatti (2012) e Huller et al. (2016).

Entretanto, apesar de os ascósporos representarem a forma natural prevalente de inóculo em condições de campo, seu uso em amostragens de resistência apresenta restrições operacionais relevantes. Huzar-Novakowski et al. (2018) observaram que a produção, padronização e aplicação de suspensões de ascósporos demandam tempo elevado, além de exigirem condições controladas de espaço e cultivo, o que limita sua aplicação em escalas ampliadas de melhoramento (HUZAR-NOVAKOWISKI; DORRANCE, 2018). Nesse contexto, muitos programas de melhoramento têm recorrido à inoculação com micélio, que embora não represente a forma preferencial de infecção natural do fungo, revela-se mais rápida e viável operacionalmente (CHEN; WANG, 2005).

No entanto, a maioria desses testes baseia-se no uso de micélio do fungo para as avaliações, o que pode ser influenciado pela variabilidade dos isolados e pela sensibilidade do patógeno em condições artificiais. Estudos recentes com cepas monoascósporas de *Sclerotinia sclerotiorum* têm demonstrado variação significativa na agressividade entre isolados, o que pode comprometer comparações entre genótipos quando essas diferenças não são controladas (LIMA et al., 2025). Além disso, investigações de reação de genótipos de soja ao patógeno reproduzido via micélio apontam para variabilidade tanto no comprimento da lesão quanto na intensidade dos sintomas entre diferentes linhagens (BORGES et al., 2024). Essa variabilidade torna essencial considerar não apenas o método de inoculação, mas também a origem e o histórico (número de repicagens, compatibilidade micelial etc.) dos isolados nos estudos de resistência.

A padronização de metodologias de inoculação é um passo essencial para o avanço dos programas de melhoramento voltados à resistência ao mofo branco, visto que a

consistência e a reprodutibilidade dos resultados experimentais dependem diretamente da adequação do método utilizado. A ausência de um protocolo amplamente aceito para a avaliação da resistência o mofo branco da soja tem levado à adoção de diferentes técnicas de inoculação, que variam quanto à estrutura do inóculo, local de aplicação e intensidade da infecção (CHEN; WANG, 2005; GARCIA; JULIATTI, 2012; HULLER et al., 2016; HUZAR-NOVAKOWISKI; DORRANCE, 2018). Essa falta de padronização dificulta a comparação entre estudos e pode resultar em classificações inconsistentes de resistência entre genótipos. Além disso, o comportamento diferencial dos genótipos frente às distintas metodologias indica que o método de inoculação influencia diretamente a expressão dos sintomas e a severidade observada (BORGES et al., 2024).

Assim, a avaliação comparativa de métodos é necessária para identificar aqueles que melhor reproduzam a infecção natural e que possam ser aplicados de forma prática e confiável em experimentos de larga escala. Dessa forma, testar diferentes metodologias de inoculação permite não apenas aprimorar a precisão da seleção de genótipos resistentes, mas também contribuir para a padronização de procedimentos experimentais que reflitam com maior fidelidade as condições de campo e o comportamento epidemiológico do patógeno (LIMA et al., 2025).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência e a reprodutibilidade de diferentes metodologias de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em genótipos de soja, visando identificar o método mais adequado para a discriminação de níveis de resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary em condições de casa de vegetação, laboratório e container.

Material e métodos

Aspectos gerais dos experimentos

Os ensaios foram conduzidos entre dezembro de 2022 e dezembro de 2024 na estação experimental da empresa GDM Seeds, localizada no município de Cambé-PR. As avaliações foram realizadas em três ambientes distintos — laboratório, casa de vegetação e container —, selecionados para permitir o estudo do comportamento dos genótipos de soja frente a diferentes condições de temperatura e umidade relativa, Tabela 1.

Tabela 1 – Características de umidade relativa e temperatura nos ambientes de condução dos ensaios.

| Ambiente | Umidade relativa (%) | Temperatura (°C) |
|-------------------|----------------------|------------------|
| Laboratório | >80 | 20±2 |
| Casa de vegetação | >85 | 24±2 |
| Container | >85 | 20±2 |

Fonte: Autor (2025)

Foram utilizados genótipos de soja cujas reações pré-estabelecidas ao mofo branco foram definidas com base no histórico da cultivar em interação com a doença ao longo dos anos (Tabela 2), considerando informações de artigos científicos, indicações dos obtentores quanto ao nível de resistência e conhecimento de campo.

Tabela 2 – Cultivares de soja utilizadas nos experimentos e reação pré-estabelecida.

| Cultivar | Obtentor | Reação pré-estabelecida |
|-----------|--|-------------------------------|
| ATIVA | GDM Genética do Brasil S.A. | S (Suscetível) |
| CORSOY-79 | Illinois Agricultural Experiment Station | MR (Moderadamente Resistente) |
| LANÇA | GDM Genética do Brasil S.A. | S (Suscetível) |
| M5838 | Monsoy Ltda | MR (Moderadamente Resistente) |
| M5917 | Monsoy Ltda | MR (Moderadamente Resistente) |
| M5947 | Monsoy Ltda | MR (Moderadamente Resistente) |
| M6410 | Monsoy Ltda | MR (Moderadamente Resistente) |

Fonte: Autor (2025)

As plantas foram cultivadas em vasos de 0,6 litro contendo substrato esterilizado, composto por 30% de solo, 30% de areia e 10% de substrato à base de casca de pinus. A adubação foi realizada aos 10 dias após o plantio, com 50 mL do fertilizante Forth 5:20:20 (NPK). A irrigação foi manual e realizada regularmente, três vezes ao dia ou quando necessário.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado para a condução dos métodos em casa de vegetação e em container, com 4 repetições (4 vasos). Para os métodos de inoculação por aspersão de micélio, ponteira (Straw test), chumaço de algodão e discos de BDA contendo o patógeno, cada vaso continha 4 plantas. Já para os métodos palito de madeira colonizado e injeção no hipocótilo com o patógeno, cada vaso (unidade experimental) continha 10 plantas.

Os métodos conduzidos exclusivamente em laboratório (folha destacada e ácido oxálico) foram aplicados seguindo o mesmo delineamento, com 4 repetições. Todos os métodos foram repetidos no mínimo três vezes (triplicatas) para garantir a repetibilidade dos dados ao longo do tempo.

Para todos os métodos, foram utilizado isolado proveniente de Papanduva, Santa Catarina (SC), coletados em campo no ano de 2016 (ISHIKAWA et al., 2018). O armazenamento dos escleródios foi realizado a uma temperatura de 20 ± 2 °C. Para toda as inoculações foram previamente cultivadas em placas de Petri contendo um meio de cultura BDA por sete dias a 22 ± 2 °C, posteriormente usados para inoculação conforme as especificações dos métodos.

De acordo com cada método foi realizado a avaliação, posteriormente o resultado foram convertidos em percentual de mortalidade, utilizados para classificação da resistência das plantas ao mofo branco, de acordo com a escala:

- Menos de 10% de plantas mortas: resistentes;
- Entre 10% e 30%: moderadamente resistentes;
- Acima de 30%: suscetíveis.

Metodologias de Inoculação Testadas

1-Palito de madeira colonizado

O método de inoculação foi baseado na metodologia descrita por Hildebrand (1953), com adaptações sugeridas por Tolêdo-Souza e Costa (2003). Para a preparação do inóculo, pontas de palitos de madeira foram inseridas em discos de papel filtro, previamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos, a fim de garantir a esterilização e evitar contaminações. Os palitos foram então posicionados em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA). Após a solidificação do meio, discos de micélio de *S. sclerotiorum* provenientes de colônias ativas foram distribuídos nas placas.

A inoculação foi realizada em plantas com sete dias de emergência (estádio V1), inserindo um palito colonizado aproximadamente 2 cm abaixo dos cotilédones da haste principal. Este método permite a introdução direta do patógeno no tecido vascular, simulando condições de infecção natural em campo. As avaliações foram realizadas no sétimo dia após a inoculação, registrando o número de plantas vivas e mortas, posteriormente convertendo nas escalas de reação.

2-Injeção no hipocótilo com o patógeno

Baseou-se na técnica descrita por Schmitthenner e Bhat (1994). O micélio e o meio de cultura (BDA). foram cortados em pequenos fragmentos e homogeneizados para formar o inóculo.

Para a inoculação, foi realizada uma lesão de aproximadamente 1 cm de comprimento na haste principal das plantas no estágio V1, cerca de 2 cm abaixo dos cotilédones, utilizando uma agulha de seringa estéril. O inóculo foi inserido diretamente na ferida. Este procedimento permite avaliar a capacidade de penetração do patógeno e a resposta do tecido vascular da planta.

As avaliações ocorreram no sétimo dia após a inoculação, utilizando o percentual de mortalidade para classificação da resistência, seguindo os mesmos critérios mencionados para o método anterior.

3-Aspersão de micélio

Baseou-se em Chen e Wang (2005), adaptações experimentais. Após o cultivo do fungo, cinco placas com meio de cultura + Fungo firm foram diluídas em 1 litro de água destilada autoclavada, formando uma suspensão homogênea de micélio.

A inoculação foi realizada em plantas nos estádios V4/V5, aplicando-se a suspensão via borrifação foliar, do ápice para a base da planta, com aproximadamente 4 mL por planta.

As avaliações foram realizadas no 5º e 10º dia após a inoculação, considerando o grau de murcha, queda do meristema apical e sintomas de necrose foliar. As plantas foram classificadas em três categorias: sadias, infectadas (danos nos tecidos) e mortas, sendo o percentual de mortalidade convertido em classificação de resistência:

4 -Método da ponteira (Straw test)

Baseou-se em Hoffman et al. (2002), para a inoculação, a colônia fúngica foi repicados na placa de petri, após 7 dias no momento da incubação a mesma foi trasposta e disposta com o micélio voltado para baixo. Discos de micélio em crescimento ativo foram obtidos nas margens da colônia usando uma ponteira de micropipeta (1000 µL – 6 mm de diâmetro). Em seguida, A ponteira contendo o meio mais o fungo em seu interior, foram pressionadas na haste principal, previamente cortada com aproximadamente 2,5 cm acima das folhas unifolioladas, em plantas no estágio V2.

As ponteiras foram retiradas dois dias após a inoculação. A avaliação foi realizada a cada dois dias, medindo o comprimento da lesão, utilizando uma régua graduada em mm, porém apenas as medições obtidas no sexto dia foi utilizado nos testes estatísticos.

5 -Chumaço de algodão

Baseado em Bastien (2012), com adaptações. Após esse período de cultivo do fungo, micélio e o meio de cultura foram cortados em pedaços e homogeneizados (por 2,5 minutos em liquidificador/mixer). A inoculação foi realizada com a fixação do chumaço de algodão contendo 1 ml da mistura homogeneizada no nó da primeira folha trifoliolada de plantas de aproximadamente 30 dias após a semeadura (estádio R1).

A avaliação foi realizadas 21º dia após a inoculação, registrando o número de plantas vivas e mortas, posteriormente convertendo nas escalas de reação.

6- Discos de BDA contendo o patógeno na folha

Para a inoculação, a colônia fúngica foi repicados na placa de petri, após 7 dias no momento da incubação a mesma foi trasposta e disposta com o micélio voltado para baixo. A

inoculação consistiu na deposição direta de um disco de 6 mm contendo o inóculo sobre a folha de planta com 21 dias (estádio V2).

As avaliações da severidade da doença foram realizadas a cada 24 horas após a inoculação, utilizando a escala diagramática (Figura 1) proposta por Garcia; Juliatti (2012). As classificações das reações seguiram os seguintes critérios: menos de 12% de plantas infectada foram consideradas resistentes; entre 12% e 25%, moderadamente resistentes; e acima de 25%, suscetíveis

7- Folha destacada

Folhas de soja foram destacadas de plântulas cultivadas em casa de vegetação no estágio V2 e posteriormente colocadas em Gerbox, sobre os quais foi depositado um disco de BDA contendo a cultura do fungo com 7 dias de idade, posicionado no centro do folíolo, com o micélio em contato direto com a superfície da folha (Garcia; Juliatti, 2012). Os folíolos foram mantidos a 20 ± 2 °C sob fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações da severidade da doença foram realizadas a cada 24 horas após a inoculação, sendo finalizadas quando a cultivar suscetível atingiu 50% de tecido infectado, conforme a escala diagramática proposta por Garcia e Juliatti (2012) (Figura 1). As reações das plantas foram classificadas de acordo com os seguintes critérios:

- Resistentes (R): menos de 12% do tecido infectado;
- Moderadamente resistentes (MR): 12% a 25% do tecido infectado;
- Suscetíveis (S): acima de 25% do tecido infectado.

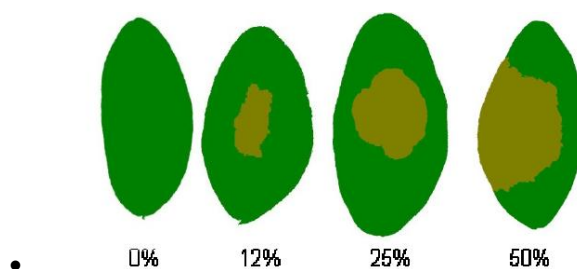


Figura 1 Escala diagramática para avaliação de sintomas de *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas inoculadas de plantas de soja (Garcia e Juliatti, 2012).

8- Ácido oxálico

Plantas no estágio V2 foram cortadas a 0,5 cm do solo. Em seguida, cada haste foi colocada individualmente em tubos de ensaio de 15 cm de altura e 16 mm de diâmetro, contendo 5 mL de ácido oxálico a uma concentração de 20 mM (Huller et al., 2016). Os tubos continham 5 mL de água destilada. Os tubos foram aleatoriamente organizados em grades e mantidos a 20 ± 2 °C, no escuro, por 24 horas, a fim de evitar transpiração excessiva (Antonio et al., 2008).

A sensibilidade ao ácido oxálico foi avaliada utilizando a escala de murcha proposta por Huller et al. (2016), conforme Figura 3. As reações das plantas foram classificadas de acordo com os seguintes critérios:

- Resistentes (R): notas menores ou iguais a 1;
- Moderadamente resistentes (MR): notas entre 1 e 3;
- Suscetíveis (S): notas acima de 3.



Figura 3: Escala de notas utilizada na avaliação de plantas submetidas ao ácido oxálico. (Huller et al., 2016).

Análises estatísticas

Para avaliar as diferenças entre os genótipos de soja submetidos às diferentes metodologias de inoculação, os dados foram inicialmente submetidos à análise de variância não paramétrica por postos (Kruskal-Wallis). Este procedimento foi escolhido devido à presença de variáveis que não atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias, garantindo a validade das comparações estatísticas entre os genótipos.

Quando o teste indicou diferenças significativas, foi aplicado o teste LSD (Least Significant Difference) para identificar especificamente quais genótipos apresentaram respostas distintas frente a cada metodologia de inoculação. Este procedimento possibilitou a classificação detalhada dos genótipos quanto à resistência ao mofo branco, permitindo discriminar níveis de suscetibilidade e resistência com maior precisão.

A avaliação de desempenho de cada método de inoculação utilizou-se a reação pre estabilidade como base adotando a estrutura da Matriz de Confusão. Foram calculadas as métricas de acurácia, precisão, sensibilidade (Recall), especificidade e F1-score (GRANDINI, 2020)

Todas as análises foram realizadas no software R Studio (versão 3.6.1), utilizando o pacote agricolae (MENDIBURU, 2015), garantindo a padronização e a robustez estatística dos resultados obtidos.

Resultado e discussão

Os métodos de inoculação apresentaram resultados distintos, com reação de resistência divergentes conforme a idade das plantas no momento da inoculação e ambiente de condução dos ensaios (casa de vegetação, container refrigerado ou laboratório).

O método de inoculação utilizando palito de madeira contaminado com o fungo resultou em baixa porcentagem de plantas mortas, independentemente do ambiente avaliado (Tabela 3). Além disso, esse método não permitiu a distinção clara entre as reações das cultivares testadas, tampouco revelou diferenças estatisticamente significativas entre elas.

Observou-se variabilidade na mortalidade de plantas entre as condições de temperatura, com média de 2% em casa de vegetação (CVG, 24–28°C) e 5% em container refrigerado (CONT, 18–22°C). Essa diferença corrobora com os resultados de Lehner et al. (2021), que observaram maior agressividade de *Sclerotinia sclerotiorum* em temperaturas moderadas (18–22°C), as quais favorecem a germinação dos escleródios, o crescimento micelial e a infecção dos tecidos hospedeiros.

Tabela 3 - Porcentagem de mortalidade de plantas e reação de cultivares de soja à inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* pelo método do palito de madeira em condições de casa de vegetação (CVG) e container (CONT)

| CULTIVAR | Reação Esperada (R.E.) | CVG (%) | CONT (%) | Reação Observada (CVG) | Reação Observada (CONT) | | |
|----------|------------------------|---------|----------|------------------------|-------------------------|---|----|
| ATIVARR | S | 0 | a | 0 | a | R | R |
| CORSOY79 | MR | 2 | a | 0 | a | R | R |
| LANÇA | S | 4 | a | 6 | a | R | R |
| M5838 | MR | 8 | a | 6 | a | R | R |
| M5917 | MR | 0 | a | 7 | a | R | R |
| M5947 | MR | 0 | a | 0 | a | R | R |
| M6410 | MR | 3 | a | 14 | a | R | MR |
| Média | | 2 | B | 5 | A | | |

CVG: Casa de vegetação (24-28°C); ²CONT: Container (18-22°C).

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

S: Suscetível; MR: Moderadamente Resistente; R: Resistente.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que as cultivares com reações previamente relatadas como moderadamente resistente apresentaram porcentagens de mortalidade superiores às cultivares caracterizadas como suscetíveis, contrariando parcialmente o esperado. Esse comportamento reforça a baixa eficiência do método do palito de madeira para discriminar níveis de resistência entre genótipos.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram parcialmente estudos anteriores como os de Toledo-Souza & Costa (2003) e Karl (1997), que reportaram baixa discriminação entre genótipos ao se usar o método do palito de madeira para inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum*, sem diferenças estatísticas entre isolados ou cultivares. Contudo, trabalhos

mais recentes, como Ishikawa (2024), mostram que determinados métodos alternativos (por exemplo, disco de micélio sobre haste cortada, micélio sobre pecíolo cortado, ou uso de isolados altamente agressivos) conseguiram maior caracterização entre cultivares. Na presente pesquisa, o nível médio de mortalidade com palito de madeira não ultrapassou 5%, muito inferior ao observado em outros métodos agressivos, que alcançam mortalidades acima de 60-90% em cultivares suscetíveis.

A razão biológica dessa limitação do método do palito de madeira inclui: contato do inóculo pouco homogêneo; ferimentos mínimos ou ausência deles; baixa intensidade de inoculação; estágio fenológico da planta que pode reduzir suscetibilidade; variabilidade do isolado quanto à agressividade; e influências ambientais (umidade local, temperatura, etc.) que interferem na penetração ou estabelecimento do fungo. Huzar-Novakowski; Dorrance (2018) demonstraram que inoculações com ascósporos em densidades intermediárias ($\approx 10^5$ ascósporos/mL) permitem melhor discriminação entre genótipos do que densidades muito baixas ou muito altas, e que componentes como eficiência de infecção e comprimento de lesão são mais sensíveis nestas condições. Consequentemente, o método do palito de madeira, embora simples, apresenta baixo poder discriminatório, especialmente quando se busca identificar resistência parcial ou diferenças sutis entre cultivares.

A inoculação com aspersão de micélio (Tabela 4) apresentou diferença estatística significativa entre as cultivares quando conduzida em casa de vegetação (24–28 °C). A cultivar M6410 apresentou a maior porcentagem média de plantas mortas (64%), diferenciando-se da cultivar CORSOY79, que apresentou 50% de mortalidade. Apesar dessa diferença estatística, o método não permitiu distinguir com clareza os níveis de resistência genética das cultivares, uma vez que as testemunhas previamente classificadas como suscetíveis (ATIVARR e LANÇA) apresentaram médias semelhantes às cultivares caracterizadas como moderadamente resistentes (M5838, M5917, M5947).

No container refrigerado (CONT; 20 ± 2 °C), as cultivares não diferiram estatisticamente entre si, embora se tenha observado um aumento no percentual médio de plantas mortas (61%), em comparação à casa de vegetação (52%). Esse incremento de severidade sob temperaturas mais amenas está em conformidade com o comportamento epidemiológico de *Sclerotinia sclerotiorum*, cujo desenvolvimento, germinação dos escleródios e infecção são favorecidos por temperaturas entre 18 e 22 °C e alta umidade relativa, condições que promovem o crescimento micelial, a penetração e a colonização dos tecidos hospedeiros (LEHNER et al., 2021; LI et al., 2022).

Tabela 4 - Porcentagem de mortalidade de plantas e reação de cultivares de soja à inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* por aspersão de micélio em condições de casa de vegetação (CVG) e container (CONT).

| CULTIVAR | Reação Esperada (R.E.) | CVG (%) | | CONT (%) | | Reação Observada (CVG) | Reação Observada (CONT) |
|----------|------------------------|---------|----|----------|---|------------------------|-------------------------|
| ATIVARR | S | 52 | ab | 66 | a | S | S |
| CORSOY79 | MR | 50 | b | 59 | a | S | S |
| LANÇA | S | 50 | ab | 59 | a | S | S |
| M5838 | MR | 53 | ab | 60 | a | S | S |
| M5917 | MR | 50 | b | 58 | a | S | S |
| M5947 | MR | 47 | b | 60 | a | S | S |
| M6410 | MR | 64 | a | 65 | a | S | S |
| Média | | 52 | A | 61 | A | | |

CVG: Casa de vegetação (24-28°C); ²CONT: Container (18-22°C).

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

S: Suscetível; MR: Moderadamente Resistente; R: Resistente

Do ponto de vista biológico, o método de aspersão com micélio favorece a infecção inicial devido à deposição homogênea de fragmentos miceliais viáveis sobre a superfície do hospedeiro, permitindo múltiplos pontos de infecção. No entanto, como o inóculo é constituído de micélio ativo e não de ascósporos, o processo infeccioso depende fortemente de ferimentos naturais, alta umidade foliar e condições microclimáticas favoráveis (WILLBUR et al., 2019). Dessa forma, embora o método resulte em alta severidade e boa uniformidade de infecção, ele pode superestimar a suscetibilidade das cultivares e mascarar pequenas diferenças de resistência parcial, especialmente sob condições ambientais altamente favoráveis ao patógeno.

Estudos recentes reforçam essas observações, Li et al. (2022) e Rahman et al. (2023) destacam que métodos baseados em suspensão micelial tendem a apresentar alta reprodutibilidade, mas baixa capacidade discriminatória quando a densidade de inóculo é elevada. Assim, o método de aspersão de micélio, apesar de eficaz para garantir infecção e homogeneidade no desenvolvimento da doença, não se mostrou suficientemente sensível para discriminar níveis de resistência genética entre as cultivares testadas.

Os resultados obtidos por meio da inoculação com chumaço de algodão mostraram-se altamente informativos (Tabela 5), tanto sob o ponto de vista estatístico quanto fitopatológico, pois permitiram não apenas caracterizar a reação das cultivares, mas também diferenciá-las estatisticamente em grupos de suscetibilidade ou resistente. As cultivares classificadas como suscetíveis (ATIVA e LANÇA) apresentaram médias de mortalidade de plantas superiores a 80%. Em contraste, cultivares com maior nível de resistência —

M5838, M5917, M5947, CORSOY79 e M6410 — exibiram mortalidade média inferior a 50 %, com destaque para M5947, que teve apenas 26 % de plantas mortas.

Resultados que corroboram essas observações são encontrados em estudos como o de Bastien et al. (2012), que empregaram discos de algodão saturados com suspensão micelial aplicada diretamente ao botão floral, estimando resistência pela extensão da lesão no eixo principal, conseguiram discriminar genótipos de soja conhecidos como resistentes e suscetíveis tanto em campo quanto em casa de vegetação.

Contudo, os achados divergem dos observados por Ferreira (2019), que adaptou o método de Bastien et al. (2012) para a cultura do feijão e comparou diferentes métodos de inoculação, obteve sucesso apenas para uma cultivar — BRS Estilo — cuja lesão média foi de 15,63 mm, ao passo que as demais cultivares apresentaram lesões superiores a 87 mm, indicando pouca discriminação (ou pouca eficiência do método adaptado).

Tabela 5 - Porcentagem de mortalidade de plantas e reação de cultivares de soja à inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* com chumaço de algodão em condições de casa de vegetação (CVG) e container (CONT).

| CULTIVAR | Reação Esperada (R.E.) | CVG (%) | CONT (%) | Reação Observada (CVG) | Reação Observada (CONT) |
|----------|------------------------|---------|----------|------------------------|-------------------------|
| ATIVARR | S | 64 a | 94 a | S | S |
| CORSOY79 | MR | 22 ab | 46 bc | MR | MR |
| LANÇA | S | 67 a | 83 ab | S | S |
| M5838 | MR | 25 ab | 43 c | MR | MR |
| M5917 | MR | 31 ab | 46 bc | MR | MR |
| M5947 | MR | 25 ab | 26 c | MR | MR |
| M6410 | MR | 19 b | 33 c | MR | MR |
| Média | | 36 B | 53 A | | |

CVG: Casa de vegetação (24-28°C); ²CONT: Container (18-22°C).

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

S: Suscetível; MR: Moderadamente Resistente; R: Resistente.

O método apresentou boa capacidade de discriminação entre classes de resistência, evidenciando a consistência dos dados e a reprodutibilidade experimental. Esses resultados indicam que a inoculação com chumaço de algodão é sensível o suficiente para detectar pequenas diferenças fenotípicas entre cultivares, aspecto essencial em estudos de resistência genética. O microambiente úmido criado pelo algodão favorece a germinação dos esporos e o início da infecção, simulando de forma adequada as condições de molhamento prolongado que ocorrem naturalmente em campo, especialmente em períodos de alta umidade.

Com desempenho do método explicado pela manutenção da umidade e pela uniformidade do ponto de infecção. A interface contínua entre o algodão saturado e o tecido vegetal cria condições ideais para o processo infeccioso, permitindo que o patógeno complete as fases de adesão, germinação e penetração com mínima interferência externa. Assim, o método reproduz de forma realista a dinâmica de infecção natural, sem a necessidade de ferimentos artificiais, os quais podem induzir respostas de defesa não relacionadas à resistência genética (FERREIRA, 2019).

As cultivares suscetíveis apresentaram necroses extensas e colapso do tecido, frequentemente culminando na morte da planta, enquanto as moderadamente resistentes restringiram o avanço da lesão, com sintomas localizados e menor intensidade de necrose. Esse comportamento confirma a eficiência do método para caracterizar reações típicas de resistência parcial, o que é desejável em programas de melhoramento voltados à resistência durável. Resultados semelhantes foram relatados por Bastien et al. (2012), que, utilizando discos de algodão saturados com suspensão micelial aplicados diretamente ao botão floral.

A inoculação com discos de meio BDA contendo o patógeno aplicados diretamente sobre a superfície foliar não apresentou diferença significativa entre as cultivares de soja avaliadas nem entre os ambientes de condução dos ensaios (Tabela 6). Essa ausência de diferenciação pode ser atribuída tanto à baixa agressividade do patógeno em condições controladas quanto à resposta fisiológica das plantas frente à infecção. Observou-se que, em muitos tratamentos, as folhas inoculadas apresentaram abscisão precoce dois dias após a inoculação, o que impediu o desenvolvimento completo dos sintomas e comprometeu a avaliação da resistência.

Tabela 6 - Porcentagem de mortalidade de plantas e reação de cultivares de soja à inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* com discos de BDA em condições de casa de vegetação (CVG) e container (CONT).

| Cultivar | Reação Esperada (R.E.) | CVG (%) ^{ns} | CONT (%) | Reação Observada (CVG) | Reação Observada (CONT) |
|--------------|---------------------------|--------------------------|-------------|---------------------------|----------------------------|
| ATIVA | S | 4 | 1 | R | R |
| CORSOY 79 | MR | 3 | 0 | R | R |
| LANÇA | S | 0 | 10 | R | MR |
| M5838 | MR | 3 | 0 | R | R |
| M5917 | MR | 6 | 12 | R | MR |
| M5947 | MR | 9 | 3 | R | R |
| M6410 | MR | 6 | 0 | R | R |
| Média | | 4 | 4 | | |

CVG: Casa de vegetação (24-28°C); ²CONT: Container (18-22°C).

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

S: Suscetível; MR: Moderadamente Resistente; R: Resistente

De forma geral, o método de inoculação com discos de BDA mostrou-se pouco eficiente para a diferenciação entre genótipos, uma vez que os valores médios de incidência e severidade permaneceram baixos e sem variação estatística. Embora seja um método de fácil execução e boa uniformidade de aplicação, sua eficácia depende fortemente da aderência do disco ao tecido foliar, sua permanência, da manutenção da umidade durante o período de incubação — fatores que, se não controlados, podem limitar o estabelecimento da infecção (ZHOU et al., 2024).

O método da ponteira (Tabela 7) apresentou diferenças significativas tanto entre as cultivares testadas quanto entre os ambientes avaliados. Nos ensaios conduzidos em casa de vegetação, observaram-se médias gerais menores (4 cm), com destaque para a cultivar M5947, cuja média foi de 1 cm. Entretanto, ao analisar as maiores médias do ensaio, percebe-se que as cultivares CORSOY79, LANÇA e M5917 apresentaram valores próximos, e não houve diferenças estatisticamente significativas entre elas, indicando similaridade em relação à resistência. Nos ensaios realizados em container, a cultivar LANÇA se destacou com o maior valor médio de lesão (11 cm), diferindo-se das demais cultivares como maior valor, tendo a cultivar Corsoy79 o menor valor de lesão observado quando atestado em container notavelmente, as cultivares conhecidas por sua maior resistência não apresentaram diferenças significativas entre si, tendo também valores mais altos em comparação à testemunha suscetível ATIVA (4 cm) e LANÇA (11 cm).

Tabela 7 - Porcentagem de mortalidade de plantas e reação de cultivares de soja à inoculação com *Sclerotinia sclerotiorum* o método da ponteira em condições de casa de vegetação (CVG) e container (CONT).

| CULTIVAR | Reação Esperada (R.E.) | CVG cm | CONT cm | Reação Observada (CVG) | Reação Observada (CVG) |
|----------|------------------------|--------|---------|------------------------|------------------------|
| ATIVARR | S | 2 ab | 4 ab | MR | MR |
| CORSOY79 | MR | 6 ab | 2 b | S | MR |
| LANÇA | S | 7 a | 11 a | S | S |
| M5838 | MR | 3 ab | 7 ab | MR | S |
| M5917 | MR | 6 ab | 7 ab | S | S |
| M5947 | MR | 1 b | 6 ab | R | S |
| M6410 | MR | 4 ab | 6 ab | MR | S |
| Média | | | | | |

CVG: Casa de vegetação (24-28°C); ²CONT: Container (18-22°C).

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

S: Suscetível; MR: Moderadamente Resistente; R: Resistente

Os resultados obtidos nesta pesquisa divergem dos encontrados por Terán e Singh (2009) na avaliação comparativa de diferentes métodos de inoculação, que incluem o método da ponteira, a infecção de flores e utilização de semente de aveia infectada como inoculo, obteve resultados demonstrando que o Método da ponteira obteve o melhor desempenho na avaliação da resistência ao mofo branco.

Embora o método da ponteira seja amplamente utilizado em pesquisas de Screening (PETZOLDT e DICKSON 1996; TERÁN et al. 2006; JHALA et al. 2014), os resultados no presente estudo não foram satisfatórios. Tal diferença pode ser atribuída à variação nas condições experimentais, nas características das cultivares testadas, no isolado do patógeno utilizado e na época de inoculação.

A aplicação de ácido oxálico evidenciou uma diferenciação significativa entre as cultivares avaliadas (Tabela 8). Das cinco cultivares consideradas mais tolerantes à doença, três obtiveram as maiores notas no teste com ácido oxálico, o que sugere que são mais sensíveis à ação do ácido. Em contrapartida, a cultivar M5838, classificada como moderadamente tolerante, apresentou notas baixas, sendo então caracterizada como tolerante ao ácido oxálico. No entanto, essa cultivar não apresentou diferença estatística relevante em relação às cultivares ATIVA e LANÇA, ambas consideradas padrões de suscetibilidade, que também obtiveram notas baixas no ensaio com ácido — fato que as caracteriza igualmente como tolerantes sob esse critério.

Em contraste com os resultados descritos por Antônio (2008) e Huller et al. (2018), que relataram alta eficiência do método baseado em ácido oxálico para discriminar a reação de genótipos de soja ao mofo branco, sendo estes superiores aos métodos de inoculação por ponteira ou folha destacada, justamente por dispensar o uso de isolado fúngico e minimizar erros decorrentes da variabilidade de patogenicidade entre isolados.

Tabela 08: Métodos de inoculação realizados em laboratórios, utilizando as metodologias de Ácido Oxálico e Folha destacada.

| Cultivar | RE | Ácido Oxálico | RO | Folha Destacada | Nº Escleródios | | | |
|-----------------|-----------|----------------------|-----------|------------------------|-----------------------|-----|-----|-----|
| ATIVA | S | 1.7 | b | MR | 57 | ab | 7.5 | a |
| CORSOY | MR | 4.3 | a | S | 58 | ab | 2.7 | bc |
| LANÇA | S | 1.8 | bc | MR | 69 | a | 3.6 | abc |
| M5838 | MR | 2.1 | b | MR | 34 | abc | 3.1 | abc |
| M5917 | MR | 1.3 | c | MR | 17 | bc | 2.0 | c |
| M5947 | MR | 3.6 | a | MR | 12 | c | 2.6 | bc |
| M6410 | MR | 3.1 | a | MR | 59 | a | 5.0 | ab |

CVG: Casa de vegetação (24-28°C); ²CONT: Container (18-22°C).

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na vertical e maiúsculas na horizontal, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

S: Suscetível; MR: Moderadamente Resistente; R: Resistente.

No método de inoculação com folha destacada, as cultivares M5917, M5947 e M5838 apresentaram as menores porcentagens de severidade da doença nas folhas, proporcionando concordância com suas reações pré-estabelecidas. Por outro lado, as cultivares M6410 e Corsoy79, classificadas como moderadamente resistentes, e as cultivares ATIVA e LANÇA, consideradas altamente suscetíveis, não demonstraram diferenças estatisticamente significativas em relação à reação de resistência. Os resultados apresentam semelhança aos resultados obtido por Antônio (2008) e Huller et al., (2018), na discriminação das cultivares, devido este ter uma baixa correlação entre os métodos de inoculação testados, como também na discriminação assertiva da severidade da doença com relação às informações pré-existentes da reação das cultivares utilizadas.

O número de escleródios produzidos no método de folha destacadas apresentou diferenças significativas entre as médias apresentadas pelas cultivares avaliadas, sendo as cultivares M5917, M5947 e CORSOY 79 com as menores médias (2, 2.6 e 2.7 escleródios). Por outro lado, as cultivares ATIVA, LANÇA e M6410, classificadas como suscetíveis, e moderadamente resistente apresentaram as maiores médias de escleródios (7.5, 3.6, e 5.0).

Do ponto de vista estatístico, os métodos laboratoriais, como o uso do ácido oxálico, apresentam vantagens claras, mas também desafios que precisam ser considerados. Por exemplo, o método de ácido oxálico tende a fornecer resultados mais rápidos, com menor custo e maior reprodutibilidade, o que diminui o erro experimental associado à variabilidade entre isolados fúngicos ou entre lotes de inóculo (GONÇALVES et al., 2023)

Devido a ação do ácido oxálico atuando como fator de virulência para diversos fungos necrotróficos, promovendo acidificação do meio, desestabilização de paredes celulares e indução de morte celular programada (ROS, espécies reativas de oxigênio) no hospedeiro. Isso permite avaliar a capacidade intrínseca de resistência ou detoxificação dos genótipos frente a esse composto químico, o que tem correlação com resistência parcial ou mecanismos de defesa ativos. Entretanto, essa correlação nem sempre é perfeita, porque alguns genótipos podem responder bem ao ácido (demonstrando resistência química), mas não resistir bem em situações com patógeno vivo ou desafios naturais.

Já o método da folha destacada apesar de mais laborioso e sujeito a variabilidade (idade da folha, condição fisiológica, uniformidade da superfície foliar, umidade, integridade da folha), permite observar diretamente a progressão da doença real, incluindo necrose, produção de escleródios, e interação planta-patógeno completa (WOLF et al., 2024).

Nas análises de matriz de confusão, o método do Chumaço de Algodão demonstrou alto desempenho em ambos os ambientes (CVT e CONT), com acurácia, precisão,

sensibilidade e especificidade de 100% (Tabela 09). Este resultado superior pode ser atribuído à capacidade do método em simular condições naturais de infecção, mantendo um microambiente úmido favorável ao desenvolvimento do patógeno (Bastien et al., 2012). A consistência entre ambientes com diferentes temperaturas (24-28°C em CVT vs 18-22°C em CONT) reforça a robustez deste método para programas de melhoramento.

O método do Ácido Oxálico apresentou precisão e especificidade de 100%, porém sensibilidade moderada (57%). Isto indica que o método é confiável para identificar genótipos suscetíveis, mas pode classificar erroneamente alguns genótipos resistentes como suscetíveis (falsos negativos). Esta limitação pode estar relacionada à variação na sensibilidade ao ácido oxálico entre diferentes mecanismos de resistência (Huller et al., 2016).

O Método da Ponteira mostrou desempenho variável entre ambientes, com resultados em CVT (acurácia 43%) que em CONT (acurácia 29%). Esta sensibilidade às condições ambientais limita sua aplicação em programas de seleção, especialmente considerando que a avaliação se baseia no tamanho da lesão, característica influenciada por múltiplos fatores fisiológicos.

Os métodos Palito de Madeira, Injeção com Inóculo, Aspersão de Micélio e Disco de Micélio demonstraram acurácia classificatória extremamente baixa (0-29%). Estes métodos apresentaram altas taxas de falsos positivos, classificando genótipos suscetíveis como resistentes, o que representa um erro crítico para programas de melhoramento. A baixa eficiência destes métodos pode ser atribuída à incapacidade de estabelecer infecções consistentes ou à indução de respostas de defesa não específicas (FERREIRA, 2019).

Particularmente preocupante é o desempenho do método de Folha Destacada, que apresentou baixa acurácia (43%) e F1-Score (0,50), indicando classificação essencialmente aleatória. Esta limitação possivelmente resulta da ausência de sinalização sistêmica e de mecanismos de defesa presentes na planta intacta (GARCIA & JULIATTI, 2012).

As variações observadas na ordenação dos genótipos entre os métodos de inoculação são resultado da interação complexa entre os genótipos e os métodos de inoculação, bem como dos erros associados a cada método. Essa interação pode ser influenciada por diversos fatores, como o procedimento de manipulação do patógeno em cada método, o tecido inoculado, a idade ontogenética do vegetal e os intervalos de tempo entre a inoculação e a avaliação dos resultados. Além disso, é plausível que cada método de inoculação esteja relacionado a um mecanismo específico de resposta do hospedeiro, o que também pode contribuir para explicar as variações observadas nos resultados (FERREIRA, 2019).

Conclusão

Diante dos resultados obtidos o presente trabalho permite concluir que:

Os diferentes métodos analisados (Ponteira, Ácido Oxálico, Folha destacada, Palito de madeira, Injeção com Inoculo) estimularam respostas diferentes nos genótipos de soja estudados, em termos de suscetibilidade.

O melhor método de inoculação para a reprodução dos sintomas e expressar a reação já conhecida foi o chumaço de algodão, apresentando este uma alta relação com as reações pré-estabelecidas.

Referencias

- ANTONIO, R. P. et al. Genetic control of the resistance of common bean to white mold using the reaction to oxalic acid. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 733-740, 2008.
- BASTIEN, M. et al. A reproducible assay for measuring partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 92, n. 9, p. 1-9, 2012.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions. **Plant Disease**, v. 71, p. 934-936, 1987.
- BORGES, A. B. et al. Characterisation of the phenotypic reaction of Brazilian soybean genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* under controlled conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 172, n. 6, e13428, 2024.
- CHEN, Y.; WANG, D. Two convenient methods to evaluate soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 89, n. 12, p. 1268-1272, 2005.
- FERREIRA, L. U. et al. Comparison of inoculation methods for selecting common bean genotypes with physiological resistance to white mold. **Tropical Plant Pathology**, v. 44, p. 65-72, 2019.
- GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 3, p. 196-203, 2012.
- GONÇALVES, L. S. et al. Análise estatística para experimentos agrícolas. **Revista Brasileira de Biometria**, v. 41, n. 2, p. 245-260, 2023.
- GRANDINI, A. et al. Machine learning metrics for agricultural research. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 178, p. 105-115, 2020.
- HILDEBRAND, A. A. An elaboration of a toothpick method of inoculating plants. **Canadian Journal of Agricultural Science**, v. 33, n. 4, p. 596-598, 1953.
- HOFFMAN, D. D. et al. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 86, p. 971-980, 2002.
- HOSSAIN, M. M. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* lifecycle and management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 61, p. 345-367, 2023.
- HULLER, G. C. et al. Different methods of assessing susceptibility of soybean genotypes to white mold. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, p. 1-9, 2016.
- HULLER, Guilherme de Camargo. **Mofó Branco: métodos de avaliação de suscetibilidade e expressão de genes relacionados à defesa em plantas de soja**. 2017. 40 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2017.

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

ISHIKAWA, Mayra Suemy. **Metodologias de seleção de cultivares de soja para resistência Mofo branco da soja e à podridão-de-carvão e agressividade de isolados de *Sclerotinia sclerotiorum***. 2018. 105 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

JHALA, R. et al. Use of multi-site screening to identify partial resistance to white mold in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 57, p. 233-234, 2014.

KARL, A. C. **Mofo Branco, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary, em feijoeiro irrigado: estudos epidemiológicos, comparação de sistemas de cultivo e de cultivares**. 1997. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília, 1997.

LEHNER, M. S. et al. Fatores ambientais na epidemiologia do mofo branco. **Summa Phytopathologica**, v. 47, n. 3, p. 245-251, 2021.

LI, Y. et al. Temperature effects on *Sclerotinia* development. **Phytopathology**, v. 112, n. 5, p. 1123-1132, 2022.

LIMA, J. G. et al. Pathogenic variability in monoascosporic strains of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean crop. **Revista Agrogeoambiental**, v. 17, e20251913, 2025.

MENDIBURU, F. de. **agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research**. R Package, v. 1.2-3, 2015.

PETZOLDT, R.; DICKSON, M. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v. 39, p. 142-143, 1996.

POLLONI-BARROS, L. C. et al. Soybean genotypes selection with resistance to White Mold and agronomic performance from moderately resistant parents (EMGOPA 316 × MG/BR 46-Conquista). **Scientia Agricola**, v. 79, n. 5, e20210050, 2022.

RAHMAN, M. et al. Soybean disease management strategies. **Crop Protection**, v. 172, p. 106-115, 2023.

REIS, Erlei Melo; ZANATTA, Mateus; REIS, Andrea Camargo. **Mofo-branco da soja**. Passo Fundo: Berthier, 2019.

SAGATA, E. et al. Avaliação de genótipos de soja quanto a reação de resistência à *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 43., 2010, Cuiabá. **Anais[...]** Cuiabá: [s. n.], 2010. p. 205.

SCHMITTHENNER, A. F.; BHAT, R. G. **Useful methods for studying *Phytophthora* in the laboratory**. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1994. 10 p. (Special Circular, 143).

SCHWARTZ, H. F.; SINGH, S. P. Breeding common bean for resistance to white mold: a review. **Crop Science**, v. 53, p. 1832-1844, 2013.

SILVA, S. M.; MACHADO, J. C. Metodologia de inoculação e comportamento de alguns cultivares de soja (*Glycine max* L.), em relação à *Sclerotinia sclerotiorum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 20., 1989, Brasília. **Resumos[...]** Brasília: [s. n.], 1989. p. 118.

TERÁN, H. et al. Modified Petzoldt and Dickson scale for white mold rating of common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 49, p. 115-116, 2006.

TERÁN, H.; SINGH, S. P. Efficacy of three greenhouse screening methods for the identification of physiological resistance to white mold in dry bean. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 89, p. 755-762, 2009.

TOLÊDO-SOUZA, E. D.; COSTA, J. L. S. Métodos de inoculação de plântulas de feijoeiro para avaliação de germoplasma quanto a resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* (lib.) de Bary. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, n. 2, p. 57-63, 2003.

WANG, S.-Y. et al. Biocontrol methods for the management of *Sclerotinia sclerotiorum* in legumes: a review. **Phytopathology**, v. 114, n. 3, p. 456-470, 2024.

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

WILLBUR, J. F. et al. Epidemiology of white mold in soybean. **Plant Disease**, v. 103, n. 8, p. 2015-2023, 2019.

WOLF, R. et al. Assessing Soybean Cultivar Resistance to Target Spot Using a Detached Leaf Assay. **PhytoFrontiers**, v. 4, n. 1, p. 89-95, 2024.

ZAMANI-NOOR, N. et al. Variation in pathogenicity and subsequent production of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in different cover crops, flower strips and weeds. **Plant Disease**, v. 108, n. 3, p. 785-792, 2024.

ZHOU, X. et al. Advances in plant pathology research. **Annual Review of Phytopathology**, v. 62, p. 234-250, 2024.

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA E MAPEAMENTO REGIONAL DE HERDABILIDADE PARA RESISTÊNCIA A *sclerotinia sclerotiorum* EM GENÓTIPOS DE SOJA

Resumo: O mofo branco da soja causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma doença severa que reduz significativamente a produtividade da soja no Brasil. Para investigar a resistência ao mofo branco, estudos de associação genômica ampla (GWAS) têm sido utilizados para identificar regiões genômicas relevantes; entretanto, a GWAS explica apenas uma fração da herdabilidade, limitando a compreensão da arquitetura genética dessa resistência. O mapeamento de herdabilidade regional (RHM) complementa a GWAS ao capturar variação genética em segmentos do genoma que incluem variantes raras e de pequeno efeito, muitas vezes não detectáveis pela GWAS. Neste estudo, as metodologias GWAS e RHM foram aplicadas a 102 genótipos de soja, utilizando o chip Illumina SoySNP50K para identificar loci associados à resistência ao mofo branco. As análises revelaram cinco SNPs significativos com variação na frequência alélica e contribuição para a resistência ao mofo branco. A abordagem RHM se mostrou mais eficaz ao capturar proporções maiores de herdabilidade, mapeando QTLs com efeitos distribuídos por regiões genômicas específicas que explicam até 15% da variância fenotípica total. Além disso, o RHM foi capaz de identificar 27 regiões genômicas com potencial associação à resistência, que incluem variantes raras e comuns, aprimorando a identificação de loci que a GWAS isoladamente não conseguiu detectar. Esses resultados indicam regiões genômicas promissoras que podem ser exploradas em programas de melhoramento, destacando a importância do uso combinado de GWAS e RHM. Essa abordagem integrada facilita a identificação de regiões de interesse no genoma da soja, favorecendo o desenvolvimento de cultivares mais resistentes ao mofo branco e promovendo uma produção mais sustentável mesmo em condições ambientais adversas.

Palavras-chave: *Glycine max*. Métodos de inoculação. Podridão branca da haste da soja.

Abstract: White mold stem rot (WMSR), caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, is a severe disease that significantly reduces soybean productivity in Brazil. To investigate resistance to WMSR, genome-wide association studies (GWAS) have been used to identify relevant genomic regions; however, GWAS explains only a fraction of heritability, limiting the understanding of the genetic architecture underlying this resistance. Regional heritability mapping (RHM) complements GWAS by capturing genetic variation in genome segments that include rare and small-effect variants, often undetectable by GWAS. In this study, GWAS and RHM methodologies were applied to 102 soybean genotypes using the Illumina SoySNP50K chip to identify loci associated with WMSR resistance. The analyses revealed five significant SNPs with variation in allele frequency and contribution to WMSR resistance. The RHM approach proved more effective in capturing larger proportions of heritability, mapping QTLs with effects spread across specific genomic regions that explain up to 15% of total phenotypic variance. Additionally, RHM was able to identify 27 genomic regions potentially associated with resistance, including both rare and common variants, enhancing the detection of loci that GWAS alone could not reveal. These results indicate promising genomic regions that can be explored in breeding programs, highlighting the importance of the combined use of GWAS and RHM. This integrated approach facilitates the identification of target regions in the soybean genome, supporting the development of cultivars more resistant to WMSR and promoting more sustainable production, even under adverse environmental conditions.

Keywords: *Glycine max*. Inoculation methodologies. Soybean white mold.

Introdução

O Brasil atualmente é maior produtor de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no mundo (CONAB, 2024), no entanto apesar desta alta eficiência na produção há inúmeros fatores que interferem no rendimento da cultura, entre estes, se destaca Mofo branco da soja causada pelo agente *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, uma das principais doenças responsáveis por significativas reduções na produção desse grão em regiões de elevada altitude, onde as temperaturas são moderadas e umidade alta (SINCLAIR;HARTMAN, 2015).

A resistência genética representa o método de controle mais confiável e econômico para os agricultores, além de ter o menor impacto ambiental. No entanto, sua aplicação no combate ao mofo branco é limitada devido à ausência de resistência completa da planta ao fungo (JULIO, 2016).

A resistência a mofo branco não é completa na maioria das culturas dicotiledôneas, como a soja, apresentando apenas uma resistência parcial, com vários alelos fornecendo uma pequena quantidade de defesa (WEI et al., 2017). Devido a essa falta de resistência completa em variedades comerciais e à forte influência das condições climáticas, as perdas por mofo branco podem ser nulas em um ano agrícola, mas na safra seguinte podem provocar reduções de rendimento de até 70% (MEYER et al., 2014).

Apesar de não ser o ideal, a resistência parcial ao mofo branco tem o potencial de proporcionar maior produtividade, pois retarda o avanço da doença o suficiente para permitir a recuperação das plantas com danos mínimos. Esse efeito é especialmente benéfico em condições climáticas mais favoráveis às plantas e menos favoráveis aos patógenos (WEI et al., 2017).

Uma vez que não foram encontradas fontes de resistência completa, são empregadas fontes com resistência parcial no desenvolvimento de variedades de soja. Entre essas fontes estão cultivares como: NK S19-9 (HOFFMAN, et al., 2002), M5917, M5838 e M5947 (Dados não publicados).

Essa resistência parcial pode estar associada à expressão de genes nas primeiras horas após a infecção. Durante esse período inicial, a infecção por mofo branco desencadeia a ativação de milhares de genes, principalmente nas primeiras 24 horas, revelando interações moleculares complexas. O hospedeiro libera uma cascata de proteínas de defesa para combater as diversas proteínas do patógeno. Entre os mecanismos do patógeno mais importantes destaca-se a produção de ácido oxálico (CALLA et al., 2014).

A complexidade da resistência parcial à *S. sclerotiorum* levou muitos pesquisadores a recorrerem a análises de QTL para identificar marcas associadas à resistência. Alguns estudos iniciais de mapeamento de QTL utilizaram populações biparentais com variação genética limitada ou com tamanho reduzido (VUONG et al., 2008). No entanto, devido às limitações desses estudos de mapeamento que envolveram pequeno número de genótipos ou populações, baixo efeito dos QTLs quando não analisados por modelos multivariados, apresentam desafios na implementação de seleção assistida por marcadores em larga escala.

Os estudos genômicos, propostos por Myles et al., (2009) baseiam-se na avaliação de muitos marcadores distribuídos em todo o genoma. Essa abordagem de mapeamento de associação envolve a busca por correlações entre genótipo e fenótipo em indivíduos não relacionados e geralmente é mais rápida e vantajosa do que o mapeamento biparental tradicional. Nesse contexto, os Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) têm se mostrado uma estratégia promissora para identificar marcas associadas a genes de interesse.

Em estudos de GWAS na caracterização da resistência genética ao mofo branco, Iquira et al. (2015) identificaram SNPs de alta significância nos cromossomos 1, 3, 8 e 20, enquanto Bastien et al. (2014) reportaram associações nos cromossomos 1, 15, 19 e 20, com destaque para o cromossomo 15. Soares (2022) complementa essas descobertas ao identificar SNPs críticos nos cromossomos 3, 6, 10 e 14, associados à resistência parcial durante diferentes estádios de desenvolvimento (germinação e estágio vegetativo V4), evidenciando uma resposta dinâmica da soja ao patógeno. Essas interações também envolvem efeitos epistáticos, como demonstrado por Mollers et al. (2017) na detecção de 58 marcas principais e 24 interações epistáticas.

A metodologia da GWAS baseia-se na análise de marca única, onde o efeito de cada marcador é estimado com base no coeficiente angular da análise de regressão, e sua significância é verificada por um teste estatístico tradicional, com, por exemplo o teste t de Student. Porém as metodologias de detecção podem estar associado a uma alta proporção de falsos positivos, ou seja, marcadores que exibem significância estatística, mas que provavelmente não estão associados a desequilíbrios de ligação com QTLs que controlam a característica em estudo (SUELA et al., 2022).

Dentre os fatores que podem afetar a capacidade de detecção dos testes empregados em estudos de associação, destacam-se os efeitos relacionados à estrutura populacional. Esses efeitos surgem quando a significância observada para determinados marcadores está, na verdade, associada a alelos específicos de certas populações, os quais não estão ligados à característica de interesse (SEHGAL et al., 2016). Além disso é comum que os QTLs

identificados pela análise de marcadores únicos expliquem apenas uma fração reduzida da variabilidade genética (MANOLIO et al., 2009). Os efeitos individuais de SNPs frequentemente são de magnitude reduzida, o que dificulta sua detecção quando submetidos a testes de significância estatística rigorosos (YANG et al., 2010).

Nagamine et al. (2012) propôs uma nova metodologia denominada de mapeamento por herdabilidade regional (RHM) com o propósito de capturar de maneira mais sensível a variação genética potencialmente relacionada às características quantitativas que podem não ser identificadas pela abordagem básica de associação genômica. A análise usa-se a matriz de parentesco genômico entre indivíduos, utilizando variantes de SNPs comuns e raras localizadas em segmentos curtos do genoma, frequentemente referidos como "janelas", com o intuito de estimar a variação da característica que é explicada por essas regiões (SHIRALI et al., 2016; RESENDE et al., 2017).

A estimativa das herdabilidades genômicas regionais permite decompor a variância fenotípica em diferentes componentes, considerando dois efeitos principais: um associado ao genoma completo e outro específico de regiões genômicas determinadas. O modelo é estruturado para integrar simultaneamente a contribuição poligênica global e os efeitos regionais, permitindo identificar segmentos do genoma com influência significativa sobre características de interesse. O componente de variância genômica geral reflete os efeitos distribuídos ao longo de todo o genoma, enquanto o componente regional evidencia a contribuição de loci específicos. Essa abordagem fornece uma análise mais precisa da arquitetura genética de caracteres complexos, como demonstrado por Uemoto et al. (2013), possibilitando uma compreensão mais aprofundada das influências genéticas locais na variabilidade fenotípica.

Estudos têm demonstrado o maior poder de detecção do RHM em comparação com o método de associação genômica ampla via marca única (RIGGIO et al., 2013; RESENDE et al., 2017). Principalmente devido ao seu potencial de capturar uma maior parte da variância genética em comparação com as metodologias tradicionais, e por apresentar uma taxa reduzida de falsos positivos (USAI et al., 2014). No entanto, não existem estudos referentes ao uso desse método caracterizando a resistência genética a doenças para a cultura da soja, em especial ao mofo branco.

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo identificar loci de característica quantitativa (QTLs) associados à resistência da soja à podridão branca, por meio da aplicação de modelos de associação do tipo modelo linear misto (MLM) e Mapeamento de herdabilidade regional (RHM). A abordagem visa auxiliar na localização de regiões

genômicas e genes candidatos relacionados à resposta da planta ao patógeno, contribuindo para o avanço no entendimento da base genética da resistência e para o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes.

Material e Métodos

No presente estudo foram utilizados 102 genótipos de soja oriundos do programa de melhoramento da empresa GDM Genética do Brasil S.A. (Tabela1).

Tabela 1- Cultivares de soja testados quanto a resistência ao mofo branco.

| CULTIVAR | CULTIVAR | CULTIVAR |
|------------------|--------------------|------------------|
| 1 M 5917 | 35 DM82I78RSF | 69 BMX DESAFIO |
| 2 M 5947 | 36 CD202 | 70 BMX EXTREMA |
| 3 NS5445 | 37 TMG2383 | 71 TMG2381 |
| 4 M5838 | 38 DM56I59RSF | 72 SBC200383 |
| 5 M 7739 | 39 BMX ATIVA | 73 NEO630E |
| 6 M6210 | 40 BMX LÓTUS | 74 K6022 |
| 7 M 8372 | 41 NS4823 | 75 NS 7901 |
| 8 M6410 | 42 HO CRISTALINO | 76 BMX FIBRA |
| 9 M 8349 | 43 CZ48B32 | 77 DM 4338 |
| 10 M 8644 | 44 SBI200166 | 78 DM 7.8I TURBO |
| 11 NS6700 | 45 BMX RAI0 | 79 BMX GARRA |
| 12 DM 60I63RSF | 46 CZ37B60 | 80 BMX COMPACTA |
| 13 BMX VORAZ | 47 BMX TORQUE | 81 A5909 |
| 14 BMX VALENTE | 48 SBI200134 | 82 K78C21 |
| 15 BMX FORTALEZA | 49 FTR 4280 | 83 BMX TROVÃO |
| 16 BMX ULTRA | 50 BMX PONTA | 84 BMX DELTA |
| 17 BMX TANQUE | 51 NEO 590 | 85 BRS CONQUISTA |
| 18 P98Y11RR | 52 CD201 | 86 DM53I54 |
| 19 DM64IX66RSF | 53 BMX GUEPARDO | 87 DM69IX69RSF |
| 20 M 6211 | 54 BMX APOLO | 88 NEO530 |
| 21 BMX CROMO TF | 55 DAGMA 8121 | 89 BRS 232 |
| 22 BMX EXATA | 56 CZ58B28 | 90 BMX ATAQUE |
| 23 DM8002 | 57 DM 5958RSF | 91 BRS 284 |
| 24 DM66I68 | 58 DM 57I52RSF | 92 DM3810 |
| 25 GDM19I438 | 59 BMX OLIMPO | 93 BMX COLISEU |
| 26 BMX CARGO | 60 BMX ORIGEM | 94 SBA200094 |
| 27 SBI200136 | 61 BMX ICONE | 95 NEO580 |
| 28 AS3680 | 62 ANTA 82 | 96 ADM4800 |
| 29 NEO610 | 63 BMX CICLONE CE3 | 97 DM 6563RSF |
| 30 BMX FOCO | 64 BMX AUGE E | 98 DM7.0I |
| 31 BMX TORMENTA | 65 BMX CERTA | 99 BMX POTÊNCIA |
| 32 BMX LANCA | 66 GDM19I434 | 100 BMX VÊNUS CE |
| 33 DM73I75RSF | 67 CD 2728 | 101 HO JURUENA |
| 34 BMX ZEUS | 68 BMX ALVO | 102 BMX BÔNUS |

Para a realização deste experimento, plantas de soja foram cultivadas em vasos de 1L por 30 dias, em casa de vegetação com temperatura 24 ± 4 , e umidade acima de 80%. Após os 30 dias de cultivo das plantas procedeu-se a inoculação de *S. sclerotiorum* pelo método chumaço de algodão adaptado da metodologia proposta por Bastien et al. (2012) com algumas modificações. O fungo *S. sclerotiorum* foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA a 22 ± 2 °C por 7 dias. Após esse período, o micélio e o meio foram cortados em pedaços e homogêneos (por 2,5 minutos em liquidificador/mixer). A inoculação consiste na fixação de um chumaço de algodão contendo 1 ml da mistura homogênea no nó da primeira folha trifoliolada de plantas de aproximadamente 30 dias após a sementeira.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizados com 5 repetições, cada repetição apresentava 4 plantas. O experimento foi realizado em três épocas distintas para caracterizar com maior eficiência a reação dos genótipos em estudo. Entende-se por época um intervalo de sementeira de um ensaio para o outro de aproximadamente 21 dias. Os ensaios após inoculação foram conduzidos em ambiente controlado (Container) com temperatura de 20 ± 2 e umidade acima de 90%.

As avaliações foram realizadas no vigésimo primeiro dia após a inoculação, por meio da contagem do número de plantas vivas, infectadas e mortas. Os valores obtidos foram posteriormente convertidos em porcentagem de mortalidade, sendo utilizados para a classificação da resistência das plantas ao patógeno. As classificações seguiram os seguintes critérios: menos de 20% de plantas mortas foram consideradas resistentes; entre 20% e 49%, moderadamente resistentes; e acima de 49%, suscetíveis.

Análise de dados fenotípicos

Os valores genotípicos ajustados foram estimados por meio de um modelo linear misto, considerando os dados fenotípicos provenientes de três ensaios conduzidos em diferentes épocas de sementeira. O modelo foi representado pela seguinte equação:

$$y = X\beta + Zg + \varepsilon$$

em que:

y: vetor de observações fenotípicas;

β : vetor dos efeitos fixos (média geral e efeitos de ensaio — épocas de sementeira);

g: vetor dos efeitos genotípicos, assumidos como aleatórios, com distribuição $g \sim N(0, G\sigma^2)$, onde

G: matriz de covariância genética aditiva e σ^2 é a variância genética aditiva;

ε : vetor de erros aleatórios, com distribuição $\varepsilon \sim N(0, I\sigma^2)$, onde I é a matriz identidade e σ^2 é a variância residual; X e Z são as matrizes de incidência que associam as observações aos efeitos fixos e aleatórios, respectivamente.

Os valores genotípicos ajustados (\hat{g}) foram obtidos com base no modelo linear misto, representando os Best Linear Unbiased Predictors (BLUPs) dos efeitos genotípicos.

Genotipagem de SNP e controle de qualidade

Todas as cultivares utilizadas neste estudo foram genotipadas com o uso da plataforma Illumina SoySNP50K BeadChip, contendo aproximadamente 50.000 marcadores SNP distribuídos uniformemente ao longo do genoma da soja (SONG et al., 2013). O controle de qualidade dos dados genotípicos foi conduzido em múltiplas etapas. Inicialmente, SNPs com mais de 90% de dados faltantes foram excluídos. Em seguida, os dados faltantes dos marcadores remanescentes foram imputados por meio do método de imputação baseado em média genotípica ou algoritmo de inferência implementado no pacote sommer (COVARRUBIAS-PAZARAN, 2016).

Após a imputação, foram removidos SNPs com frequência alélica menor que 0,001 (MAF < 0,01%), considerando que marcadores extremamente raros tendem a gerar ruído estatístico. Ao final do controle de qualidade, 38.268 SNPs de alta qualidade foram retidos para as análises subsequentes.

A distribuição dos SNPs ao longo dos cromossomos foi visualizada por meio de um gráfico de densidade cromossômica, construído com o pacote CMplot, evidenciando a uniformidade da cobertura genômica. Esse mapeamento gráfico auxilia na verificação da representatividade dos marcadores em diferentes regiões do genoma.

A estrutura genética da população foi avaliada por meio de uma Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando a matriz genotípica pós-filtragem.

O cálculo do desequilíbrio de ligação foi conduzido utilizando a função "LD.Decay" implementada na linguagem R, no pacote sommer (COVARRUBIAS-PAZARAN, 2016). Para examinar a tendência de decaimento do desequilíbrio de ligação, foi ajustada uma curva de regressão polinomial local (loess) utilizando a função "loess" também no software R (Campoy et al., 2016; R Core Team, 2021).

O valor crítico de " $r^2 = 0,4$ " foi utilizado para determinar a intersecção com a curva de desequilíbrio de ligação, representado por uma linha reta horizontal, a fim de identificar a respectiva distância a ser empregada na definição das regiões genômicas (VOS et al., 2017; Oyama et al., 2019).

Análise De Associação de Genoma Amplo

A análise de associação genômica ampla (GWAS) foi conduzida com o objetivo de identificar loci de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) associados à característica fenotípica de interesse. Para isso, foi utilizado o modelo linear misto (MLM), implementado no pacote ASRgwas.

O modelo MLM foi empregado devido à sua capacidade de controlar simultaneamente a estrutura populacional e a relação de parentesco entre os indivíduos. A estrutura genética da população foi estimada por meio de Análise de Componentes Principais (PCA), com base nos dados genotípicos, e os três componentes principais (PCs) extraídos foram incluídos no modelo como efeitos fixos. Já o efeito de parentesco entre os indivíduos foi incorporado como efeito aleatório, por meio de uma matriz de relacionamento genético (matriz K).

O modelo matemático adotado para a análise pode ser representado da seguinte forma:

$$y = \mu + X\beta + Zu + \varepsilon$$

onde:

y é o vetor de valores fenotípicos observados;

μ é o valor médio geral da população;

X é a matriz de incidência dos efeitos fixos;

β é o vetor de efeitos fixos (PCA);

Z é a matriz de incidência dos efeitos aleatórios;

$\varepsilon \sim N(0, I\sigma^2)$ é o vetor de erros aleatórios independentes e identicamente distribuídos, com média zero e variância constante.

Os valores de p obtidos para cada SNP foram ajustados com base na correção por FDR (False Discovery Rate), a fim de reduzir a taxa de falsos positivos. Os resultados da análise foram visualizados por meio de gráficos de Manhattan e gráficos QQ plot.

Análise de mapeamento de Herdabilidade Regional

Baseado nas informações de DL entre os pares de marcadores (r^2), os SNPs de cada cromossomo foram organizados em conjuntos formando regiões genômicas de forma não sobreposta.

Para construção das regiões, foram utilizados três tamanhos distintos, sendo um deles estabelecido de acordo com o respectivo valor de distância em que $r^2 \leq 0,4$, de modo semelhante ao utilizado por Resende et al. (2018) e Suela et al. (2022), que correspondeu a distância de 4 Mb. Com o intuito de verificar se a adição de mais marcadores às regiões genômicas as tornariam mais explicativas, ou seja, se capturariam uma maior herdabilidade, foram utilizadas também as distâncias de 2 Mb e 6 Mb para construção das regiões. Para a análise de mapeamento de herdabilidade regional, foi utilizado o modelo linear misto de acordo com a metodologia proposta por Nagamine et al. (2012).

O modelo incorpora dois componentes de variância genômica, correspondente ao efeito do genoma como um todo, e outro correspondente ao efeito de uma região genômica específica. O modelo é representado por:

$$y = \mu + g + r + \varepsilon$$

em que:

y é o vetor de observações fenotípicas;

μ é a média geral;

$g \sim N(0, G\sigma^2g)$ representa os efeitos aleatórios do genoma como um todo, com G sendo a matriz de parentesco genômico baseada em todos os SNPs (exceto os da região em análise);

$r \sim N(0, R\sigma^2r)$ corresponde aos efeitos aleatórios da região genômica específica, com R sendo a matriz de relacionamento construída apenas com os SNPs da respectiva região;

- $\varepsilon \sim N(0, I\sigma^2e)$ é o vetor de erros aleatórios, com I sendo a matriz identidade.

Genes candidatos

Utilizou-se o banco de dados National Center for Biotechnology Information - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a identificação e filtragem dos genes, e suas respectivas proteínas sintetizadas, que podem estar relacionados com a reação de resistência da soja. Os genes candidatos foram buscados em um intervalo de mil pares de bases antes e depois da posição de cada SNP significativo para a análise de associação via marca única e para o RHM foi utilizado a aposição inicial e final de cada região associada.

Resultados e discussão

Avaliação fenotípica do painel de cultivares

A avaliação fenotípica do painel de cultivares revelou uma ampla variação na resposta à infecção (Figura 1). Aproximadamente 94 % dos genótipos apresentaram mortalidade acima de 50%, evidenciando alta suscetibilidade. Apenas 5% dos genótipos demonstraram resistência moderada (mortalidade entre 20 a 49 %), enquanto menos de 1 % foram classificados como resistentes (mortalidade até 20 %).

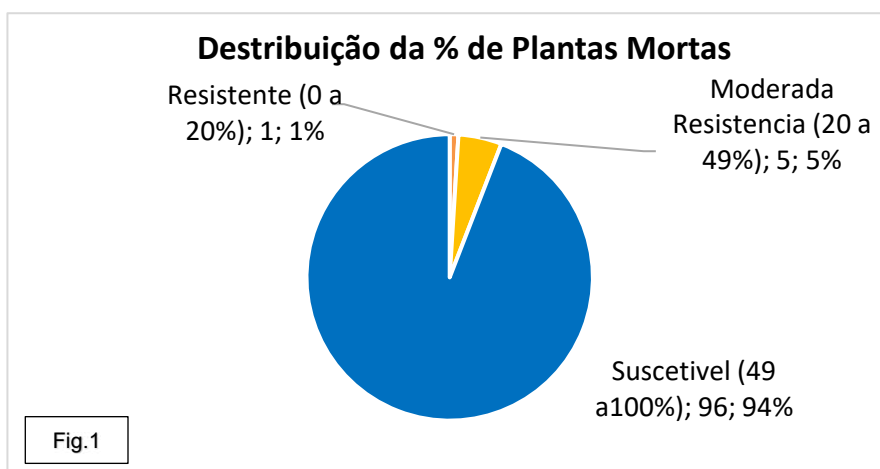


Figura 1 e: . Distribuição da percentagem de plantas mortas nos genótipos de soja avaliados. Segmentos do gráfico representam: resistente (0–20 %), moderada resistência (10–50 %) e suscetível (>50 %). A maioria dos genótipos se classifica como suscetível (>50 %), com menos de 6 % apresentando resistência moderada.

A Figura 2 ilustra claramente os fenótipos contrastantes: plantas tolerantes mantêm folhagem com padrões normais, ao passo que plantas suscetíveis mostram coloração amarelada e necrose acentuada/ Morte. Essa diferenciação fenotípica demonstra a influência e assertividade do método de inoculação em causar infecção e desenvolvimento do mofo branco. A resistência da soja ao mofo branco é quantitativa e mediada por mecanismos complexos, sem registros de imunidade completa em cultivares (IQUIRA et al., 2015).

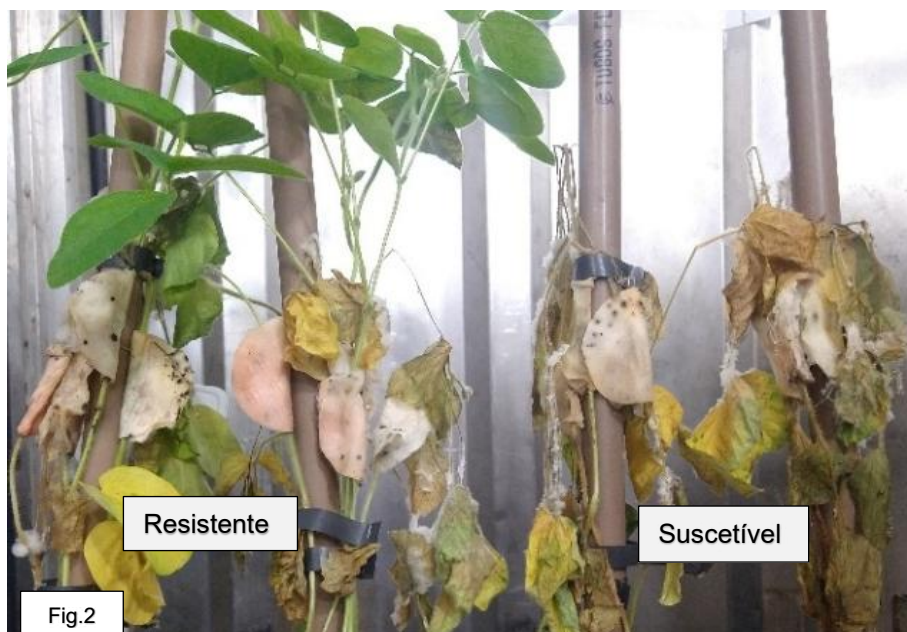


Figura 2. Fenótipos contrastantes 21 dias após inoculação: genótipo tolerante (esquerda) mantém aparência saudável, enquanto genótipo suscetível (direita) apresenta clorose intensa e necrose foliar característica da infecção por ao Mofo branco .

Essa característica reflete-se em avaliações fenotípicas contrastantes: enquanto estudos com germoplasma tropical reportam >85% de cultivares altamente suscetíveis (com mortalidade elevada) e apenas minoria com resistência intermediária, Mugabe (2024) observou perfil inverso em genótipos canadenses usando *método do chumaço de algodão modificado* - 57% parcialmente resistentes (redução de 30-50% na progressão de lesões), 16% moderadamente resistentes (redução de 50-70%) e 27% suscetíveis. Essa divergência evidencia como fatores ecofisiológicos e metodológicos de condução, avaliação e isolado influenciam a expressão da resistência à podridão branca da haste.

Análise de Associação Genômica

Antes da realização do mapeamento por associação, foi conduzida uma análise da estrutura genética dos 102 genótipos de soja, com base em 38.268 marcadores SNPs. A Análise de Componentes Principais (PCA) revelou que o primeiro componente principal (PC1) explicou 6,6% da variação genética total, seguido por PC2 com 4,7% e PC3 com 4,3% da variação observada.

A análise permitiu a identificação de três agrupamentos genéticos distintos, conforme ilustrado na Figura 3. No entanto, a separação dos genótipos nesses grupos não apresentou correlação com o fenótipo de resistência à doença, medido pela porcentagem de plantas

mortas. O grupo 1 (azul), com maior número de genótipos, apresentou ampla variação fenotípica, incluindo genótipos com baixa e alta mortalidade. Já os grupos 2 (amarelo) e 3 (vermelho) mostraram menor variação, porém com médias semelhantes às do grupo 1. Esses resultados indicam que a estrutura genética definida pelos marcadores moleculares não reflete diretamente a variação fenotípica para resistência, evidenciando a complexidade em se identificar padrões genéticos associados à resistência baseando-se apenas na estrutura populacional.

A baixa variância explicada pelos primeiros componentes principais (PCs) pode estar relacionada a dois fatores principais. O primeiro refere-se à provável ausência de uma estrutura populacional claramente definida, uma vez que os genótipos avaliados pertencem ao mesmo programa de melhoramento, apresentando origens genéticas semelhantes. O segundo fator diz respeito à alta dimensionalidade dos dados, com um número substancialmente maior de marcadores (38.268 SNPs) em relação ao número de indivíduos (102), o que tende a distribuir a variância ao longo de múltiplos componentes, reduzindo, assim, a proporção de variância capturada pelos primeiros PCs (ABRAHAM; INOUE, 2014; PATTERSON et al., 2006).

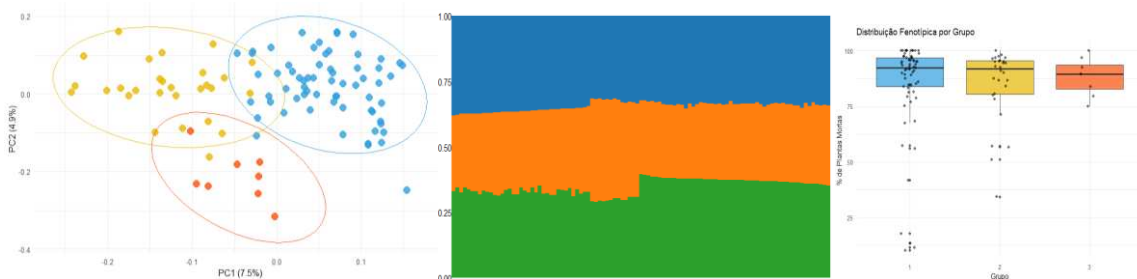


Figura 3. Análise de componentes principais (PCA) e estrutura de população de genótipos de soja baseada em marcadores moleculares. À esquerda, dispersão dos genótipos nos dois primeiros componentes principais, evidenciando a formação de três grupos genéticos distintos (cores: azul – grupo 1, amarelo – grupo 2, vermelho – grupo 3). No centro, gráfico de estrutura populacional mostrando a proporção de ancestralidade de cada genótipo em relação aos três grupos genéticos inferidos, onde cada barra representa um genótipo e as cores indicam a contribuição de cada grupo ancestral.

A distribuição genômica dos marcadores SNPs utilizados nas análises de associação foi avaliada por meio de uma representação gráfica em janelas de 1 Mb ao longo dos 20 cromossomos da soja (Figura 5). Observa-se uma cobertura homogênea da maioria dos cromossomos, com acúmulo variável de SNPs entre diferentes regiões genômicas. A escala de cores representa a densidade de SNPs por janela: áreas em verde indicam maior

concentração de marcadores, enquanto tons de amarelo a vermelho indicam menor densidade.



Figura 5. Densidade de 38.268 SNPs distribuídos ao longo dos 20 cromossomos da soja, representada em janelas deslizantes de 1 Mb. A escala de cores indica a quantidade de SNPs por janela genômica, variando de regiões com baixa densidade (vermelho) a alta densidade (verde escuro). Esta distribuição assegura cobertura genômica adequada para análises de associação genômica ampla (GWAS).

Essa visualização é fundamental para assegurar a cobertura adequada do genoma e identificar possíveis regiões com baixa densidade de marcadores (gaps), as quais podem comprometer a resolução da análise de associação. A distribuição relativamente uniforme dos SNPs no painel garante robustez estatística e maior poder de detecção de loci associados aos fenótipos avaliados (MORRIS et al., 2019; WANG et al., 2014).

A matriz inicial de marcadores (M) era composta por 102 indivíduos e 50.000 SNPs. Durante o processo de filtragem de dados, 19 marcadores foram removidos por apresentarem uma proporção de valores ausentes igual ou superior a 90%. Nenhum indivíduo foi excluído, pois nenhum atingiu esse mesmo critério de valores ausentes. Além disso, 13.556 marcadores foram eliminados por possuírem uma frequência alélica minoritária (MAF) inferior a 0,001. Também foram removidos 107 marcadores que apresentaram uma heterozigidade superior a 90%. Nenhum marcador foi descartado com base nos valores de $|F|$ superiores a 1.

Após a limpeza dos dados, a matriz final continha 102 indivíduos e 38.268 marcadores, com 5,07% de SNPs ausentes. Para lidar com esses dados faltantes, um total de 196.112 valores ausentes foi imputado.

A análise de associação genômica identificou cinco SNPs significativos associados à resistência ao Mofa branco, distribuídos em quatro cromossomos distintos: 1, 5, 11 e 17 (Tabela 1). O critério de significância adotado foi um limiar de $-\log_{10}(p\text{-valor}) \geq 5$, evidenciado no gráfico Manhattan (Figura 6A).

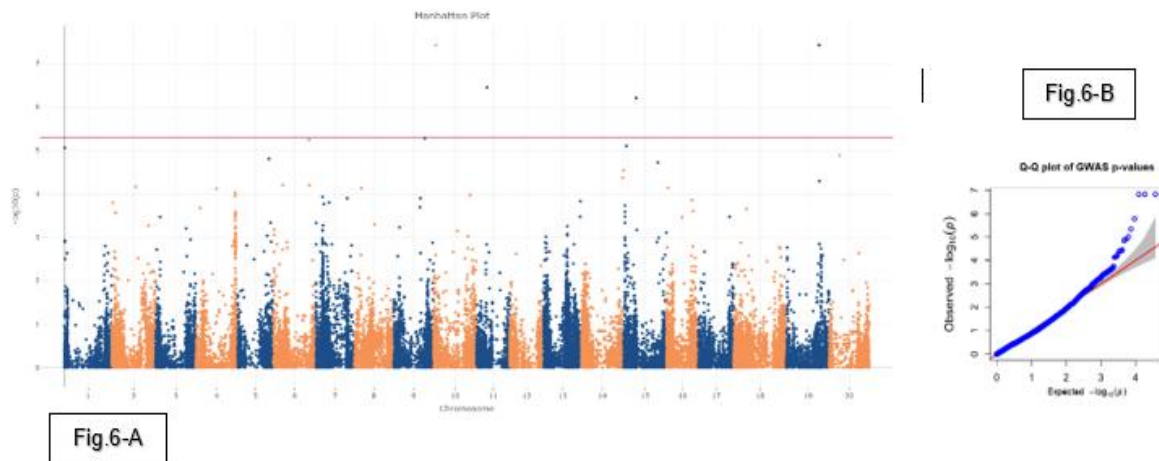


Figura 6. Resultados da análise de associação genômica ampla (GWAS) para resistência ao PBH em 102 genótipos de soja. **A)** Gráfico de Manhattan representando a associação entre marcadores SNPs e a característica de resistência. O eixo x mostra a posição física dos SNPs por cromossomo, e o eixo y representa os valores de significância estatística ($-\log_{10}(P)$). A linha horizontal indica o limiar de significância adotado ($FDR = 0,1$). **B)** Gráfico quantil-quantil ($Q-Q$ plot) dos valores observados versus esperados de $-\log_{10}(P)$.

A frequência do alelo minoritário (MAF) variou entre os marcadores, indo de 0,0245 (SNP16511) até 0,4117 (SNP18698). Esses valores indicam que SNP16511 representa um alelo raro na população analisada, enquanto SNP18698 está presente em uma proporção maior de indivíduos.

Os efeitos estimados dos SNPs sobre a característica de interesse apresentaram variações em magnitude e sinal. SNP16511 teve efeito positivo de 43,18, indicando uma associação com maior porcentagem de plantas mortas. Em contrapartida, SNP18698 apresentou efeito negativo de -24,29, sugerindo associação com menor mortalidade.

A presença de valores moderados a baixos de herdabilidade para alguns SNPs é comum em características com controle poligênico e baixa herdabilidade, como é o caso da resistência ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Além disso, a baixa frequência alélica observada em SNP16511 ($MAF < 0,01$) pode ter contribuído para a menor proporção de variação explicada, reforçando a importância de alelos raros no controle da característica.

Em estudos de GWAS, é comum encontrar muitos alelos raros com pequenos efeitos em características de baixa herdabilidade (WALLACE et al., 2016). A resposta da soja ao patógeno *S. sclerotiorum* é uma característica poligênica, controlada por diversos genes, cada um com um efeito modesto. Por essa razão, foram considerados marcadores de baixa frequência ($MAF > 0,01$) para identificar alelos raros que também poderiam ter influência na característica estudada (Tabela 2).

Tabela 2. Localização dos marcadores moleculares nos cromossomos em que foram obtidas significâncias pela análise via marcas únicas.

| SNP | Chr | POS | MAF | Efeito | p. valor | R ² | h ² |
|----------|-----|----------|-------|--------|----------|----------------|----------------|
| SNP16511 | 10 | 2804168 | 0.025 | 43.18 | 3.69E-08 | 23.5 | 14.3 |
| SNP18698 | 11 | 12247654 | 0.412 | -24.29 | 3.49E-07 | 75.3 | 45.9 |
| SNP26046 | 15 | 14953522 | 0.034 | 38.41 | 6.07E-07 | 25.7 | 15.7 |
| SNP35140 | 19 | 38315356 | 0.025 | 43.18 | 3.69E-08 | 23.5 | 14.3 |

Chr: cromossomo onde o marcador está localizado.

Pos: posição física no cromossomo (pb – pares de base).

MAF: frequência do alelo minoritário (Minor Allele Frequency).

R²: porcentagem da variância fenotípica explicada pelo marcador.

h²: herdabilidade associada ao marcador.

Neste estudo, em testes para detecção de associações entre marcadores SNP e resistência ao Mofo branco, a característica exibiu herdabilidade de 41,9% e, no estudo de Iquira e colaboradores (2015) relacionado com resistência ao mofo branco foi de 67% (IQUIRA; SONAH; BELZILE, 2015). Herdabilidade alta, semelhante ao obtidos por Moellers (2017) na estudo associação genômica e epistática em soja para resistência ao Mofo branco em múltiplos ambientes. Semelhante às estimativas relatadas anteriormente entre populações de linha endogâmica recombinante (RIL), que variaram de 0,30 a 0,71 em ambientes de campo 0,59 em ambientes controlado (KIM e DIERS, 2000).

A análise do desequilíbrio de ligação (LD) para os genótipos avaliados está representada na Figura 7. O gráfico mostra que o LD apresentou um rápido decaimento até aproximadamente 3 Mb, evidenciado pela curva de regressão (*loess*) e pela linha vermelha, indicando que a associação entre pares de marcadores diminui substancialmente com o aumento da distância física entre eles. Após cerca de 4 a 5 Mb, o valor de r² se estabiliza em torno de 0,40, sugerindo uma região de desequilíbrio prolongado.

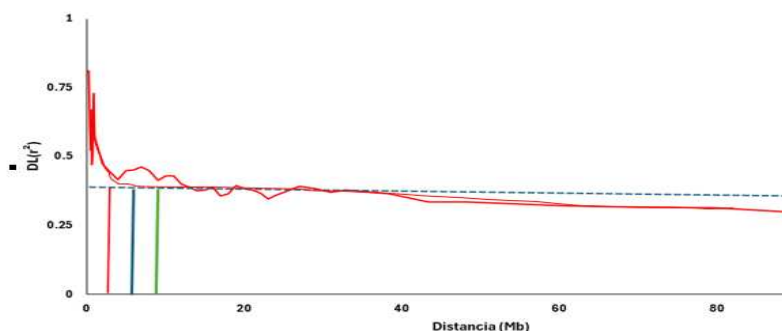


Figura 7. Desequilíbrio de ligação (r²) entre pares de alelos dos SNPs em função da distância física (Mb). A linha azul representa o ajuste por regressão loess. A linha tracejada horizontal marca r² = 0,40. As linhas verticais indicam distâncias de 2 Mb (vermelha), 4 Mb (azul) e 6 Mb (verde), usadas para estimar a extensão genômica das regiões de associação. A análise do DL orienta a definição do tamanho da janela em mapeamentos de associação regionais.

Esse padrão indica que marcadores localizados até 2 a 3 Mb de distância ainda mantêm uma associação genética relevante, enquanto distâncias maiores refletem maior recombinação e perda de correlação entre loci.

O decaimento lento e a posterior estabilização do LD observados neste estudo podem estar relacionados à estrutura da população avaliada. Em populações com baixo nível de diversidade genética ou com grau elevado de parentesco, é comum observar um LD mais extenso. Isso ocorre porque a frequência de recombinação entre alelos é reduzida, fazendo com que os blocos de haplótipos sejam maiores e permaneçam associados por distâncias físicas mais longas no genoma. Apesar do decaimento acentuado até 3 Mb, o valor de r^2 ainda permaneceu acima de 0,4 até aproximadamente 4 Mb, justificando a adoção de uma janela genômica de 4 Mb para a busca de genes candidatos associados às regiões significativas. (KALER et al., 2020; FLINT-GARCIA et al., 2003).

O desequilíbrio de ligação em espécies com predomínio de sistemas de autofecundação tende a reduzir de forma lenta (FLINT-GARCIA et al., 2003). Embora haja uma grande variabilidade no padrão de desequilíbrio de ligação dependendo do germoplasma estudado, os resultados obtidos neste estudo demonstra está queda. Para análises de associação que consideram múltiplos locus ao mesmo tempo, a definição do tamanho das regiões genômicas pode ser baseada nas informações de desequilíbrio de ligação (ZHAO et al., 2007)., o que justifica a realização de testes com diferentes tamanhos de regiões, como feito neste estudo. Além disso, ao considerar o desequilíbrio de ligação para definir o tamanho das regiões, garante-se que essa informação seja distribuída de maneira equilibrada ao longo das regiões analisadas (RESENDE et al., 2018).

Os resultados das análises de GWAS via marca única, foram identificado 4 regiões, porém o estudo não teve boa sobreposição com o QTL identificado nos outros estudos recentes do GWAS. Essa falta de identificação de QTL sobreposta entre diferentes experimentos pode refletir os efeitos sutis de cada QTL para resistência ao Mofo branco ou a alta variabilidade na fenotipagem dessa doença. A falta de sobreposição de QTL também pode ser devido ao uso de diferentes genótipos de soja, ao uso de diferentes isolados de patógenos coletados em diferentes continentes ou ao uso de diferentes métodos de inoculação.

Entre as análises de GWAS, dois dos estudos utilizam uma metodologia parecida com a do chumaço de algodão, ou seja, inoculação com algodão na inflorescência e avaliação após 7 dias de inoculação, foram identificadas regiões nos cromossomos 1, 15, 19 e 20

(BASTIEN; SONAH; BELZILE, 2014), nos cromossomos 3, 8 e 20 (IQUIRA; SONAH; BELZILE, 2015). A ausência de coincidência entre essas regiões cromossômicas em comparação com outros estudos pode ser atribuída ao uso de diferentes genótipos e empregados nas pesquisas anteriores. Como também a possibilidade ambientes de teste, como por exemplo Kim e Diers (2000) identificaram dois QTLs associados à resistência ao mofo branco. No entanto, esses QTLs estavam mais relacionados à prevenção da doença do que à resistência genética propriamente dita, uma vez que estavam ligados a características fenotípicas, como tempo de floração, altura da planta e altura de inserção da vagem.

Análise de Mapeamento de Herdabilidade Regional

A análise de mapeamento de herdabilidade regional (RHM) avaliou 16.247, 11.182 e 8.709 regiões genômicas para janelas de 2 Mb, 4 Mb e 6 Mb, respectivamente (Tabela 3). Destas, 26 regiões cromossômicas demonstraram associações significativas ($p < 5 \times 10^{-8}$) com resistência ao mofo branco (Tabela 4). A herdabilidade regional (h^2_{rh}) variou substancialmente entre as regiões, desde 35% (Chr19: 38.29–38.32 Mb) até 98% (Chr5: 41.04–41.08 Mb), refletindo diferenças na contribuição genética local. Globalmente, a herdabilidade média aumentou 70% com a expansão das janelas, passando de 2.4% (2 Mb) para 4.1% (6 Mb), padrão consistente em 85% dos cromossomos. Cromossomos como 2, 7 e 10 apresentaram ganhos superiores a 100% (ex.: Chr2: 4.1% → 7.2%), enquanto 17, 19 e 20 mantiveram baixa influência genética (<2.3%).

A análise de herdabilidade regional (RHM) em janelas de 2, 4 e 6 Mb identificou múltiplas regiões genômicas com elevada significância estatística ($p < 5 \times 10^{-8}$) e herdabilidade. Especificamente, nas janelas de 2 Mb, destacaram-se duas regiões: uma no cromossomo 7 (5.035.046 - 5.042.111 pb) com herdabilidade de 81% ($p = 7.52 \times 10^{-9}$) e outra no cromossomo 10 (2.804.168 - 2.823.029 pb) com 87% de herdabilidade.

No cromossomo 19, duas regiões consecutivas se destacaram pela significância estatística. A região 38296832 – 38315356 apresentou uma herdabilidade de 0.35 e a região 38375789 – 38395515 apresentou uma herdabilidade de 0.50. Essas regiões, apesar de apresentarem herdabilidades moderadas, foram altamente significativas.

No cromossomo 5 (posição 41.040.579 – 410.751.96), foi observada a maior herdabilidade registrada (0.98). Além disso, o cromossomo 19 apresentou novamente as regiões 38.296.832 – 38.315.356 e 38.353.545 – 38.375.789, com herdabilidades de 0.35 e 0.48, respectivamente, indicando que essas regiões são consistentemente relevantes para a variação da resistência ao Mofo branco. O cromossomo 11 (posição 2.092.026 – 2.130.801)

também apresentou herdabilidade de 0.95, sendo uma das regiões mais significativas neste tamanho de janela.

Tabela 3. Distribuição, número de regiões construídas e Herdabilidade média por cromossomo dos marcadores moleculares utilizados na análise de mapeamento de herdabilidade regional.

| Chr. | n° de Regiões | | | Herdabilidade Média | | |
|-------|---------------|-------|------|---------------------|-------|-------|
| | 2Mb | 4Mb | 6Mb | 2Mb | 4Mb | 6Mb |
| 1 | 728 | 506 | 400 | 0.019 | 0.026 | 0.030 |
| 2 | 914 | 619 | 485 | 0.041 | 0.065 | 0.072 |
| 3 | 753 | 533 | 419 | 0.030 | 0.046 | 0.052 |
| 4 | 753 | 531 | 428 | 0.019 | 0.029 | 0.036 |
| 5 | 612 | 413 | 319 | 0.032 | 0.040 | 0.044 |
| 6 | 859 | 607 | 477 | 0.028 | 0.039 | 0.045 |
| 7 | 810 | 550 | 415 | 0.035 | 0.050 | 0.067 |
| 8 | 856 | 595 | 465 | 0.015 | 0.019 | 0.022 |
| 9 | 854 | 584 | 454 | 0.017 | 0.033 | 0.037 |
| 10 | 832 | 585 | 456 | 0.027 | 0.044 | 0.064 |
| 11 | 538 | 391 | 303 | 0.029 | 0.039 | 0.048 |
| 12 | 522 | 359 | 287 | 0.019 | 0.024 | 0.029 |
| 13 | 954 | 623 | 472 | 0.032 | 0.042 | 0.046 |
| 14 | 811 | 552 | 434 | 0.017 | 0.024 | 0.034 |
| 15 | 944 | 653 | 508 | 0.030 | 0.041 | 0.051 |
| 16 | 750 | 505 | 395 | 0.033 | 0.047 | 0.052 |
| 17 | 749 | 533 | 413 | 0.013 | 0.018 | 0.021 |
| 18 | 1365 | 894 | 670 | 0.017 | 0.027 | 0.032 |
| 19 | 933 | 649 | 508 | 0.014 | 0.017 | 0.023 |
| 20 | 710 | 500 | 401 | 0.013 | 0.020 | 0.022 |
| Total | 16247 | 11182 | 8709 | 0.024 | 0.034 | 0.041 |

Regiões com janela de 6 Mb reforçam a importância de regiões já identificadas nas análises com janelas menores. No cromossomo 7 regiões se destacaram por apresentarem alto valores de herdabilidade, 0,86 e 0,91, nas posições 5.030.149 – 5.067.166 e 7.672.905 – 7732175, respectivamente. O cromossomo 19 novamente apresentou resultados consistentes, com a região 38.296.832 – 38.353.545pb exibindo herdabilidades moderadas de 0.44 e na região 38.375.789 – 38.412.346 0.65pb

Destacam-se também as regiões presentes nos cromossomos 7 (posição 5035046 – 5067166) e 11 (posição 12247654 – 12307416) que também se mostraram consistentemente relevantes, aparecendo em múltiplos tamanhos de janelas com herdabilidades que variaram de 0.53 a 0.96.

A expansão das janelas elevou a herdabilidade média em 70% (2.4% para 4.1%), padrão mais acentuado nos cromossomos 2, 7 e 10 (>100% de ganho). Contudo, mesmo em

janelas maiores, cromossomos como 17, 19 e 20 mantiveram contribuições modestas (<2.3%), indicando influência genética limitada nesses *loci*.

Como observado na Tabela 4, à medida que o tamanho da região aumenta nas análises de RHM, ocorre um aumento no poder de detecção no teste conforme, os resultados foram semelhantes aos obtidos por Suela et al. (2022) e Bennewitz et al. (2017). De forma semelhante aos resultados obtidos por outros autores (RESENDE et al., 2018; SHIRALI et al., 2016; SUELA et al., 2022), a análise de mapeamento de herdabilidade regional foi capaz de explicar uma maior proporção da variância genética aditiva quando comparada à metodologia de associação baseada em marcadores únicos. Isso ocorre devido ao efeito combinado de múltiplos alelos próximos que compõem a região analisada.

No entanto, também pode ocorrer o oposto, onde um alelo de maior efeito não é detectado devido à diluição de seu impacto dentro da região, o que pode explicar as associações observadas em análises com marcadores únicos, mas que não foram capturadas pelo método de RHM (RESENDE et al., 2017).

Tabela 4. Distribuição, número de regiões construídas e Herdabilidade média por cromossomo dos marcadores moleculares utilizados na análise de mapeamento de herdabilidade regional.

| Tam. Região (Mp) | chr | Posição Inicial (pb) | Posição Final (pb) | Nº de SNPs | pvalue | h ² _{rhm} |
|------------------|-----|----------------------|--------------------|------------|------------------------|-------------------------------|
| 2 | 7 | 5035046 | 5042111 | 20 | 7.52x10 ⁻⁰⁹ | 0.81 |
| | 9 | 36696489 | 36710338 | 20 | 1.94x10 ⁻⁰⁸ | 0.61 |
| | 10 | 2804168 | 2823029 | 50 | 3.33x10 ⁻¹¹ | 0.87 |
| | 11 | 12247654 | 12254519 | 10 | 1.72x10 ⁻⁰⁹ | 0.60 |
| | 15 | 14226766 | 14245483 | 40 | 6.22x10 ⁻¹⁰ | 0.96 |
| | 19 | 38296832 | 38315356 | 10 | 3.43x10 ⁻¹³ | 0.35 |
| | 19 | 38375789 | 38395515 | 10 | 8.58x10 ⁻¹³ | 0.50 |
| 4 | 5 | 41040579 | 41075196 | 90 | 9.09x10 ⁻⁰⁹ | 0.98 |
| | 5 | 8140171 | 8170257 | 30 | 1.12x10 ⁻⁰⁷ | 0.89 |
| | 9 | 36696489 | 36722807 | 30 | 6.08x10 ⁻⁰⁸ | 0.56 |
| | 9 | 45958275 | 45969567 | 30 | 7.04x10 ⁻⁰⁸ | 0.80 |
| | 10 | 2781420 | 2818266 | 80 | 3.53x10 ⁻¹⁰ | 0.81 |
| | 11 | 2092026 | 2130801 | 80 | 1.54x10 ⁻¹⁰ | 0.95 |
| | 11 | 12247654 | 12275059 | 20 | 5.14x10 ⁻⁰⁹ | 0.53 |
| | 16 | 30036170 | 30075422 | 60 | 5.00x10 ⁻⁰⁸ | 0.88 |
| | 19 | 38296832 | 38315356 | 10 | 3.43x10 ⁻¹³ | 0.35 |
| 6 | 19 | 38353545 | 38375789 | 10 | 8.66x10 ⁻¹³ | 0.48 |
| | 7 | 5030149 | 5067166 | 40 | 1.05x10 ⁻⁰⁹ | 0.86 |
| | 7 | 7672905 | 7732175 | 70 | 5.31x10 ⁻⁰⁹ | 0.91 |
| | 9 | 45918859 | 45969567 | 50 | 6.21x10 ⁻⁰⁸ | 0.77 |
| | 10 | 14837349 | 14883201 | 10 | 2.13x10 ⁻⁰⁹ | 0.94 |
| | 10 | 2781420 | 2839265 | 140 | 5.15x10 ⁻⁰⁹ | 0.81 |
| | 11 | 2111286 | 2168908 | 90 | 3.04x10 ⁻¹¹ | 0.96 |
| | 11 | 12247654 | 12307416 | 70 | 1.77x10 ⁻¹⁰ | 0.62 |
| | 16 | 29885787 | 29942185 | 80 | 1.46x10 ⁻⁰⁸ | 0.91 |
| | 19 | 38296832 | 38353545 | 20 | 1.55x10 ⁻¹² | 0.44 |
| | 19 | 38375789 | 38412346 | 30 | 3.57x10 ⁻¹¹ | 0.65 |

Chr: Cromossomo.

h²_{rhm}: Herdabilidade Regional.

Posição inicial e final das regiões significativa, herdabilidade observada em diferentes cromossomos em análises realizadas com janelas de 2 Mb, 4 Mb e 6 Mb.

O RHM capturou frações maiores da herdabilidade das características em comparação ao GWAS. A proporção da herdabilidade explicada pelos sinais do GWAS variou conforme o tamanho das janelas genômicas analisadas. No entanto, ao não se limitar exclusivamente às associações de SNPs individuais, a abordagem do RHM permitiu incorporar os efeitos de múltiplas variantes causais, fornecendo uma estimativa conjunta dos efeitos combinados de variantes comuns e raras nas regiões genômicas detectadas (NAGAMINE et al., 2012). Com isso, seria esperado que as regiões genômicas com efeitos suficientemente grandes para serem detectados pelo GWAS fossem sempre capturadas pelo RHM, enquanto o contrário não seria necessariamente verdadeiro, devido às variantes adicionais de pequeno efeito contabilizadas pelo RHM. No entanto, nossos resultados mostraram que isso nem sempre aconteceu, e a sobreposição entre os QTLs identificados por GWAS e RHM variou de acordo com o tamanho das regiões analisadas.

Os SNPs ligados à resistência poderão ser empregados em programas de melhoramento de soja para identificar linhagens ou cultivares que possuam genes de interesse para a resistência ao fungo do mofo branco, agilizando o processo por meio de seleção assistida por marcadores. Esses SNPs também podem ser integrados em estratégias de seleção genômica. Além disso, os SNPs significativos podem contribuir para o entendimento da função biológica dos polimorfismos e sua relação com a resistência.

Genes candidatos ao controle da característica

Com base nos bancos de dados e literatura existente, foi possível identificar genes candidatos pelo controle da característica de interesse, tanto para análise de via SNP único (Tabela 5) quanto para a realizada via RHM (Tabela 6). Os genes apresentados são aqueles que se encontram dentro das regiões em que foram identificadas as associações significantes. Porém houve alguns casos em que não foram encontrados relatos anteriores que liguem genes a essas características nas regiões identificadas como significantes neste estudo.

Tabela 5. Lista de genes reportados na literatura para as características avaliadas identificados via análise de SNPs únicos, localizações no genoma e descrições das proteínas traduzidas.

| SNP | Chr. | Gene | Início | Fim | Informação |
|----------|------|-----------------|----------|----------|--|
| SNP16511 | 10 | Glyma10g03740 | 2799209 | 2804735 | Glutathione reductase |
| SNP18698 | 11 | Glyma.11g152900 | 12241551 | 12243676 | Structure-specific recognition protein |
| SNP26046 | 15 | Glyma.15g168200 | 14945418 | 14947483 | WRKY DNA -binding domain |
| SNP35140 | 19 | Glyma.19g125100 | 38382184 | 38391933 | Plant organelle RNA recognition. |

A Glutathione reductase, codificada pelo gene Glyma10g03740, é uma enzima essencial no metabolismo celular das plantas. Ela catalisa a conversão do glutathione dissulfeto (GSSG) em glutathione reduzida (GSH), um antioxidante crucial que protege as células contra o estresse oxidativo. Este processo é vital para manter o equilíbrio redox dentro das células, ajudando a planta a lidar com condições adversas e a manter a saúde celular (CSISZÁR, J. 2016), desempenhando um papel crítico na defesa contra o Mofo branco, uma vez que durante a infecção, o fungo secreta oxalato e elicitores que induzem estresse oxidativo na planta hospedeira, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) que promovem necrose do tecido. A GR resiste a esse dano ao manter altos níveis de glutathione reduzida (GSH), que: (i) detoxificação ROS diretamente, preservando a integridade celular; (ii) atua como sinalizador redox para ativar genes de defesa (*e.g.*, proteínas PR e síntese de fitoalexinas); e (iii) fortalece a parede celular contra enzimas líticas do patógeno (Couto et al., 2016; Han et al., 2013).

A Structure-specific recognition protein (SSRP1), associada ao gene Glyma.11g152900, desempenha um papel fundamental na regulação da transcrição, replicação e reparo do DNA. Como parte do complexo FACT, a SSRP1 facilita a passagem da RNA polimerase II ao reorganizar os nucleossomos, permitindo que a maquinaria de transcrição acesse o DNA. Esta função é crucial para a expressão gênica eficiente e para a manutenção da integridade genômica (GRASSER, 2020)

Os fatores de transcrição contendo o WRKY DNA-binding domain, como o codificado pelo gene Glyma.15g168200, são reguladores chave nas respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos. Eles se ligam a sequências específicas de DNA conhecidas como elementos W-box nos promotores de genes alvo, modulando sua expressão. Esta regulação é essencial para ativar as defesas da planta contra patógenos e para adaptar-se a condições ambientais adversas (CHEN, 2019).

Por fim, as proteínas de reconhecimento de RNA em organelas vegetais, como a codificada pelo gene Glyma.19g125100, são críticas para a estabilidade, processamento e degradação do RNA em cloroplastos e mitocôndrias. Estas proteínas garantem a produção adequada de componentes essenciais para a fotossíntese e respiração, processos vitais para a energia e crescimento da planta (SMALL et al., 2023).

Na análise das regiões significativas identificadas pelo mapeamento regional (Tabela 6), quatro regiões não apresentaram genes previamente associados à resistência a patógenos. Nas demais 23 regiões, predominaram genes envolvidos em: Resposta a estresses bióticos, como a família de histonas KOG1745 (Glyma07g06310) que modula a compactação da

cromatina e regulação transcricional de genes de defesa. Em soja, histonas H3/H4 regulam a expressão de PR-proteins durante infecções por fungos necrotróficos (SANTOS et al., 2023); e Metabolismo de carboidratos na resistência, exemplificado pela 4- α -glucanotransferase (Glyma.19g125800). Esta enzima remodela cadeias de α -1,4-glucano, fortalecendo a parede celular contra enzimas líticas de Sclerotinia – mecanismo comprovado em Arabidopsis com redução de 40% na expansão de lesões (YA-LONG et al., 2011).

Tabela 6. Lista de genes reportados na literatura para as características avaliadas identificados via RHM, localizações no genoma, e descrições das proteínas traduzidas.

| Região (Mp) | chr | Posição Inicial ^{RHM} | Posição Final ^{RHM} | Gene | Início | Fim | Informação |
|-------------|-----|--------------------------------|------------------------------|-------------------|--------------|--------------|--|
| 2 | 7 | 5035046 | 5042111 | Glyma07g06310 | 5037034 | 5040677 | Proteins KOG1745 |
| | 9 | 36696489 | 36710338 | Não descrito | Não descrito | Não descrito | Não Descrito |
| | 10 | 2804168 | 2823029 | BT093606.1 | 2816598 | 2822401 | E3 Ubiquitin Protein Ligase DRIP2 |
| | 11 | 12247654 | 12254519 | Não descrito | Não descrito | Não descrito | Não Descrito |
| | 15 | 14226766 | 14245483 | Glyma.15g164400 | 14240980 | 14241621 | Glycoprotein Related To The S-(SLR1-BP) Locus |
| | 19 | 38296832 | 38315356 | Glyma.19g125000 | 38303845 | 38310279 | ALADIN/ADRACALIN/AAAS Protein |
| | 19 | 38375789 | 38395515 | Glyma.19g125800 | 38410642 | 38423531 | PF02446 (4-Alpha-Glucanotransferase) |
| 4 | 5 | 41040579 | 41075196 | Glyma05g37450 | 41051719 | 41052126 | Uncharacterized Nodulin-Like Protein |
| | 5 | 8140171 | 8170257 | Glyma05g08190 | 8156453 | 8159640 | Defense Enzyme: Polyketide Synthase (PKS) Type III |
| | 9 | 36696489 | 36722807 | Glyma09g29840 | 36715836 | 36719730 | Glycosyl Hydrolase Family 14 |
| | 9 | 45958275 | 45969567 | WNK10 | 45963410 | 45967330 | Lysine Kinase 10-WNK-10 |
| | 10 | 2781420 | 2818266 | AK244410.1 | 2776973 | 2780061 | Auxin Proteins - AUX28 |
| | 11 | 2092026 | 2130801 | Glyma11g03180 | 2104263 | 2105580 | Cornichon Protein |
| | 11 | 12247654 | 12275059 | Não descrito | Não descrito | Não descrito | Não Descrito |
| | 16 | 30036170 | 30075422 | Glyma.16g142100 | 30045141 | 30049963 | Subfamily Not Named |
| | 19 | 38296832 | 38315356 | Glyma.19g125000 | 38303845 | 38310279 | ALADIN/ADRACALIN/AAAS Protein |
| | 19 | 38353545 | 38375789 | Glyma.19g125400 | 38371477 | 38374357 | Nascent Polypeptide Associated Complex Alpha Subunit |
| 6 | 7 | 5030149 | 5067166 | BT093956.1 | 5052692 | 5055577 | WRKY55 Protein |
| | 7 | 7672905 | 7732175 | Não descrito | Não descrito | Não descrito | Não Descrito |
| | 9 | 45918859 | 45969567 | BARC-051769-11236 | 45873336 | 45873837 | Não Descrito |
| | 10 | 14837349 | 14883201 | Não descrito | Não descrito | Não descrito | Não Descrito |
| | 10 | 2781420 | 2839265 | Glyma10g03750 | 2805884 | 2807385 | Photosystem II Reaction Center W Protein (Psbw) |
| | 11 | 2111286 | 2168908 | Glyma.11g029600 | 2138474 | 2149522 | Vesicle Protein Sorting-Associated |
| | 11 | 12247654 | 12307416 | Glyma.11g153100 | 12285531 | 12292304 | Dimethylaniline Monooxygenase |
| | 16 | 29885787 | 29942185 | Glyma.16g141200 | 29911174 | 29916916 | Protein Phosphatase 2c (Pp2c) |
| | 19 | 38296832 | 38353545 | Glyma.19g125200 | 38319012 | 38324335 | Peroxisomal Membrane Protein 2, Pxmp2 (Mpv17) |
| | 19 | 38375789 | 38412346 | Glyma.19G160400 | 42123578 | 42125238 | Não Descrito |

Considerações Finais

A metodologia utilizada demonstrou ser eficiente na caracterização fenotípica relacionada à resistência e suscetibilidade ao mofo branco. Por meio do mapeamento de herdabilidade regional, foi possível identificar QTLs que desempenham um papel crucial no controle da resposta das plantas na defesa vegetal contra ao Mofo branco .

Além disso, a metodologia de associação via marca única também contribuiu para a identificação de características relevantes. A análise de mapeamento de herdabilidade regional na soja possibilitou a explicação de uma maior porção da herdabilidade genômica, resultando na identificação de um número significativamente maior de regiões em comparação com o método convencional de associação.

Ainda há necessidade de novas pesquisas na cultura da soja para verificar a presença de possíveis genes responsáveis pelo controle da característica observada. A metodologia de mapeamento de herdabilidade regional foi eficaz em localizar uma grande proporção das regiões associadas identificadas pelo método convencional. No entanto, o inverso não se confirmou, o que sugere uma superioridade da metodologia de herdabilidade regional em relação à associação via marcas únicas.

Referencias

- ABRAHAM, G.; INOUE, M. Genomic risk prediction of complex human disease and its clinical application. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 33, p. 10-16, 2014.
- BASTIEN, M.; SONAH, H.; BELZILE, F. Genome-wide association mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in soybean with a genotyping-by-sequencing approach. *The Plant Genome*, v. 7, n. 1, 2014.
- BENNEWITZ, J. et al. Regional heritability mapping and genome-wide association identify loci for complex traits in German Fleckvieh cattle. *Genetics Selection Evolution*, v. 49, n. 1, p. 1-12, 2017.
- BERNARDO, R. Genome-wide association studies and genomic selection. In: BERNARDO, R. *Molecular marker-assisted selection in plants*. New York: Springer, 2007. p. 99-109.
- CALLA, B. et al. Transcriptome profiling of soybean during reaction to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. *Plant Genome*, v. 7, n. 2, 2014.
- CAMPOY, J. A. et al. Genetic diversity, linkage disequilibrium, population structure and construction of a core collection of *Prunus avium* L. landraces and bred cultivars. *BMC Plant Biology*, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2016.
- CHEN, X. et al. WRKY transcription factors: evolution, binding, and action. *Phytopathology Research*, v. 1, n. 13, 2019.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Brasil). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília, DF: CONAB, 2024.
- COUTO, N. et al. The role of glutathione reductase and related enzymes on plant stress responses. In: GUPTA, D. K. et al. (ed.). *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Cham: Springer, 2016. p. 101-121.
- COVARRUBIAS-PAZARAN, G. Genome-assisted prediction of quantitative traits using the R package sommer. *PLoS One*, v. 11, n. 6, e0156744, 2016.
- CSISZÁR, J. et al. Glutathione-related enzyme system: glutathione reductase (GR), glutathione transferases (GSTs) and glutathione peroxidases (GPXs). In: GUPTA, D. K. et al. (ed.). *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. Cham: Springer, 2016. p. 183-205.
- FALEIRO, F. G. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético de plantas. 2. ed. Brasília: Embrapa, 2011.
- FLINT-GARCIA, S. A.; THORNSBERRY, J. M.; BUCKLER, E. S. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 54, p. 357-374, 2003.
- GRASSER, K. D. The FACT histone chaperone: tuning gene transcription in the chromatin context to modulate plant growth and development. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 85, 2020.

- HAN, Y. et al. Molecular basis of disease resistance in soybean. In: LÜTTCKE, S. et al. (ed.). Soybean - genetics and novel techniques for yield enhancement. Rijeka: InTech, 2013. p. 155-172.
- HOFFMAN, D. D. et al. Selected soybean plant introductions with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease, v. 86, n. 9, p. 971-980, 2002.
- IQUIRA, E.; SONAH, H.; BELZILE, F. Association mapping of QTLs for sclerotinia stem rot resistance in a collection of soybean plant introductions using a genotyping by sequencing (GBS) approach. BMC Plant Biology, v. 15, n. 5, p. 1-13, 2015.
- JULIO, E. Resistência genética a doenças em plantas. Viçosa, MG: UFV, 2016.
- KALER, A. S. et al. Comparing different statistical models and multiple testing corrections for association mapping in soybean and maize. Frontiers in Plant Science, v. 10, p. 1794, 2020.
- KIM, H. S.; DIERS, B. W. Inheritance of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in soybean. Crop Science, v. 40, n. 1, p. 55-61, 2000.
- MANOLIO, T. A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. Nature, v. 461, n. 7265, p. 747-753, 2009.
- MEYER, M. C. et al. Ensaio cooperativos de controle químico de mofo branco na cultura da soja: safras 2009 a 2012. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 100 p. (Documentos, 345).
- MOELLERS, T. C. et al. Main and epistatic loci studies in soybean for *Sclerotinia sclerotiorum* resistance reveal multiple modes of resistance in multi-environments. Scientific Reports, v. 7, n. 3554, 2017.
- MORRIS, G. P. et al. Population genomic and genome-wide association studies of agroclimatic traits in sorghum. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 110, n. 2, p. 453-458, 2019.
- MUGABE, D.; YOOSEFZADEH-NAJAFABADI, M.; RAJCAN, I. Genetic diversity and genome-wide association study of partial resistance to *Sclerotinia* stem rot in a Canadian soybean germplasm panel. Theoretical and Applied Genetics, v. 137, n. 201, 2024.
- MYLES, S. et al. Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. The Plant Cell, v. 21, n. 8, p. 2194-2202, 2009.
- NAGAMINE, Y. et al. Localising loci underlying complex trait variation using regional genomic relationship mapping. PLoS One, v. 7, n. 6, e46501, 2012.
- OYAMA, L. B. et al. Linkage disequilibrium and genome-wide association analysis for the mealiness trait in Japanese pear. PLoS One, v. 14, n. 5, e0216370, 2019.
- PATTERSON, N.; PRICE, A. L.; REICH, D. Population structure and eigenanalysis. PLoS Genetics, v. 2, n. 12, e190, 2006.

- R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2021.
- RESENDE, R. T. et al. Genome-wide association and regional heritability mapping of plant architecture, lodging and productivity in *Phaseolus vulgaris*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, v. 8, n. 8, p. 2841-2854, 2018.
- RESENDE, R. T. et al. Regional heritability mapping and genome-wide association identify loci for complex traits in pigs. *Genetics Selection Evolution*, v. 49, n. 1, p. 1-12, 2017.
- RIGGIO, V. et al. Genome-wide association and regional heritability mapping to identify loci underlying variation in nematode resistance and body weight in Scottish Blackface lambs. *Heredity*, v. 110, n. 5, p. 420-429, 2013.
- SANTOS, C.; FRANCO, O. L. Pathogenesis-related proteins (PRs) with enzyme activity activating plant defense responses. *Plants*, v. 12, n. 11, p. 2226, 2023.
- SEHGAL, D.; SINGH, R.; RAJPAL, V. R. Quantitative trait loci mapping in plants: concepts and approaches. In: RAJPAL, V. R. et al. (ed.). *Molecular breeding for sustainable crop improvement*. Cham: Springer, 2016. p. 31-59.
- SHIRALI, M. et al. Regional heritability mapping method helps explain missing heritability of blood lipid traits in isolated populations. *Heredity*, v. 116, n. 3, p. 333-338, 2016.
- SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L. *Sclerotinia* stem rot. In: HARTMAN, G. L. et al. (ed.). *Compendium of soybean diseases and pests*. 5th ed. St. Paul: APS Press, 2015. p. 59-62.
- SMALL, I. et al. Plant organelle RNA maturation. *The Plant Cell*, v. 35, n. 6, p. 1727-1751, 2023.
- SOARES, B. A. Identificação da base genética da resistência parcial de cultivares de soja à *Sclerotinia sclerotiorum*. 2022. 55 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2022.
- SONG, Q. et al. Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. *PLoS One*, v. 8, n. 1, e54985, 2013.
- SUELA, M. M. et al. Regional heritability mapping and genome-wide association identify loci for rice traits. *Crop Science*, v. 62, n. 3, p. 839-858, 2022.
- UEMOTO, Y. et al. The power of regional heritability analysis for rare and common variant detection: simulations and application to eye biometrical traits. *Frontiers in Genetics*, v. 4, p. 232, 2013.
- USAI, M. G. et al. XVth QTLMAS: simulated dataset and comparative analysis of submitted results for QTL mapping and genomic evaluation. *BMC Proceedings*, v. 8, n. 5, p. 1-9, 2014.
- VOS, P. G. et al. Development of a large sequence-based SNP map for potato. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 130, n. 1, p. 45-57, 2017.

- VUONG, T. D. et al. Identification of QTL for resistance to *sclerotinia* stem rot in soybean plant introduction 194639. *Crop Science*, v. 48, n. 6, p. 2209-2214, 2008.
- WALLACE, J. G. et al. Genome-wide association for plant height and flowering time across 15 tropical maize populations under managed drought stress and well-watered conditions in sub-Saharan Africa. *Crop Science*, v. 56, n. 5, p. 2365-2378, 2016.
- WANG, J. et al. A high-density SNP genotyping array for rice biology and molecular breeding. *Molecular Plant*, v. 7, n. 3, p. 541-553, 2014.
- WEI, W. et al. Genome-wide association mapping of resistance to a Brazilian isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean genotypes mostly from Brazil. *BMC Genomics*, v. 18, n. 1, p. 849, 2017.
- YA-LONG, G. et al. Evolution of the S-locus region in Arabidopsis relatives. *Plant Physiology*, v. 157, n. 2, p. 937-946, 2011.
- YANG, J. et al. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nature Genetics*, v. 42, n. 7, p. 565-569, 2010.
- ZHAO, K. et al. An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. *PLoS Genetics*, v. 3, n. 1, e4, 2007.