

**Técnicas Utilizadas para Estudos com
Phytophthora sojae na Embrapa Trigo**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Trigo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos
_____online **163**

**Técnicas Utilizadas para Estudos com
Phytophthora sojae na Embrapa Trigo**

*Leila Maria Costamilan
Cláudia Cristina Clebsch*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Trigo

Rodovia BR 285, km 294

Caixa Postal 3081

Telefone: (54) 3316-5800

Fax: (54) 3316-5802

99050-970 Passo Fundo, RS

www.embrapa.br

https://www.embrapa.br/fale-conosco

Unidade responsável pelo conteúdo e edição:

Embrapa Trigo

Tratamento editorial: *Fátima Maria De Marchi*

Capa: *Fátima Maria De Marchi*

Diagramação eletrônica: *Fátima Maria De Marchi*

Fotos: *Leila Maria Costamilan*

Normalização bibliográfica: *Maria Regina Martins*

1ª edição

Versão on-line (2016)

Comitê de Publicações

Presidente: *Mercedes Concórdia Carrão-Panizzi*

Vice-Presidente: *Leila Maria Costamilan*

Membros: *Anderson Santi, Genei Antonio Dalmago, Paulo Roberto Valle da Silva Pereira, Sandra Maria Mansur Scagliusi, Tammy Aparecida Manabe Kiihl, Vladirene Macedo Vieira*

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Trigo

Costamilan, Leila Maria.

Técnicas utilizadas para estudos com *Phytophthora sojae* na Embrapa Trigo. / Leila Maria Costamilan, Cláudia Cristina Clebsch. – Passo Fundo : Embrapa Trigo, 2016.

PDF (31 p.). – (Documentos online / Embrapa Trigo, ISSN 1518-6512 ; 163)

1. Soja - Doença - Chromista. I. Clebsch, Cláudia Cristina. II. Título. III. Série.

CDD: 633.3493

© Embrapa, 2016

Autores

Leila Maria Costamilan

Engenheira-agrônoma, M.Sc. em Fitotecnia, pesquisadora da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

Cláudia Cristina Clebsch

Bióloga, M.SC. em Ecologia, analista da Embrapa Trigo, Passo Fundo, RS.

Apresentação

A podridão radicular de fitóftora é uma doença de soja que está disseminada no Brasil, em lavouras do Rio Grande do Sul ao Mato Grosso. É importante porque pode causar a morte de plantas desde a pré-emergência, levando a replantios em áreas extensas, até a fase reprodutiva, produzindo lavouras com estandes desuniformes. A forma mais eficiente de controle é através do uso de cultivares resistentes. Para o obtentor de cultivares de soja, conhecer a reação de suas linhagens em pré-seleção, antes do lançamento comercial, é fator de segurança.

O recente interesse pela liberação de cultivares de soja resistentes à esta doença tem gerado grande procura por técnicas de trabalho com *Phytophthora sojae*. Apresentamos, nesta publicação, técnicas que têm se mostrado eficientes, no trabalho desenvolvido pela Embrapa Trigo. Além disto, a descrição destas técnicas contribui para o constante treinamento de pessoal do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Trigo.

O objetivo deste trabalho foi organizar as informações sobre metodologias de trabalho com *P. sojae* em uso na Embrapa Trigo, para treinamento de pessoal e como fonte de informação sobre técnicas simples de identificação, isolamento, manutenção e inoculação de plantas de soja, visando à seleção de genótipos resistentes à doença.

Sergio Roberto Dotto
Chefe-Geral da Embrapa Trigo

Sumário

Introdução	9
Importância.....	9
Etiologia.....	9
Sintomas.....	10
Controle.....	11
Objetivo.....	12
Técnicas.....	12
Diagnose.....	12
Isolamento.....	14
Manutenção.....	15
Armazenamento.....	16
Produção de colônia monozoospórica.....	17
Inoculação.....	19

Resistência completa através do teste do palito.....	19
Resistência completa através do teste de injeção.....	21
Identificação do gene <i>Rps</i> presente em linhagens resistentes.....	23
Resistência parcial através do método da camada de micélio.....	24
Identificação de patotipos de <i>P. sojae</i>	24
Referências.....	29

Técnicas Utilizadas para Estudos com *Phytophthora sojae* na Embrapa Trigo

Leila Maria Costamilan
Cláudia Cristina Clebsch

Introdução

Importância

A podridão radicular de fitóftora foi observada em soja pela primeira vez em 1948, nos Estados Unidos da América (EUA) e é também relatada na China, Japão, Argentina, Brasil e Austrália (SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015). No Brasil, a doença foi identificada no Rio Grande do Sul, na safra 1994/95 (COSTAMILAN, 2001), e em Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás e Tocantins. Prejuízos foram registrados na safra 2005/2006 em várias lavouras do Rio Grande do Sul e do Paraná, provocando tombamento de plantas em pós-emergência, levando a falhas de estande inicial, à ressemeadura de áreas extensas e à morte de plantas adultas.

Atualmente, nos EUA, causa prejuízos entre um e dois milhões de toneladas de grãos/ano (SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015) e, resumindo dados dos EUA, Brasil e Argentina, ocupa a sétima posição entre as doenças causadoras de maiores perdas de rendimento de grãos (HARTMAN, 2015). Wilcox e St. Martin (1998) registraram redução na produção de grãos entre 65% e 93%, comparando o rendimento de cultivares de soja suscetíveis e resistentes.

Etiologia

O agente causal é *Phytophthora sojae* Kaufm. & Gerd. 1958, de classificação Chromista (ou Straminipila), Oomycota, Oomycetes, Peronosporales (MYCOBANK DATABASE, 2016). Os integrantes do gênero *Phytophthora* não são fungos, estando filogeneticamente relacionados às algas. Entre outras características contrastantes, possuem clorofila na parede celular, e não quitina, como os fungos verdadeiros (FRY; GRÜNWARD, 2010; ROSSMAN; PALM, 2016).

P. sojae é homotálico e o micélio é cenocítico, quando jovem, e septado, quando mais velho. Anterídios são díclinos, geralmente paráginos. Oogônios são grandes (29,0-58,0 μm), esféricos ou subesféricos, de paredes finas. Um anterídio fertiliza um oogônio, desenvolvendo um oosporo. O diâmetro de oosporos dormentes varia

entre 19,2 e 38,8 μm , e são formados em meio de cultura ou em tecido infectado; a temperatura ideal para sua formação e germinação é 24 °C. Esporângios terminais são, tipicamente, obpiriformes, não papilados, prolíferos, de dimensões extremamente variáveis (42,0-65,0 μm x 32,0-53,0 μm). Podem germinar diretamente, atuando como conídios, ou indiretamente, pela extrusão de zoosporos. A temperatura ideal para germinação direta é de 25 °C e, para germinação indireta, de 14 °C. Zoosporos são ovoides, com dois flagelos, um anterior e outro posterior, este quatro a cinco vezes maior que o anterior; a temperatura ótima para sua germinação é de 20 °C (SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015).

Em soja, a podridão radicular de fitóftora é uma doença monocíclica. Oosporos remanescentes, no solo, ou formados em tecido vegetal, durante a safra, podem sobreviver por muitos anos na ausência do hospedeiro. Formam esporângios em temperaturas próximas a 25 °C, que se acumulam até que ocorra encharcamento do solo, quando liberam zoosporos, que nadam curtas distâncias (1 cm ou menos) ou são levados por corrente de água em direção a raízes de soja, atraídos por isoflavonoides produzidos por raízes e sementes em germinação. Quando encontram tecido vegetal, os zoosporos encistam, germinam e penetram diretamente.

A temperatura ótima para crescimento da maioria dos isolados é entre 25 °C e 28 °C, e os meios de cultivo em ágar mais comuns são à base de suco V8, farinha de milho, feijão lima e BDA 1/4. A doença é favorecida por temperatura próxima a 25 °C e por água livre disponível no solo, devido à textura argilosa, à compactação e a prolongados períodos de saturação de umidade, que provocam a liberação e a disseminação de zoosporos. Chuvas pesadas na primeira semana após semeadura criam as condições mais favoráveis para o desenvolvimento da doença. Práticas culturais como preparo reduzido de solo, plantio direto (que resulta em aumento na quantidade de inóculo nos primeiros 4-5 cm de solo), monocultura de soja e aplicação de altas doses de fertilizantes orgânicos ou com potássio, imediatamente antes da semeadura, podem tornar a doença mais severa. Não há disseminação por sementes, sendo o solo e restos culturais de soja contaminados a fonte de inóculo inicial (SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015; WORKNEH et al., 1999).

Sintomas

Os sintomas podem ser observados desde a pré-emergência até fase adulta de plantas, sendo que as mais jovens são mais suscetíveis e morrem mais rapidamente. Na fase inicial do ciclo da soja, causa apodrecimento de sementes ou flacidez na radícula, progredindo ao cotilédone, e os tecidos afetados adquirem coloração marrom. Sementes infectadas germinam lentamente e, quase sempre, as plântulas morrem durante a emergência, com hipocótilo apresentando anasarca e coloração marrom escura. Durante a emissão das primeiras folhas trifolioladas, a extremidade da raiz principal torna-se flácida e marrom, e essa descoloração estende-se e envolve o hipocótilo até o nó cotiledonar, ocorrendo o colapso do tecido, causando amarelamento de folhas, murcha e morte (Fig. 1). Plantas adultas morrem lentamente, apresentando folhas amareladas e tecido seco entre as nervuras, seguindo-se murcha completa e seca de tecidos, permanecendo as folhas presas às plantas, voltadas para baixo. Há destruição quase completa de raízes secundárias e apodrecimento da raiz principal, que adquire coloração marrom escura. Nesta fase, o sintoma característico é o aparecimento, no exterior da haste, de tecido de cor marrom escura, que circunda a mesma desde o solo e, frequentemente, progride ao longo desta e das hastes laterais em direção ao topo da planta (fig. 2 e 3). Em planta adulta, os tecidos apodrecidos da raiz e da haste permanecem firmes. Plantas afetadas podem ocorrer entre plantas sadias, e falhas causadas por plantas mortas precocemente pela doença são compensadas pelo crescimento de plantas vizinhas. O tecido escurecido na haste pode ficar coberto de micélio de fungos saprófitas, principalmente de *Fusarium* spp., levando à confusão na identificação do agente causal (Fig. 4).

Em cultivares menos suscetíveis ou com moderada resistência parcial, os danos podem ficar restritos às raízes, e, neste caso, as plântulas apresentam clorose e menor desenvolvimento. Em plantas adultas, ocorre apodrecimento da raiz principal e, ocasionalmente, ocorrem lesões longas, lineares, levemente aprofundadas e de cor marrom, em apenas um dos lados da haste, semelhantes a lesões de cancro da haste, causado por *Diaporthe aspalathi* (sin. *D. phaseolorum* var. *meridionalis*). As plantas afetadas podem desenvolver raízes secundárias superficiais,

para compensar a perda da raiz principal, originando plantas debilitadas, com desenvolvimento mais lento que o normal e mais sensíveis a períodos de falta de água.



Fig. 1. Planta jovem de soja morta por *Phytophthora sojae*.



Fig. 2. Planta adulta de soja morta por *Phytophthora sojae*.



Fig. 3. Detalhe de haste com escurecimento, causado por *Phytophthora sojae*.



Fig. 4. Haste de soja morta por *Phytophthora sojae*, contaminada por saprófitas.

Controle

A resistência genética é o principal meio de controle da doença, e pode manifestar-se de três formas. A primeira é raça-específica (completa), mediada por genes maiores (*Rps*). Atualmente, estão relatados mais de 14 genes de resistência dominantes; os principais são: *Rps1* (1a, 1b, 1c, 1d, 1k), *Rps2*, *Rps3* (3a, 3b e 3c), *Rps4*, *Rps5*, *Rps6*, *Rps7* e *Rps8* (BURNHAM et al., 2003; DORRANCE et al., 2004). Todos os genes descritos, exceto *Rps2* (ligado à expressão de resistência apenas em raízes), limitam completamente o crescimento de *P. sojae* através de reação de hipersensibilidade no hipocótilo. Em raízes, a colonização do córtex é similar em cultivares suscetíveis e resistentes (genes *Rps*) durante as primeiras 14 horas, após o que cessa nas resistentes, pois *P. sojae* não acessa o tecido vascular. Oogônios formam-se em cultivares suscetíveis, moderadamente suscetíveis ou *Rps*-resistentes; entretanto, muito mais oosporos serão formados em cultivares altamente suscetíveis (SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015).

Até 2004, mais de 55 raças de *P. sojae* haviam sido descritas usando-se o conjunto de diferenciais com *Rps1a*, 1b, 1c, 1d, 1k, 3a, 6 e 7. Atualmente, a identificação de patotipos ou de fórmulas de virulência, baseados em reações de suscetibilidade ou resistência de plantas com genes *Rps*, é preferível para descrever a variabilidade dentro da espécie (DORRANCE et al., 2004). Há perda de resistência em cultivares de soja na Austrália e nos EUA, com o surgimento de patotipos compatíveis com *Rps1a* e *Rps1k* (SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015).

A segunda forma também é raça-específica, referida como resistência radicial, mediada por *Rps2*, com a qual o hipocótilo apresenta reação suscetível ou intermediária (50% de plantas mortas ou com lesões longas), mas as raízes são altamente resistentes.

O terceiro tipo não é raça-específico, sendo herdado quantitativamente e é conhecido como resistência parcial, de campo, de planta adulta ou tolerância. Expressa-se pela redução de extensão de colonização de tecidos radiculares, sendo avaliada pela capacidade de resistir à penetração, à colonização ou à multiplicação do patógeno. Esta resistência só é funcional a partir da formação da primeira folha trifoliolada, sendo efetiva contra todos os patotipos de *P. sojae* (MIDEROS et al., 2007; SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015).

O controle químico é efetivo para cultivares com resistência parcial. Os princípios ativos eficazes são metalaxil e mefenoxam, da classe fenilamidas. O tratamento pode ser realizado via semente ou diretamente no solo, na linha de semeadura, onde sua eficiência é mais longa (SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015).

Além do uso de cultivares resistentes e de fungicida, outras medidas de controle integrado podem ser necessárias, como melhoria nas condições físicas do solo, especialmente pela drenagem e pela descompactação, na maioria dos ambientes. Rotação de culturas pode ser usada para evitar aumento do nível de inóculo no solo (SCHMITTHENNER; DORRANCE, 2015).

Objetivo

Informar os procedimentos para diagnose, isolamento, manutenção, armazenagem, inoculação e avaliação de resistência para *Phytophthora sojae*, agente causal da podridão radicular de fitóftora em soja, adotados na Embrapa Trigo.

Técnicas

Diagnose

A diagnose pode ser realizada de três formas: pela observação visual de sintomas típicos nas plantas (podridão radicular e escurecimento da base da haste), por amassamento de raízes e verificação da presença de oosporos, em observação ao microscópio, e/ou pelo isolamento e observação de colônias características em meio de cultura.

Amassamento de raízes: selecionam-se raízes finas e escuras, que são lavadas em água-corrente, colocadas sobre uma lâmina com uma gota de água, raspadas e abertas com o auxílio de duas agulhas histológicas, para facilitar a visualização ao microscópio. Normalmente, os oosporos encontram-se no tecido exterior da raiz. Sobrepe-se outra lâmina, apertando-a fortemente contra a outra, com movimentos de vai e vem. Ao microscópio ótico, procurar oosporos, no aumento de 40x e, a seguir, em 100x visualizar estruturas circulares, normalmente de paredes duplas (figs. 5, 6 e 7A).

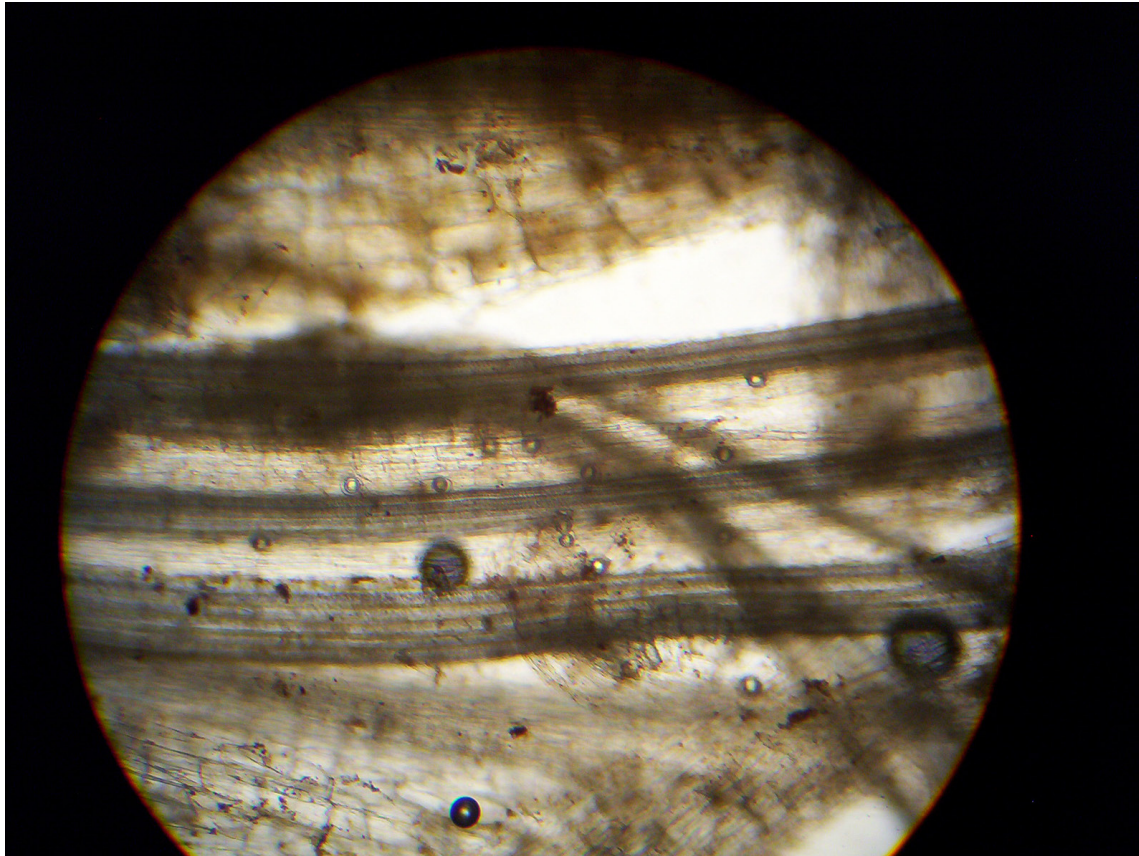


Fig 5. Oosporos de *Phytophthora sojae* em raiz amassada de soja, como observados em microscópio ótico em aumento 40x.

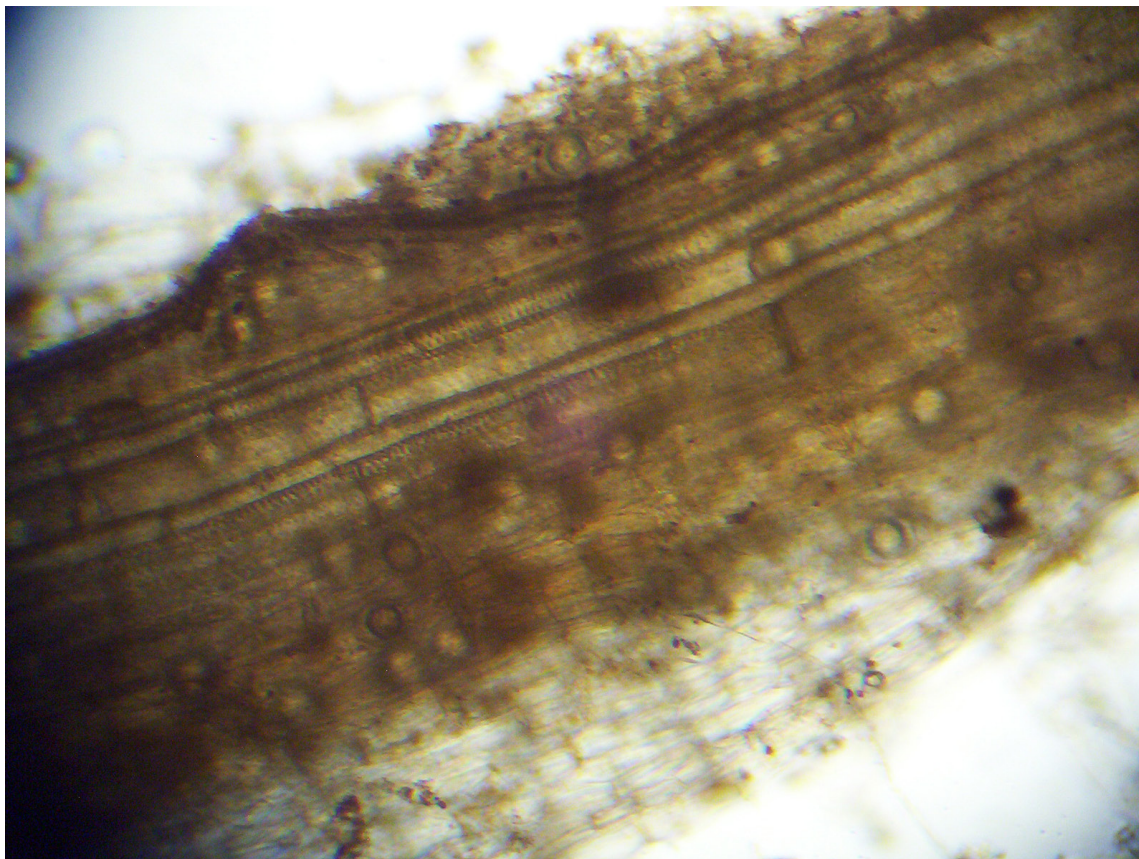


Fig. 6. Oosporos de *Phytophthora sojae* em raiz amassada de soja, como observados em microscópio ótico em aumento 100x.

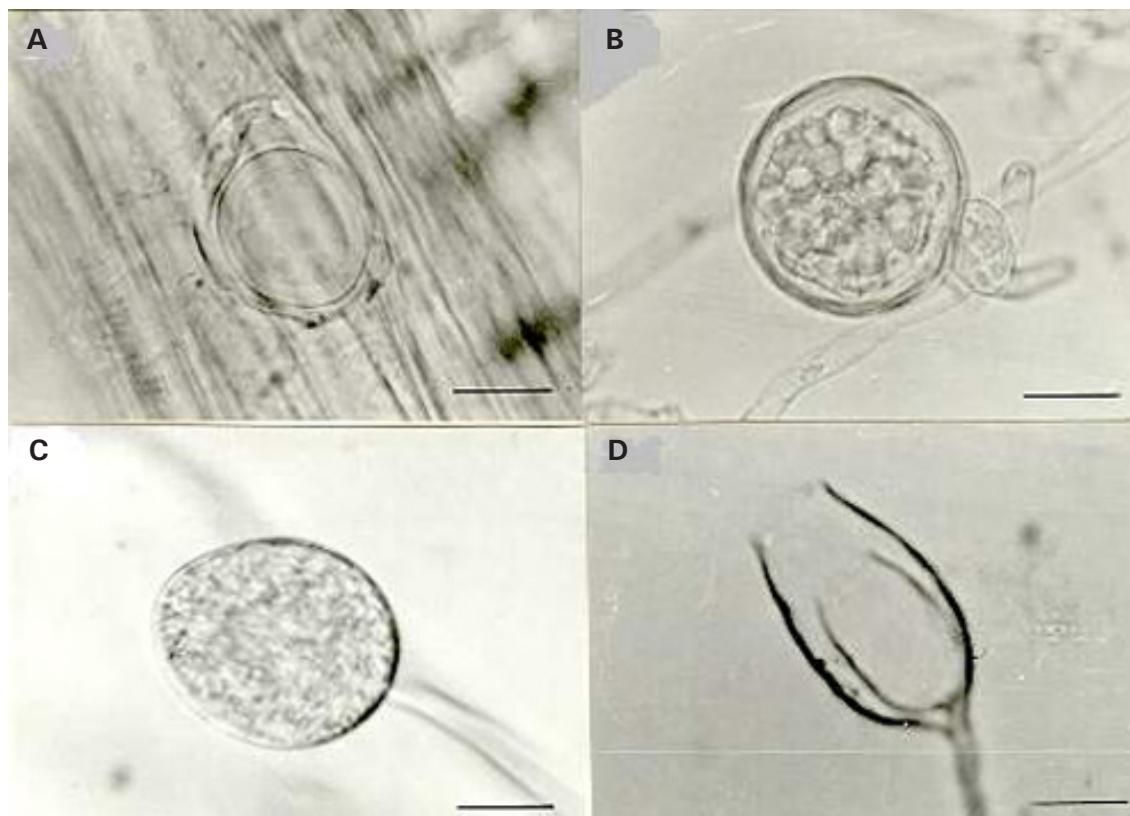


Fig 7. Estruturas de *Phytophthora sojae*. A: oosporo em tecido de raiz; B: anterídio e oogônio; C: esporângio; e D: esporângio prolífico, após liberação de zoosporos

Isolamento

Materiais necessários: papel filtro esterilizado, tesoura esterilizada ou flambada, pinça esterilizada, água destilada e esterilizada, caixa gerbox, béquer para descarte, álcool 70%, duas espátulas esterilizadas e meio de isolamento (Tabela 1).

Tabela 1. Ingredientes para elaboração de meio de cultura para isolamento de *Phytophthora sojae*.

Produto	Quantidade
Suco V8 ou extrato de tomate	40 mL ou 40 g
Carbonato de cálcio	0,60 g
Extrato de levedura	0,20 g
Sacarose	1,00 g
Benomil 50% – Benlate® (uso desautorizado no Brasil)	0,01 g
Quintozeno 75% - Terraclor®	0,05 g
Sulfato de neomicina	0,10 g
Cloranfenicol	0,01 g
Iprodiona 50% - Rovral®	0,04 g
Ágar	20,00 g
Água destilada	q.s.p. 1 L de solução

Fonte: adaptada de Dorrance et al. (2008) e Jackson et al. (2004).

Modo de preparo: a água, o carbonato de cálcio e o suco V8 (que pode ser substituído por extrato de tomate) são levados ao fogo até levantar fervura. Todos os ingredientes são misturados em erlenmeyer de 2 L, exceto iprodiona. A mistura é autoclavada por 15 min a 127 °C. Antes de verter o meio em placas de petri, iprodiona é parcialmente dissolvido em etanol (entre 2 mL e 10 mL, o suficiente para garantir que todo o produto seja lavado do papel alumínio utilizado para sua pesagem) e adicionado ao meio ainda líquido (temperatura próxima a 50 °C), em câmara de fluxo laminar. Utilizam-se placas de petri de vidro ou de plástico descartáveis novas, pois a fitóftora é sensível a resíduos de formaldeído, substância utilizada para esterilização de placas de plástico em reutilização, especialmente em períodos menos ensolarados e frios, nos quais a evaporação do produto é reduzida.

O isolamento é feito preferencialmente de plantas sintomáticas colhidas recentemente. Evitar embalar as plantas em plástico. O armazenamento de amostras pode ser feito em saco de papel, na geladeira (temperatura até 5 °C). Quanto maior o tempo de armazenamento, maior a incidência de bactérias e menor o sucesso no isolamento.

Para o isolamento, no caso de plântula, eliminar raízes, cotilédones e folhas, e cortar a haste de modo que permaneça até 4 cm de haste verde (tecido aparentemente sadio) acima do limite do tecido escurecido. Em plantas adultas, dar preferência ao tecido de ramos laterais, pela maior facilidade em cortá-lo, deixando até 4 cm de tecido aparentemente sadio acima do limite entre tecido doente e sadio.

Lavar as hastes seccionadas em água corrente e, após, em câmara de fluxo laminar, fazer assepsia em álcool 70% por 10 segundos, seguido de duplo enxague com água destilada e esterilizada. Com o auxílio de tesoura e pinça esterilizadas, cortar fatias do ponto de transição entre tecido sadio e doente da haste até que a medula comece a apresentar coloração levemente escurecida. Colocar cinco pedaços por placa de petri contendo meio de isolamento, fixando cada pedaço no meio de cultura, sem atravessá-lo. Após, com o auxílio de duas espátulas, virar o meio de cultura ao contrário, invertendo o disco de meio de cultura na própria placa, de modo que a superfície sobre a qual estão os pedaços de tecido vegetal entre em contato com a base da placa. Este procedimento visa à criação de condições anaeróbicas para dificultar o desenvolvimento de contaminações bacterianas.

Incubar em temperatura de 25 °C ± 1 °C, no escuro. Após três a quatro dias, verificar o crescimento de micélio de *P. sojae* (micélio branco, ralo, com presença de oosporos), que terá atravessado verticalmente a camada de meio de cultura em direção à superfície livre. Repicar a camada superior do meio contendo o micélio para outra placa, com meio de manutenção. Se necessário, passar mais uma vez pelo meio de isolamento, seguido de inversão, para garantir a pureza da colônia.

Manutenção

Após isolamento, usar meio de manutenção descrito a seguir:

Tabela 2. Ingredientes para elaboração de meio de cultura para manutenção de *Phytophthora sojae*.

Produto	Quantidade
Suco V8 ou extrato de tomate	40 mL ou 40 g
Carbonato de cálcio	0,60 g
Extrato de levedura	0,20 g
Sacarose	1,00 g
Ágar	20,00 g
Água destilada	q.s.p. 1 L de solução

Fonte: adaptada de Dorrance et al. (2008) e Jackson et al. (2004).

Modo de preparo: a água, o carbonato de cálcio e o suco V8 (que pode ser substituído por extrato de tomate) são levados ao fogo até levantar fervura. Todos os ingredientes são misturados em erlenmeyer de 2 L e a mistura é autoclavada por 15 min a 127 °C. O meio pode ser resfriado em água corrente com agitação leve do erlenmeyer, até que seja possível seu manuseio. O meio é vertido, em câmara de fluxo laminar, em placas de petri de vidro ou de plástico descartáveis novas (Fig. 8).

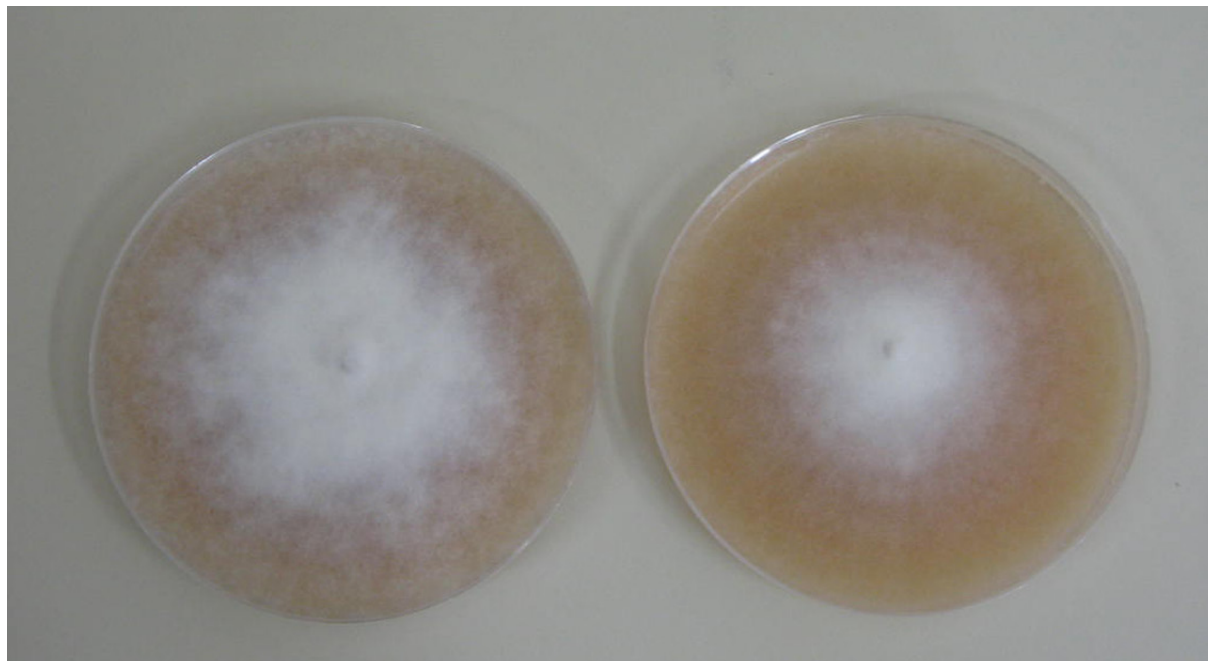


Fig. 8. Aspecto de colônias de *Phytophthora sojae* desenvolvidas em meio de cultura de manutenção com extrato de tomate.

Para manutenção de agressividade de isolado padrão, reisolar o isolado Ps2.4 após uma inoculação em BRS 244RR, anualmente, seja pelo método do palito ou da injeção, retirando as plantas da casa de vegetação entre três e quatro dias após a inoculação, para ter maior sucesso no isolamento e evitar contaminações. Proceder conforme descrito no item 3.2 (isolamento).

As repicagens são feitas a partir de discos de micélio da borda da colônia. Evitam-se muitas repicagens sucessivas para não perder a agressividade e o padrão de virulência do isolado. Anualmente, realiza-se o reisolamento a partir de soja suscetível. A cultivar de soja BRS 244RR é utilizada como padrão de suscetibilidade.

Armazenamento

Em nitrogênio líquido (técnica para criopreservação de *P. sojae* adaptada de Tooley, (1988): são necessárias colônias de *P. sojae*, crescidas em meio de manutenção por pelo menos 14 dias (para possibilitar o completo desenvolvimento de oosporos); tubos criogênicos esterilizados, de capacidade de 2 mL; e solução de glicerol a 10%, esterilizada em volumes pequenos (5 mL), armazenada em geladeira, ao abrigo da luz. Pipetar 1,5 mL de solução de glicerol a 10% em cada criotubo e realizar a transferência de cinco discos de micélio (± 5 mm) da borda da colônia para cada criotubo. Prender os criotubos nos perfis (cryocanes); levar para ultrafreezer a 80 °C negativos, onde pernoita. Na manhã seguinte, retirar do ultrafreezer, colocar o perfil contendo os criotubos dentro de canister, recolocar o canister no interior do botijão contendo nitrogênio líquido e fechar o mesmo. Manter mensalmente o abastecimento de nitrogênio líquido.

Para recuperar os isolados armazenados em nitrogênio líquido, os criotubos retirados devem ser colocados imediatamente em água à temperatura de 37 °C durante três a quatro minutos, agitando lentamente até o descongelamento, para impedir a formação de cristais de gelo. Após esse tempo, os criotubos são levados para câmara de fluxo laminar, onde é feita a drenagem do glicerol, transferindo-se discos de cada criotubo para béquer esterilizado contendo, aproximadamente, 60 mL de água destilada e autoclavada (pode ser em temperatura ambiente ou resfriada). O banho para lavagem do glicerol deve durar, no mínimo, três horas, com uma troca de água, pelo menos. Após, os discos de micélio são transferidos novamente para meio de cultura de manutenção, com a face da colônia desenvolvida voltada para baixo. Observar crescimento micelial a partir do quarto dia. A vantagem desta técnica é que os isolados mantêm o patotipo de virulência e a agressividade por quatro anos.

Em incubadora: retirar cinco discos de micélio, retirados da borda da colônia com, pelo menos, 14 dias de desenvolvimento em meio de manutenção, e armazenar em tubos de capacidade de 2 mL, esterilizados, contendo 1,5 mL de água destilada e autoclavada. A temperatura da incubadora deve ser regulada para 10 °C a 12 °C. Anualmente, verificar a viabilidade através de inoculação em plantas da série diferencial.

Em geladeira: as placas contendo colônias crescidas de *P. sojae* podem ser armazenadas durante um ano na geladeira, em temperatura até 5 °C, embaladas com parafilme ou filme plástico, com a tampa para baixo. Manter neste ambiente por, no máximo, um ano.

Produção de colônia monozoospórica

Técnica adaptada de Schmitthenner et al. (1994): retirar 10 discos de micélio da borda da colônia com, pelo menos, 10 dias, crescida em meio de manutenção, e transferir para erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio de extrato de tomate líquido (meio de manutenção sem ágar). Incubar por 48 horas a 25 °C. A cultura líquida é, então, substituída por 25 mL da solução salina de Chen-Zentmyer por quatro vezes, em intervalos de 15 min e, após, por 25 mL de água destilada esterilizada. Os zoosporos são formados após 5-6 horas a 25 °C (Figs. 9 a 12). Fazer diluições sucessivas de 10, 100 e 1.000 vezes com água destilada e esterilizada, e espalhar 0,2 mL de cada diluição na superfície do meio de isolamento. Selecionar colônias isoladas após 3 dias, e armazená-las em meio de manutenção.

Tabela 3. Solução salina de Chen-Zentmyer.

Produto	Molaridade	Correspondente
Nitrato de potássio	0,005 M	0,506 g de KNO ₃
Sulfato de magnésio	0,004 M	0,986 g de MgSO ₄ .7H ₂ O
Nitrato de cálcio tetrahidratado	0,01 M	2,36 g de Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O
Água destilada	-	q.s.p. 1 L de solução

Colocar a água destilada dentro de béquer e, com auxílio de um agitador magnético, diluir os reagentes acima, na ordem em que estão listados. Autoclavar a solução por 15 minutos a 127 °C. Deixar esfriar. Adicionar 1 mL de ferro quelatado (item 5.6 b), preparado a partir de Titriplex® III ou de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A solução de ferro quelatado deve apresentar coloração verde e, antes de ser adicionada à solução de Chen-Zentmyer, deve ser esterilizada por filtração em filtro de membrana.

Tabela 4. Ferro quelatado.

Produto	Quantidade
Titriplex® III	2,61 g
Hidróxido de potássio (KOH)	0,75 g
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	4,98 g
Água destilada	q.s.p. 200 mL de solução

Tabela 5. EDTA.

Produto	Quantidade
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	2,61 g
Hidróxido de potássio (KOH)	1,5 g
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ .7H ₂ O)	4,98 g
Água destilada	q.s.p. 200 mL de solução

Tabela 6. Cronograma para obtenção de colônias monozoospóricas de *Phytophthora sojae*.

Organograma	Atividade	Material
Dia 1 (de preferência, sexta-feira)	<ul style="list-style-type: none"> Repicar discos de <i>P. sojae</i> para placas matrizes 	<ul style="list-style-type: none"> Placas de petri com meio de manutenção
Dia 11 (11 dias após a repicagem)	<ul style="list-style-type: none"> Preparar meio de manutenção líquido 	<ul style="list-style-type: none"> Erlenmeyer (125 mL) Produtos para o meio de manutenção, exceto ágar
Dia 12	<ul style="list-style-type: none"> Retirar discos de micélio das placas matrizes Colocar 10 discos em cada erlenmeyer 	<ul style="list-style-type: none"> Cortador de 3 mm de diâmetro
Dia 13	<ul style="list-style-type: none"> Preparar 1 L de solução salina de Chen-Zentmyer e 200 mL de ferro quelatado Autoclavar materiais e meio de manutenção 	<ul style="list-style-type: none"> 1 béquer (2 L) 1 béquer (500 mL) Agitador magnético Balancetes Filtro de membrana (tipo Millipore®), 0,22 µ de diâmetro de poro Ponteiras de 10 mL Micropipetas de 1 mL, 10 mL, e 200 µL Meio de manutenção Solução de Chen-Zentmyer sem ferro quelatado Água destilada Tubos de ensaio para diluições Provetas de 25 mL Alças de Drigalski de vidro Tubos com tampa contendo 9 mL de água destilada e autoclavada para fazer as diluições Ponteiras de 1 mL e 200 µL para diluições e plaqueamento 1 seringa para ferro quelatado 1 pipeta de vidro de 1 mL para ferro quelatado.
Dia 14	<ul style="list-style-type: none"> Lavagens com solução salina Diluições sucessivas Repicar para placas 	<ul style="list-style-type: none"> Solução salina Água esterilizada Placas com meio de manutenção
Dia 17	<ul style="list-style-type: none"> Isolar colônias monozoospóricas 	<ul style="list-style-type: none"> Placas com meio de manutenção

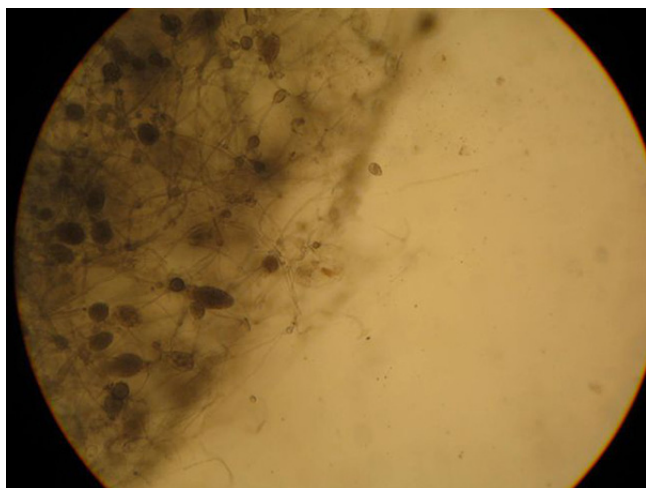


Fig. 9. Esporângios de *Phytophthora sojae*, produzidos com a técnica de obtenção de culturas monozospóricas. Aumento de 40 x.

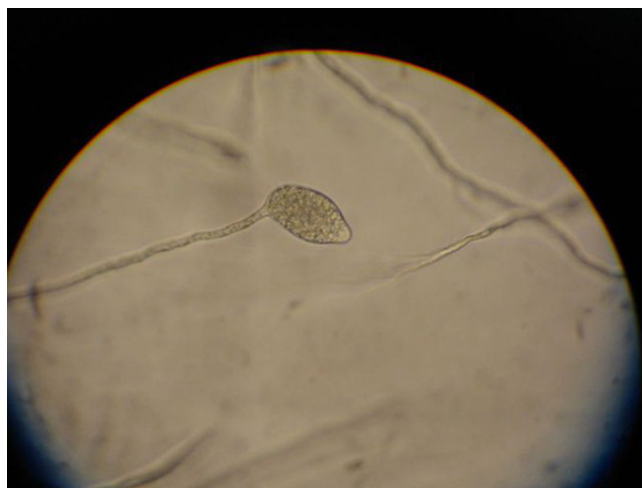


Fig. 10. Detalhe de esporângio de *Phytophthora sojae*. Aumento de 100x.



Fig. 11. Zoosporo de *Phytophthora sojae* (seta). Aumento de 100x.



Fig. 12. Zoosporos de *Phytophthora sojae* germinados (setas). Aumento de 100x.

Inoculação

Resistência completa através do teste do palito: metodologia adaptada de Keeling (1982), utilizada para seleção de genótipos de soja resistentes

Montagem de placa de palito de dente: são necessários dois moldes simetricamente perfurados; agulha histológica; placas de petri de vidro (9 cm diâmetro); disco de papel filtro (diâmetro menor que o fundo da placa de petri); pontas de palitos de dentes (menores do que a altura da placa) e alicate para cortar os palitos (Fig. 13). Posicionar o disco de papel entre os dois moldes perfurados, fazendo coincidir as perfurações. Com agulha histológica, furar o papel nas perfurações (evita que a ponta do palito seja dobrada ou partida). Posicionar uma ponta de palito em cada perfuração e fazer com que atravesse o papel, utilizando o lado oposto da agulha histológica para empurrar o palito. Quando o molde estiver completo, retirar cuidadosamente os moldes, com auxílio de agulha histológica. Colocar o disco de papel (com as pontas fixadas voltadas para cima) no fundo de placa de petri de vidro. Esterilizar o conjunto em autoclave por, no mínimo, 15 minutos a 127 °C. Verter meio de cultura de manutenção esterilizado em cada placa com palitos, de forma que cerca de 2 mm das pontas permaneçam para fora da superfície. Deixar solidificar. Repicar até cinco discos de micélio por placa, de colônias com pelo menos 10 dias de idade, posicionando a superfície colonizada para baixo. Levar à câmara de incubação (temperatura em torno de 25 °C) por 10 a 14 dias, até a colonização da ponta do palito.

Os testes são realizados em casa de vegetação, com temperatura variando entre 15 °C e 30 °C. Doze sementes de cada genótipo de soja são semeadas em substrato agrícola, contido em vasos plásticos de 500 mL de capacidade, preparando-se um vaso por genótipo. No mesmo dia, colônias do isolado Ps2.4/07 de *P. sojae* são repicadas para meio de cultura de manutenção, contendo pontas de palitos de dentes montadas, na vertical, com a ponta para cima, sobre base de papel filtro (Fig. 14). O isolado padrão Ps2.4/07 representa a população brasileira mais frequente deste patógeno (fórmula de virulência *Rps1d*, 2, 3b, 3c, 4, 5, 6, 7) (COSTAMILAN et al., 2013). As placas são mantidas em sala de incubação em temperatura de 25 °C ± 2 °C durante, aproximadamente, 14 dias, até colonização da extremidade do palito de dente (Fig. 15). A inoculação ocorre 14 dias após a semeadura, inserindo-se uma ponta de palito colonizada no hipocótilo de cada planta, aproximadamente 1 cm abaixo do nó cotiledonar, inoculando-se até 10 plantas por vaso (Fig. 16). A cultivar de soja BRS 244RR é usada como testemunha suscetível. Segue-se período de 48 h de alta umidade relativa, pela nebulização de água por 1 min a cada 3 min. A leitura da reação ocorre entre cinco e sete dias após a inoculação, contando-se o número de plantas mortas por vaso (Fig. 17). Considera-se resistente o genótipo que apresentar até 20% de plantas mortas, suscetível o genótipo com 80% ou mais de plantas mortas, e, com reação intermediária, entre 21% e 79% de plantas mortas (SLAMINKO et al., 2010).



Fig. 13. Materiais necessários para elaboração de placas de pontas de palitos.



Fig. 14. Placa de petri de vidro com pontas de palito montadas em base de papel.



Fig. 15. Aspecto de colônia de *Phytophthora sojae* em placa de palito de dentes, 14 dias após repicagem, para ser usada em inoculação.



Fig 16. Reação de suscetibilidade à *Phytophthora sojae* após inoculação pela técnica do palito de dente.



Fig. 17. Reações de suscetibilidade e de resistência de genótipos de soja após sete dias da inoculação de *Phytophthora sojae* pela técnica do palito de dente.

Resistência completa através do teste de injeção: as linhagens de soja são inoculadas através de introdução de macerado de micélio na haste, com o meio de cultura a seguir (SCHMITTHENNER; BHAT, 1994)

Tabela 7. Meio de cultura para inoculação por injeção (V8 mole ou extrato de tomate mole).

Produto	Quantidade
Suco V8 ou extrato de tomate	40 mL ou 40 g
Carbonato de cálcio	0,60 g
Extrato de levedura	0,20 g
Sacarose	1,00 g
Ágar	7,00 g
Água destilada	q.s.p. 1 L de solução

Modo de preparo: a água, o carbonato de cálcio e o suco V8 (ou extrato de tomate) são levados ao fogo até levantar fervura. Todos os ingredientes são misturados em erlenmeyer de 2 L e a mistura é autoclavada por 15 min a 127 °C. O meio pode ser resfriado em água corrente com agitação leve do erlenmeyer, até que seja possível seu manuseio. O meio é então vertido, em câmara de fluxo laminar, em placas de petri de vidro ou de plástico descartáveis novas. O meio contendo suco V8 produz menos micélio aéreo que o meio contendo extrato de tomate, o que facilita as inoculações por injeção.

O isolado de rotina Ps2.4/07 é repicado para meio suco V8 ou extrato de tomate mole, que corresponde ao meio de manutenção com 7,0 g de ágar/litro. Incubar por 10-14 dias a 25 °C ± 2 °C, sem necessidade de luz. No dia da inoculação, são cortadas tiras do meio de cultura com colônia, com auxílio de bisturi ou faca previamente flambados e resfriados. As tiras são colocadas dentro de seringa de 20 mL e, com o êmbolo, são prensadas em direção à extremidade sem agulha, macerando o meio com a colônia. Repete-se mais uma vez este processo e recarrega-se a seringa, acoplando agulha de 0,8 mm (18 gauge) (figs. 18 A-E).

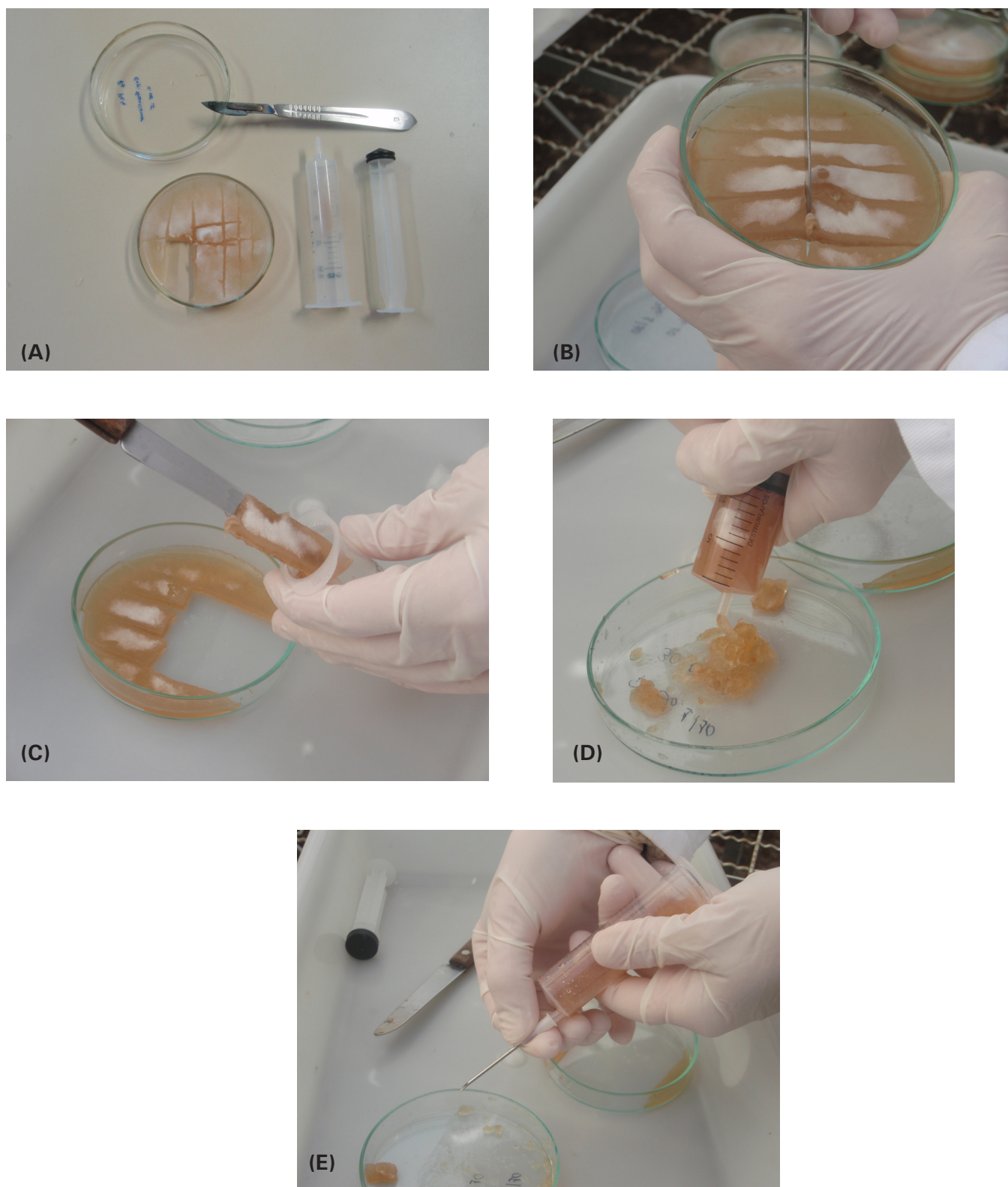


Fig. 18. Procedimentos para preparação de inóculo de V8 para inoculação de *Phytophthora sojae* em soja, pelo método de injeção. (A) material necessário; (B) corte de tiras de meio de cultura com micélio; (C) carregamento do corpo da seringa com tiras de meio de cultura e micélio; (D) prensagem do meio de cultura e micélio através da extremidade da seringa, com auxílio do êmbolo; (E) acoplamento de agulha 18 gauge, após recarregamento da seringa com o meio de cultura e micélio macerado.

Para a inoculação, fazer um corte no hipocótilo de até 1 cm de comprimento com a agulha, iniciando aproximadamente 0,5 cm abaixo dos cotilédones, e inserir na fenda cerca de 0,1 mL do macerado (Fig. 19). Inocular cinco a sete plântulas por patotipo, 10 a 12 dias após semeadura. Considera-se resistente o genótipo

que apresente até 20% de plantas mortas, suscetível o genótipo com 80% ou mais de plantas mortas, e, com reação intermediária, entre 21% e 79% de plantas mortas (SLAMINKO et al., 2010).

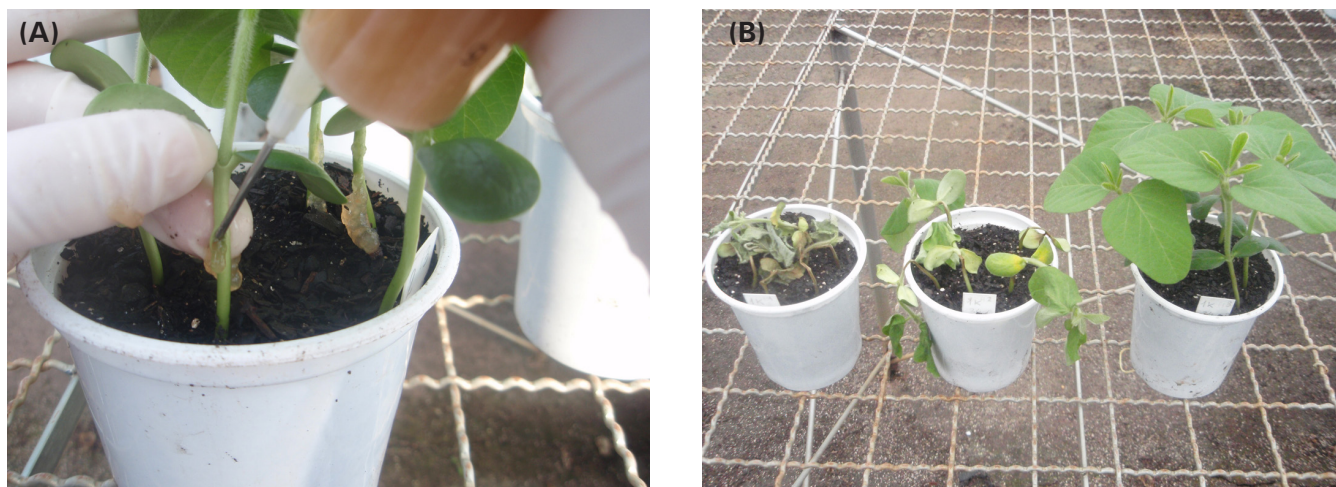


Fig. 19. (A) Inoculação de *Phytophthora sojae* pela técnica de injeção; (B) reação de suscetibilidade (esquerda e centro) e de resistência (direita) à inoculação de *Phytophthora sojae*.

Identificação do gene *Rps* presente em linhagens resistentes

Com o método de injeção, usam-se outros três patótipos da coleção da Embrapa Trigo, cada um com uma fórmula de virulência específica a genes *Rps*: patótipo R4 (*Rps*1a, 1c), Ps14.4 (*Rps*3a, 3b, 8) e Ps36.1 (*Rps*1b, 3a, 8) (Fig. 20). Sempre testar, no mesmo momento, as cultivares da série diferencial com genes *Rps*1a, 1c, 1k, 3a e 8, para conferir se os isolados continuam efetivos a estes genes. A cultivar BRS 244RR é usada como testemunha suscetível. O ambiente de casa de vegetação é mantido com elevada umidade relativa nas primeiras 48 h após a inoculação e a leitura da reação é realizada após sete dias. Considera-se resistente o genótipo que apresente até 20% de plantas mortas, suscetível o genótipo com 80% ou mais de plantas mortas, e, com reação intermediária, entre 21% e 79% de plantas mortas (SLAMINKO et al., 2010).

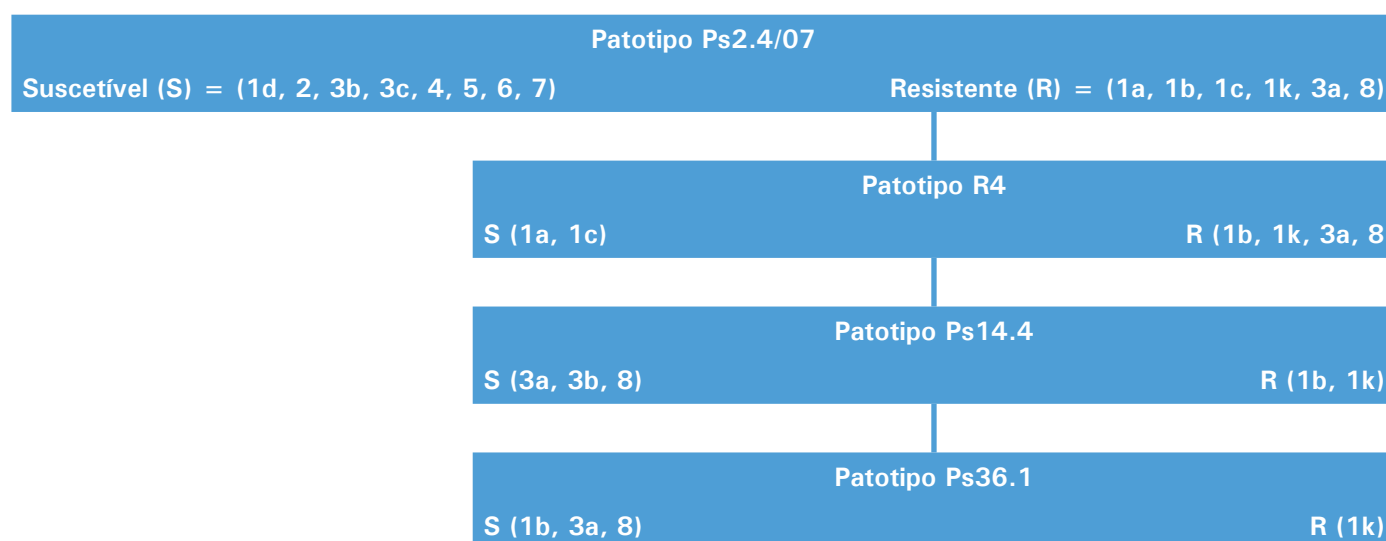


Fig. 20. Esquema de uso de patótipos de *Phytophthora sojae* para identificação de genes *Rps* em linhagens de soja, usado na Embrapa Trigo. Se, na sequência de isolados Ps2.4, R4, 14.4 e 36.1, as reações forem R-R-R-R, teremos *Rps*1k como gene efetivo; se for R-R-R-S, então *Rps*1b; se R-R-S-S, então *Rps*3a; se R-R-S-R, então *Rps*8; se R-S-...., então *Rps*1a ou 1c.

Resistência parcial através do método da camada de micélio: adaptado de Dorrance et al. (2003)

Utiliza-se disco de meio de cultura de manutenção, com colônia de *P. sojae* repicada há, pelo menos, dez dias. Os copos (cap. 500 mL) são preparados da seguinte forma: colocar cerca de 1 cm de vermiculita fina no fundo; umedecer com água; depositar sobre a mesma o disco inteiro de meio de cultura com a colônia desenvolvida até a borda (acertar o tamanho, se necessário, recortando as bordas), com o micélio voltado para cima; cobrir com nova camada de vermiculita (aproximadamente 5 cm a 7 cm); umedecer com água; posicionar cinco sementes na superfície; cobrir com 1 cm a 2 cm de substrato vegetal; umedecer com água (Fig. 21 A-E). Preparar três copos por linhagem além da cultivar de soja Conrad, testemunha padrão para alta resistência parcial. Usa-se o isolado Ps34.1, que apresenta fórmula de virulência mais completa entre os isolados da coleção da Embrapa Trigo: *Rps*1a, 1b (Intermediário), 1c, 1d, 1k, 2, 3a (Intermediário), 3b, 3c, 4, 5, 6 (Intermediário), 7 (COSTAMILAN et al., 2013).

Após 21 dias, as raízes são lavadas e avaliadas visualmente através da seguinte escala de notas (DORRANCE et al., 2003, com modificações): (1) sem raízes apodrecidas; (2) traços de apodrecimento; (3) massa de raízes com terço inferior apodrecido, (4) massa de raízes com dois terços inferiores apodrecidos; (5) todas raízes podres, além de 10% de plântulas mortas; (6) 50% de plântulas mortas, além de diminuição moderada de crescimento da parte aérea; (7) 75% de plântulas mortas, além de severa diminuição de crescimento; (8) de 90% a 100% de plântulas mortas (Fig. 22 A-H). Linhagens são consideradas com alta resistência parcial quando obtêm nota média até 4,0; com moderada resistência parcial, apresentando nota de 4,1 a 5,0; moderadamente suscetíveis, com nota até 6,0; e altamente suscetíveis, com nota acima de 6,0.

Identificação de patotipos de *P. sojae* (técnica adaptada de Schmitthenner & Bhat, 1994)

Utilizam-se cultivares de soja da série diferencial, composta por 14 genes *Rps*: PI 547677 (*Rps*1a), PI 547842 (*Rps*1b), PI 547834 (*Rps*1c), PI 103091 (*Rps*1d), Williams 82 (*Rps*1k), PI 547838 (*Rps* 2), PI 547862 (*Rps* 3a), PI 591509 (*Rps*3b), L92-7857 (*Rps*3c), L85-2352 (*Rps*4), PI 547876 (*Rps*5), PI 591511 (*Rps*6), Harosoy (*Rps*7) e PI 399073 (*Rps*8). Outras fontes conhecidas destes genes estão apresentadas na Tabela 8. A cultivar testemunha suscetível é BRS 244RR. Todas as cultivares da série diferencial são testadas em três repetições, com cinco sementes por vaso, em vasos de plástico (cap. 500 mL), com substrato vegetal. Plantas com 10 a 12 dias são inoculadas por injeção, incubadas em câmara úmida por 48 horas, com 100% de umidade relativa, pela nebulização de água, em temperatura variando entre 18 °C e 20 °C. Após, a temperatura pode variar entre 18 °C e 28 °C. A avaliação do número de plantas mortas ocorre entre 5 e 7 dias pós-inoculação. Cultivares entre 30% e 70% de plantas mortas (reação intermediária) são testadas mais duas ou três vezes. Os dados podem ser convertidos para código octal, com o programa Habgood-Gilmour Spreadsheet – HaGiS (HERRMAN et al., 1999). É baseado na reação incompatível a genes *Rps* ou resistência (0), e na reação compatível ou suscetibilidade (1) nas seguintes sequências triplas de genes *Rps*: 1a,1b,1c; 1d,1k,2; 3a,3b,3c; 4,5,6 e 7, 8. De acordo com a nomenclatura octal, um único número é dado para cada sequência tripla, baseado na reação de cada diferencial, com segue: 000 (= 0), 100 (= 1), 010 (= 2), 110 (= 3), 001 (= 4), 101 (= 5), 011 (= 6) e 111 (= 7). Por exemplo, um isolado com virulência 1d, 2, 3a, 7 será descrito como 05101 pelo código octal.

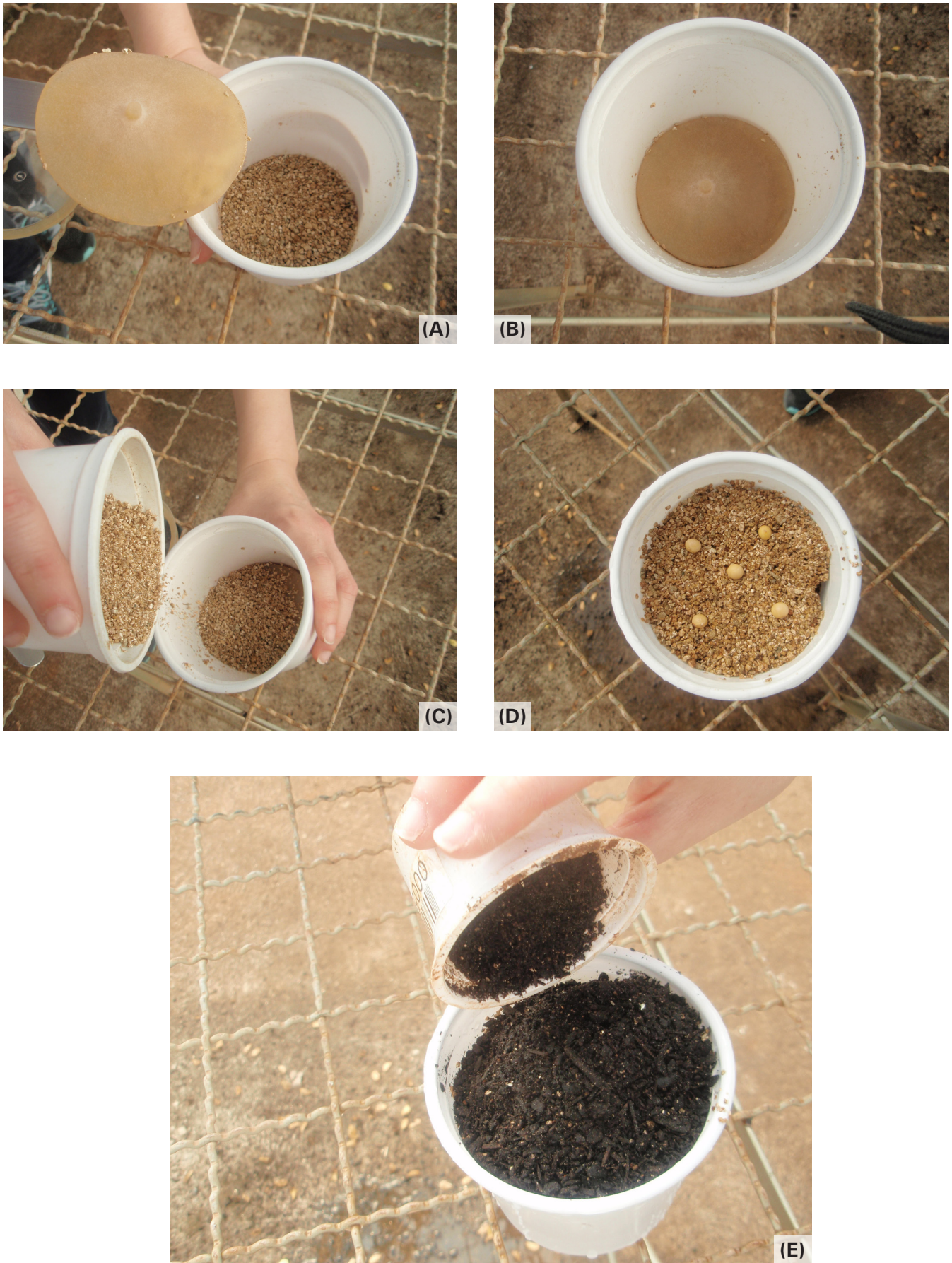









Fig. 21. Método de preparação de teste de avaliação de resistência parcial de genótipo de soja à *Phytophthora sojae*. (A) disco de meio de cultura, com colônia de *P. sojae*, sendo colocado sobre camada de vermiculita umedecida; (B) disco posicionado; (C) cobertura com nova camada de vermiculita (5 cm a 7 cm); (D) semeadura sobre camada umedecida de vermiculita; (E) cobertura das sementes com camada de substrato vegetal.

Escala visual	Descrição	Nota
 <p>(A)</p>	Sem raízes apodrecidas	1
 <p>(B)</p>	Traços de apodrecimento de raízes	2
 <p>(C)</p>	Massa de raízes com 1/3 inferior apodrecido	3

continua...

Escala visual	Descrição	Nota
 <p>(D)</p>	<p>Massa de raízes com 2/3 inferior apodrecido</p>	<p>4</p>
 <p>(E)</p>	<p>Todas raízes apodrecidas + 10% de plantas mortas</p>	<p>5</p>
 <p>(F)</p>	<p>Metade das plantas mortas + diminuição moderada de crescimento da parte aérea</p>	<p>6</p>
 <p>(G)</p>	<p>75% de plantas mortas + severa diminuição do crescimento</p>	<p>7</p>

continua...


Escala visual	Descrição	Nota
	De 90% a 100% de plantas mortas	8

Fig. 22. Escala de avaliação de reação de resistência parcial de soja à *Phytophthora sojae*, modificada de Dorrance et al.(2003). (A) nota 1; (B) nota 2; (C) nota 3; (D) nota 4; (E) nota 5; (F) nota 6; (G) nota 7; (H) nota 8.

Tabela 8. Cultivares ou linhagens de soja contendo genes *Rps*, usadas na série diferencial para teste de virulência de patótipos de *Phytophthora sojae*.

Gene <i>Rps</i>	Genótipo ou cultivar de soja	Fonte do gene <i>Rps</i>
<i>Rps</i> (suscetível)	Williams	-
	Sloan	-
<i>Rps1a</i>	L59-731 (PI 547677)	Blackhawk
	Harlon	Blackhawk
	Harosoy 12XX	Blackhawk
	Union	Mukden
	L88-8470 (PI 591505)	Mukden
<i>Rps1b</i>	L77-1863 (PI 547842)	Harrell
	Harosoy 13XX	Sanga

continua...

Tabela 8. continuação.

Gene <i>Rps</i>	Genótipo ou cultivar de soja	Fonte do gene <i>Rps</i>
<i>Rps1c</i>	L75-3735 (PI 547834)	Lee 68
	Williams 79	Lee 68
	L77-1727 (PI 547841)	Clark 63 (PI 229342)
	Mack	Lee 68
	Vickery	Mack
	Beeson 80	não conhecido
	L85-129 (PI 547791)	Higan
<i>Rps1d</i>	L99-3312	PI 103091
	PI 103091	PI 103091
	Haro16	PI 103091
<i>Rps1k</i>	L77-1794 (PI 547890)	Kingwa
	Williams 82	Kingwa
	Ancor 89	Williams 82
	Pella 86	Williams 82
	Resnik	não conhecido
<i>Rps2</i>	L76-1988 (PI 547838)	CNS
	L82-1449 (PI 547788)	CNS
<i>Rps3a</i>	L83-570 (PI 547862)	PI 86972-1
	PI 171442	PI 171442
	Chapman	não conhecido
<i>Rps3b</i>	L91-8347 (PI 591509)	PI 172901
	PRX-146-36	não conhecido
	L89-1541 (PI 591507)	PI 82.312N
<i>Rps3c</i>	L92-7857	PI 340046
	PRX-145-48	PI 340046
<i>Rps4</i>	L85-2352	PI 86050
<i>Rps5</i>	L85-3059 (PI 547876)	PI 91160
	L62-904	PI 91160
<i>Rps6</i>	L89-1581 (PI 591511)	Altona
	Harosoy 62XX	não conhecido
<i>Rps7</i>	L93-3258 (PI 591512)	Harosoy
	Harosoy	não conhecido
<i>Rps8</i>	PI 399073	não conhecido

Referências

BURNHAM, K. D.; DORRANCE, A. E.; FRANCIS, D. M.; FIORITTO, R. J.; ST. MARTIN, S. K. *Rps8*, a new locus in soybean for resistance to *Phytophthora sojae*. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 1, p. 101-105, 2003.

- COSTAMILAN, L. M. A podridão de raiz e de haste de soja. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Ed.). **Doenças causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas: Rural, 2001. p. 678-730.
- COSTAMILAN, L. M.; CLEBSCH, C. C.; SOARES, R. M.; SEIXAS, C. D. S.; GODOY, C. V.; DORRANCE, A. E. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* pathotypes from Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 4, p. 845-853, 2013. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s10658-012-0128-9>>. Acesso em: 29 ago. 2016.
- DORRANCE, A. E.; MCCLURE, S. A.; ST. MARTIN, S. K. Effect of partial resistance on *Phytophthora* stem rot incidence and yield of soybean in Ohio. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 3, p. 308-312, 2003.
- DORRANCE, S. E.; JIA, H.; ABNEY, T. S. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. *Plant Health Progress*, 2004. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/psojae>>. Acesso em: 25 ago. 2016.
- DORRANCE, A. E.; BERRY, S. A.; ANDERSON, T. R.; MEHARG, C. Isolation, storage, pathotype characterization and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybeans. **Plant Health Progress**, 2008. Disponível em: <<https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2008/soybean>>. Acesso em: 25 ago. 2016.
- FRY, W. E.; GRÜNWARD, N. J. Introduction to oomycetes. In: THE PLANT health instructor. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2010. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/introoomycetes.aspx>>. Acesso em: 29 ago. 2016.
- HARTMAN, G. L. Worldwide importance of soybean pathogens and pests. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. **Compendium of soybean diseases**. 5. ed. St. Paul: APS Press, 2015. p. 4-5.
- HERRMANN, A.; LÖWER, C. F.; SCHACHTEL, G. A. A new tool for entry and analysis of virulence data for plant pathogens. **Plant Pathology**, London, v. 48, n. 2, p. 154-158, 1999.
- JACKSON, T. A.; KIRKPATRICK, T. L.; RUPE, J. C. Races of *Phytophthora sojae* in Arkansas soybean fields and their effects on commonly grown soybean cultivars. **Plant Disease**, St. Paul, v. 88, n. 4, p. 345-351, 2004.
- KEELING, B. L. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 72, n. 7, p. 807-809, 1982.
- MIDEROS, S.; NITA, M.; DORRANCE, A. E. Characterization of components of partial resistance, *Rps2*, and root resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, n. 5, p. 655-662, 2007.
- MYCOBANK DATABASE. **Phytophthora sojae**. Utrecht: International Mycological Association, 2016. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=21677&Fields=All>>. Acesso em: 30 ago. 2016.
- ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E. Why are *Phytophthora* and other oomycota not true fungi? In: THE PLANT health instructor. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2016. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/oomycetes.aspx>>. Acesso em: 25 ago. 2016.
- SCHMITTHENNER, A. F.; BHAT, R. G. **Useful methods for studying Phytophthora in the laboratory**. Wooster: Ohio Agricultural Research and Development Center, 1994. (Special circular, 143).
- SCHMITTHENNER, A. F.; HOBE, M.; BHAT, R. G. *Phytophthora sojae* races in Ohio over a 10-year interval. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 3, p. 269-276, 1994.
- SCHMITTHENNER, A. F.; DORRANCE, A. E. *Phytophthora* root and stem rot. In: HARTMAN, G. L.; RUPE, J. C.; SIKORA, E. J.; DOMIER, L. L.; DAVIS, J. A.; STEFFEY, K. L. **Compendium of soybean diseases**. 5. ed. St. Paul: APS Press, 2015. p. 73-76.

SLAMINKO, T. L.; BOWEN, C. R.; HARTMAN, G. L. Multi-year evaluation of commercial soybean cultivars for resistance to *Phytophthora sojae*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 94, n. 3, p. 368-371, 2010.

TOOLEY, P. W. Use of uncontrolled freezing for liquid nitrogen storage of *Phytophthora* species. **Plant Disease**, St. Paul, v. 72, n. 8, p. 680-682, 1988.

WILCOX, J. R.; ST. MARTIN, S. K. Soybean genotypes resistant to *Phytophthora sojae* and compensation for field losses of susceptible isolines. **Plant Disease**, St. Paul, v. 82, n. 3, p. 303-306, 1998.

WORKNEH, F.; TYLKA, G. L.; YANG, X. B.; FAGHIHI, J.; FERRIS, J. M. Regional assessment of soybean brown stem rot, *Phytophthora sojae*, and *Heterodera glycines* using area-frame sampling: prevalence and effects of tillage. **Phytopathology**, St. Paul, v. 89, n. 3, p. 204-211, 1999.

Embrapa

Trigo