

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
CURSO DE AGRONOMIA

**MOFO BRANCO: MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE E
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DEFESA EM PLANTAS DE SOJA**

GUILHERME DE CAMARGO HÜLLER

Ponta Grossa
2017

GUILHERME DE CAMARGO HÜLLER

**MOFO BRANCO: MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE E
EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À DEFESA EM PLANTAS DE SOJA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração em Fitopatologia.

Orientador: Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

Ponta Grossa
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

H913 Hüller, Guilherme de Camargo
Mofo branco: métodos de avaliação de suscetibilidade e expressão de genes relacionados à defesa em plantas de soja/ Guilherme de Camargo Hüller. Ponta Grossa, 2017.
40f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho.

1.Sclerotinia sclerotiorum. 2.Glycine max. 3.Patógeno. 4.Resistência. 5.Genótipos. I.Jaccoud Filho, David de Souza. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Agronomia. III. T.

CDD: 633.34



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “Mofo Branco: Métodos de avaliação de suscetibilidade e expressão de genes relacionados à defesa em plantas de soja”.

Nome: Guilherme de Camargo Hüller

Orientador: David de Souza Jaccoud Filho

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

Prof.^a. Dr.^a Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski

Prof. Dr. Helio Antonio Wood Joris

Data da Realização: 14 de junho de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e companhia em todos os momentos durante essa caminhada.

À minha esposa, pais, família e amigos por todo apoio, incentivo e paciência.

Ao professor e amigo Dr. David de Souza Jaccoud Filho, pelos ensinamentos éticos e profissionais, os quais levarei para toda vida.

À Capes, pela concessão de 1 ano de bolsa durante o mestrado.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade de continuar os estudos após a graduação, realizando um sonho.

Aos demais professores pelos conhecimentos passados para minha formação profissional.

Aos membros da família F 12, Luciane, Zima, Carlos Rafael, Cláudio, Edilaine, Ayrton, Felipe Fadel, Felipe Manfron, Hamilton, Victor, Letícia, Ana Paula, André, Rubiane e os mais novos membros da família, pela parceria e tantas contribuições nos estudos e no trabalho.

A todos os funcionários da UEPG, em especial as “tias” da limpeza.

A todas as amizades feitas durante esses 7 anos de UEPG, pelo companheirismo nas horas de estudo e trabalho.

Às empresas produtoras de sementes que em muito ajudaram para a realização do projeto, especialmente fornecendo material para a realização dos experimentos.

RESUMO

O mofo branco, causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das mais importantes doenças que incidem na cultura da soja. Seu manejo se dá através de técnicas integradas como a utilização de defensivos, rotação de culturas e utilização de material menos suscetível. Porém, não há genótipos comercialmente disponíveis que apresentem elevado grau de resistência. Grande entrave na seleção de material mais resistente é a inconsistência de resultados à nível de campo, de modo que diferentes métodos vem sendo aplicados em laboratório com a finalidade de avaliar a resistência de genótipos de soja à *S. sclerotiorum*. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo verificar se diferentes métodos utilizados para acessar níveis de resistência estimulam respostas similares aos genótipos de soja, em termos de suscetibilidade. Foram empregados quatro métodos (ácido oxálico, disco de micélio na haste, micropipeta e suspensão de esporos) em quatro genótipos de soja. Os experimentos foram conduzidos em triplicata, no delineamento inteiramente casualizado com 7 repetições. A sensibilidade ao ácido oxálico foi avaliada através de uma chave de escores de murchamento, foi medida a lesão (cm) para os métodos micropipeta e disco na haste, e avaliada a severidade de ataque do patógeno para suspensão de ascósporos. Para comparação foi utilizado o ranqueamento dos genótipos dentro de cada método e também análise de expressão de genes relacionados à defesa. Os diferentes métodos analisados estimularam respostas similares aos genótipos de soja, em termos de suscetibilidade. Verificou-se que o nível de suscetibilidade dos genótipos não variou quando estes foram submetidos aos diferentes métodos. Ainda, foi observada correlação positiva entre os resultados dos diferentes métodos, porém o grau de correlação entre eles é diferente. Menor correlação observada foi entre os métodos AO e Ascósporos (coeficiente de Spearman: 0,498) ao passo que maior grau de correlação foi observado entre os métodos Micropipeta e disco na Haste (coeficiente de Spearman: 0,877). Foi observada similaridade em relação aos estímulos causados pelos diferentes métodos às plantas de soja por ocasião do contato com o patógeno e/ou fator de patogenicidade do mesmo (ácido oxálico) para expressão de genes do grupo PR-5.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Glycine max*, patógeno, resistência, genótipos.

ABSTRACT

The White mold, caused by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*, is one of the most important disease that affect the soybean crop. The management is based on integrated practices as by applying pesticides, crop rotation and the usage of less susceptible genotypes. However, there is not a high level resistance genotype commercially available. The inconsistency of results from field trials has been the major obstacle in the selection of resistant material. For this reason, a great variety of methods have been used in laboratory to assess the soybean genotypes resistance to *S. sclerotiorum*. Then, the objective of this study was to evaluate different methods used to assess sensitivity levels and if they stimulate equal responses in soybean genotypes, in terms of susceptibility. Four methods were applied (oxalic acid, stem test, straw test and by applying spores) to four soybean genotypes. The completely randomized design was used. Experiments were conducted in triplicates, with seven replications each. The sensitivity to the oxalic acid was assessed by using a wilting score key, it was measured the size of lesion (cm) for the stem and straw test, and for the ascospore method, the severity of disease symptoms was assessed. The rank of genotypes was used to compare methods as well as the analysis of gene expression of some genes related to soybean defence. All method were shown to simulate similar responses to the soybean genotypes, in terms of susceptibility. The susceptibility level of genotypes did not change when submitted to the different methods. Also, it was shown that there is a correlation among the methods results, although the degree which it occurs is different. The methods AO and Ascospore were the ones that demonstrated lower correlation (Spearman coefficient: 0,498), whereas the stem and straw test were shown to have the highest correlation levels (Spearman coefficient: 0,877). Furthermore, it was noticed similarity in the stimuli caused in soybean plants by the different methods due to either the contact with fungus or the pathogenicity factor (oxalic acid) to express genes from PR-5 group.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Glycine max*, pathogen, resistance, genotypes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Primers utilizados para Real-Time PCR. Ponta Grossa, PR. 2017....	22
Tabela 2-	Suscetibilidade de quatro genótipos de soja ao método AO (escores de murchamento), em três experimentos. Ponta Grossa, PR. 2017.....	23
Tabela 3-	Análise de conjunta de experimentos para o método AO, 3 (experimentos) x 4 (genótipos de soja). Ponta Grossa, PR. 2017.....	23
Tabela 4-	Rankeamento dos genótipos de soja submetidos ao método AO, mediante análise conjunta. Ponta Grossa, PR., 2017.....	24
Tabela 5-	Suscetibilidade de quatro genótipos de soja ao método disco na Haste (cm), em três experimentos. Ponta Grossa, PR. 2017.....	24
Tabela 6-	Análise de conjunta de experimentos para o método inoculação na Haste, 3 (experimentos) x 4 (genótipos de soja). Ponta Grossa, PR. 2017.....	25
Tabela 7-	Rankeamento dos genótipos de soja submetidos ao método disco na Haste, mediante análise conjunta. Ponta Grossa, PR. 2017.....	25
Tabela 8-	Suscetibilidade de quatro genótipos de soja ao método Micropipeta (cm), em três experimentos. Ponta Grossa, PR. 2017.....	25
Tabela 9-	Análise de conjunta de experimentos para o método inoculação Micropipeta, 3 (experimentos) x 4 (genótipos de soja). Ponta Grossa, PR. 2017.....	26
Tabela 10-	Rankeamento dos genótipos de soja submetidos ao método Micropipeta, mediante análise conjunta. Ponta Grossa, PR. 2017.....	26
Tabela 11-	Suscetibilidade de quatro genótipos de soja ao método Ascósporos (%), em três experimentos. Ponta Grossa, PR. 2017.....	27
Tabela 12-	Análise de conjunta de experimentos para o método inoculação Ascósporos, 3 (experimentos) x 4 (genótipos de soja). Ponta Grossa, PR. 2017.....	27
Tabela 13-	Rankeamento dos genótipos de soja submetidos ao método Ascósporos, mediante análise conjunta. Ponta Grossa, PR. 2017.....	27

Tabela 14-	Suscetibilidade de quatro genótipos de soja quando aplicados os métodos AO, Haste, Micropipeta e Ascósporos. Ponta Grossa, PR. 2017.....	28
Tabela 15-	Coeficiente de correlação de Spearman (rs) para os níveis de suscetibilidade obtidos por cada método. Ponta Grossa, PR. 2017...	28
Tabela 16-	Expressão dos genes em estudo, para os quatro métodos e quatro genótipos de soja. Ponta Grossa, PR. 2017.....	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVOS.....	10
2.1	OBJETIVO GERAL.....	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1	CULTURA DA SOJA.....	11
3.2	MOFO BRANCO.....	12
3.3	MÉTODOS PARA ACESSAR A RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA À <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	14
3.4	GENES DE SOJA EXPRESSOS EM RESPOSTA À <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	16
3.5	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE REAL-TIME PCR.....	16
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1	LOCALIZAÇÃO.....	17
4.2	GENÓTIPOS DE SOJA UTILIZADOS.....	17
4.3	MÉTODOS UTILIZADOS PARA ACESSAR NÍVEIS DE SUSCETIBILIDADE DOS GENÓTIPOS DE SOJA.....	18
4.3.1	Ácido Oxálico.....	18
4.3.2	Inoculação na Haste.....	19
4.3.3	Micropipeta.....	19
4.3.4	Inoculação com suspensão de ascósporos.....	19
4.4	OBTENÇÃO DAS FONTES DE INÓCULO.....	20
4.4.1	Micélios.....	20
4.4.2	Ascósporos.....	20
4.5	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA.....	20
4.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	21
4.7	GENES SELECIONADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL.....	22
4.8	PRIMERS PARA PCR EM TEMPO REAL.....	22
4.9	DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1	RESULTADO PARA MÉTODOS.....	23
5.2	RESULTADO PARA EXPRESSÃO DE GENES.....	29
6	CONCLUSÃO.....	30
7	REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

O Mofo Branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é atualmente, uma das principais doenças da cultura da soja pelos prejuízos ocasionados nas últimas safras e pela dificuldade de controle. O patógeno tem como hospedeiros mais de 400 espécies de plantas e, dentre essas, a soja (BOLAND; HALL, 1994). O fungo produz estruturas de resistência denominadas escleródios que se formam externa e internamente à planta, podendo manter seu poder patogênico por mais de 5 anos. Estes escleródios podem germinar e produzir micélio, infectando diretamente os tecidos da planta ou germinar e produzir apotécios que liberarão os ascósporos, infectando da mesma forma a parte aérea das plantas (STEADMAN, 1983).

Dentre as estratégias de manejo desta doença, além do uso de sementes sadias para prevenir a contaminação de novas áreas (MACHADO, 2000; JACCOUD FILHO et al., 2010; HENNEBERG, 2012), a disponibilidade de material menos suscetível apresenta grande importância e parece ser a maneira mais confiável, econômica e que menos afeta o meio ambiente (CASTAÑO; VEAR; LABROUHE, 1993; LU, 2003; SAGATA et al., 2010; PIERRE et al., 2011). Estudos realizados em casas de vegetação mostraram que existe diferença na suscetibilidade dos genótipos de soja a *S. sclerotiorum* (WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; KULL et al., 2003; CHEN; WANG, 2005; GARCIA; JULIATTI, 2012), entretanto, no Brasil, ainda não há cultivares de soja com alto nível de resistência comercialmente disponíveis.

Situações de resistência parcial de algumas culturas a este fungo em condições de campo apresentaram correlação com a resistência ao ácido oxálico em laboratório (KOLKMAN; KELLY, 2000). Esta estreita relação entre o ácido oxálico e a patogenicidade de *S. sclerotiorum* vem sendo mostrada em muitos estudos (VUONG; HARTMAN, 2003; FAVARON; SELLA; D'OIDIO, 2004; GUIMARÃES; STOTZ, 2004; HAREL; BERCOVICH; YARDEN, 2006; KIM; DICKMAN; MIN, 2008), incluindo pesquisas de melhoramento genético, apresentando bons resultados com plantas transgênicas capazes de degradar o ácido oxálico produzido pelo fungo (WALZ et al., 2008). Um método para acessar a resistência de genótipos de feijão a *S. sclerotiorum* baseada na reação a este ácido demonstrou resultados promissores (ANTONIO et al., 2008; GONGALVES; SANTOS, 2010) e recentemente, quando adaptada para a avaliação de plantas de soja, apresentou resultados similares à outros métodos de inoculação comumente empregados, destacando-se pela praticidade na execução e agilidade para obter os resultados (HULLER et al., 2016). Além do método baseado na reação ao ácido oxálico, outros encontram-se disponíveis para avaliar a suscetibilidade de plantas de soja a este fungo, porém, persistem relatos de resultados inconsistentes ao longo do tempo, ou mesmo quando comparados

resultados obtidos para um mesmo genótipo através de métodos diferentes (WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; CHENG; WANG, 2005), levantando a hipótese de que diferentes métodos podem estimular respostas de defesa/suscetibilidade diferentes num mesmo genótipo.

Métodos de inoculação que apresentem menor custo e maior agilidade na execução são de grande interesse para o acesso de cultivares de soja menos suscetíveis a *S. sclerotiorum*, porém, persistem dúvidas sobre qual o método mais adequado e até que ponto resultados obtidos em laboratório são compatíveis com resultados de campo. Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo verificar se as respostas de genótipos de soja são semelhantes quando submetidas à diferentes métodos de inoculação de *S. sclerotiorum* em termos de suscetibilidade, utilizando como ferramenta comparativa as severidades obtidas através dos diferentes métodos (em suas respectivas escalas de avaliação) e a expressão de genes reconhecidamente envolvidos na relação patógeno-hospedeiro entre a cultura da soja e o fungo *S. sclerotiorum*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se diferentes métodos utilizados para acessar a resistência de genótipos de soja à *S. sclerotiorum* (ácido oxálico, disco de micélio na haste, micropipeta e suspensão de esporos) estimulam respostas similares, em termos de suscetibilidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se o nível de suscetibilidade dos genótipos de soja à *S. sclerotiorum* é variável de acordo com o método utilizado e se existe correlação entre os resultados obtidos por meio dos diferentes métodos.

Analisar o perfil de expressão de genes envolvidos na defesa de genótipos de soja contra *S. sclerotiorum*, quando submetidos à quatro diferentes métodos aplicados para avaliar níveis de suscetibilidade (utilizando ácido oxálico, disco de micélio na haste, micropipeta e suspensão de esporos), afim de verificar se os métodos se equiparam nos estímulos causados às plantas de soja por ocasião do contato com o patógeno e/ou fator de patogenicidade do mesmo (ácido oxálico).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A CULTURA DA SOJA

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill], devido à grande diversidade do uso de seus derivados e ao aumento da demanda global por alimentos, é uma espécie de grande importância econômica. Tem como centro de origem o continente asiático (mais precisamente a região correspondente à China), e há referências de que essa leguminosa fazia parte da base alimentar do povo chinês há mais de 5.000 anos (EMBRAPA, 2014).

Na América, foi citada pela primeira vez no século XIX quando os Estados Unidos (EUA) iniciaram sua exploração comercial, primeiramente como forrageira e, mais tarde, como produtora de grãos (EMBRAPA, 2014). No Brasil, a soja foi introduzida em 1882 na Bahia, chegando ao estado de São Paulo em meados de 1890, porém, foi em 1940 o início da soja como grande cultura no Rio Grande do Sul. Em 1950, quando fortes geadas atingiram a região Sul do país e prejudicaram as lavouras cafeeiras, a soja expandiu-se para os estados de Santa Catarina e Paraná (CÂMARA, 2000).

A partir da década de 1970, impulsionada pelo interesse crescente da indústria de óleo a base de soja e pela demanda do mercado internacional pelos grãos e seus derivados, a soja se estabeleceu como a principal cultura do agronegócio brasileiro (EMBRAPA, 2003).

O Brasil, segundo maior produtor mundial de soja, bateu mais um recorde de produção na safra 2016/17, oficialmente estimada em 110,16 milhões de toneladas numa área plantada de aproximadamente 33,71 milhões de hectares, representando um incremento de 1,4% em relação ao ano anterior. As exportações, de extrema importância para o país, para a safra 2016/17 são estimadas em aproximadamente 61 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Apesar do constante aumento da área plantada (chegando a 33% na última década, de acordo com o USDA), do investimento em pesquisa e produtividades crescentes, a cultura da soja ainda encontra limitações para expressar seu máximo potencial produtivo. Entre os fatores responsáveis pela redução do rendimento, lucratividade e do sucesso de produção destacam-se as doenças (FERREIRA; LEHMAN; ALMEIDA, 1979; YORINORI et al., 1993; JULIATTI; SAGATA; JULIATTI, 2012).

Dentre elas, o mofo branco tem causado grandes perdas em lavouras brasileiras de soja, superiores a 70% segundo levantamentos de campo realizados por Jaccoud Filho et. al.

(2010) no estado do Paraná, e chegando a 40% em regiões produtoras do estado de Goiás (NUNES JUNIOR et al., 2011).

Os primeiros relatos da ocorrência de mofo branco no Brasil ocorreram em 1921, na cultura da batata no Estado de São Paulo. Posteriormente foi relatada ocorrência em hortaliças e, na cultura da soja, o primeiro relato ocorreu em 1976. Na safra 1982/83 o mofo-branco já havia sido relatado em diversas regiões de Minas Gerais em lavouras de feijão e de soja no Distrito Federal em soja em 1985. A partir de 2003, com o aumento da utilização de sementes próprias e sementes piratas, houve grande expansão do mofo branco para as regiões do Centro-Oeste e do Nordeste, estimando-se que atualmente cerca de 25% da área cultivada com essa leguminosa no Brasil está infestada com o patógeno (HENNING, 2012). O uso de sementes contaminadas de outras espécies como nabo forrageiro, canola, feijão, girassol, bem como uso de maquinário em áreas contaminadas e depois em novas áreas, foram em grande parte responsáveis pela sua disseminação e introdução em novas áreas.

3.2 MOFO BRANCO

A doença conhecida como Mofo Branco é causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Discomycetes*, ordem *Helotiales*, família *Sclerotiniaceae*, gênero *Sclerotinia* (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Mundialmente distribuído, o fungo tem como hospedeiras mais de 400 espécies de plantas, incluindo a soja e plantas invasoras de culturas (BOLAND; HALL, 1994).

Na ausência de hospedeiro suscetível, pode persistir por longo período no solo, através de estruturas de resistência denominadas escleródios (compostos por uma massa de hifas de formato irregular, negros e duros, responsáveis pela sobrevivência do fungo). Estes podem germinar e produzir micélio (germinação miceliogênica, que pode infectar os tecidos da planta), ou então germinar carpogenicamente e produzir apotécios (corpos de frutificação em forma de taça) que liberarão os ascósporos (STEADMAN, 1983). Os ascósporos, ao encontrarem tecidos senescentes, germinam e iniciam o processo de infecção da planta (em geral, o processo de infecção inicia a partir das inflorescências e das axilas das folhas e ramos laterais). A liberação de esporos ocorre continuamente por 2 a 17 dias, sendo que o total potencial de ascósporos produzidos por um apotécio fica em torno de dois milhões (SCHWARTZ; STEADMAN, 1989). A disseminação de *S. sclerotiorum* para novas áreas pode ocorrer por ascósporos carregados pelo vento (MUCKEL; STEADMAN, 1981), escleródios misturados às sementes,

através de micélio dormente na semente, solos contaminados, maquinário agrícola, entre outros (ADAMS; AYERS, 1979; TU, 1988; KIMATI; BERGAMIN FILHO, 2005; JACCOUD FILHO et al., 2010).

A colonização ocorre associada à liberação de uma série de enzimas capazes de macerar os tecidos e degradar a parede celular das células hospedeiras. Acredita-se que a grande variedade de pectinases, celulases e hemicelulases produzidas por este patógeno sejam um dos fatores responsáveis pela falta de especificidade (RIOU; FREYSSINET; FEVRE, 1991). Além disso, são muitos os trabalhos que associam a produção de ácido oxálico (AO) com a patogenicidade de espécies de *Sclerotinia*. Dentre as principais evidências do envolvimento deste ácido no processo de infecção de *Sclerotinia* spp. estão:

- a) A presença de AO nos tecidos infectados (MARCIANO; DI LENNA; MAGRO, 1983; GODOY, 1990);
- b) Correlação positiva entre o nível de AO e a severidade da doença (MAXWELL; LUMSDEN, 1970; MAGRO; MARCIANO; DI LENNA, 1984);
- c) Verificação de mutantes de *S. sclerotiorum* incapazes de sintetizar AO que não foram patogênicos a *Phaseolus vulgaris* mesmo tendo mantido todo o aparato de produção enzimática que atuam na degradação da parede celular (GODOY, 1990; CUNHA, 2010).

O AO desempenha importantes funções na interação patógeno-hospedeiro. No início do processo de infecção, o acúmulo de AO provoca uma redução no pH extracelular, chegando a níveis abaixo de 5, o que aumenta a atividade das enzimas responsáveis pela degradação da parede celular (BATEMAN; BEER, 1965; MARCIANO; DI LENNA; MAGRO, 1983; MAGRO; MARCIANO; DI LENNA, 1984). Com o contínuo acúmulo de AO, o pH reduz para valores inferiores a 4, o que não favorece a ação destas enzimas, porém inibe a atividade das proteínas inibidoras de poligalacturonases (importantes pectinases produzidas pelo fungo) produzidas pelas plantas (FAVARON; SELLA; D'OVÍDIO, 2004).

O AO também inibe a atividade da polifenoloxidase produzida pela planta, limitando assim a quantidade de compostos fenólicos que protegem a oxidação das substâncias pécticas da parede celular (MARCIANO; DI LENNA; MAGRO, 1983; MAGRO; MARCIANO; DI LENNA, 1984). Ainda, este ácido promove a abertura estomática (induzindo à desidratação e consequente murchamento foliar durante o processo de infecção), e manipula a função das células guarda induzindo a abertura dos estômatos por meio do acúmulo de solutos e pela inibição do ácido abscísico, responsável pelo fechamento (GUIMARÃES; STOTZ, 2004).

Uma vez que temperaturas amenas (em torno de 19 a 21°C) e umidade elevada favorecem a germinação carpogênica do patógeno (com maior potencial de infecção), o controle desta doença reside em um sistema integrado de práticas agronômicas, como o plantio de cultivares resistentes ao acamamento, maior espaçamento entre linhas (no intuito de reduzir as condições ideais para desenvolvimento do fungo pelo microclima gerado no dossel), rotação com culturas não hospedeiras e plantio direto (palha atuando como barreira física à liberação dos esporos do fungo). Entre as ferramentas disponíveis tem-se também o controle biológico (principalmente com espécies de *Trichoderma* spp., *Coniothyrium* spp. e *Bacillus* spp.) e controle químico (FERREIRA; LEHMAN; ALMEIDA, 1979; HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999; NASSER; NAPOLEÃO; CARVAJAL, 1999; JUNIOR; ABREU, 2000; VIEIRA et al., 2001; FONTANA et al., 2006; GRABICOSKI et al., 2010; MANOSSO NETO et al., 2010). Contudo, o uso de fungicidas aumenta demasiadamente os custos de produção, reduzindo o lucro do agricultor. Outro fator a ser considerado em se tratando do uso de fungicidas para o controle do mofo branco é o desenvolvimento de resistência à alguns ingredientes ativos, além de causar grande impacto ambiental. Dessa forma, uma alternativa economicamente viável seria a utilização de genótipos mais tolerantes ao patógeno. Entretanto, a resistência genética ao hospedeiro é bastante complexa e de baixa herdabilidade, sendo restrita a genótipos que apresentam resistência parcial (KIM; DIERS, 2000; VUONG; DIERS; HARTMAN, 2008; CUNHA, 2010), de modo que a identificação destes genótipos apresentando menor suscetibilidade é de grande valia no manejo desta doença.

3.3 MÉTODOS PARA ACESSAR A RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA À *Sclerotinia sclerotiorum*

A resistência de cultivares de soja a *S. sclerotiorum* tem sido avaliada em condições de campo, casas de vegetação e laboratório, sendo observadas respostas que variam de elevada resistência a completa suscetibilidade (BOLAND; HALL, 1987; SILVA; MACHADO, 1989; WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; SAGATA et al., 2010).

A maneira mais coerente de verificação da alta ou baixa suscetibilidade de uma planta ao patógeno seria sob condições de campo, porém uma série de fatores como distribuição errática de fontes de inóculo (escleródios) no campo, ocorrência de zonas de “escape” e condições climáticas desfavoráveis ao fungo quando a planta se encontra num estágio mais sensível, dificultam o estabelecimento de experimentos para tal verificação. Outro fator que

pode dificultar a avaliação de genótipos de soja quanto ao seu nível de resistência ao mofo branco a nível de campo é o hábito de crescimento, onde cultivares que apresentam hábito do tipo determinado possuem um período mais curto de maior suscetibilidade (florescimento). Logo, a fim de estabelecer as condições de temperatura e umidade ideais para o desenvolvimento do fungo, trabalhos conduzidos em casas de vegetação e em laboratório exercem um papel importante na avaliação da resistência de plantas a este patógeno.

Várias são as pesquisas que comparam as técnicas de inoculação de *S. sclerotiorum* em ambiente controlado com a avaliação dos genótipos a campo (CHUN; KAO; LOCKWOOD, 1987; NELSON; HELMS; KURAL, 1991; WEGULO; YANG; MARTINSON, 1998; KIM et al., 2000; VUONG et al., 2004), e assim como há bons resultados (metodologias fáceis e rápidas de se executar, de baixo custo e apresentando boa correlação com experimentos de campo), também há relatos de técnicas com resultados inconsistentes e sem correlação com os experimentos de campo (KULL et al., 2003).

Uma série de técnicas têm sido utilizadas para a avaliação de genótipos de soja em laboratório, dentre elas: uso de partículas de micélio seco junto ao colo da planta, suspensão de ascósporos pulverizados nas flores, palitos colonizados pelo fungo inseridos nas hastes (SOUZA, 1999), micélio crescido em meio de cultura colocado sobre folhas destacadas (LEONE; TONNELJCK, 1990), micélio colocado no cotilédone ou na haste das plantas (por tempo determinado ou não), micélio colocado sobre haste da planta quando extraído seu ápice (também chamado de método da “micropipeta” por comumente se utilizar ponteiros de micropipeta para fixar o disco de micélio), spray de micélio crescido em meio de cultura líquido (CHEN; WANG, 2005) e escleródios (CHAVES, 1995). Nota-se que a maioria das metodologias faz uso do micélio do fungo como inóculo (crescido em meio de cultura sólido ou líquido) ao invés de utilizar os ascósporos, uma vez que a produção e manipulação destes esporos em laboratório é laborosa (KULL et al., 2003).

Outra metodologia, baseada na reação ao ácido oxálico, tem sido utilizada para a avaliação de níveis de resistência fisiológica de feijão a *S. sclerotiorum* (SOUZA, 1999; KOLKMAN; KELLY, 2000; ANTONIO et al., 2008; GONGALVES; SANTOS, 2010), onde cultivares menos sensíveis (com uma expansão mais lenta do ácido), sugerem um progresso mais lento da doença nas plantas infectadas (GARCIA, 2008). Recentemente, esta metodologia foi adaptada para a avaliação de plantas de soja, apresentando grandes vantagens como a rápida execução, baixo custo e confiabilidade de resultados (HULLER et al., 2016).

3.4 GENES DE SOJA EXPRESSOS EM RESPOSTA À *Sclerotinia sclerotiorum*

A rápida evolução e conhecimento acumulado em bioquímica e nas bases da resistência genética de plantas à patógenos, tornou o uso de cultivares resistentes uma importante estratégia no manejo de doenças de plantas (CRUTE; PINK, 1996; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997). A partir da descoberta dos genes de resistência a doenças (“*R genes*”), muitos foram os estudos dedicados à busca por genes envolvidos na defesa de plantas e genes responsáveis por induzir a síntese de metabólitos que desfavoreciam a prevalência dos patógenos, direta ou indiretamente.

Estudos com a utilização de *microarrays* serviram de base para estudos iniciais de um grande número de genes envolvidos na resposta a estresses e/ou patógenos, tanto na área de saúde humana (COLOMBO; RAHAL, 2010) como em plantas e animais (GIACHETTO, 2010).

Estudos utilizando *microarrays* para observar perfis de expressão gênica de soja quando submetidas à inoculação do fungo *S. sclerotiorum* através do método utilizando ponteiros de micropipeta, identificaram mais de 1200 genes diferentemente expressos quando a variável era o tempo após a inoculação, e mais de 100 genes diferentemente expressos em se tratando de cultivares contrastantes em nível de suscetibilidade (CALLA et al., 2009). Foram observadas mudanças na expressão de genes relacionados à composição da parede celular, na transmissão de sinais, e ainda, fortes indicativos que a síntese de antocianidina e intensa atividade de genes denominados “PR-5” estão diretamente relacionados ao nível de resistência de plantas de soja à *S. sclerotiorum* (CALLA et al., 2009). Ainda, outros grupos de genes foram apontados como decisivos na interação *S. sclerotiorum*-planta, como genes relacionados à peroxidação, síntese de lignina, proteínas de sinalização (“*G proteins*”), fitoalexinas associadas a estas proteínas de sinalização, e o gene oxalado oxidase (PARK et al., 2000; COBER et al., 2003; ZHAO; SAKAI, 2003), que inclusive já foi inserido em plantas de soja (transgênicas) para super-expressar esse gene que confere uma maior resistência à *S. sclerotiorum* (CUNHA, 2010; CALLA et al., 2014).

3.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA ATRAVÉS DE PCR EM TEMPO REAL

A Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) consiste em uma técnica que permite a rápida amplificação de um segmento específico de DNA (um gene por exemplo), replicando

este segmento várias vezes e permitindo posterior identificação de sequências de interesse, separadas de acordo com seu tamanho e carga usualmente utilizando processo denominado de eletroforese (TAYLOR, 1991).

A PCR em Tempo Real, é uma evolução da técnica de PCR, utilizada com o mesmo fim (amplificar segmentos específicos de DNA de interesse) porém trazendo consigo mais informações do que a mera detecção do segmento. Através da PCR em Tempo Real é possível tanto a detecção quanto a quantificação deste produto da PCR, enquanto este é sintetizado (HEID et al., 1996; QIAGEN, 2010).

O processo ocorre como em uma PCR convencional (com repetidos ciclos de amplificação de DNA em 3 passos: desnaturação – anelamento - extensão), porém é adicionado à reação um corante fluorescente, e à medida que este corante se liga à sequência de DNA que está sendo amplificada, a fluorescência é emitida e detectada pelo equipamento (LIVAK et al., 1995; QIAGEN, 2010).

Atualmente, é um dos métodos mais empregados para avaliação da expressão gênica por conta de sua elevada especificidade e boa reprodutibilidade. Para avaliação quantitativa dos resultados, duas estratégias são utilizadas: a análise de expressão absoluta e expressão relativa. A primeira consiste na observação do número de cópias do gene em estudo, determinado através de cálculos à partir de curvas-padrão realizadas previamente. A análise de expressão relativa, por outro lado, é baseada na taxa de expressão do gene alvo em relação à expressão de um gene de referência (cujos níveis de expressão se mantêm constantes), adequada para estudos de alterações fisiológicas e níveis de expressão gênica (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em Ponta Grossa-PR.

4.2 GENÓTIPOS DE SOJA UTILIZADOS

Foram utilizados os genótipos de soja: EMGOPA 316, BRS 232, NA 5909 e ANTA 82. Sendo os genótipos EMGOPA 316 e BRS 232 menos suscetíveis a *S. sclerotiorum* e os

genótipos NA 5909 e ANTA 82 mais suscetíveis (GARCIA; JULIATTI, 2012; JULIATTI et al., 2013; HULLER et al., 2016).

4.3 MÉTODOS PARA ACESSAR OS NÍVEIS DE SUSCETIBILIDADE DOS GENÓTIPOS DE SOJA

4.3.1 Ácido Oxálico

Para realização do teste com o ácido oxálico, foram colocadas plantas com 21 dias após a semeadura, desprovidas de raiz em uma chapa de poliestireno sobre solução de ácido oxálico na concentração 20 mM, com pH ajustado para 4,0 utilizando-se hidróxido de sódio 1,0 M. As plantas permaneceram em contato com a solução ácida (uma região de aproximadamente 2 cm da haste) por 20 horas, a 20°C no escuro, a fim de evitar transpiração excessiva (ANTONIO et al., 2008). A sensibilidade ao ácido foi avaliada através de uma chave de escores de murchamento (Figura 1) proposta por Huller et al. (2016), elaborada a partir de trabalho anterior realizado por Antonio et al. (2008), para avaliar genótipos de feijão.

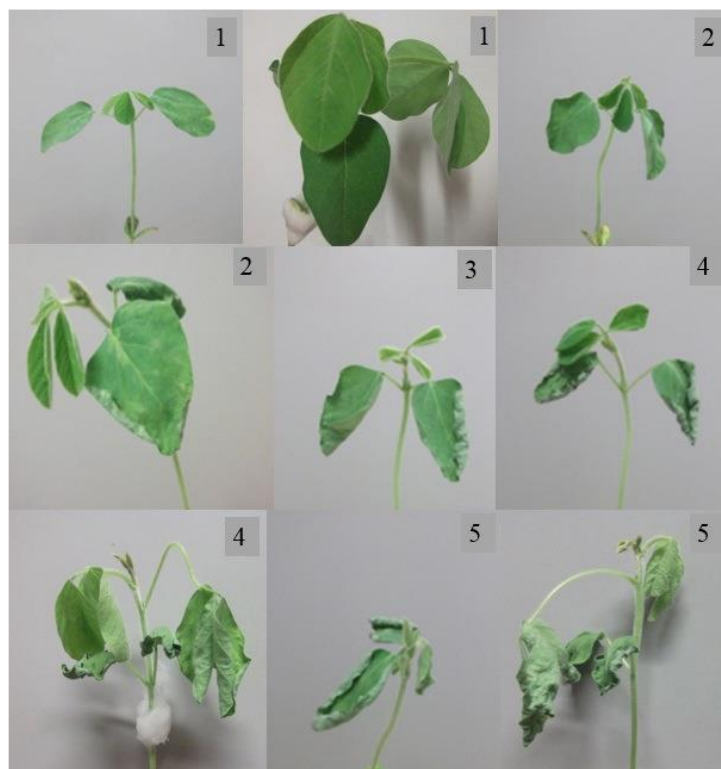


Figura 1 – Escores de murchamento para avaliação de plantas de soja submetidas ao ácido oxálico. Ponta Grossa, PR. 2017.

4.3.2 Inoculação na haste

Para o método de inoculação na haste, foram utilizadas plantas crescidas em casa de vegetação em estágio fenológico V2-V3 (FEHR; CAVINESS, 1977), onde foi colocado um disco de BDA (de aproximadamente 6 mm de diâmetro) contendo micélio do fungo (com 48 horas de idade) na axila do primeiro trifólio, fixando-se o disco com uma fita adesiva.

As plantas foram acondicionadas em câmara úmida utilizando sacos de polietileno e vedação adequada, a 20°C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro. Para avaliar a severidade de ataque do patógeno, foi medido o tamanho médio de lesão (em centímetros), 72 horas após a inoculação (PETZOLDT; DICKSON, 1996; SINGH; TERÁN, 2008; JULIATTI et al., 2013; CASTRO et al., 2016).

4.3.3 Micropipeta

Para o método denominado micropipeta, foram utilizadas plantas crescidas em casa de vegetação em estágio fenológico V2-V3, de acordo com a escala de desenvolvimento fenológico da soja proposta por Fehr e Caviness (1977), onde foi extraído o ápice da planta e colocado um disco de BDA (de aproximadamente 6 mm de diâmetro) contendo micélio do fungo, com 48 horas de idade. Para que o disco não caísse ou entrasse em contato com outras partes da planta que não o ferimento, foram colocadas ponteiros de micropipeta (1000 µL – 6 mm de diâmetro) para fixá-lo. As plantas foram acondicionadas em câmara úmida utilizando sacos de polietileno e vedação adequada, a 20°C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro. Para avaliar a severidade de ataque do patógeno, foi medido o tamanho médio de lesão (em centímetros), 72 horas após a inoculação (PETZOLDT; DICKSON, 1996; SINGH; TERÁN, 2008; CASTRO et al., 2016).

4.3.4 Inoculação com suspensão de ascósporos

Para o método de inoculação utilizando suspensão de ascósporos, plantas crescidas em casa de vegetação no estágio fenológico R1 (FEHR; CAVINESS, 1977), foram borrifadas com solução contendo água destilada esterilizada e ascósporos de *S. sclerotiorum*, na concentração aproximada de 2×10^4 esporos/mL de água (YANAR; MILLER, 2003). Após a aplicação da suspensão de esporos (15 mL por planta), as plantas foram mantidas em câmara

úmida utilizando sacos de polietileno e vedação adequada, a 20°C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro. Foi avaliada, periodicamente, a severidade de ataque do patógeno como descrito por Juliatti e Juliatti (2010) para avaliações a nível de campo, iniciando no quinto dia após inoculação (120 horas).

4.4 OBTENÇÃO DAS FONTES DE INÓCULO DE *Sclerotinia sclerotiorum*

4.4.1 Micélios

Os micélios de *S. sclerotiorum* foram obtidos do cultivo em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) de escleródios provenientes de campos comerciais de Mauá da Serra - PR. Os escleródios foram previamente desinfestados em álcool 70% e hipoclorito de sódio a 0,5% (diluídos em água destilada). Em seguida, os escleródios foram isolados em placas de Petri contendo o meio de BDA e incubados a 20°C e fotoperíodo de 12 horas luz/escuro para o desenvolvimento de micélios.

4.4.2 Ascósporos

Os ascósporos de *S. sclerotiorum* foram obtidos de escleródios provenientes de campos comerciais de Mauá da Serra - PR, germinados carpogenicamente. Os escleródios foram desinfestados em álcool 70% e hipoclorito de sódio a 0,5% (diluídos em água destilada), em seguida, foram acondicionados em caixas plásticas contendo substrato esterilizado e 15 mL de água destilada autoclavada, sob temperatura de 18°C para favorecer a formação de apotécios. A coleta de ascósporos se deu quando da liberação destes pelos apotécios, sendo coletados em placas de Petri e imediatamente transferidos para tubo contendo água deionizada autoclavada.

4.5 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

A coleta de amostras para a extração de RNA foi feita 24h após a inoculação, tendo em vista recursos disponíveis para extração e trabalhos relatando que entre 18 e 24 horas após a interação patógeno-hospedeiro há uma intensificação nas respostas do hospedeiro em termos de expressão de genes de resistência (CALLA et al., 2009; CHEN et al., 2014; CALLA et al., 2014). As amostras constituíram de partes das plantas inoculadas e as correspondentes

testemunhas (controle negativo), que foram congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido, maceradas, e seguiram os passos para extração e purificação de RNA utilizando-se o kit RNASpin Mini RNA Isolation (GE Healthcare). Após purificação, averiguação da qualidade e integridade, as amostras passaram imediatamente para a etapa de síntese de cDNA. Os cDNAs foram sintetizados à partir de 0,4 µg do RNA total extraído, por transcrição reversa, utilizando-se o kit First-Strand cDNA Synthesis (GE Healthcare). As amostras foram ajustadas para 200 ng/µL com água ultra-pura e estocadas a -20°C.

4.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para tornar possível a análise de expressão gênica, ensaios com tratamentos denominados “negativos” foram instalados sob as mesmas condições (utilizando plantas cultivadas em vasos com substrato), em triplicata, com 7 repetições. O objetivo foi fornecer um comparativo aos métodos aplicados, onde nos tratamentos “negativos” as plantas não foram expostas ao fungo e/ou fator de patogenicidade (ácido oxálico). Para o método AO, o tratamento negativo constituiu da exposição das plantas à água deionizada autoclavada (para que não houvesse influência de íons alterando o pH da água). Para os métodos de inoculação na haste e micropipeta, o controle negativo constituiu apenas da exposição das plantas ao disco de BDA (sem micélio do fungo), e para o método utilizando suspensão de ascósporos, o tratamento negativo constituiu da aspersão de água deionizada autoclavada somente.

A análise da expressão dos genes de interesse foi realizada por meio de PCR em Tempo Real utilizando o equipamento MX3005P QPCR (Stratagene), de acordo com as recomendações do fabricante do kit e enzima a serem utilizados (ROCHE). O experimento foi realizado com três replicações biológicas e pelo menos duas replicações técnicas (RIEU; POWERS, 2009). Cada repetição biológica foi formada por um pool de 7 plantas submetidas à cada método e respectivo controle negativos. A qualidade e confiabilidade das reações foi averiguada mediante análise das curvas de dissociação. A análise dos dados foi realizada utilizando o software REST 2009 v.2.0.13, para análise de expressão relativa de genes (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

4.7 GENES SELECIONADOS PARA COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS UTILIZANDO PCR EM TEMPO REAL

Foram selecionados 4 grupos de genes diferentemente expressos quando da interação *S. sclerotiorum*-soja (CALLA et al., 2009). Foram avaliados 3 genes do grupo “PR-5”, e 1 gene dos demais grupos (“*G-Proteins*”, “*Antocianidinas*” e “*Peroxidases*”). Como normalizador para a análise de expressão relativa de genes, foi utilizado o gene endógeno CONS_15, utilizado por Libault et al. (2008) e Calla et al. (2009), sendo classificado pelos autores como o mais adequado para tal comparação.

4.8 PRIMERS PARA A PCR EM TEMPO REAL

Os primers utilizados (Tabela 1) foram selecionados de publicações anteriores (CALLA et al., 2009; 2014) ou desenhados utilizando o software Primer3 v. 0.4.0. Os primers selecionados de publicações anteriores foram: *Cons_15*, *PR-5*¹, *Antocianidina*. Os primers desenhados utilizando o Primer3 v. 0.4.0 foram: *G-Protein*, *PR-5*², *PR-5*³, *Peroxidases*.

Tabela 1 – Primers utilizados para Real-Time PCR. Ponta Grossa, PR. 2017.

Gene alvo	Sequência do Primer (Foward)	Sequência do Primer (Reverse)
<i>Cons_15</i>	TAAAGAGCACCATGCCTATCC	TGGTTATGTGAGCAGATGCAA
<i>PR-5</i> ¹	TCCTGCAGGCACGTCTAAAG	CTCTATGCTGCACCTCTGCC
<i>“G-Protein”</i>	ACACACATTAGCGGGCTTGA	ATCTTCCTTTGCAGGGACGG
<i>Antocianidina</i>	GTGACCCATTGGCCTTCGTA	GGTACATGCATGCAGTGAGG
<i>PR-5</i> ²	AGGCATCAGGGCACCTCTCCTT	TTCCTGGCGGCTGCAACAAC
<i>PR-5</i> ³	TAAGGGCACCTGGGGGATGCAA	CGACCTTGTAAGTTAGAGCCAGCGG
<i>Peroxidases</i>	GCCCTGGAGTTGTTTCATGT	ACCACATCAGCTCTGCTCCT

4.9 DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata para cada método, com 7 repetições (onde 1 planta constituiu 1 repetição), no delineamento inteiramente casualizado. Procedeu-se análise conjunta de experimentos para cada metodologia mediante análise de homocedacidade de variâncias. Os testes de separação de médias, análise conjunta dos experimentos e testes de correlação foram feitos utilizando os programas estatísticos SASM-Agri[®], XLSTAT[®] e ASSISTAT[®] (CANTERI et al., 2001; ADDINSOLFT, 2009; SILVA; AZEVEDO, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS PARA MÉTODOS

Conforme pode-se observar na Tabela 2, quando utilizado o método AO para avaliar as os genótipos EMGOPA 316, ANTA 82, BRS 232 e NA 5909, foi possível diferenciá-las quanto ao nível de suscetibilidade através da escala de avaliação proposta por Huller et al. (2016) onde: quanto mais próximo de 5, maior a suscetibilidade pelo método. Ainda, nota-se que o nível de suscetibilidade das cultivares ANTA82 e NA5909 foi superior ao obtido para as cultivares EMGOPA 316 e BRS 232 em todos os experimentos realizados.

Procedendo-se a análise conjunta de experimentos para AO (Tabela 3), observa-se que não houve influência do fator “experimento” (interação não significativa), indicando que o método se apresentou constante quanto ao estímulo provocado nos genótipos (em termos de níveis de suscetibilidade).

Tabela 2 – Suscetibilidade de quatro genótipos de soja ao método AO (escores de murchamento de 7 plantas), em três experimentos. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Experimento 1*	Experimento 2*	Experimento 3*
Anta 82	2,71 a	2,43 a	2,43 a
NA 5909	2,71 a	3,00 a	2,57 a
BRS 232	1,86 b	1,86 b	1,71 b
EMGOPA 316	1,71 b	1,86 b	1,71 b
CV (%)	26,15	27,42	24,29

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 3 – Análise de conjunta de experimentos para o método AO, 3 (experimentos) x 4 (genótipos de soja). Ponta Grossa, PR. 2017.

Fonte de Variação	GL	SQD	QM	F
Experimentos	2	0.92857	0.46429	1.3605 ^{ns}
Genótipos	3	13.55952	4.51984	13.2442 ^{**}
Interação Experimentos x Genótipos	6	0.69048	0.11508	0.3372 ^{ns}
Resíduo	72	24.57143	0.34127	
Total	83	39.75000		

^{ns} – Não significativo a 5% de probabilidade

^{**} - Significativo a 1% de probabilidade

A distinção dos níveis de suscetibilidade dos genótipos fica clara ao se observar o ranqueamento destes, mediante análise conjunta para o método AO (Tabela 4), onde os genótipos EMGOPA 316 e BRS 232 apresentaram-se menos suscetíveis (escores mais

próximos à 1) do que ANTA 82 e NA 5909. Ao analisar resultados destes genótipos em publicações anteriores, observa-se que o presente trabalho obteve respostas similares quanto ao nível de suscetibilidade destes (JULIATTI et al., 2013; HULLER et al., 2016).

Tabela 4 – Ranqueamento dos genótipos de soja submetidos ao método AO, mediante análise conjunta. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Escore de Murchamento*
EMGOPA 316	1,76 b
BRS 232	1,81 b
Anta 82	2,52 a
NA 5909	2,76 a
CV (%)	25,96

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Analisando os resultados obtidos pelo método disco na Haste (Tabela 5), nota-se que foi possível diferenciar os níveis de suscetibilidade dos genótipos, apresentando resultado similar ao obtido pelo método AO, ainda que avaliados em diferentes escalas.

Tabela 5 – Suscetibilidade de quatro genótipos de soja ao método disco na Haste (cm), em três experimentos. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Experimento 1*	Experimento 2*	Experimento 3*
Anta 82	4,27 b	4,47 a	4,59 a
NA 5909	5,06 a	4,58 a	4,70 a
BRS 232	4,16 b	3,69 b	4,06 b
EMGOPA 316	3,70 c	3,84 b	3,15 c
CV (%)	7,90	9,92	10,32

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Como pode se observar, o genótipo EMGOPA 316 apresentou-se com maior nível de resistência quando comparado aos demais, igualando-se apenas ao genótipo BRS 232 no experimento 2. No experimento 1 o genótipo BRS 232 apresentou-se com nível de suscetibilidade semelhante à ANTA 82, ambos com nível de suscetibilidade inferior ao genótipo NA 5909, porém nos demais tanto BRS 232 quanto EMGOPA 316 foram mais resistentes do que ANTA 82 e NA 5909.

Ao proceder análise conjunta dos experimentos (Tabela 6), nota-se que o fator “experimento”, assim como observado para o método baseado para o método AO, não exerceu influência nos resultados (interação não significativa), permitindo assim afirmar que o método denominado “disco na Haste” também apresentou-se constante em relação aos estímulos causados nos genótipos, em termos de nível de suscetibilidade.

Tabela 6 – Análise de conjunta de experimentos para o método inoculação na Haste, 3 (experimentos) x 4 (genótipos de soja). Ponta Grossa, PR. 2017.

Fonte de Variação	GL	SQD	QM	F
Experimentos	2	0.09596	0.04798	0.3113 ^{ns}
Genótipos	3	14.53546	4.84515	31.4362 ^{**}
Interação Experimentos x Genótipos	6	1.79976	0.29996	1.9462 ^{ns}
Resíduo	72	11.09710	0.15413	
Total	83	27.52828		

^{ns} – Não significativo a 5% de probabilidade

^{**} - Significativo a 1% de probabilidade

Ao analisar a Tabela 7, pode-se notar que o ranqueamento dos genótipos foi similar ao obtido com o método AO, demonstrando que estes métodos, embora utilizem de diferentes escalas para avaliação, acabam por classificar os genótipos de maneira semelhante em relação ao nível de suscetibilidade.

Tabela 7 – Ranqueamento dos genótipos de soja submetidos ao método disco na Haste, mediante análise conjunta. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Tamanho de lesão (cm)*
EMGOPA 316	3,60 c
BRS 232	3,93 b
Anta 82	4,43 a
NA 5909	4,67 a
CV (%)	9,44

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Ainda que obtidos de diferentes métodos de inoculação, vale ressaltar que estes resultados (em níveis de suscetibilidade) corroboram com os descritos para estes genótipos em trabalhos anteriores, tendo classificado os genótipos EMGOPA 316 e ANTA 82, bem como BRS 232 e NA 5909 em diferentes níveis de suscetibilidade (GARCIA; JULIATTI, 2012; JULIATTI et al., 2013; HULLER et al., 2016).

Quando analisados os resultados de suscetibilidade dos genótipos obtidos para o método Micropipeta (Tabela 8), mesma situação foi observada em relação à distinção dos genótipos.

Tabela 8 – Suscetibilidade de quatro genótipos de soja ao método Micropipeta (cm), em três experimentos. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Experimento 1*	Experimento 2*	Experimento 3*
Anta 82	3,70 a	3,48 a	3,58 a
NA 5909	3,81 a	3,70 a	3,79 a
BRS 232	2,94 b	3,13 b	2,89 b
EMGOPA 316	3,07 b	2,85 b	2,99 b
CV (%)	6,90	8,74	6,67

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A análise conjunta de experimentos para o método da Micropipeta (Tabela 9) também demonstrou que este, apresentou-se consistente na discriminação da suscetibilidade dos genótipos estudados (interação não significativa).

Tabela 9 – Análise de conjunta de experimentos para o método inoculação Micropipeta, 3 (experimentos) x 4 (genótipos de soja). Ponta Grossa, PR. 2017.

Fonte de Variação	GL	SQD	QM	F
Experimentos	2	0.12067	0.06033	0.9731 ^{ns}
Genótipos	3	10.55653	3.51884	56.7544 ^{**}
Interação Experimentos x Genótipos	6	0.47490	0.07915	1.2766 ^{ns}
Resíduo	72	4.46409	0.06200	
Total	83	15.61619		

^{ns} – Não significativo a 5% de probabilidade

^{**} - Significativo a 1% de probabilidade

Ao se observar o ranqueamento dos genótipos obtido através do método Micropipeta (Tabela 10), pode-se observar o mesmo resultado obtido pelos métodos AO e disco na Haste, apesar de discriminar 1 genótipo em grupo intermediário (Anta 82). Estes resultados estão de acordo com o discutido por Huller et al. (2016), onde os autores observaram semelhança no ranqueamento de genótipos empregando o método Micropipeta e disco na Haste.

Tabela 10 – Ranqueamento dos genótipos de soja submetidos ao método Micropipeta, mediante análise conjunta. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Tamanho de lesão (cm)*
EMGOPA 316	2,97 c
BRS 232	2,99 c
Anta 82	3,59 b
NA 5909	3,77 a
CV (%)	7,48

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Analisando a Tabela 11, pode-se notar que o método utilizando suspensão de ascósporos, assim como os demais empregados, foi capaz de discriminar os genótipos em níveis distintos de suscetibilidade. Ainda, ao se observar a Tabela 12, nota-se a mesma situação de não significância para o efeito de “experimentos” (interação não significativa), indicando que assim como os demais métodos apresentados anteriormente, este também demonstrara resultados constantes em termos de níveis de suscetibilidade dos genótipos, apesar de ter classificado o genótipo BRS 232 no mesmo grupo das suscetíveis nos experimentos 2 e 3. Tendo observado estas variações no grupo a que pertence o genótipo BRS 232 em experimentos isolados, recomenda-se um maior número de repetições para garantir a assertividade do resultado, ou como realizado no presente, repetições dos experimentos.

Tabela 11 – Suscetibilidade de quatro genótipos de soja ao método Ascósporos (%), em três experimentos. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Experimento 1*	Experimento 2*	Experimento 3*
Anta 82	16,57 a	15,00 a	20,14 a
NA 5909	18,29 a	15,29 a	17,86 a
BRS 232	9,71 b	12,86 a	15,29 a
EMGOPA 316	4,71 c	5,00 b	5,14 b
CV (%)	18,86	11,98	27,70

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 12 – Análise de conjunta de experimentos para o método inoculação Ascósporos, 3 (experimentos) x 4 (genótipos de soja). Ponta Grossa, PR. 2017.

Fonte de Variação	GL	SQD	QM	F
Experimentos	2	111.2381	55.6191	1.6250 ^{ns}
Genótipos	3	2100.7023	700.2341	20.4590 ^{**}
Interação Experimentos x Genótipos	6	132.7619	22.1269	0.6465 ^{ns}
Resíduo	72	2464.2857	34.2261	
Total	83	4808.9881		

^{ns} – Não significativo a 5% de probabilidade

^{**} - Significativo a 1% de probabilidade

Na Tabela 13, onde é apresentado o ranqueamento dos genótipos para o método Ascósporos, observamos resultado similar aos demais métodos. Única alteração de posição no ranqueamento ocorreu entre os genótipos ANTA 82 e NA 5909, porém a diferença entre estes foi mínima (0,1%), indicando que este método estimula nos genótipos respostas semelhantes aos anteriormente apresentados, em termos de níveis de suscetibilidade.

Tabela 13 – Ranqueamento dos genótipos de soja submetidos ao método Ascósporos, mediante análise conjunta. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Severidade (%)*
EMGOPA 316	4,95 c
BRS 232	12,62 b
NA 5909	17,14 a
Anta 82	17,24 a
CV (%)	21,45

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Como pode-se observar, os resultados obtidos para suscetibilidade dos genótipos de soja através dos quatro métodos de avaliação propostos, foram similares quando realizado ranqueamento dos genótipos. Na Tabela 14 são apresentados os resultados da análise conjunta para cada método, lado a lado. Nota-se que quando aplicado o método AO, disco na Haste e Micropipeta, as diferenças entre os escores obtidos para os genótipos foi mais estreita (variando em torno de 1 unidade em sua respectiva escala de avaliação) enquanto que a diferença entre

valores de severidade para o método Ascósporos foi mais ampla (variando de 4,95 a 17,24), sugerindo que para se ter maior segurança um maior número de repetições deve ser aplicado. Quando aplicado o teste estatístico, porém, para avaliação e definição do ranqueamento, os resultados em termos de suscetibilidade foram praticamente idênticos.

Tabela 14 – Suscetibilidade de quatro genótipos de soja quando aplicados os métodos AO, Haste, Micropipeta e Ascósporos. Ponta Grossa, PR. 2017.

Cultivar	Ácido Oxálico^{1*}	Haste^{2*}	Micropipeta^{2*}	Ascósporos^{3*}
EMGOPA 316	1,76 b	3,60 c	2,97 c	4,95 c
BRS 232	1,81 b	3,93 b	2,99 c	12,62 b
Anta 82	2,52 a	4,43 a	3,59 b	17,14 a
NA 5909	2,76 a	4,67 a	3,77 a	17,24 a
CV (%)	25,96	9,44	7,48	21,45

¹ - Avaliações realizadas através de escores de Murchamento, proposta por HULLER *et al.*, (2016);

² - Avaliações realizadas através da medição (cm) da lesão ocasionada pelo patógeno.

³ - Avaliações realizadas através da severidade de ataque do patógeno (%)

* - Médias seguidas pela mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para verificar o grau de similaridade entre os resultados obtidos para cada método, foi aplicado o teste de Correlação de Spearman (Tabela 15), onde, através da ordenação em postos (ranqueamento) dentro de cada método, é possível avaliar o grau de correlação entre eles.

Tabela 15 – Coeficiente de correlação de Spearman (r_s) para os níveis de suscetibilidade obtidos por cada método. Ponta Grossa, PR. 2017.

Métodos	Ácido Oxálico	Haste	Micropipeta	Ascósporos
Ácido Oxálico	-	0,700*	0,745*	0,498*
Haste	0,700*	-	0,877*	0,825*
Micropipeta	0,745*	0,877*	-	0,729*
Ascósporos	0,498*	0,825*	0,729*	-

^{1*} Significativo ao nível de 5% de probabilidade pela tabela de coeficientes de correlação de Spearman.

Pode-se observar correlação positiva e significativa entre os quatro métodos analisados. Vale destacar diferenças no grau de correlação observado entre os métodos AO e Ascósporos, considerada como moderada, ao passo que todas as demais são consideradas correlações fortes (valores entre 0,7 e 0,9). Estes resultados corroboram com o encontrado por Huller *et al.* (2016), onde os autores identificaram correlação positiva entre o método até então proposto como novidade (AO) e os métodos disco na Haste e Micropipeta, quando analisado o ranqueamento de 77 genótipos em cada método. Por outro lado, no presente trabalho a força da correlação encontrada entre o método AO e Ascósporos foi inferior aos demais, indicando que os resultados apresentam certa similaridade, porém é bastante reduzida a segurança que se tem ao assumir que o resultado obtido pelo método AO se equipara ao obtido com a utilização de ascósporos na discriminação de genótipos, em termos de níveis de suscetibilidade. Esta menor

correlação pode estar relacionado ao fato de o método AO ser o único que não utiliza o fungo para acessar os níveis de suscetibilidade, podendo haver outros fatores influenciadores nos resultados quando empregado o patógeno e não apenas um fator de patogenicidade (AO).

Alguns pesquisadores relatam dificuldade em se obter resultados semelhantes para níveis de suscetibilidade de genótipos de soja quando submetidos à diferentes métodos de avaliação, muitas vezes alcançando resultados inconclusivos e/ou inconsistentes (KULL et al., 2003; CHEN; WANG, 2005). Em contrapartida, o presente trabalho demonstrou através dos resultados obtidos para cada método (onde não foi observada diferença significativa entre experimentos ao longo do tempo), ranqueamento equivalente e forte correlação entre os métodos, que pode haver grande similaridade. Tal resultado de similaridade entre métodos pode estar relacionado ao fato de neste trabalho terem sido utilizados um menor número de genótipos enquanto outros trabalhos trabalharam com número maior, aumentando por consequência a variabilidade possível de ocorrer. Sabe-se que aumentando o número de repetições e experimentos os fatores devidos ao acaso tendem a reduzir, logo, outro fator que pode ter levado à alta similaridade dos resultados em termos de ranqueamento foi o emprego de 3 experimentos e não apenas 2 como a maioria dos trabalhos anteriores.

5.2 RESULTADOS PARA EXPRESSÃO DE GENES

Em se tratando da análise de expressão relativa de genes, na Tabela 16 podemos observar para cada método: os genótipos, se os genes estão mais expressos (UP) ou menos expressos (DOWN) do que o endógeno, e a taxa de expressão em relação ao controle negativo (valores entre parêntesis).

Pode-se observar os genes *PR-5*² e *PR-5*³ foram os mais expressos (UP) em praticamente todos os métodos empregados, independentemente do genótipo. Houve situações onde a expressão do *PR-5*³ não foi significativa para o método Ascósporos (para os genótipos EMGOPA 316, BRS 232 e NA 5909, porém para este mesmo método o gene *PR-5*¹ apresentou-se mais expresso (UP) para estes genótipos. Estes resultados estão de acordo com o exposto por Calla et al. (2009) onde foi demonstrado que os genes do grupo *PR-5*, independentemente do grau de suscetibilidade do genótipo, apresentam-se significativamente mais expresso (UP).

Quando observado o método AO, nota-se que o gene *PR-5*¹ foi menos expresso (DOWN) em relação ao controle negativo, em contraste com todos os outros resultados obtidos para genes do grupo *PR-5*. Uma vez que o esperado era o contrário, pode se supor que em algum

momento, quando expostos ao AO, os genótipos respondam de maneira diferente ao estímulo. O fato de os resultados de correlação do método AO com os demais ser inferior, pode ser atribuído à diferentes estímulos causados pelo método (por exemplo, na expressão de genes do grupo *PR-5*), porém é necessário um estudo mais profundo para poder que se possa chegar a uma conclusão. Além disso, outros genes podem estar envolvidos na interação e desempenhar importante papel em relação à resposta dos genótipos.

Tabela 16 – Expressão dos genes em estudo, para os quatro métodos e quatro genótipos de soja. Ponta Grossa, PR. 2017.

	Ácido Oxálico*							
Genes	EMGOPA 316		BRS 232		NA 5909		ANTA 82	
<i>PR-5¹</i>	DOWN	(0,16)	DOWN	(0,23)	DOWN	(0,08)	-	(0,62)
<i>"G-Protein"</i>	DOWN	(0,39)	DOWN	(0,47)	-	(1,11)	DOWN	(0,13)
<i>Antocianidina</i>	DOWN	(0,28)	-	(0,57)	UP	(5,55)	DOWN	(0,05)
<i>PR-5²</i>	UP	(9,75)	UP	(27,19)	UP	(23,39)	UP	(23,28)
<i>PR-5³</i>	UP	(11,13)	UP	(21,06)	-	(1,59)	UP	(21,83)
<i>Peroxidases</i>	UP	(2,65)	-	(1,14)	UP	(4,54)	UP	(2,45)

	Inoculação na Haste*							
Genes	EMGOPA 316		BRS 232		NA 5909		ANTA 82	
<i>PR-5¹</i>	-	(0,75)	DOWN	(0,47)	-	(1,31)	-	(0,71)
<i>"G-Protein"</i>	UP	(6,84)	UP	(9,52)	-	(0,65)	UP	(28,37)
<i>Antocianidina</i>	DOWN	(0,30)	-	(0,78)	UP	(4,48)	-	(0,65)
<i>PR-5²</i>	UP	(100,25)	UP	(143,80)	UP	(113,34)	UP	(171,59)
<i>PR-5³</i>	UP	(4,48)	UP	(23,49)	UP	(20,13)	UP	(38,49)
<i>Peroxidases</i>	-	(1,13)	UP	(3,31)	DOWN	(0,23)	-	(0,81)

	Micropipeta*							
Genes	EMGOPA 316		BRS 232		NA 5909		ANTA 82	
<i>PR-5¹</i>	UP	(3,20)	-	(1,38)	UP	(9,76)	UP	(8,75)
<i>"G-Protein"</i>	DOWN	(0,16)	-	(1,13)	-	(1,14)	-	(0,51)
<i>Antocianidina</i>	DOWN	(0,02)	DOWN	(0,48)	DOWN	(0,16)	DOWN	(0,45)
<i>PR-5²</i>	UP	(48,63)	UP	(7,89)	UP	(57,06)	UP	(27,17)
<i>PR-5³</i>	UP	(123,78)	UP	(3,05)	UP	(16,95)	UP	(38,25)
<i>Peroxidases</i>	-	(0,68)	DOWN	(0,25)	-	(2,01)	-	(0,65)

	Ascósporos*							
Genes	EMGOPA 316		BRS 232		NA 5909		ANTA 82	
<i>PR-5¹</i>	UP	(3,04)	UP	(3,28)	UP	(2,81)	-	(1,28)
<i>"G-Protein"</i>	-	(0,83)	UP	(3,01)	-	(0,53)	UP	(8,71)
<i>Antocianidina</i>	-	(0,92)	UP	(3,15)	-	(0,77)	-	(1,21)
<i>PR-5²</i>	UP	(2,66)	UP	(3,11)	UP	(1,97)	UP	(15,99)
<i>PR-5³</i>	-	(1,14)	-	(0,99)	-	(1,32)	UP	(7,01)
<i>Peroxidases</i>	UP	(2,54)	UP	(1,84)	UP	(3,42)	UP	(14,43)

* Valores entre parênteses representam a taxa de expressão gênica comparada ao gene endógeno (1,00)

* DOWN: significativo a 5% de probabilidade,

* UP: significativo a 5% de probabilidade,

* - Não significativo.

Em contrapartida à diferença de expressão observada entre o método AO e Ascósporos para os genes do grupo *PR-5*, quando observa-se a expressão do gene *Peroxidase*, a maior semelhança encontrada é justamente entre estes dois métodos. Os resultados de expressão deste grupo de genes (envolvidos na síntese de peroxidases) estão de acordo com o apontado por Liang et al. (2008) e Calla et al. (2009), onde o esperado é justamente que estes sejam mais expressos (UP). Neste caso, apesar de outros genes poderem desempenhar importantes papéis na interação, o estímulo por conta da alteração de pH inicial e ação das enzimas de resposta à esta alteração pode ter sido determinante para obtenção de tal resultado.

Os resultados de expressão para o gene do grupo *G-Proteins* variou de mais expresso (UP) a menos expresso (DOWN) entre genótipos. Resultados contrastantes foram observados quando comparados os métodos AO e disco na Haste, onde para o primeiro o estímulo induziu uma menor expressão (DOWN) e o segundo induziu maior expressão (UP). Resultados que variaram de maior a menor expressão foram observados também por Calla et al. (2009), onde genes do grupo *G-Protein* apresentaram-se diferentemente expressos tanto entre genótipos quanto ao longo do tempo após exposição ao fungo.

Para o gene do grupo *Antocianidina*, o esperado era que fosse menos expresso (DOWN) de acordo com Calla et al. (2014). Quando analisamos o método Micropipeta, todos os genótipos demonstraram redução na expressão deste gene. Para os demais métodos, ocorreu grande variabilidade de resultados.

Vale destacar que o presente estudo avaliou a alteração na expressão destes genes após 24 horas, e, sabe-se que ocorrem certas variações na expressão dos genes ao longo do tempo após interação. Deste modo, para poder confirmar os padrões observados se fazem necessárias avaliações de níveis de expressão também ao longo do tempo (por exemplo: 8 horas, 12 horas, 24 horas e 36 horas).

Ainda, os genes aqui estudados são indicativos e comprovadamente envolvidos na interação *S. sclerotiorum*-planta, mas podem haver outros que exercem importante papel na interação que não foram trabalhados.

CONCLUSÃO

Os diferentes métodos analisados (AO, disco na Haste, Micropipeta e Ascósporos) estimularam respostas similares aos genótipos de soja, em termos de suscetibilidade.

Verificou-se que o ranqueamento dos genótipos não variou quando estes foram submetidos aos diferentes métodos.

Foi observada correlação positiva e significativa entre os resultados dos diferentes métodos.

Os métodos AO e Ascósporos, foram os que apresentaram menor correlação entre si, ao passo que maior grau de correlação foi observado entre os métodos Micropipeta e disco na Haste.

Foi observada similaridade em relação aos estímulos causados pelos diferentes métodos às plantas de soja (genes UP ou DOWN) por ocasião do contato com o patógeno e/ou fator de patogenicidade do mesmo (ácido oxálico) para expressão dos genes do grupo PR-5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P. B.; AYERS, W. A. Ecology of *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 896-899, 1979.

ADDINSOLFT. XLSTAT for Windows. Disponível em: <<http://www.xlstat.com/>>. Acesso em: 27 de Agosto de 2016.

ANTÔNIO, R. P.; SANTOS, J. B.; SOUZA, T. P.; CARNEIRO, F. F. 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.

BATEMAN, D. F.; BEER, S. V. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. **Phytopathology**, v. 55, p. 204-211, 1965.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Evaluating soybean cultivars for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* under field conditions. **Plant Disease**, v. 71, p. 934-936, 1987.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 16, p.93-108, 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, p. 1-16, 2006.

CALLA, B.; VUONG, T.; RADWAN, O.; HARTMAN, G. L.; CLOUGH, S. J. Gene Expression Profiling Soybean Stem Tissue Early Response to *Sclerotinia sclerotiorum* and In Silico Mapping in Relation to Resistance Markers. **The Plant Genome**. v. 2, n. 2, p. 149-166, 2009.

CALLA, B.; BLAHUT-BEATTY, L.; KOZIOL, L.; ZHANG, Y.; NEECE, D. J.; CARBAJULCA, D.; GARCIA, A.; SIMMONDS, D. H.; CLOUGH, S. J. Genomic evaluation of oxalate-degrading transgenic soybean in response to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 16, p. 563-575, 2014.

CÂMARA, G. M. S. **Soja: Tecnologia da produção**. 2 ed. Piracicaba: ESALQ/LPV, 2000. 450p.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S. das; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v.1, n. 1, p.18-24, dez./jan. 2001.

CASTAÑO, F.; VEAR, F.; LABROUHE, D. T. Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. **Euphytica**, v. 68, p. 85-98, 1993.

CASTRO, L. H. S.; FIGUEIRÓ, A. A.; NOGUEIRA, A. P. O.; CLOUGH, S. J.; JULIATTI, F. C. Resistance of soybean genotypes to *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in different incubation environments. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4. 2016.

CHAVES, M. S. **Aspectos epidemiológicos da interação *Whetzelinia sclerotiorum* x *Glycine max***. Dissertação de mestrado (Agronomia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995. 53p.

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

CHEN, Y. N.; REN, X. P.; ZHOU, X. J.; HUANG, L.; HUANG, J. Q.; YAN, L. Y.; LEI, Y.; QI, Y.; WEI, W. H.; JIANG, H. F. Alteration of gene expression profile in the roots of wild diploid *Arachis duranensis* inoculated with *Ralstonia solanacearum*. **Plant Pathology**, v. 63, p. 803-811, 2014.

CHUN, D.; KAO, L. B.; LOCKWOOD, J. L. Laboratory and field assessment of resistance in soybean to stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 71, p. 811- 815, 1987.

COBER, E.R., S. RIOUX, I. RAJCAN, P.A. DONALDSON, AND D.H. SIMMONDS. Partial resistance to white mold in a transgenic soybean line. **Crop Science**, v. 43, p. 92–95, 2003.

COLOMBO, J.; RAHAL. P. A tecnologia de microarray no estudo do câncer de cabeça e pescoço. **Brazilian Journal of Biosciences**. v. 8, p. 64-72, 2010.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira – Grãos**. v.4, safra 2016/17, n. 7 – Sétimo levantamento. Abril de 2017.

CRUTE, I. R; PINK, D. A. C. The genetics and utilization of pathogen resistance in plants. **Plant Cell**, v. 8, p. 1747–55, 1996.

CUNHA, W. G. **Resistência a *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de soja geneticamente modificadas para expressar o gene da oxalate descarboxilase de *Flammulina velutipes***. Tese de doutorado (Agronomia). Universidade Federal de Brasília. Brasília, 2010. 90p.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja 4 – Região Central do Brasil**. Londrina, 2003. 237p.

EMBRAPA. 2014. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br>>. Acessado em 27 de janeiro de 2014.

FAVARON, F.; SELLA, L.; D’OVIDIO, R. Relationships among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, p. 1402-1409, 2004.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology (special report, 80), 1977. 11p.

FERREIRA, L. P.; LEHMAN, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da soja no Brasil**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo (Circular Técnica, 1), 1979. 42p.

FONTANA, J. A.; CAPELETTI, J. L.; KALSING, M. S.; MAZARO, S. M.; GOUVEA, A.; MARI, L. F.; TARTARI, L. D.; LINK, L.; CAMINI, N. A.; ZANOTTI, J.; PAZINATTO, H.; RAMOS FILHO, J. B.; DONAZZOLO, J. Manejo de doenças na cultura da soja no sudoeste do Paraná na safra 2005/2006. **Synergismus scyentifica**, Pato Branco, v. 1, p. 150-155, 2006.

GARCIA, R. A. **Produção de inóculo, efeitos de extratos vegetais e de fungicidas e reação de genótipos de soja à *Sclerotinia sclerotiorum***. Dissertação de mestrado (Agronomia). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2008. 154p.

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, p. 196-203, 2012.

GIACHETTO, P. F. A tecnologia de microarranjos na identificação de genes de interesse na bovinocultura. **Embrapa Informática Agropecuária**, Campinas, SP. 2010. 35p.

GODOY, G.; STEADMAN, J. R.; DICKMAN, M. B.; DAM, R. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 37, p. 179-191, 1990.

GONÇALVES, P. R. C.; SANTOS, J. B. Physiological resistance of common bean cultivars and lines to white mold based on oxalic acid reaction. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 53, p.236-237, 2010.

GRABICOSKI, E. M.; JACCOUD-FILHO, D. S.; HENNEBERG, L.; VRISMAN, C. M.; MANOSSO NETO, M. O. Potencial inibitório de extratos de plantas para *Sclerotinia sclerotiorum*. In: **XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA**. 2010.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Plant disease resistance genes. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 48, p. 575-607, 1997.

HENNING, A. A. Visão histórica, progressos e perspectivas no manejo e controle do mofo branco. In: **I ENCONTRO INTERNACIONAL DE MOFO BRANCO**, Ponta Grossa-PR. p. 16. 2012.

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

HAREL, A.; BERCOVICH, S.; YARDEN, O. Calcineurin Is Required for Sclerotial Development and Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* in an Oxalic Acid-Independent Manner. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 682-693, 2006.

HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. **Compendium of soybean diseases**. 4th ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1999.

HEID, C. A; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; JACCOUD FILHO, D. S.; PANOBIANCO, M. Incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de soja e sensibilidade dos testes de detecção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 763-768, 2012.

HULLER, G. C.; JACCOUD FILHO, D. S.; PIERRE, M. L. C.; TULLIO, H. E.; GRABICOSKI, E. M. G.; JULIATTI, F. C. Different methods of assessing susceptibility of soybean genotypes to white mold. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 2, p. 389-402, mar./abr. 2016.

JACCOUD FILHO, D. S.; MANOSSO NETO, M. O.; VRISMAN, C. M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E. M. G.; PIERRE, M. L. C.; BERGER NETO, A.; SARTORI, F. F.; DEMARCH, V. B.; ROCHA, C. H. Análise, distribuição e quantificação do “Mofo Branco” em diferentes regiões produtoras do estado do Paraná. (Resumo). In: **XXXI Reunião de Pesquisa de Soja da Região Central do Brasil** – Resumos. Londrina: EMBRAPA SOJA, p. 226 – 228, 2010.

JULIATTI, F. C.; SAGATA, E. JULIATTI, B. C. M. Ranqueamento de genótipos de soja com resistência parcial por diferentes métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* submetidos à análise de correlação. **Bioscience Journal**, v. 29, p. 681-689, 2012

JULIATTI, F. C.; CAIRES, A. M.; JULIATTI, B. C. M.; BORIN, M. R.; JACCOUD FILHO, D. S. Reação de genótipos de soja transgênicos e convencionais à podridão branca da haste. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 4, p. 921-931, jul./ago. 2013.

JULIATTI, F. C.; JULIATTI, F. C. A. Podridão branca da haste da soja: manejo e uso de fungicidas em busca da sustentabilidade nos sistemas de produção. Uberlândia: **Composer**, 2010, 33p.

JUNIOR, M. L.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 2, p.521-526, 2000.

KIM, K. 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.; HARTMAN, G. L.; MANANDHAR, J. B.; GRAEF, G. L.; STEADMAN, J. R.; DIERS, B. W. Reaction of soybean cultivars to *Sclerotinia* stem rot in field, greenhouse, and laboratory evaluations. **Crop Science**, v. 40, p. 665-669, 2000.

KIM, K. S.; DICKMAN, M. B.; MIN, J. Y. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 605-612, 2008.

KIMATI, Y.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios gerais de controle. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ceres, v. 2. 2005.

KOLKMAN, J. M.; KELLY, J. D. An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. **Crop Science**, v. 40, p. 281–285, 2000.

KULL, L. S.; VUONG, T. D.; POWERS, K. S.; ESKRIDGE, K. M.; STEADMAN, J. R.; HARTMAN, G. L. Evaluation of resistance screening methods for *Sclerotinia* stem rot of soybean and dry bean. **Plant Disease**, v. 87, p. 1471-1476, 2003.

LEONE, G.; TONNEIJCK, A. E. G. A rapid procedure for screening the resistance of bean cultivars (*Phaseolus vulgaris*) to *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. **Euphytica**. Wageningen, v. 48, p. 87-90, 1990.

LIANG, Y. S.; SRIVASTAVA, M. H.; RAHMAN, S. E.; STRELKOV, N. N. V. Proteome changes in leaves of *Brassica napus* L. as a result of *Sclerotinia sclerotiorum* challenge. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 56, p.1963–1976. 2008.

LIBAULT, M.; THIBIVILLIERS, S.; BILGIN, D.D; RADWAN, O.; BENITEZ, M.; CLOUGH, S. J. Identification of four soybean reference genes for gene expression normalization. **The Plant Genome**, v. 1, p. 44–54, 2008.

LIVAK, K. J.; FLOOD, S. J. A.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods Appl.** v. 4, p. 357–362, 1995.

LU, G. Engineering *Sclerotinia Sclerotiorum* Resistance in Oilseed Crops. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 509-516, 2003.

MACHADO, J. C. **Patologia de sementes: significado e atribuições**. In: Carvalho, N.M. e Nakagawa, J. (Eds.). Sementes: ciência, tecnologia e produção. Jaboticabal: FUNEP, p. 522-588, 2000.

MAGRO, P.; MARCIANO, P.; DI LENNA, P. Oxalic acid production and its role in pathogenesis of *Sclerotinia sclerotiorum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 24. p. 9-12, 1984.

MANOSSO NETO, M.O.; JACCOUD-FILHO, D.S.; VRISMAN, C.M.; HENNEBERG, L.; GRABICOSKI, E.M.G.; PIERRE, M.L.C.; SARTORI, F.F. Efeito de diferentes épocas de semeadura da cultura da soja e sua relação com a incidência do Mofo-Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*). In: **XLIII CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA/ XLIII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN PHYTHOPATHOLOGICAL SOCIETY**, 23, 2010, Cuiaba. Resumo. Brasília: Brazilian Phytopathological Society, v.35, supl. p. 28. 2010.

MARCIANO, P; DI LENNA, P.; MAGRO, P. Oxalic acid, cell-wall degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. **Physiological Plant Pathology**, v. 22, p. 339-345, 1983.

MAXWELL, D. P.; LUMSDEN, R. D. Oxalic acid production by *Sclerotinia sclerotiorum* in infected bean and in culture. **Phytopathology**, v. 60, p. 1395-1398, 1970.

MUCKEL, R. O.; STEADMAN, J. R. Dissemination and survival of *Sclerotinia sclerotiorum* in bean field in Western Nebraska. **Phytopathology**, v. 71, p. 244, 1981.

NASSER, L. C. B.; NAPOLEÃO, R.; CARVAJAL, R. A. Mofo branco - cuidado com a semente. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, São Paulo, n. 4, 1999.

NELSON, B. D.; HELMS, T. C.; KURAL, I. Effects of temperature and pathogen isolate on laboratory screening of soybean for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 71, p. 347-352, 1991.

NUNES JUNIOR, J.; PIMENTA, B. C.; MEYER, M. C.; COSTA, N. B.; SEIL, A. H.; NUNES SOBRINHO, J. B. Avaliação da eficácia de fungicidas no controle de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, no Estado de Goiás. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 36, Supl., p. 495, 2011.

PARK, J.; CHOI, H. J.; LEE, S.; LEE, T.; YANG, Z.; LEE, Y. Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. **Plant Physiology**, v. 124, p.725–732, 2000.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFFLE, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in Real-Time PCR. **Nucleic Acid Research**, v. 30, n. 9, e36. 2002.

PIERRE, M. L. C.; JACCOUD FILHO, D. S.; VRISMAN, C. M.; BERGER NETO, A.; GRABICOSKI, E. M. G.; SARTORI, F. F.; HENNEBERG, L.; CANTELE, M. A.; CANTELE, L. E.; TULIO, H. E.; HULLER, G. C. Avaliação da suscetibilidade de diferentes genótipos de soja inoculados com *Sclerotinia sclerotiorum* em laboratório. In: 44 Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 2011, Bento Gonçalves. **Tropical Plant Pathology**, 2011.

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

QIAGEN. Critical factors for successful Real-Time PCR. 2010. Disponível em: <www.qiagen.com>. Acesso em março de 2016.

RIEU, I.; POWERS, S. J. Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. **Plant Cell**, v. 21, n. 4, p.1031–1033. 2009.

RIOU, C.; FREYSSINET, G.; FEVRE, M. Producing of cell-wall degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 1478-1484, 1991.

SAGATA, E.; JULIATTI, F. C.; SILVA, C. L.; REZENDE, A. A.; CAIRES, A. M. Avaliação de genótipos de soja quanto a reação de resistência à *Sclerotinia sclerotiorum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, p. 205, 2010.

SCHWARTZ, H. F.; STEADMAN, J. R. White Mold. In: SCHWARTZ, H.F.; PASTOR-CORRALES, M. A. (ed.). **Bean production problems in the tropics**. 2. ed. Cali: CIAT, 1989, 726p.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

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**, v. 20, p. 118, 1989.

SINGH, O. S.; TERÁN, H. Evolution of screening methods for detection of physiological resistance to White mold in common bean. **Annual Report Bean Improvement Cooperative**. v. 51, p. 40-41. 2008.

SOUZA, E. D. T. **Métodos de inoculação para avaliação e seleção de germoplasma de *Phaseolus* spp. quanto à resistência à *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999. 82p.

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

TAYLOR, G. R. **Polymerase chain reaction: basic principles and automation**. In: McPHERSON, M. J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G. R. PCR: A Practical Approach. IV Series. New York: Oxford University Press, 1991. Cap. 1, p. 1-14.

TU, J. C. The role of white mold-infected white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds in the dissemination of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. **Journal of Phytopathology**, v. 121, n. 1, p. 40-50, 1988.

VIEIRA, R. F.; PAULA JÚNIOR, T. J.; PERES, A. P.; MACHADO, J. C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 770-773, 2001.

VUONG, T. D.; HARTMAN, G. L. Evaluation of soybean resistance to *Sclerotinia* stem rot using reciprocal grafting. **Plant Disease**, v. 87, p.154-158, 2003.

VUONG, T. D.; HOFFMAN, D. D.; DIERS, B. W.; MILLER, J. F. STEADMAN, J. R.; HARTMAN, G. L. Evaluation of Soybean, Dry Bean, and Sunflower for Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Crop Science**, v. 44, p. 777-783, 2004.

VUONG, T. D.; DIERS, B. W.; HARTMAN, G. L. Identification of QTL for QTL to resistance to *sclerotinia* stem rot in soybean plant production. **Crop Science**, v. 48, p. 2209-2214, 2008.

WALZ, A.; ZINGEN-SELL, I.; THIESEN, S.; KORTEKAMP, A. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 120, p. 317-330, 2008.

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

YANAR, Y.; MILLER, S. A. Resistance of Pepper Cultivars and Accessions of *Capsicum* spp. to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 87, p. 303-307, 2003.

YORINORI, J. T.; CHARCHAR, M. J. D.; NASSER, L. C. B.; HENNING, A. A. **Doenças da soja e seu controle**. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. Cultura da soja nos cerrados. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 334-397.

ZHAO, J.; SAKAI, K. Multiple signaling pathways mediate fungal elicitor-induced beta-thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitânica* cell cultures. **Journal of Experimental Botany**. v. 54, p. 647–656. 2003.