

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CAROLINE DE MARCHI BORDON

Análise molecular, características morfológicas e reações de cultivares de soja à
Phytophthora sojae

MARINGÁ
2013

CAROLINE DE MARCHI BORDON

Análise molecular, características morfológicas e reações de cultivares de soja à
Phytophthora sojae

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agronomia do
Departamento de Agronomia, Centro de
Ciências Agrárias da Universidade Estadual de
Maringá, como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Agronomia

Área de concentração: Proteção de
Plantas

Orientador: Prof. Dr. João Batista
Vida

MARINGÁ
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINE DE MARCHI BORDON

Análise molecular, características morfológicas e reações de cultivares de soja à
Phytophthora sojae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Wilson Story Venâncio
Universidade Estadual de Ponta Grossa (Presidente)

Dr. Ricardo Ribeiro de Oliveira
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. João Batista Vida
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2013.

Local da defesa: Anfiteatro II, Bloco J-45, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos que fizeram parte da minha vida durante essa trajetória, a Deus, aos meus Pais e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sem Ele nada faz sentido de existir.

Aos meus pais, pelo incentivo, apoio e esforço; faço da minha conquista a deles também.

Ao Professor Dr. João Batista Vida, pela confiança depositada, pelos subsídios fornecidos, pela orientação e auxílio.

Ao pesquisador Dr. Ricardo Ribeiro de Oliveira, pela ajuda, coorientação, conselhos e amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelos serviços prestados e oportunidade de formação.

À Dra. Leila Maria Costamilan, Dra. Anne E. Dorrance, Dra. Caroline Goulart, Dra. Tatiane Dalla Nora Montecelli e ao Dr. Rudimar Mafacioli, pelo apoio prestado.

À funcionária do Laboratório de Fitopatologia Vilma Pereira de Melo, pelo inestimável incentivo, ajuda nos experimentos, conselhos e amizade.

Ao funcionário Mauro Moreira, pelo auxílio nos experimentos, dedicação e amizade.

Aos amigos, Rodrigo Oliveira, Aniele Andrade, Gabriela Moura, Renata de Guimarães, Patrícia Carnelossi, Danilo Neves, pela parceria, colaboração no trabalho, amizade e momentos de descontração.

As estagiárias do Laboratório de Fitopatologia Carla e Jéssica, pela ajuda e dedicação.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação, pelos ensinamentos e conselhos.

A todos os funcionários do Departamento de Agronomia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos os colegas conquistados ao longo do curso.

A todos, que de alguma forma, estiveram presentes durante esse período.

À CAPES, pela bolsa de estudos fornecida ao longo desse trabalho.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)

Análise molecular, características morfológicas e reações de cultivares de soja à *Phytophthora sojae*

RESUMO

A soja (*Glycine max.* (L.) Merr.) é uma espécie pertencente à família das leguminosas (Fabaceae), originária na costa leste da Ásia. Foi introduzida no Brasil em 1882 e se tornou um dos principais produtos agrícolas. Seu cultivo gerou ao País uma posição de destaque no agronegócio mundial, tornando-o um grande produtor e exportador de grãos e subprodutos. A podridão por *Phytophthora* na soja é uma doença que acomete a cultura em qualquer estágio de desenvolvimento, ocasionando sintomas de podridão de sementes, tombamento, podridão radicular e da haste. Seu desenvolvimento é favorecido por condições de solos argilosos, compactados e sujeitos a prolongados períodos de saturação por umidade. Existem relatos de ocorrência da doença em diversas regiões produtoras de soja no mundo, que resulta em grandes perdas de produtividade e danos econômicos aos produtores. O principal agente causal da doença é a espécie *Phytophthora sojae*, apesar de relatos de outra espécie envolvida no patossistema em países como Estados Unidos e China. A população do patógeno possui grande variabilidade patogênica e isso leva a existência de muitos patótipos. O principal meio de controle da doença é a resistência genética, com o uso cultivares de soja com genes de resistência (*Rps*) contra o patógeno. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi reunir uma coleção de isolados brasileiros de *P. sojae* de diferentes regiões do país; realizar uma análise molecular relacionada à sua identificação, caracterizar morfológicamente suas estruturas, e avaliar as reações de cultivares de soja comerciais, recomendadas para o Sul do País na safra de 2012/2013, aos isolados obtidos. Para tanto, avaliaram-se 10 isolados procedidos dos Estados do Paraná e Rio Grande do Sul. A identificação molecular dos isolados teve como intuito a verificação da espécie, com base na técnica de PCR, com o uso de ‘primers’ específicos (PSOJF1 e PSOJR1) desenvolvidos para a região ITS do DNA ribossômico do patógeno, sendo obtidos resultados de confirmação da espécie *P. sojae* para todos. Na caracterização morfológica, os padrões observados foram os mesmos descritos para a espécie, consistindo de esporângios persistentes, predominantemente ovoides, não papilados, com dimensões entre 34,9 - 56,6 x 24,7- 33,2 µm. Os anterídios foram, predominantemente, anfígenos e os oósporos variaram de 17,1 a 39,1 µm de diâmetro. Quanto à resistência, as 36 cultivares comerciais apresentaram grande variabilidade de reações resistentes, suscetíveis e

intermediárias. A cultivar BRS 282 foi suscetível a todos os isolados avaliados, ao contrário dos cultivares CD 230, TMG 7161, SD 688, SD 615 RR, BMX Alvo e SD 60A02i que apresentaram resistência a todos isolados. As demais cultivares exibiram uma resposta suscetível ou intermediária para pelo menos um isolado avaliado. Os isolados do Paraná P.S. 9.1, P.S. 24.1 e P.S. 15.2, respectivamente, foram responsáveis por infectar o maior número de cultivares dentre as avaliadas.

Palavras-chave: Oomicetos. Podridão de fitóftora. Podridão radicular e da haste da soja.

Molecular analysis, morphologic characteristics and soybean cultivars reactions'
to *Phytophthora sojae*

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max.* (L.) Merr.) belongs to Fabaceae family originated from east coast of Asia. It was introduced in Brazil in 1882, becoming currently one of the major agricultural products of the Country. The cultivation of soybean led the country to a prominent position in global agribusiness, making it a major producer and exporter of grain and byproducts. *Phytophthora* rot in soybean can affect the crop at any stage of development, causing symptoms of rot seeds, tipping, root and stem rot. Their development is favored by conditions of clay soils, compacted and subjected to prolonged periods of moisture saturation. The occurrence of the disease has been reported in several soybean producing regions in the world which resulted in large productivity losses and economic damage to farmers. The main causal agent of the disease was recognized as *Phytophthora sojae*, despite reports of other species involved in the pathosystem in countries like United States and China. Pathogen's population has high pathogenic variability showing the existence of many pathotypes. The main tool to control the disease is genetic resistance that use soybean cultivars with resistance genes (*Rps*) against the pathogen. The objective of the study was to gather a collection of brazilian *P. sojae* isolates; to make a molecular analysis regarding its identification, to make a morphological characterization of their structures; and evaluate the commercial soybean cultivars reactions recommended for the South Brazil in crop year 2012/2013, for the isolates. Therefore, 10 isolates originated from Paraná and Rio Grande do Sul State were evaluate. The molecular analysis for identification was made by PCR technique with specific primers (PSOJF1 and PSOJR1) developed on the ITS region from pathogen ribosomal DNA and it was obtained specie confirmation of *P. sojae* for all. The morphological patterns observed were the same described for the *P. sojae* species, consisting of sporangia persistent; predominantly ovoid, not papillate, with sizes ranging from 34.9 to 56.6 x 24.7 to 33.2 µm. The antherides were predominantly anfigenous and oospores ranged from 17.1 to 39.1 µm in diameter. The pathogenicity analysis showed high variability to 36 commercial cultivars with resistant, intermediate and susceptible reactions. The BRS 282 was susceptible to all isolates, unlike cultivar CD 230, TMA 7161, SD 688, SD 615 RR, BMX and SD 60A02i were resistant to all. The others cultivars had one intermediate or susceptible response for at least

one isolate evaluated. Isolates from Paraná, PS 9.1, PS 24.1 and P. S 15.2 were responsible for infecting the largest number of cultivars among those evaluated.

Keywords: Oomycetes. *Phytophthora* rot. Root and stem rot of soybean.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Isolados de <i>Phytophthora sojae</i> , procedência e fonte de aquisição.	12
Tabela 2 Relação de cultivares utilizadas para o teste de reação cultivares aos isolados de <i>Phytophthora sojae</i>	18
Tabela 3 Formato das colônias e aspecto micelial dos isolados de <i>Phytophthora sojae</i>	23
Tabela 4 Dimensões do oogônio de oósporo e posição do anterídios de isolados de <i>Phytophthora sojae</i> em meio de cultura cenoura-ágar.....	26
Tabela 5 Dimensões e formas predominantes de esporângios de isolados de <i>Phytophthora sojae</i> produzidos em meio líquido de extrato de solo não autoclavado.....	29
Tabela 6 Dimensões de clamidósporos de isolados <i>Phytophthora sojae</i> produzidos em meio líquido de extrato de solo não autoclavado.	31
Tabela 7 Reação de cultivares de soja aos diferentes isolado de <i>Phytophthora sojae</i>	39
Tabela 8 Representação das reações de cultivares de soja à inoculação de isolados de <i>Phytophthora sojae</i>	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Procedência dos isolados dos Estados do Paraná (direita) e Rio Grande do Sul (esquerda).	13
Figura 2 Gel de agarose com os produtos de amplificação por PCR obtidos com o par de 'primers' PSOJF1 e PSOJR1, compreendendo a região ITS do rDNA específico para a espécie <i>Phytophthora sojae</i> . (PS 1 – PS 24.1↔) Isolados para confirmação da espécie <i>sojae</i> ; (P70 e P97) Isolados de <i>Phytophthora</i> sp. oriundos de outros hospedeiros; (M) Marcador Molecular Ladder – 100 pb.	21
Figura 3 Formato das colônias de <i>Phytophthora sojae</i> em meio de cultura cenoura-ágar a 25°C por sete dias. (A) concêntrico; (B) concêntrico para estrelado; (C) cotonoso; (D) irregular e (E) rosáceo.	24
Figura 4 Oogônios, Oósporos e anterídios de <i>Phytophthora sojae</i> . (A e B) anterídios paráginos e (C e D) anterídios anfígenos.....	27
Figura 5 Esporângios de <i>Phytophthora sojae</i> produzidos em meio líquido de extrato de solo não autoclavado. Formas (A) Irregular; (B) Elipsóide; (C) Obpiriforme e (D) Ovóide.	30
Figura 6 Clamidósporo de <i>Phytophthora sojae</i> produzido em meio líquido de extrato de solo não autoclavado.	32
Figura 7 Características de formação de esporângios de <i>Phytophthora sojae</i> (A, B) formação individual; (C,D) esporângio de repetição – proliferação interna.	33
Figura 8 Cultivares de soja inoculadas com <i>Phytophthora sojae</i> . À esquerda testemunha e a direita cultivar avaliada. (A) Cultivar suscetível; (B) Cultivar resistente; (C) Cultivar Intermediária.....	34
Figura 9 Sintomas de podridão de <i>Phytophthora</i> em cultivar de soja suscetível.....	35
Figura 10 Cultivar de soja resistente à inoculação de <i>Phytophthora sojae</i>	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	A soja	4
2.2	A podridão da raiz e da haste da soja (podridão de fitóftora)	5
2.3	O gênero <i>Phytophthora</i>	7
2.4	<i>Phytophthora sojae</i>	8
2.5	Patogenicidade	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Localização e período do experimento	12
3.2	Obtenção e preservação dos isolados	12
3.3	Identificação molecular	13
3.3.1	Obtenção de micélio	13
3.3.2	Extração de DNA	13
3.3.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	14
3.3.4	Eletroforese em gel de agarose	15
3.4	Análise morfológica	15
3.4.1	Aspectos da colônia	15
3.4.2	Dimensão dos oogônios e oósporos e morfologia dos anterídios	16
3.4.3	Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos	16
3.4.4	Ontogenia de esporângios	17
3.5	Reação de cultivares de soja	17
3.5.1	Obtenção de cultivares de soja	17
3.5.2	Preparação do inóculo e inoculação	18
3.5.3	Avaliação	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1	Análise Molecular	21
4.2	Caracterização morfológica	23
4.2.1	Aspectos da colônia	23
4.2.2	Dimensão dos oogônios e oósporos e morfologia dos anterídios	25
4.2.3	Dimensão e morfologia de esporângios e clamidósporos	28
4.2.4	Ontogenia de esporângios	32

4.3	Reação de cultivares de soja	34
5	CONCLUSÃO	45
6	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max.* L. Merr.), espécie pertencente à família das leguminosas (Fabaceae), é considerada a mais importante oleaginosa cultivada do mundo, constituindo-se a principal atividade agrícola do Brasil e também a mais expressiva economicamente (EMBRAPA SOJA, 2011). Seus grãos são usados pela agroindústria (produção de óleo vegetal e rações para alimentação animal), indústria química e de alimentos, além do crescente uso como fonte alternativa de biocombustível (COSTA NETO; ROSSI, 2000).

Atualmente, o Brasil ocupa o segundo lugar em produção de soja segundo o relatório da USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) de 2012, sendo o principal produto agrícola do país, com 24,05 milhões de hectares plantados. O cultivo da soja é considerado o principal responsável pela expansão da fronteira agrícola no país, estendendo-se as diversas regiões, sendo elas, Sul, Sudeste, Centro-Oeste, além das regiões Norte e Nordeste (SEAB, 2012; YORINORI, 1996).

Paralelamente à expansão da cultura da soja no mundo, observa-se o crescente aumento dos problemas fitossanitários que limitam o rendimento da cultura. Henning (2009) relatou estimativa de redução na produtividade variando de 15 a 20% anualmente devido à ocorrência de doenças. Nesse contexto, insere-se a podridão de fitóftora (agente causal classificado como *Phytophthora sojae* Kaufmann e Gerdemann) uma doença típica em solos pesados, sujeitos ao encharcamento.

Esse patógeno pode acometer o hospedeiro em qualquer fase da cultura, causando desde o apodrecimento de semente no solo, morte de plântulas em pré e pós-emergência e, em plantas adultas, o apodrecimento de raízes, levando à murcha e morte das mesmas (HENNING, 2009; COSTAMILAN; BERTAGNOLLI; MORAES, 2007; DORRANCE et al., 2008). Dorrance e Mills (2009) descreveram como sintomas da doença o tombamento, podridão da raiz e da haste da soja visíveis em plântulas e plantas mais velhas. Em plântulas, os sintomas observados assemelham-se aqueles causados por *Phytium* spp., com coloração marrom por toda a plântula e murcha seguida de morte. As plantas mais velhas possuem como sintoma característico a fase de podridão da haste depois do desenvolvimento das primeiras folhas, apresentando lesões de coloração marrom chocolate que se desenvolvem da base da planta até a haste iniciando-se em qualquer ponto da raiz, hipocótilo ou cotilédones.

A severidade da doença está diretamente relacionada com o período de exposição a solos saturados, bem como a suscetibilidade da cultivar (DORRANCE et al., 2008), podendo causar perdas de 100% em cultivares com alta suscetibilidade (SCHMITTHENNER, 1999).

P. sojae é pertence ao grupo dos Oomicetos, constituindo uma das mais de 80 espécies do gênero que causam doenças destrutivas em uma ampla gama de hospedeiros (TYLER, 2007; ERWIN; RIBEIRO, 1996). O referido patógeno está estritamente relacionado à soja, sendo considerado seu hospedeiro primário, embora haja relatos de infecção em algumas espécies de trevoço (TYLER, 2007).

A doença de podridão radicular e da haste da soja pode apresentar a associação de outras espécies de *Phytophthora*, como a *P. sansomeana*, fato esse relatado em países como Estados Unidos e China (HAMM; HANSEN, 1981; MALVICK; GRUNDEN 2004; REESER; HANSEN, 2009; TANG et al. 2010; ZELAIA-MOLINA et al. 2010; SMITH, 2012)

Na taxonomia tradicional, os caracteres morfológicos foram principalmente utilizados para classificar as espécies de *Phytophthora*, baseados nas dimensões e formas de esporângios, anterídios, clamidósporos, oósporos e oogônios que os separam em grupos morfológicos (WATERHOUSE, 1963). Porém, tal classificação não é considerada precisa, visto a existência de muitas espécies similarmente morfológicas, além da atipicidade de alguns isolados dentro de uma mesma espécie, dificultando, assim, tal procedimento. Esses critérios podem ser utilizados como auxílio, parâmetro, ou dados para uma integração morfológica/molecular na identificação e/ou caracterização de uma espécie (ABAD, 2008).

A população de *P. sojae* é composta de cerca de 70 raças fisiológicas ou patogênicas descritas, baseadas na virulência em um conjunto de variedades de soja diferenciadoras (DORRANCE; MILLS 2009). Cada raça do patógeno resulta em uma reação específica com a cultivar de soja de acordo com o(s) gene(s) de resistência (*Rps*) que essa possui (TYLER, 2007).

O conhecimento da variabilidade patogênica de *P. sojae* em um dado ambiente é essencial para o manejo da doença. O principal método de controle utilizado, a resistência genética, parte do pressuposto do conhecimento prévio acerca da população patogênica e a maneira com que ela varia em determinada região ao longo do tempo. Tais conhecimentos aliados aos programas de melhoramento genético de cultivares são determinantes para um controle efetivo do patógeno.

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi reunir uma coleção de isolados brasileiros de *P. sojae*, analisar a espécie quanto à sua identificação com o uso da técnica molecular de PCR, mensurar as características morfológicas de estruturas reprodutivas e vegetativas, e avaliar a resistência de cultivares comerciais de soja recomendados para a região Sul do Brasil, na safra de 2012/2013, para os isolados obtidos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A soja

A soja (*Glycine max.* (L.) Merr. é uma espécie pertencente à família das leguminosas (Fabaceae), originária na costa leste da Ásia, mais precisamente na China, cuja evolução se deu pelo cruzamento natural de duas espécies de soja selvagem, que, posteriormente, foi domesticada e melhorada por cientistas chineses visando o uso na alimentação (EMBRAPA SOJA, 2011). O gênero *Glycine* Wild. é dividido em dois subgêneros *Glycine* e *Soja*, sendo que no gênero *Soja* pertence a espécie anual *Glycine max* comercialmente explorada (BORÉM, 2009).

A importância da soja está associada ao fato dos grãos serem utilizados como fonte de proteínas para animais e humanos e possuir uma composição química quase completa, sendo um alimento essencialmente fornecedor de proteínas, ácidos graxos saturados e insaturados, algumas vitaminas, além de possuir compostos polifenólicos, como as isoflavonas (ÁVILA, 2007).

A introdução da cultura no Brasil ocorreu em 1882, proveniente dos Estados Unidos para avaliações de adaptação da cultura, a princípio como cultura forrageira. Em 1914, registrou-se o primeiro cultivo de soja no país no município de Santa Rosa no Rio Grande do Sul, lugar onde as variedades trazidas dos Estados Unidos melhor se adaptaram às condições edafoclimáticas, principalmente em relação ao fotoperíodo (BONETTI, 1981), surgindo como opção para a sucessão do trigo no inverno e ganhando destaque progressivo com o passar dos anos (EMBRAPA SOJA, 2011)

A efetiva expansão da soja ocorreu na década de 70, quando a cultura consolidou-se devido à política de subsídios ao trigo, visando a autossuficiência do país na produção desse grão. Posteriormente, motivada por interesses do mercado interno e externo, a soja se tornou o principal produto agrícola do país, com cultivo estendendo-se em diversas regiões do país como sul, sudeste, centro-oeste além de outras regiões como o norte e nordeste (SEAB, 2012; APROSOJA, 2012), e com uma estimativa de produção de 24,05 milhões de ha plantados em 2012 (USDA, 2012).

Nas décadas de 1960 e 1970, a região Sul do País, representadas pelos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, era a principal responsável pela produção da soja. Porém, a partir dos anos de 1980, o Mato Grosso assumiu a posição de destaque na produção nacional, juntamente com regiões do cerrado, como Triângulo Mineiro, Mato Grosso do Sul,

Goiás, Tocantins, Sul do Maranhão, Sul do Piauí e Oeste da Bahia (APROSOJA, 2012), atribuindo à sojicultora o fator responsável pela expansão de fronteiras agrícolas no país. Segundo informações da Conab (2012), na safra de soja 2011/2012, o Estado do Mato Grosso foi o maior produtor nacional de soja, com uma produção estimada de 21,85 milhões de toneladas, seguido pelo Paraná com 10,94 milhões de toneladas de soja produzidas.

Segundo o relatório da USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) de 2012, os Estados Unidos ocupam a posição de maior produtor mundial de soja com 84,19 milhões de toneladas, seguido pelo Brasil 66,5 milhões de toneladas e Argentina com 40,1 milhões de toneladas, na safra de 2011/2012.

O crescimento da cultura da soja no país esteve sempre associado aos avanços científicos, disponibilização de tecnologias e incentivos ao setor produtivo. A mecanização, o melhoramento genético visando aumento na produtividade e adaptação às diversas regiões, o desenvolvimento de pacotes tecnológicos relacionados ao manejo de solos, o manejo de adubação, calagem, pragas e doenças, além da identificação e solução para os principais fatores responsáveis por perdas no processo de colheita são fatores promotores que colaboraram para o avanço da cultura (FREITAS, 2012).

Como principal item na Balança Comercial Brasileira, as exportações de grão, farelo e óleo de soja foram responsáveis por US\$ 15,9 bilhões no ano de 2012. A indústria nacional transforma, por ano, cerca de 30,7 milhões de toneladas de soja, produzindo 5,8 milhões de toneladas de óleo comestível e 23,5 milhões de toneladas de farelo proteico, contribuindo para a competitividade nacional na produção de carnes, ovos e leite (MAPA, 2012).

A soja é, majoritariamente, usada como insumo para a produção animal na forma de farelos e para a indústria de óleos e gorduras, que juntos consomem mais de 90% da produção. Pode-se relatar o uso do grão da soja na agroindústria de alimentos e na indústria química, compondo ingredientes de pães, massas, bebidas, além de adesivos, nutrientes, adubos, espumas, papel, biodiesel, lubrificantes, entre outros (EMBRAPA SOJA, 2012).

2.2 A podridão da raiz e da haste da soja (podridão de fitóftora)

A podridão da raiz e da haste da soja teve o seu primeiro relato de ocorrência em 1948, no estado de Indiana, nos Estados Unidos, e em 1951 severos danos foram observados ocasionando elevadas perdas nas lavouras no estado de Ohio. Primeiramente, sua etiologia não foi elucidada e os sintomas foram associados aos fitopatógenos *Fusarium* e *Diaporthe*.

Em 1954, o agente causal da doença foi associado a *Phytophthora*, na Carolina do Norte e Ohio, contudo, sendo descrito como *P. cactorum* (SCHMITTHENNER, 1985).

Desde então, a doença tem sido relatada em diversos países, como Brasil, Argentina, Chile, Canadá, Japão, China, França, Itália, Rússia, Irã, Paquistão, entre outros, sendo considerada altamente cosmopolita (SCHMITTHENNER, 1985; CAB Internacional, 2006; COSTAMILAN; BERTAGNOLLI; MORAES 2007; EPPO, 2009). Nos Estados Unidos e Canadá, a doença é relatada em todas as regiões produtoras de soja (DORRANCE, 2008).

No Brasil, o primeiro relato da doença ocorreu no Rio Grande do Sul na safra de 1994/1995 e, posteriormente, em Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul (COSTAMILAN; BONATO 1996; PACHECO, 1998; COSTAMILAN, 2001).

O patógeno pode infectar plantas de soja em qualquer estágio de desenvolvimento desde a emergência até plantas adultas. Em plantas jovens, observa-se um rápido amarelecimento e murchamento, acompanhados por uma podridão mole e um colapso da raiz (TYLER, 2007; DORRANCE; MILLS 2009). Plantas mais velhas apresentam redução de vigor, um amarelecimento generalizado das folhas mais baixas que progride por toda a planta, seguida de murchamento e morte. O sistema radicular é severamente afetado, de tal forma que as raízes laterais são quase completamente deterioradas (DORRANCE; MILLS 2009).

Drapper e Chase (2001) descreveram os sintomas da podridão radicular e da haste de fitóftora de acordo com os estágios de desenvolvimento da cultura, os quais se dividem: fase da podridão de sementes, onde os sintomas da infecção ocorrem depois do intumescimento da semente e antes da germinação; a fase de tombamento (damping-off), que ocorre após a emergência a qual leva a planta rapidamente a murchar e morte e pode tornar o tecido do hipocótilo escuro com aspecto encharcado; e a fase de podridão de caule e raiz, onde o patógeno invade a planta através das raízes e cresce dentro da haste inferior, e com a progressão da doença os sintomas se manifestam como uma descoloração marrom-escuro da porção inferior da haste que se desenvolve ao longo do caule da planta a partir do nível do solo. Nesta última fase a planta infectada apresentará sintoma de murcha das folhas, pecíolos e queda das folhas, começando da parte inferior da planta e progredindo para cima da haste. As folhas de plantas murchas podem desenvolver um aspecto acinzentado e murchas amareladas antes da murcha permanente.

Além dos sintomas mencionados, uma descoloração interna pode se estender dentro do hipocótilo, tornando-se externa na superfície apenas abaixo do nó cotiledonar, que forma uma lesão anelada que destrói o hipocótilo e leva a planta à morte (SCHMITTHENNER,

1985). O melhor sintoma diagnóstico da doença em variedades suscetíveis é uma descoloração marrom-escura da haste que pode se estender a vários nós no caule (DORRANCE; MILLS, 2009).

De acordo com Schmitthenner (1999) e Wang et al. (2006), a podridão por fitóftora é considerada uma das doenças mais destrutivas de soja, podendo causar reduções de rendimento de grãos de até 100% em cultivares altamente suscetíveis em áreas que recebem chuva intensa. As perdas são decorrentes de falhas de estande, da necessidade de realizar operações de ressemeadura e da redução de peso e de produção de grãos.

Nos Estados Unidos, a doença já foi considerada a segunda maior responsável por perdas na produção de soja no período de 1999 a 2002 com um prejuízo calculado na época de 252,1 milhões de dólares (216 dólares/ton.) (WRATHER; KOENNING; ANDERSON, 2003) e entre 2003 e 2005 uma estimativa de prejuízos em torno de 251,6 milhões de dólares (WRATHER; KOENNING, 2006).

No Brasil, o primeiro relato de perdas significativas pela doença ocorreu na safra de 2006/2007, sendo relatada em várias lavouras do Rio Grande do Sul e do Paraná, que provocou tombamento de plantas em pós-emergência, em locais de solo compactado, levando às falhas de estande inicial, à ressemeadura de áreas extensas e à morte de plantas adultas (COSTAMILAN; BERTAGNOLLI; MORAES, 2007).

2.3 O gênero *Phytophthora*

O gênero *Phytophthora* (significado: destruidor de plantas) foi estabelecido por Anton de Bary, em 1875, retratando a devastação provocada por *P. infestans* nos batatais da Irlanda. O gênero abrange cerca de 80 diferentes espécies, associadas a uma vasta gama de hospedeiros, constituindo mais de mil patossistemas, muitos deles afetando culturas economicamente importantes no Brasil e no mundo (LUZ; MATSUOKA, 2001).

Segundo a classificação mais recente de Alexopoulos, Mims e Blackwell (1996), o gênero *Phytophthora* pertence ao Reino Stramenopila, Filo Oomycota, Classe dos Oomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae. O Filo Oomycota possui características que o aproxima dos organismos pertencentes ora de vegetais, ora de fungos, tais como a presença de celulose nas paredes celulares e características de DNA, além de algas diatomáceas e marrons (DEACON, 1997). Embora não sejam considerados fungos

verdadeiros, a menção a este não é considerado errônea, visto a semelhança estrutural e importância fitopatogênica que possuem.

Os oomicetos estão associados aos hábitos aquáticos, suas paredes celulares são compostas de glucano e celulose ao invés de quitina como os fungos, além do seu estágio vegetativo diploide ao contrário de haploides para fungos verdadeiros (STEWART, 2011).

Como características principais do gênero, aponta-se a presença de micélio cenocítico, ou seja, com hifas asseptadas e tipicamente diploide na maior parte do ciclo de vida, podendo se reproduzir assexuadamente. Produzem diferentes tipos de esporos, como os zoósporos móveis, produzidos e diferenciados dentro de esporângios, os oósporos, ou esporos sexuais, produzidos da fecundação do oogônio com o anterídeo, e os clamidósporos, ou esporos de resistência, produzidos por algumas espécies e importantes para sua sobrevivência (TYLER, 2007; LUZ; MATSUOKA, 1996).

As estruturas morfológicas e suas variações foram importantes na taxonomia do gênero, contudo, apesar de úteis, necessitam de suplementação para a classificação precisa da espécie. Baseado nessas características, Waterhouse (1963) propôs uma chave para classificação de espécies que dividiu o gênero em 6 grupos, onde *P. sojae*, na sinonímia *P. megasperma* var. *sojae*, foi incluída no grupo V.

Outra peculiaridade do gênero é a não habilidade para sintetizar ergosterol componente funcional da manutenção da integridade da membrana plasmática dos fungos verdadeiros, fato esse que confere ineficácia de controle frente aos fungicidas comerciais que possuem modo de ação na inibição da síntese desse composto (TYLER, 2007).

Até 2001, dezoito espécies de *Phytophthora* foram relatadas associadas às doenças de plantas no Brasil, além de outras espécies ainda não identificadas até a data. Como exemplos de doenças causadas pelo gênero no país, ressaltam-se a gomose do citros (*P. parasitica*, *P. citrophthora*, entre outras), requeima ou mela da batata e do tomate (*P. infestans*), gomose da acácia-negra (*P. nicotianae*, *P. meadii* e *P. boehmeriae*), doenças de plantas ornamentais, doenças da seringueira, entre outras (LUZ; MATSUOKA, 2001).

2.4 *Phytophthora sojae*

A primeira descrição abrangente sobre a etiologia e classificação dessa doença foi publicada por Kaufmann e Gerdemann (1958), onde o agente causal foi, pela primeira vez, denominado de *Phytophthora sojae*. Um ano mais tarde, Hildebrant (1959) mudou a denominação para *Phytophthora megasperma* var. *sojae* com base na identificação desses

isolados no Commonwealth Mycological Institute em Kew, Inglaterra. Essa denominação dada ao patógeno perdurou até 1980, quando Kuan e Erwin reclassificaram-na como *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* depois de estudos aprofundados sobre gama de hospedeiros e dimensão de oósporos, baseados no fato de que a dimensão do oogônio de isolados de diferentes hospedeiros apresentavam similaridade, assim tornava impróprio a separação em variedades. Entretanto, avaliando isolados de soja e alfafa constataram grande distinção de gama de hospedeiros e, assim, classificaram em duas forma especialis, *P. megasperma* f. sp. *glycinea* e *P. megasperma* f. sp. *medicanigis* (SCHMITTHENNER, 1985).

A partir de 1991, a nomenclatura do agente causal estabelecida com base em estudos morfológicos e filogenéticos foi instituída de *Phytophthora sojae* Kaufmann & Gerdemann (sin. *P. megasperma* Drechs. f. sp. *glycinea* Kuan & Erwin; *P. megasperma* var. *sojae* Hildebrand; *P. sojae* f. sp. *Glycines* Faris) (FARIS et al. 1989; HANSEN; MAXWELL, 1991 apud COSTAMILAN, 2001).

O centro de origem de *P. sojae* não é completamente estabelecido, sendo que uma das hipóteses propõe a coevolução do patógeno com a soja selvagem domesticada na Ásia Oriental, e uma outra propõe a existência de uma mudança de hospedeiro a partir de espécies de tremoço nativo na América do Norte. Pesquisadores acreditam que a segunda hipótese apresenta maior confiabilidade (GIJZEN; QUTOB, 2008).

O patógeno em questão possui uma gama restrita de hospedeiros, apresentando além da associação com a soja, algumas espécies de tremoço como *Lupinus angustifolius*, *L. luteus* e *L. albus* (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Em contrapartida, considerando o patossistema soja x *P. sojae*, esta espécie não é a única capaz de infectar soja (BIENAPFL; MALVICK; PERCICH, 2011). Hamm e Hansen (1981) descreveram isolados do complexo *P. megasperma* que foram patogênicos à soja. Malvick e Grunden (2004), examinando populações de *Phytophthora* infectantes de soja com base nas sequências de DNA da região ITS, constataram que os isolados estavam intimamente relacionados com *P. sansomeana*. Além da soja, há relatos de *P. sansomeana* causando podridão em milho em Ohio (ZELAIA-MOLINA et al., 2010). Em 2012, esta espécie foi detectada pela primeira vez causando severos danos em soja em Wisconsin, EUA (SMITH, 2012).

Quanto a sua morfologia, *P. sojae* cresce primeiramente como hifa asseptada, embora possa apresentar septos conforme a idade, sendo considerada heterotrófica e saprófita (TYLER, 2007). Trata-se de uma espécie homotática, com micélio, oósporo e esporângio diploides, e anterídios e oogônios haploides. A fusão dos anterídios e oogônios origina

oósporos e a germinação destes pode resultar em micélio ou esporângio. Em tecidos de soja infectados, ocorre uma grande quantidade de oósporos que podem sobreviver no solo por muitos anos após a decomposição da planta hospedeira (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

Os esporângios produzidos pela diferenciação de hifas podem germinar diretamente produzindo novas hifas ou sofrer diferenciação e produzir de 10-30 zoósporos, sendo a principal forma de dispersão do patógeno na água do solo. Condições de solo saturado, compactados, argilosos, sujeitos à inundações com temperaturas entre 25 e 30 °C favorecem o desenvolvimento da doença por induzirem a germinação de esporos e produção de esporângios assexuais (TYLER, 2007).

A podridão da raiz e da haste por fitóftora é uma doença monocíclica, e a maior parte das infecções ocorre a partir de inóculo primário (presente no solo). Infecções ocorrentes no estágio de plântula normalmente levam à morte das mesmas, já infecções no final da fase de crescimento geralmente ficam restritas às raízes secundárias, podendo causar, em condições favoráveis, danos ocultos responsáveis pela diminuição do rendimento da cultura (SCHMITTHENNER, 1999).

2.5 Patogenicidade

Cultivares de soja e acessos de germoplasma diferem suas reações aos diferentes isolados de *P. sojae* (KAUFMANN; GERDEMANN, 1958). A interação entre patógeno e hospedeiro (*P. sojae* x Soja) segue a teoria de gene-a-gene proposta por Flor (1971), na qual para cada gene de resistência no hospedeiro há um gene de avirulência correspondente no patógeno – interação raça específica.

A expressão da resistência requer uma interação entre um gene para resistência na soja (*Rps*) e um gene para avirulência em *P. sojae*, que implica, portanto, uma indução de resistência. Resistência induzida é resultado de uma ativação de um mecanismo de defesa em resposta a uma infecção que serve para inibir ou suprimir o desenvolvimento da doença. A suscetibilidade ou compatibilidade, por outro lado, é considerada como uma resposta passiva (não induzida) devido à ausência de genes de resistência/avirulência (STEWART, 2011).

Hoje, existem confirmados, 14 genes de resistência dominantes *Rps* na soja que confere resistência à podridão da raiz e da haste. Esses genes foram identificados em 8 loci *Rps1* (1a, 1b, 1c, 1d, 1k), *Rps2*, *Rps3* (3a, 3b e 3c), *Rps4*, *Rps5*, *Rps6*, *Rps7* (DORRANCE et al., 2008), além de *Rps8* (BURNHAM et al., 2003 apud DORRANCE et al., 2008).

A variabilidade dentro da população de *P. sojae* tem sido avaliada através de testes de virulência usando um conjunto de cultivares ou linhagens de soja diferenciadoras (SCHMITTENNER, 1999, DORRANCE et al., 2008), que permitem caracterizar raças da espécie, bem como os patótipos (DORRANCE; JIA; ABNEY, 2004).

Aproximadamente 70 raças fisiológicas compõem a população de *P. sojae*, que foram descritas baseadas na virulência em um conjunto de variedades de soja diferenciadoras (DORRANCE; MILLS, 2009). Schmittenner (1985; 1999) acrescentou que reações de muitos isolados não se enquadraram em nenhum fenótipo de virulência já identificado.

Inoculações no hipocótilo da soja com raças ou patótipos conhecidos também podem identificar a presença de genes *Rps* em uma dada cultivar de soja (DORRANCE et al., 2008).

Além da resistência raça-específica acima relatada, outro tipo de resistência foi descrita, denominada de resistência parcial ou resistência de raiz (SCHMITTENNER, 1999). A resistência parcial é um caráter poligênico, sendo expressa e herdada quantitativamente e o número exato de genes envolvidos na resistência parcial ainda não é conhecido (COSTAMILAN; BERTAGNOLLI; MORAES 2007).

Esse tipo de resistência também é denominado tolerância ou resistência de campo e foi caracterizado pelo menor grau de apodrecimento de raízes e progressão da doença, ocorrendo a uma taxa mais lenta do que em cultivares suscetíveis (DORRANCE et al., 2008; SLAMINKO; BOWEN; HARTMAN, 2010).

Mideros, Nita e Dorrance (2007) retrataram a resistência parcial da soja a *P. sojae* na como efetiva a quase todas as raças do patógeno, na qual se observou uma redução no nível de colonização do patógeno nas raízes. Essa resistência não se mostra funcional nas fases iniciais do desenvolvimento da planta, desenvolvendo-se progressivamente conforme seu crescimento.

Existe o conhecimento atual de mais de 200 patótipos para esse patógeno, que sugere alta variação genética relacionada à virulência em populações naturais (DORRANCE; MCCLURE; ST. MARTIN, 2003). Os relatos da doença nos últimos anos têm aumentado, e surge a necessidade de verificação de resistência das cultivares disponíveis comercialmente plantadas (SOARES; COSTAMILAN; JANEGITZ 2009).

Para Schmittenner (1999), o mais efetivo método de reduzir danos é a utilização de cultivares resistentes e, para evitar a quebra de resistência, a combinação de uso de genes *Rps* e de resistência parcial é recomendada. Segundo o autor, é importante conhecer quais

fenótipos de virulência estão presente no campo antes de selecionar uma cultivar com resistência específica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e período do experimento

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Fitopatologia e casa de vegetação do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá, Paraná, no período de fevereiro a dezembro de 2012.

3.2 Obtenção e preservação dos isolados

Os isolados analisados foram obtidos através de concessões de centros de ensino e pesquisa, sendo associados à doença de podridão radicular e da haste da soja. Este estudo envolveu dez isolados, oriundos de regiões variadas, compreendendo os Estados do Paraná e Rio Grande do Sul (TABELA 1 E FIGURA 1).

Para todos os isolados, foram feitas culturas da ponta de hifas para garantir a pureza dos mesmos e preservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura CA (200 g de cenoura; 17 g ágar e 1000 mL de água destilada), lacrados com tampas herméticas de alumínio e vedadas com filme plástico. Os tubos foram acondicionados em câmara climatizadas (BOD), sob fotoperíodo alternado de 12 h de luz/12 h de escuro, com luz fluorescente à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabela 1. Isolados de *Phytophthora sojae*, procedência e fonte de aquisição.

	Isolados	Procedência	Fonte
1	P.S 1	Soledade (RS)	Syngenta
2	P.S 2	Soledade (RS)	Syngenta
3	P.S 3	Pântano Grande (RS)	Syngenta
4	P.S 4RS	Santa Maria (RS)	Instituto Phytus
5	P.S 5C	Coxilha (RS)	Coodetec
6	P.S 6 D	Maringá (PR)	UEM
7	P.S 9.1	Ponta Grossa (PR)	Embrapa Trigo

8	P.S 15.2	Carambeí (PR)	Embrapa Trigo
9	P.S 22.1	Pato Branco (PR)	Embrapa Trigo
10	P.S 24.1	Castro (PR)	Embrapa Trigo

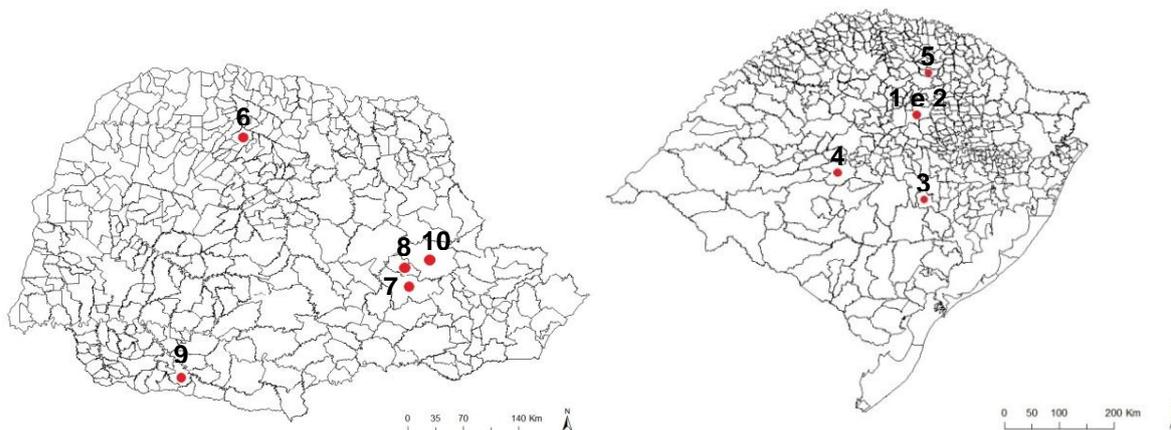


Figura 1- Procedência dos isolados dos Estados do Paraná (esquerda) e Rio Grande do Sul (direita).

3.3 Identificação molecular

3.3.1 Obtenção de micélio

O micélio de cada isolado foi obtido pelo cultivo em meio de cenoura líquido. Três discos de 5 mm de meio de cultivo CA contendo micélio de cada isolado foram transferidos para erlenmeyers com auxílio de um furador e uma alça de repicagem em câmara de fluxo laminar. Os frascos foram transferidos para câmara climatizada (BOD) por 7 dias sob fotoperíodo alternado de 12 h de luz/12 h de escuro, com luz fluorescente de 12 h à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após o período de incubação, separou-se a massa micelial de cada isolado por filtragem em dupla camada de gase, transferindo-os para microtubos de 2 mL (Eppendorf[®]) e armazenados em freezer vertical a -20°C .

3.3.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA dos isolados de *P. sojae*, foi utilizado o método do CTAB baseado no protocolo de extração descrito por Doyle & Doyle (1987).

O micélio armazenado foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido, reduzindo-o a um pó fino e transferido para um novo microtubo (Eppendorf®). Acrescentaram-se 650 µL do tampão de extração CTAB (2% CTAB - brometo de cetiltrimetilamônio, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA (pH 8,0)) e 2 µL de 2-mercaptoetanol. Essa mistura foi, então, homogeneizada em vórtex por 2 minutos e incubada a 65°C por 15 minutos em banho maria. Após esse período, adicionaram-se aos tubos 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v) e centrifugou a 11.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante das amostras foi transferido para microtubos (Eppendorf®) de 2 mL novos, utilizando pipetas micrométricas, e adicionados 5 µL de uma suspensão contendo 20 mg/mL de RNase, os quais foram incubados em banho maria a 37°C por 30 minutos. Acrescentaram-se, aos tubos, cerca de 500 µL de isopropanol e 250 µL de acetato de amônio 7,5 M para a remoção dos polissacarídeos, invertendo-os cuidadosamente para a precipitação do DNA seguidos de centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos. Após essa etapa, o pellet do DNA foi precipitado, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com a adição de 100 µL de etanol e centrifugação a 11.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e as paredes internas do tubo foram secas com papel absorvente esterilizado. Depois de secos, adicionaram-se 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 mM EDTA) para a ressuspensão do pellet. Todas as amostras do DNA extraído foram armazenadas em geladeira à temperatura de 4 – 8° C.

3.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR convencional realizada nesse trabalho utilizou ‘*primers*’ específicos para a espécie *P. sojae* desenvolvidos por Bienapfl, Malvick e Percich (2011) a partir da região ITS, PSOJF1 (5’ - 50- GCC TGC TCT GTG TGG CTG T – 3’) (forward) e PSOJR1 (5’ - GGT TTA AAA AGT GGG CTC ATG ATC – 3’) (reverse).

Com o intuito de testar a especificidade dos ‘*primers*’ utilizados, foram inseridas na análise duas espécies de *Phytophthora* sp., não identificadas, porém provenientes de outros hospedeiros, cuja preparação de amostras foram as mesmas descritas no item anterior.

As reações de PCR foram conduzidas num volume de 25 µL, contendo 1 µL de DNA genômico (diluído em água destilada 1:10), 20,06 µL de água destilada, 2,5 µL de PCR buffer, 0,75 µL de MgCl₂, 0,05 µL de dNTP’s (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,125 µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,25 µL de 10 µM de cada ‘*primer*’ – forward e reverse.

O protocolo de amplificação foi 1 ciclo inicial de 94°C por 5 minutos, para a desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 66°C por 30 segundos (anelamento), 72°C por 30 segundos (extensão) e 72°C por 10 minutos (extensão final) realizados termociclador Tpersonal Whatman Biometra®.

3.3.4 Eletroforese em gel de agarose

A visualização da amplificação do DNA por PCR foi realizada através da eletroforese em gel de agarose, a qual se baseia na separação de moléculas de acordo com o tamanho mediante a aplicação de uma diferença de potencial (voltagem).

A preparação do gel de agarose a 2% foi realizada utilizando 40 mL de tampão TAE, acrescido de 0,8 g de agarose e 2 µL de SYBR® Safe (Invitrogen). Essa solução foi fundida e vertida sobre a cuba de eletroforese horizontal. Após a solidificação do meio, adicionou-se sobre o gel cerca de 50 mL de tampão TAE e retiraram-se os pentes para a formação dos poços de aplicação das amostras. As amostras produzidas pela PCR foram aplicadas juntamente com o corante de corrida para a reação, sendo que, no primeiro e último poço, foi aplicado o marcador de massa molecular (DNA ladder) de 100 bp que permite uma estimativa visual do tamanho dos fragmentos de DNA para a análise comparativa das bandas formadas pelas amostras.

A corrente elétrica aplicada para a separação das moléculas foi aproximadamente 87 V, com duração de 30 minutos.

O tampão de corrida foi, então, retirado da cuba de eletroforese e o gel foi transferido para um transiluminador de luz UV, que permitiu sua visualização e fotografia

A avaliação do resultado foi analítica, sendo que resultados positivos apresentaram formação de bandas de DNA no gel de agarose.

3.4 Análise morfológica

3.4.1 Aspectos da colônia

Para a avaliação das características culturais das colônias dos isolados, discos de micélio com 5 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 7 cm de diâmetro, contendo meio de cultura CA e incubadas em câmara climatizada (BOD), sob fotoperíodo

alternado de 12 h de luz/12 h de escuro, com luz fluorescente à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Após 7 dias de crescimento, foram avaliados aspectos referentes à coloração e ao formato das colônias.

Luz et al. (2008) descreveram os seguintes formatos de colônias para espécies de *Phytophthora*: radiado, rosáceo ou petaloide, estrelado e cotonoso, como sendo de ocorrência frequente.

3.4.2 Dimensão dos oogônios e oósporos e morfologia dos anterídios

Para a avaliação das estruturas sexuais, todos os isolados foram crescidos em placa-de-Petri contendo meio de cultura CA e incubados por 7 dias conforme condições descritas no item 3.4.1. Para cada isolado, foram retirados, com o auxílio de uma alça, fragmentos de micélio de diferentes pontos das colônias e preparadas 10 lâminas de microscopia com o uso do corante lactofenol. As lâminas foram observadas em microscópio óptico na objetiva de 40x onde se considerou 50 estruturas por isolado. Para a aferição das medidas, empregou-se como auxílio o programa Motic Images Plus 2.0[®] e a análise dos dados foi feita através da estatística descritiva do programa Excel.

As avaliações morfológicas dos anterídios fazem referência ao posicionamento deste em relação ao ponto de inserção com o oogônio, sendo considerados anfígenos, quando localizados abaixo ao oogônio, ou paráginos, quando localizados ao lado destes.

3.4.3 Morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos

Para a avaliação da morfologia e dimensão de esporângios e clamidósporos, os isolados foram cultivados em meio líquido de extrato de solo não autoclavado de acordo com metodologia proposta por Ribeiro (1978).

O meio de cultura consistiu da homogeneização de 10 g de solo em 1000 mL de água destilada num béquer, com repouso por 24 h sem agitação e filtragem em dupla camada de papel filtro, aproveitando-se a fração líquida para o ensaio. O solo utilizado foi o Nitossolo Vermelho Eutroférico, coletado nas dependências do Laboratório de Fitopatologia.

O ensaio foi realizado colocando-se seis discos de 5 mm de diâmetro de meio de cultivo contendo micélio de cada isolado (com 7 dias de crescimento em meio de cultura CA) em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. Na sequência, foi adicionado o extrato de solo

obtido até a submersão dos discos na placa. As placas foram vedadas e mantidas em câmara climatizada (BOD), sob luz fluorescente contínua por 48 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Após o período de incubação, retiraram-se fragmentos dos discos que apresentaram maior crescimento micelial, transferindo-os para lâminas microscópicas contendo corante lactofenol e visualizaram-se as estruturas na objetiva de 40x, em microscopia ótica. Foram feitas 10 lâminas para cada isolado, sendo mensuradas 50 estruturas por isolado, na objetiva de 40x, com o auxílio do programa Motic Image Plus[®].

Foram mensurados comprimento e largura (C e L) para os esporângios e diâmetro e espessura da parede para os clamidósporos, quando presentes.

3.4.4 Ontogenia de esporângios

Para a avaliação da ontogenia dos esporângios, utilizou-se o meio líquido de extrato de solo não autoclavado descrito no item 3.4.3.

O ensaio foi realizado colocando-se seis discos de micélio de cada isolado com 5 mm de diâmetro em placas de Petri de 90 mm de diâmetro e mantidos nas mesmas condições anteriormente descritas.

Após o período de incubação, as placas foram abertas e observadas diretamente em microscópio óptico na objetiva de 10x. Para cada disco de micélio, foram realizadas cinco visualizações de formação de esporângios, totalizando 30 observações por isolado.

A ontogenia dos isolados foi classificada segundo considerações de Luz et al. (2008), Erwin e Ribeiro (1996) e Schmitthenner (1999).

3.5 Reação de cultivares de soja

3.5.1 Obtenção de cultivares de soja

As cultivares utilizadas nesse trabalho para avaliação de reação a *P. sojae* foram recomendadas para a região Sul do país na safra de 2012/2013 e fornecidas por produtores rurais, cooperativas, empresas produtoras de sementes e revendas da região (TABELA 2).

Para o cultivo das plantas, foram utilizados vasos de polietileno flexível com capacidade de 1L e substrato comercial para hortaliças MECPLANT[®], a base de casca de Pinus bio-estabilizada, não atotoclavado.

Para o ensaio, foram utilizadas sementes saudáveis, sem rachaduras e com ausência de tratamentos com fungicidas/inseticidas. As mesmas foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 20% do produto comercial de uso doméstico (2,5% p.a.), por 30 segundos, seguida de lavagem em água destilada autoclavada e secagem à temperatura ambiente em papel de filtro autoclavado.

Foram dispostas 25 sementes por vaso contendo o substrato, para a obtenção de 20 plântulas. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e irrigados diariamente com volume de água variado, de modo a manter uma condição hídrica de umidade no substrato.

Tabela 2. Relação das cultivares de soja utilizadas para o teste de reação cultivares aos isolados de *Phytophthora sojae*.

CULTIVARES	
SD 60A02 Ri	SD 64A42 Ri
BMX Alvo RR	NA 4909
SD 688 RR	SYN 1157 RR
SD 615 RR	SYN 1152 RR
CD 230	CD 215 RR
TMG 7161	CD 237 RR
BMX Turbo	BMX Potência
CD 244 RR	BMX Força
NS 5858 RR	BMX Magna RR
BMX Apolo	FT Campo Mourão
FUNDECEP 65 RR	RS 628
BMX Tornado RR	CD 2585
BRS 283	RA 626
INT 6100	SYN 1059 RR (Vtop)
NA 5909	NK 7059 RR
CD 202 RR	BRS 284 RR
TMG 1067RR	BRS 282

3.5.2 Preparação do inóculo e inoculação

Para a inoculação, o método utilizado foi o do palito de dente colonizado pelo fungo, adaptado para o estudo do cancro da haste em soja de acordo com KEELING, 1982 apud YORINORI, 1996.

O método consiste na utilização de pontas de palitos de dentes cortadas num tamanho aproximado de 1 cm, espetadas sobre um papel filtro com tamanho circular e colocadas em placas de Petri. As placas foram autoclavadas e sobre os palitos foi vertido meio de cultura CA. Após a solidificação, 5 fragmentos de micélio dos isolados foram transferidos para as placas e distribuídos sobre a superfície do meio com o auxílio de uma alça de repicagem. As placas de Petri foram incubadas em câmara climatizada (BOD) por um período de 7 a 10 dias, sob fotoperíodo alternado de 12 h de luz/12 h de escuro, com luz fluorescente à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

A inoculação das plantas ocorreu quando as mesmas se encontravam no estágio fenológico V2 (primeiro trifólio completamente desenvolvido). Foi realizado um toailete dos vasos, retirando-se folhas mortas do substrato, plantas em excesso, plantas com má formação e plantas não saudáveis. A inoculação foi feita através da inserção do palito contendo o micélio dos isolados a 1 cm abaixo do nó cotiledonar com o auxílio de uma pinça anatômica de dissecação. Para as testemunhas, foram inseridas somente as pontas dos palitos de dente autoclavadas.

Após a inoculação, realizou-se, individualmente em cada vaso, uma câmara úmida com o auxílio de sacos plásticos de polietileno transparentes, borrifados com água destilada e elásticos para a vedação.

Os vasos foram mantidos por 5 dias em sala de incubação, onde permaneceram em condição de umidade saturada, fotoperíodo alternado de 12 h de luz/12 h de escuro, com luz fluorescente, e temperatura variando de 25 a 30°C .

3.5.3 Avaliação

Posteriormente ao período de incubação, a câmara úmida dos vasos foi removida adicionando-se uma pequena quantidade de água no substrato somente para o reestabelecimento da umidade do meio. Aguardou-se 30 minutos antes da avaliação para que as plantas pudessem recuperar a turgidez.

As plantas foram avaliadas quanto à resistência/suscetibilidade à doença, de acordo com o protocolo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de soja (MAPA, 2007).

A metodologia de avaliação é análoga à avaliação do cancro da haste, sendo consideradas resistentes as cultivares que apresentaram até 30% de plantas mortas, moderadamente resistentes (Intermediárias) as cultivares com 31 a 70% de plantas mortas, e suscetíveis, as cultivares com a partir de 71% de plantas mortas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise Molecular

No presente estudo, a análise molecular usando o conjunto de ‘*primers*’ PSOJF1 e PSOJR1 confirmou a espécie *P. sojae* para todos os isolados avaliados (PS 1, PS 2, PS 3, PS 4RS, PS 5C, PS 6D, PS 9.1, PS 15.2, PS 22.1 e PS 24.1), resultando na formação de bandas entre as faixas de 100 e 200 pares de bases para todos. Os dois isolados de *Phytophthora* sp. (P70 e P97) não identificados e provenientes de diferentes hospedeiros, inseridos na análise para confirmação da especificidade dos ‘*primers*’, não apresentaram formação de bandas (FIGURA 2). As bandas formadas em gel de agarose condisseram com o tamanho das bandas produzidas no estudo de Bienapfl, Malvick e Percich (2011), que apresentaram bandas de 120 pb para amostras de isolados de *P. sojae* analisadas provenientes de regiões do mundo todo.

Com base nos resultados de Bienapfl, Malvick e Percich, (2011) e nos obtidos nesse trabalho, observou-se a possibilidade do uso diagnóstico dos ‘*primers*’ testados, bem como a distinção da espécie em estudo em relação as outras do gênero.

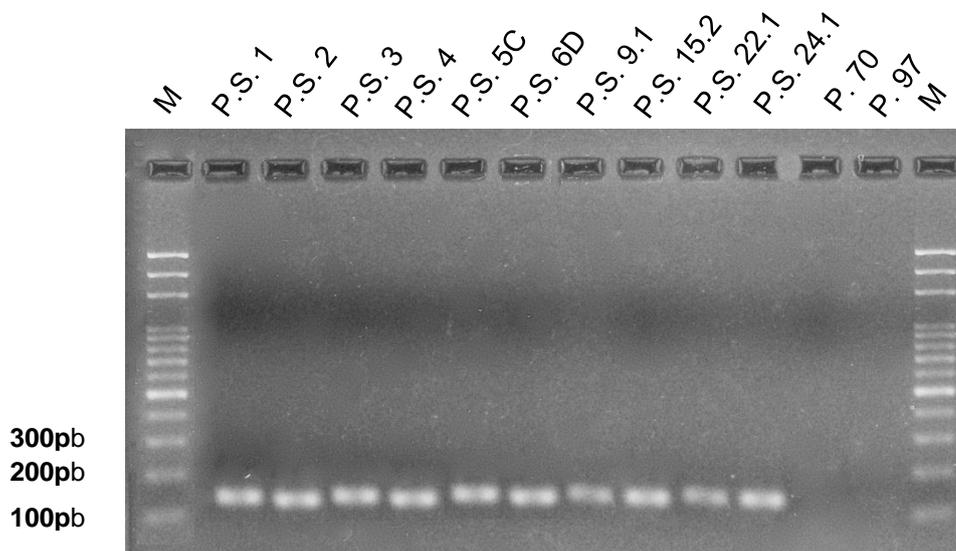


Figura 2. Gel de agarose com os produtos de amplificação por PCR obtidos com o par de ‘*primers*’ PSOJF1 e PSOJR1, compreendendo a região ITS do rDNA específico para a espécie *Phytophthora sojae*. (P.S. 1 – P.S. 24.1) - isolados para confirmação da espécie *P. sojae*; (P. 70 e P. 97) - isolados de *Phytophthora* sp. provenientes de outros hospedeiros; (M) - Marcador Molecular Ladder, 100 pb.

A diagnose da podridão da raiz e da haste da soja por *Phytophthora* há muito causa controvérsia no meio fitopatológico, devido à semelhança dos sintomas àqueles causados por outros patógenos como *Pythium*, espécies de *Diaporthe*, *Fusarium* e *Rhizoctonia* (HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999; WANG et al., 2006).

Métodos de identificação, como isolamentos direto ou indireto do hospedeiro e kits de ELISA, já foram usados para a identificação, contudo possuem limitações quanto à especificidade e tempo de execução.

A técnica de PCR, dentre outras utilizações, oferece inúmeras vantagens no diagnóstico de doenças quando comparada aos métodos tradicionais. Possui sensibilidade de detecção, rapidez e versatilidade a um custo relativamente baixo (HENSON; FRENCH, 1993). Os ensaios moleculares de PCR surgem como ferramentas para a detecção e diagnose de *P. sojae*, bem como outros patógenos de plantas, potencializando práticas de manejo eficazes para doença (WANG et al., 2006; O'BRIEN et al., 2009; BIENAPFL; MALVICK; PERCICH, 2011).

Wang et al. (2006), estudando métodos para amplificação específica de *P. sojae* por PCR, desenvolveram o conjunto de 'primers' chamados P.S. 1 e P.S. 2, desenhados a partir da região DC6 e ITS4 (*Internal Transcribed Spacer*), que possibilitou o uso para a detecção da espécie a partir de tecidos de plantas doentes, bem como de solos infestados com oósporos. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie (FUNGARO, 2000).

No entanto, Bienapfl, Malvick e Percich, (2011) relataram problemas na especificidade do 'primer' PS desenvolvido por Wang, pois seu uso não permitiu distinguir outras espécies de *Phytophthora* associadas à soja, bem como de outros hospedeiros. Assim, os autores desenvolveram um novo conjunto de 'primers' - PSOJF1 e PSOJR1, desenhados a partir da região ITS do rDNA, do genoma do patógeno, para PCR-real time e PCR convencional, obtendo resultados satisfatórios para ambos os tipos de reações, tanto para material vegetal infectado, como para solos com oósporos. Nos seus resultados, os 'primers' não amplificaram DNA de outras 10 espécies de *Phytophthora* ou 19 outras espécies de fungos ou oomicetos patogênicos às plantas, sendo, então, considerados espécie-específicos. Ainda como confirmação, no referido estudo, foram sequenciados cinco isolados de *P. sojae* amplificados, e se obteve a sequência alvo esperada da região ITS, ao qual o 'primer' foi elaborado.

4.2 Caracterização morfológica

4.2.1 Aspectos da colônia

Todos os isolados apresentaram colônias de coloração branca, bordas variadas e assumiram cinco tipos de aspectos em meio de cultivo cenoura-ágar. Os padrões observados foram: concêntrico (isolados P.S. 1 e P.S. 4 RS), cotonoso (isolado PS 3 e PS 5C), rosáceo (isolados P.S. 9.1, P.S. 15.2, P.S. 22.1 e P.S. 24.1), concêntrico para estrelado (isolado 2) e irregular (isolado 6D) (TABELA 2 E FIGURA 3).

Tabela 3. Formato das colônias e aspecto micelial dos isolados de *Phytophthora sojae*, após sete dias de incubação em câmara de crescimento (BOD) sob fotoperíodo alternado (12 h claro/12 h escuro), sob luz fluorescente à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Isolados P.S.	Colônias	
	Formato da colônia	Aspecto do Micélio
1	Concêntrico	Aéreo e pouco denso
2	Concêntrico para estrelado	Aéreo e denso
3	Cotonoso	Superficial de pouco denso
4 RS	Concêntrico	Aéreo e denso
5 C	Cotonoso	Aéreo e denso
6 D	Irregular	Aéreo e denso
9.1	Rosáceo	Aéreo e denso
15.2	Rosáceo	Aéreo e denso
22.1	Rosáceo	Aéreo e denso
24.1	Rosáceo	Aéreo e denso

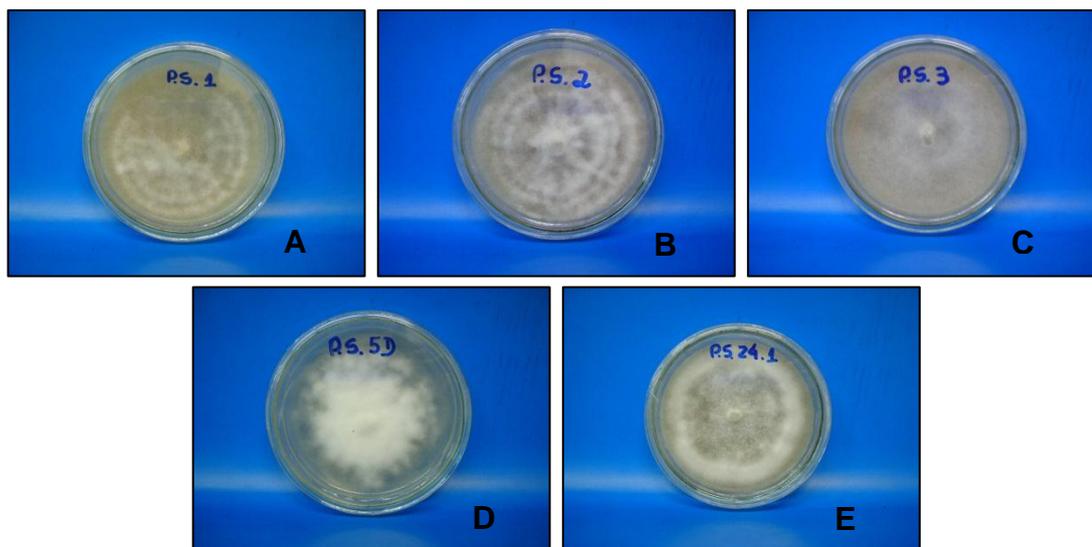


Figura 3. Formato das colônias de *Phytophthora sojae* em meio de cultura cenoura-ágar a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por sete dias. (A) concêntrico, (B) concêntrico para estrelado, (C) cotonoso, (D) irregular e (E) rosáceo.

A forma cultural depende da frequência, angulação e extensão da ramificação das hifas. Acredita-se que essa é uma característica variável e, possivelmente, esteja sob o controle do citoplasma, mas, mesmo assim, certas espécies possuem um padrão cultural que persiste sob variadas condições culturais (WATERHOUSE, 1970). O crescimento micelial, bem como a morfologia das colônias de *Phytophthora* sp., variam conforme o meio de cultura utilizado e a temperatura (COSTAMILAN, 2001; ABDANUR; SANTOS; TRATCH, 2003).

Em função dessa variabilidade, as características culturais não são muito úteis na identificação e caracterização das espécies de *Phytophthora*, porém servem como auxílio nas chaves de identificação.

Os formatos de colônias encontrados para o gênero *Phytophthora* são os mais diversificados, podendo apresentar crescimento circuncêntrico, rosáceo ou petaloide, estrelado, cotonoso, irregular, colapsada, zonada e com bordas difusas ou bem delimitadas circularmente, micélio denso e cotonoso ou pouco micélio aéreo, conforme descritos por Erwin e Ribeiro (1996), Abdanur, Santos e Tratch (2003) e Luz et.al (2008).

Chen et al. (2009) descreveram, para isolados de *P. sojae*, colônias brancas de bordas circulares e lisas. Kaufmann e Gardemann (1958) analisaram as características da colônia de *P. sojae* em diferentes meios de cultura e constataram que em BDA (batata-dextrose-ágar) o patógeno cresceu na superfície do meio com o micélio formando uma colônia densa, espessa e branca na qual apareceram ondulações após alguns dias. As margens das colônias eram

definidas e usualmente onduladas. Os mesmo autores descrevem ainda que, em meio de cultura farinha de milho-ágar, a maior parte do crescimento ocorreu abaixo da superfície do meio, apresentando poucas hifas aéreas.

4.2.2 Dimensão dos oogônios e oósporos e morfologia dos anterídios

Nesse estudo, os oogônios, anterídios e oósporos foram produzidos em abundância em meio de cultura cenoura-ágar sob as condições anteriormente descritas e as dimensões e classificações encontradas apresentam-se na Tabela 3.

Os oogônios apresentaram o maior diâmetro de 44 μm , o menor de 21,3 μm , com média de 32,5 μm , exibindo formato esférico ou subesférico e paredes finas.

Os oósporos apresentaram diâmetro máximo de 39,1 μm , mínimo de 17,1 μm , e uma média de 28,1 μm , com paredes sem ornamentações e preenchimento do tipo plerótico em sua maioria, preenchendo quase totalmente o oogônio com periplasma. O isolado P.S. 5C diferiu dos demais e apresentou características de oósporos appleróticos não preenchendo totalmente o espaço do oogônio.

Para as estruturas avaliadas nesse estudo, foram constatadas a presença de anterídios díclinos, ou seja, provindos de hifas diferentes do mesmo micélio, e posicionamento parágino e anfígeno em relação ao oogônio, FIGURA 4. Todos os isolados apresentaram predominância de anterídios paráginos em relação aos anfígenos, exceto o isolado P.S. 22.1, onde a quantidade de anfígenos foi predominante.

Tabela 4. Dimensões do oogônio de oósporo e posição dos anterídios de isolados de *Phytophthora sojae* em meio de cultura cenoura-ágar.

Isolado P.S.	Diâmetro (µm)		Anterídio
	Oogônio	Oósporo	
1	39,8 ¹ – 35,3 ² – 21,2 ³ (±2,90) ⁴	35,7 ¹ – 31,25 ² – 18,9 ² (±2,88) ⁴	Ambos – predominância de paráginos
2	41,2 – 33,84 – 23,9 (±4,09)	37 – 30,42 – 17,1 (±4,58)	Ambos – predominância de paráginos
3	22,3 – 28,75 – 35,7 (±2,76)	32,8 – 24,93 – 17,1 (±3,05)	Ambos – predominância de paráginos
4	39,8 – 29,78 – 22,4 (±3,68)	32 – 25,3 – 18,3 (±3,38)	Ambos – predominância de paráginos
5 C	40 – 34,62 – 29 (±3,14)	36,1 – 29,47 – 24 (±2,77)	Ambos – predominância de paráginos
6 D	37,2 – 29,24 – 22,5 (±3,42)	34,2 – 28,58 – 17,5 (±3,82)	Ambos – predominância de paráginos
9.1	44,0 – 34,0 – 22,7 (±5,1)	39,1 – 29,9 – 19,4 (±5,31)	Ambos – predominância de paráginos
15.2	42 – 34,2 – 23,2 (±4,1)	38,9 – 30,35 – 19,1 (±3,9)	Ambos – predominância de paráginos
22.1*	36 – 28,82 – 22,4 (±3,71)	31,9 – 24,7 – 18,3 (±3,57)	Ambos – com predominância de anfígenos
24.1	34,6 – 28,33 – 22,9 (±3,46)	31,5 – 24,06 – 18,5 (±3,11)	Ambos – predominância de paráginos

¹ Limite superior; ² Média de 50 oogônios ou oósporos; ³ Limite inferior; ⁴ Desvio padrão.

* Único isolado com característica de anterídio predominantemente anfígeno

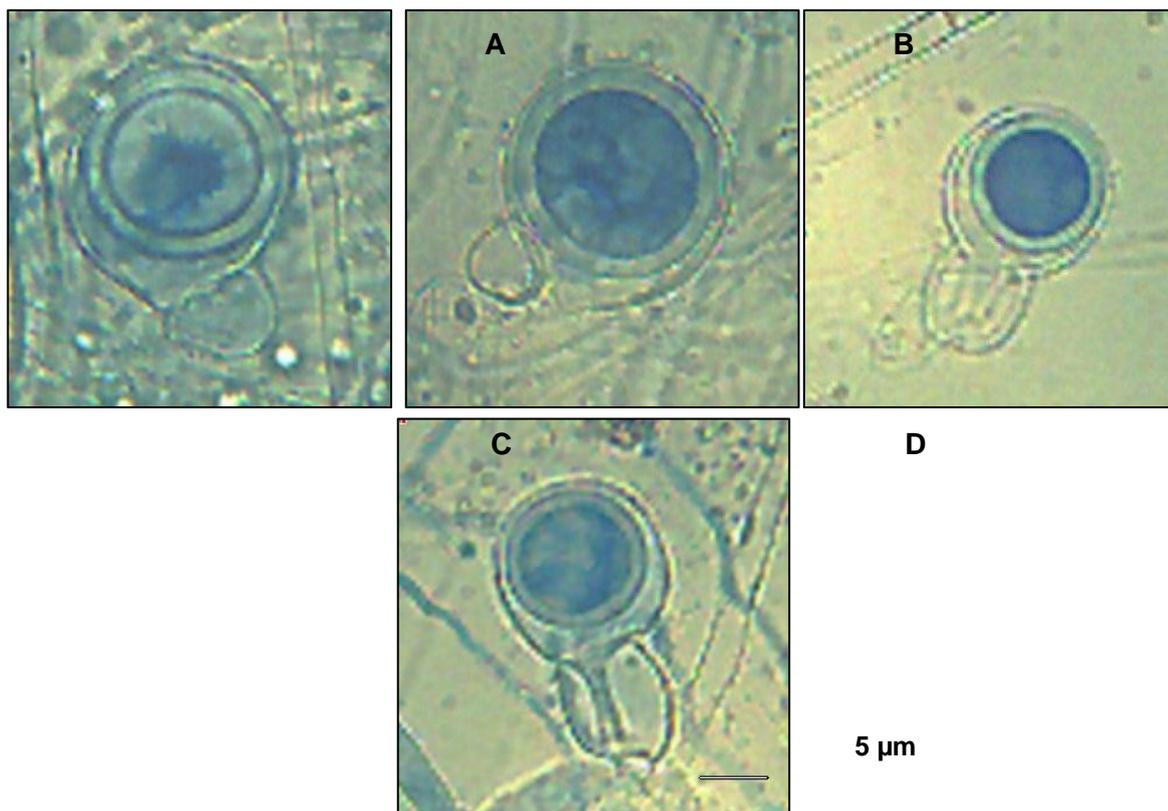


Figura 4. Oogônios, Oósporos e anterídios de *Phytophthora sojae*. A e B: anterídios paráginos e C e D: anterídios anfígenos.

O gênero *Phytophthora* possui algumas espécies descritas como heterotálicas, ou seja, requerem dois grupos diferentes de compatibilidade para a produção de estruturas sexuais. Ao contrário dessa condição de cruzamento de algumas espécies, *P. sojae* é designada como homotálica, ou seja, a diferenciação de oogônios e anterídios ocorre de uma mesma hifa ou talo, assim a produção de esporos sexuais ocorre livremente em meio de cultura (TYLER, 2007). A germinação dos oósporos pode resultar na produção de micélio e esporângio (SCHMITTENER, 1999).

Costamilan (2001) e Schmittener (1999) descreveram oogônios de *P. sojae* como grandes, com diâmetro médio de 41 μm , variando entre 29 a 58 μm , com formatos esféricos ou subsféricos e paredes finas. Esses resultados se assemelham aos observados nesse estudo. Waterhouse, Newhook e Stamps (1983) utilizavam o critério de tamanho do oogônio para diferenciar *P. megasperma* var. *megasperma* de *P. megasperma* var. *sojae*, entre outras espécies, justificando o fato da última nunca apresentar alcances de diâmetro acima de 50 μm .

Dimensões de oósporos de 19,2 e 38,8 μm , com média de 31,4 μm de diâmetro, foram descritas para *P. sojae* de acordo com Costamilan (2001). Os oósporos são formados após a

fertilização do oogônio e isso pode acontecer em meio de cultura ou tecido do hospedeiro infectado, e podem germinar, aproximadamente, 30 dias após a sua formação. A germinação de oósporos é favorecida quando a luz aumenta, porém inibe a subsequente formação de esporângio (ERWIN; RIBEIRO, 1996; SCHMITTENNER, 1999). Outra descrição retrata oogônios de *P. sojae* como globosos com mais de 30 µm de diâmetro e anterídios paráginos e anfígenos (ERWIN; RIBEIRO, 1996).

A posição do anterídio é uma característica de grande importância na taxonomia de espécies do gênero *Phytophthora* (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Waterhouse, Newhook e Stamps (1983) expuseram que espécies com grandes proporções de ambos os tipos de anterídio (anfígeno e parágino) possuem números variáveis de cada tipo por razões não conhecidas. Acrescentaram ainda que espécies com anterídios predominantemente anfígeno variaram pouco em relação a essa característica, e o mesmo não acontece com espécies com predominância de anterídios paráginos, onde frequentemente se encontram ambos os tipos, mesmo que seja em pequena proporção.

Dorrance et al. (2008) relataram a presença de ambos os tipos de anterídios na caracterização de *P. sojae* e Schmittenner (1999) descreveu que, para a espécie anterídios díclinos e geralmente paráginos, embora anterídios anfígenos, pudessem ser encontrados.

4.2.3 Dimensão e morfologia de esporângios e clamidósporos

Os esporângios foram produzidos em grande quantidade em meio de solo não autoclavado, apresentaram-se persistentes e com formato predominante ovoide entre os isolados, embora padrões elipsoides, obpiriformes e irregulares também foram observados juntamente com a ausência de papilas (FIGURA 5). As dimensões variaram de 34,9 a 56,6 µm de comprimento e 24,7 a 33,2 µm de largura com uma média de 45,8 x 28,9 µm de comprimento x largura (TABELA 4). Todos os isolados avaliados apresentaram certo padrão de dimensão de esporângios, exceto o isolado P.S. 24.1, que apresentou dimensões muito superiores aos outros isolados, e uma proporção muito maior em relação às outras estruturas, como os oósporos.

Tucker (1931) concluiu que as dimensões de esporângios, quando consideradas independentemente, não poderiam merecer muita importância taxonomicamente. Segundo o autor, existe uma dificuldade em se padronizar métodos para as melhores condições de produção de esporângios de uma espécie, os quais poderiam ser desfavoráveis à produção de outra espécie.

Erwin e Ribeiro (1996) descreveram, como características de *P. sojae*, esporângios não papilados, ovoides, elipsoides, obpiriformes e variando de 23-88 x 16-52 µm. Costamilan (2001) relatou, para a mesma espécie, esporângios obpiriformes, não papilados e com dimensões variando de 42-65 µm x 32-53 µm. Tais padrões de mensuração não diferiram das medidas encontradas para esporângios no presente estudo.

A germinação dos esporângios ocorre diretamente para a produção de hifas ou indiretamente para a produção de zoósporos. Esporângios também são formados na superfície de raízes infectadas, podendo atuar como inóculo secundário na infecção (SCHMITTNER, 1999). Tyler (2007) relatou que, em algumas espécies, como *P. infestans*, os esporângios podem ser liberados a partir do micélio aéreo e servir como agente de dispersão, contradizendo o descrito para *P. sojae*, onde os esporângios não são liberados das hifas e os principais meios de dispersão são os zoósporos e os oósporos.

Tabela 5. Dimensões e formas predominantes de esporângios de isolados de *Phytophthora sojae* produzidos em meio líquido de extrato de solo não autoclavado.

Isolado P.S.	Esporângio (µm)		Formas predominantes
	Comprimento (C)	Largura (L)	
1	46,4 ¹ – 26,31 ² – 15,1 ³ (±7,37) ⁴	33,2 ¹ – 19,02 ² – 11,7 ³ (±5,61) ⁴	Ovoide e elipsoide
2	34,9 – 25,6 – 15,4 (±5,33)	26 – 17,25 – 9,6 (±4,54)	Ovoide
3	79,9 – 38,0 – 14,4 (±14,16)	28,9 – 21,34 – 9 (±5,5)	Ovoides, elipsoides e irregulares
4 RS	37,2 – 24,4 – 15,1 (±6,5)	28,7 – 16,49 – 9,1 (±4,96)	Ovoides
5 C	38,4 – 25,38 – 14,8 (±5,39)	28,31 – 18,1 – 9,3 (±4,59)	Ovoides
6 D	52,3 – 26,43 – 15,4 (±7,63)	28,3 – 17,78 – 9,6 (±4,94)	Ovoides e obpiriformes
9.1	60,7 – 29,39 – 14,9 (±13,62)	29,5 – 17,98 – 9,1 (±5,57)	Ovoides
15.2	36,9 – 25,66 – 13 (±6,76)	25 – 18,75 – 7,8 (±5,20)	Ovoides
22.1	35,6 – 28,28 – 18,8 (±6,49)	24,7 – 19,15 – 12,3 (±3,83)	Ovoides
24.1	56,6 – 41,18 – 23,4 (±10,64)	30,6 – 24,65 – 14,8 (±4,64)	Ovoides e elipsoides

¹ Limite superior; ² Média de 50 esporângios; ³ Limite inferior; ⁴ Desvio padrão.

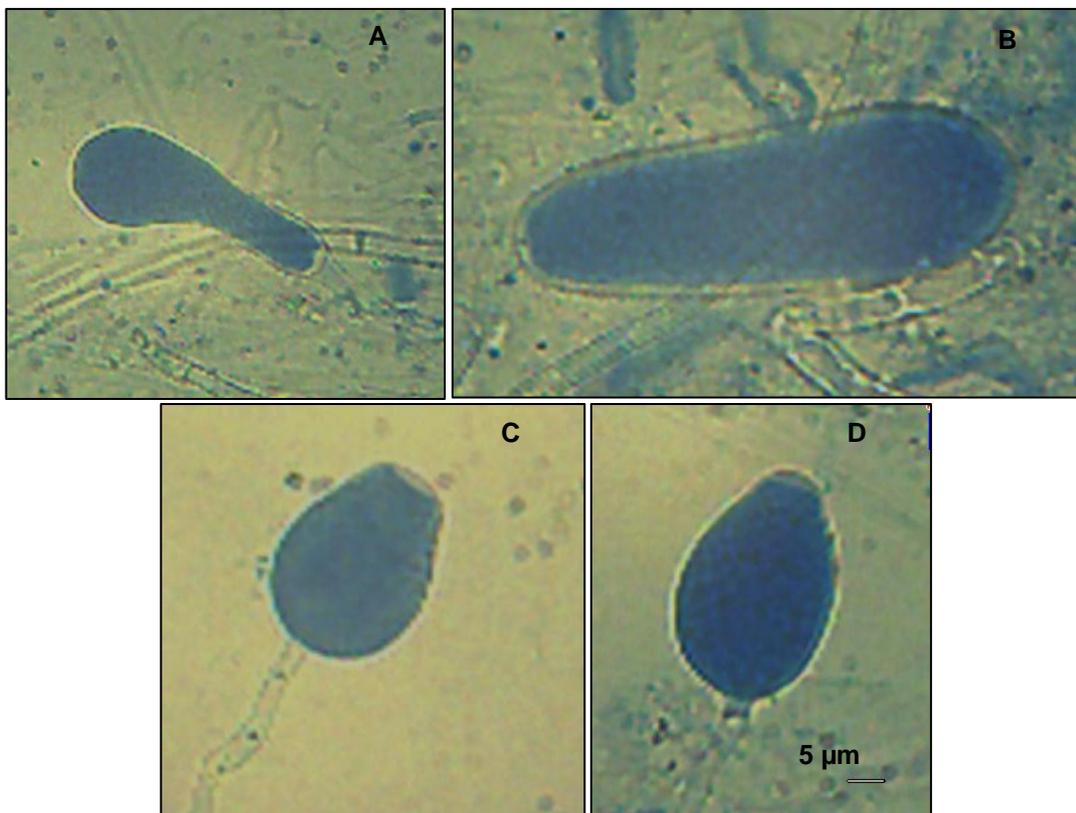


Figura 5. Esporângios de *Phytophthora sojae* produzidos em meio líquido de extrato de solo não autoclavado. Formas (A) Irregular, (B) Elipsoide, (C) Obpiriforme e (D) Ovoide.

Na avaliação das estruturas morfológicas feita nesse trabalho, observou-se uma baixa ocorrência de clamidósporos terminais quando o micélio foi cultivado em meio de cultura de extrato de solo não autoclavado, e ausência dessa estrutura quando produzido em meio sólido de cenoura-ágar. Foi observada uma média de 3,2 clamidósporos em 50 observações num campo de visão de aumento de 400 vezes.

Somente alguns isolados apresentaram produção de clamidósporos, os quais foram P.S. 1, 2, 3, 4RS, 6D e 9.1. As dimensões encontradas para as estruturas variaram de 11,6 a 38,4 µm, com média de 25 µm de diâmetro e com uma espessura de parede de 1,1 a 2,1 µm e média 1,6 µm. (TABELA 5; FIGURA 6).

Tabela 6. Dimensões de clamidósporos de isolados *Phytophthora sojae* produzidos em meio líquido de extrato de solo não autoclavado.

Isolado P.S.	Clamidósporo (μm)	
	Diâmetro (μm)	Espessura da parede (μm)
1	$38,4^1 - 30,53^2 - 20^3$ ($\pm 9,48$) ⁴	2,1 – 1,66 – 1,2 ($\pm 0,45$)
2	31,9 – 31,65 – 31,4 ($\pm 0,35$)	1,7 – 1,65 – 1,6 ($\pm 0,07$)
3	16,5 – 16,3 – 16,4 ($\pm 0,14$)	1,8 – 1,7 – 1,6 ($\pm 0,14$)
4 RS	29,6 – 22,9 – 16,2 ($\pm 9,47$)	1,1 – 1,1 – 1,1 (0)
5 C		Ausentes
6 D	23,4 – 21,46 – 18,5 ($\pm 2,30$)	1,8 – 1,6 – 1,3 ($\pm 0,24$)
9.1	11,6	1,4
15.2		Ausentes
22.1		Ausentes
24.1		Ausentes

¹ Limite superior; ² Média dos clamidósporos observados; ³ Limite inferior; ⁴ Desvio padrão.



Figura 6. Clamidósporo de *Phytophthora sojae* produzido em meio líquido de extrato de solo não autoclavado.

Os clamidósporos são estruturas de resistência produzidas em abundância por algumas espécies de *Phytophthora* e não produzidas por outras. Sua morfologia não possui variação entre espécies, tendo significância deste caráter na taxonomia em grande parte, limitada a sua presença ou ausência (ERWIN; RIBEIRO, 1996). Os mesmos autores mencionaram que tais estruturas não são facilmente formadas nessa espécie e que possivelmente a temperatura ótima para a formação está entre 20-25°C.

Tyler (2007) descreveu os clamidósporos de *P. sojae* como sendo de paredes grossas, encontrados em plantas ou culturas velhas, possuem uma vida longa e preserva o organismo em períodos desfavoráveis.

Outros autores como Costamilan, Bertagnolli e Moraes (2007) e Schmittener (1999) não citam a presença de clamidósporos em descrições morfológicas de *P. sojae*.

4.2.4 Ontogenia de esporângios

A disposição dos esporângios nos esporangióforos apresentou diferenças entre os isolados, sendo observados dois tipos de formação (individual e de repetição). Os isolados P.S. 1 e P.S. 2 não apresentaram ramificações, sendo considerados de formação simples ou individual. Os demais isolados apresentaram esporângios de repetição e de proliferação interna, na qual ocorre a formação de um esporângio dentro de outro que já tenha liberado

seus zoósporos. Vários esporângios podem ser formados sucessivamente dessa maneira, podendo ser chamados de percorrentes (LUZ et al., 2008) (FIGURA 7).

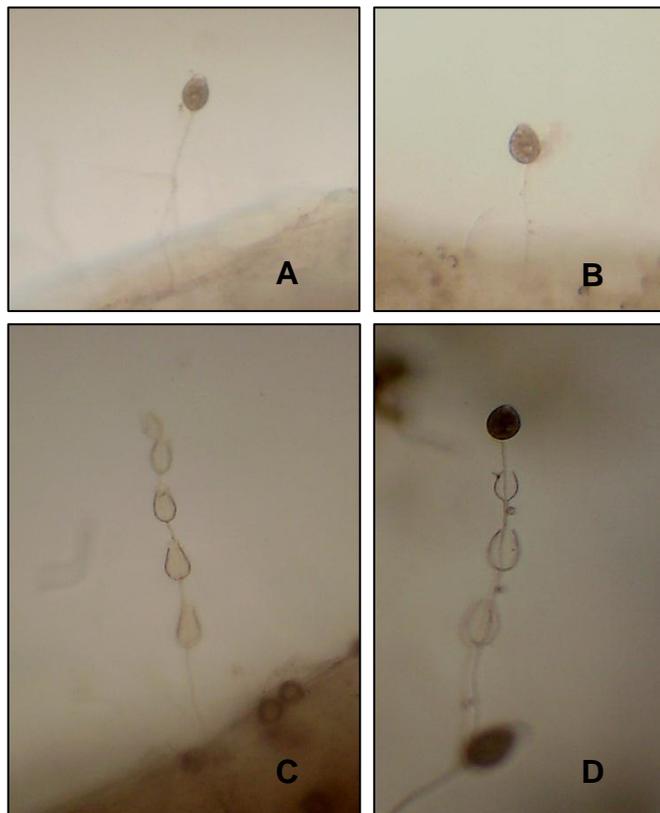


Figura 7. Características de formação de esporângios de *Phytophthora sojae*. (A, B) formação individual, (C,D) esporângio de repetição – proliferação interna.

Para Hildebrand (1959), a formação de esporangióforos em *P. sojae* pode ocorrer tanto simpodialmente como por proliferação interna e externa. Luz et al. (2008) expuseram que a formação do esporângio tipo repetição é uma característica importante na identificação de outra espécie do gênero, a *P. cinamomi*.

As características observadas para os isolados em estudo estão em concordância com Schmitthenner (1999), que descreveu para *P. sojae* a produção de esporangióforos simples e indiferenciados com esporângios terminais e proliferação de um novo esporângio formado terminalmente ou dentro de esporângios velhos. Estes esporângios também podem germinar diretamente funcionando como conídios.

4.3 Reação de cultivares de soja

A identificação das raças patogênicas dos isolados com base em linhagens de soja diferenciadoras não foi contemplada neste trabalho.

As plantas que manifestaram suscetibilidade à inoculação exibiram lesões de cor marrom que se estendeu a partir do ponto de introdução do inóculo, seguida de podridão mole da haste e folhas cotiledonares, murchamento e morte. As plantas resistentes apresentaram necrose do tecido da haste restrita ao ponto de introdução do palito com micélio, sem sintomas visuais na parte aérea ou haste (FIGURAS 8, 9 E 10).



Figura 8. Cultivares de soja inoculadas com *Phytophthora sojae*. À esquerda testemunha e à direita cultivar avaliada. (A) Cultivar suscetível, (B) Cultivar resistente, (C) Cultivar Intermediária.



Figura 9. Sintomas de podridão de fitóftora sobre soja suscetível



Figura 10. Cultivar de soja resistente à inoculação de *Phytophthora sojae*

A reação das cultivares testadas à inoculação com os isolados mostrou grande variabilidade de reações, sendo elas suscetíveis, resistentes e intermediárias, sugerindo grande variabilidade patogênica dos isolados de *P. sojae*, bem como dos genótipos de soja testados (TABELA 7 e 8).

Dentre as cultivares de soja, puderam ser identificadas seis cultivares resistentes a todos os isolados e uma cultivar suscetível a todos. A cultivar BRS 282 foi utilizada como padrão de suscetibilidade, com 100% de plantas mortas quando inoculada com qualquer

isolado. As cultivares CD 230, TMG 7161, SD 688 RR, SD 615 RR, BMX Alvo RR e SD 60A02i exibiram resistência para todos os isolados. As demais cultivares expressaram respostas suscetíveis ou intermediárias a pelo menos um dos isolados avaliados.

Para os isolados do Paraná P.S 9.1, P.S 24.1 e P.S 15.2, observou-se maior porcentagem de cultivares suscetíveis, correspondendo a 61, 55,5 e 52% respectivamente. Em contrapartida, as três maiores porcentagens de reações resistentes foram encontradas para isolados do Rio Grande do Sul, sendo P.S. 5C, P.S 1 e P.S 3 respectivamente com 77, 75 e 72%. Para o isolado P.S 4 RS, observou-se maior número de reações intermediárias das cultivares.

A população de isolados avaliadas neste trabalho consiste de boa representação da variabilidade do patógeno em virtude da sua distribuição geográfica contemplar regiões distintas. Convém ressaltar que a afirmação precisa da existência de uma correlação entre reação de cultivares e localização geográfica requer o envolvimento de maior população avaliada. Esses resultados sugerem diferenças de agressividade dos isolados entre regiões para as cultivares comerciais da região Sul do País.

A preferência pela utilização de metodologias que primassem à avaliação da resistência completa das cultivares se baseou no fato dos programas de melhoramento focarem principalmente nesse tipo de resistência regida pelos genes *Rps* no genótipo da soja (SOARES; COSTAMILAN; JANEGITZ, 2009). Crescentes relatos de ocorrência de podridão radicular, aliado à grande diversidade patogênica da população do patógeno, levam a necessidade do reconhecimento dos patótipos existentes em uma dada região.

Os genes de resistência conferem proteção contra as raças de *P. sojae* incompatíveis a eles e são amplamente usados em cultivares de sojas comerciais (DORRANCE; SCHMITTENNER, 2000, SLAMINKO; BOWEN; HARTMAN, 2010). O melhoramento voltado para cultivares resistentes a *Phytophthora* requer seleção de genes *Rps* efetivos, tornando essencial se familiarizar sobre a diversidade racial nas regiões produtoras de soja (SUGIMOTO et al., 2012).

Soares, Costamilan e Janegitz (2009), avaliando as reações de genótipos de soja submetidos a dois tipos de resistência para um isolado de *P. sojae*, verificaram que houve diferenças de resistência e suscetibilidade entre cultivares. Este estudo apresentou resultados semelhantes para a cultivar BRS 282, que mostrou alta suscetibilidade ao isolado analisado naquele estudo.

Em se tratando de variabilidade de raças, no Brasil e na Argentina, os isolados descritos na década de 90 pertenciam a raça 1 (BARRETO; STEGMAN DE GURFINKEL; FORTUGNO, 1995; COSTAMILAN, BONATO, 1996). Em avaliação realizada em 2007, isolados do Rio Grande do Sul e do Paraná foram classificados como raça 3 (COSTAMILAN; BONATO, 1996).

Os patótipos existentes em determinadas regiões tendem a se modificar com o passar do tempo, alterando, assim, a composição de uma dada população de patógenos. Dorrance, McClure e Silva (2003), avaliando a diversidade patogênica de *P. sojae* no estado de Ohio, EUA, constataram que o número de patótipos encontrados aumentou de 72 em estudos anteriores para 202, com base em 8 genes de resistência diferenciais, entre os anos de 1991 a 1997/1999, demonstrando, desta forma, um potencial de adaptação do patógeno aos genes de resistência (*Rps*) comumente utilizados em soja.

Corroborando a ideia de variabilidade, Malvick e Grunden (2004), estudando a população de *P. sojae* no Estado de Illinois, nos Estados Unidos, verificaram cerca de 22 patótipos, com base em 8 genes de resistência diferenciais, concluindo que a população de *P. sojae* é diversa e composta de múltiplos patótipos e raças, e atribuíram o mau desempenho de cultivares de soja resistentes a *Phytophthora* em muitos campos de soja de Illinois a virulência do patógeno. Schmitthenner (1999) estimou entre oito e 15 anos o período de efetividade de uma cultivar de soja com resistência completa à podridão radicular por fitóftora, nos EUA.

Hobe (1981) afirma que a ampla gama de raças pode existir numa população natural que podem se expressar quando uma cultivar de soja resistente é introduzida. A grande diversidade e o aumento contínuo de raças com introdução de cultivares resistentes podem ser explicadas por mutações aleatórias, dispersão e seleção natural pela cultivar de soja resistente (ERWIN; BARTNICKI-GARCIA; TSAO, 1983).

Poucos trabalhos avaliam a variabilidade das cultivares comerciais de soja quanto à resistência ao patógeno *P. sojae*. Este trabalho trata-se de um estudo preliminar sobre a reação dessas cultivares, evidenciando a complexidade e diversificação patogênica dos isolados da região Sul do Brasil.

Mudanças na composição da população de patógenos, em função da sua contínua adaptação a novos genes de resistência introduzidos em cultivares comerciais, podem levar a uma perda da efetividade de resistência de cultivares. Portanto, o conhecimento prévio acerca

da população do patógeno se faz necessário para a adoção de novas estratégias de controle e resistência.

Tabela 7. Reação de cultivares de soja aos diferentes isolados de *Phytophthora sojae*

Cultivar	Isolados									
	1	2	3	4 RS	5 C	6 D	9.1	15.2	22.1	24.1
SD 60A02 Ri	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BMX Alvo RR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SD 688 RR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SD 615 RR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CD 230	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TMG 7161	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BMX Turbo	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
CD 244 RR	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
NS 5858 RR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
BMX Apolo	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
FUNDECEP 65 RR	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
BMX Tornado RR	R	R	R	I	R	R	R	R	R	S
BRS 283	R	R	R	I	R	R	S	I	R	R

INT 6100	R	R	I	I	S	R	S	R	R	R
NA 5909	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R
CD 202 RR	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R
TMG 1067RR	R	R	R	I	R	R	S	S	R	S
SD 64A42 Ri	R	R	R	R	S	R	S	I	S	S
NA 4909	I	R	R	I	R	S	S	S	S	S
SYN 1157 RR	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S
SYN 1152 RR	S	R	S	S	R	S	R	R	S	R
CD 215 RR	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S
CD 237 RR	R	S	R	S	R	S	I	S	S	S
BMX Potência	I	I	R	S	R	S	S	S	S	S
BMX Força	S	I	R	S	R	I	S	S	S	S
BMX Magna RR	R	S	S	S	S	S	S	R	I	S
FT Campo Mourão	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S
RS 628	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
CD 2585	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R

RA 626	R	S	S	S	R	R	S	S	S	S
SYN 1059 RR (Vtop)	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
NK 7059 RR	S	S	I	S	I	R	I	I	S	S
BRS 284 RR	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
BRS 282	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R – Resistente; S – Suscetível; I – Intermediária

Tabela 8. Representação das reações de cultivares de soja à inoculação de isolados de *Phytophthora sojae*

Cultivar	ISOLADOS									
	1	2	3	4 RS	5 C	6 D	9.1	15.2	22.1	24.1
SD 60A02 Ri	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
BMX Alvo RR	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
SD 688 RR	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
SD 615 RR	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
CD 230	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
TMG 7161	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
BMX Turbo	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
CD 244 RR	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green
NS 5858 RR	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
BMX Apolo	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green
FUNDECEP 65 RR	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green
BMX Tornado RR	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Red
BRS 283	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Red	Yellow	Green	Green

INT 6100	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Green	Red	Green	Green	Green
NA 5909	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green
CD 202 RR	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Red	Red	Green	Green
TMG 1067RR	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Red	Red	Green	Red
SD 64A42 Ri	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Red	Yellow	Red	Red
NA 4909	Yellow	Green	Green	Yellow	Green	Red	Red	Red	Red	Red
SYN 1157 RR	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red
SYN 1152 RR	Red	Green	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Red	Green
CD 215 RR	Green	Green	Green	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Red
CD 237 RR	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Yellow	Red	Red	Red
BMX Potência	Yellow	Yellow	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red
BMX Força	Red	Yellow	Green	Red	Green	Yellow	Red	Red	Red	Red
BMX Magna RR	Green	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Green	Yellow	Red
FT Campo Mourão	Green	Red	Green	Red	Green	Red	Red	Red	Red	Red
RS 628	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Green	Red
CD 2585	Green	Red	Red	Red	Red	Green	Red	Red	Red	Green

RA 626	Resistente	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Resistente	Resistente	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível
SYN 1059 RR (Vtop)	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Resistente	Resistente	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível
BRS 284 RR	Suscetível	Suscetível	Resistente	Suscetível	Suscetível	Resistente	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível
NK 7059 RR	Suscetível	Suscetível	Intermediária	Suscetível	Intermediária	Resistente	Intermediária	Intermediária	Suscetível	Suscetível
BRS 282	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível	Suscetível

 Cultivar suscetível
  Cultivar resistente
  Cultivar intermediária

5 CONCLUSÃO

- 1- A utilização dos ‘*primers*’ PSOJF1 e PSOJR1, na análise molecular, confirmou a espécie *P. sojae* para todos os isolados avaliados, possibilitando seu uso como ferramenta de auxílio na sua identificação e distinção desta de outras espécies do gênero;
- 2- Os padrões morfológicos observados condisseram com os descritos para a espécie *P. sojae*;
- 3- As reações das cultivares de soja comerciais avaliadas apresentaram grande variedade, sugerindo alta variabilidade na população patogênica, bem como nas cultivares de soja.

6 REFERÊNCIAS

- ABAD, G. **Methods for identification of *Phytophthora* species**. Workshop: Fighting Phytophthora: How to Detect, Investigate, and Manage Phytophthora. Saint Paul: American Phytopathological Society, 2008. Disponível em: <www.phytophthoradb.org/pdf/2008APS_abad.pdf>. Acesso em 10 nov. 2012.
- ABDANUR, A.; SANTOS, A. F.; TRATCH, R. Crescimento micelial e esporulação de isolados de *Phytophthora* sp. patogênicos a acácia-negra. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Curitiba, n. 47, p. 33-42, 2003.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1996.
- APROSOJA. Associação dos Produtores de Soja e Milho de Mato Grosso. Cuiabá, s.d. Disponível em: <<http://www.aprosoja.com.br>>. Acesso em: 2 dez. 2012.
- ÁVILA, M. R. et al. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista brasileira de sementes**, Londrina, v. 29, n.3, p. 111-127, jul. 2007.
- BARRETO, D.; STEGMAN DE GURFINKEL, B.; FORTUGNO, C. Races of *Phytophthora sojae* in Argentina and reaction of soybean cultivars. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 79, p. 599-600, jun. 1995.
- BIENAPFL, J. C.; MALVICK, D. K.; PERCICH, J. A. Specific molecular detection of *Phytophthora sojae* using conventional and real-time PCR. **Fungal Biology**, Ardwick, v. 115, n.8, p. 733-740, abr. 2011.
- BONETTI, L. P. Distribuição da soja no mundo: origem, história e distribuição. In : MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Ed.). **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981, p. 1-6.
- BORÉM, A. Os Riscos do escape gênico no Brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** – Encarte Especial, 1999. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2012.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anexo II - Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de soja (*glycine max* (l.) Merrill). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Re...oCultivares/SOJA_ANEXO_II_-_PROTOCOLOS_DOEN%C7AS_P.doc>. Acesso em: 22 nov. 2012.
- CAB INTERNATIONAL. Centre for Agricultural Bioscience Internacional. Crop protection compendium, Oxford, 2006. Disponível em: <<http://www.cabi.org/compendia/cpc>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

CHEN, C. et al. Diversity among single zoospore isolates derived from single-zoosporangia of *Phytophthora sojae* Kauf. and Gerd. **Journal of Phytopathology**, Malden, v. 157 n. 3, p. 181-187, mar. 2009.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, quarto levantamento, Brasília: Conab, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=&Pagina_objcmsconteudos=2#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 05 jan. 2013.

COSTA NETO, P. R. & ROSSI, L. F. S. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em fritura. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n. 4, p. 531-537, jul./ago. 2000.

COSTAMILAN, L. M. A podridão de raiz e de haste de soja. In: LUZ, E. D. M. N. et al. (Org.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Seropédica: Rural, 2001, p. 678-730.

COSTAMILAN, L. M.; BERTAGNOLLI, P. H; MORAES, R. M. A. Podridão Radicular de Fitóftora em soja. **Embrapa Trigo: Documentos Online**, Passo Fundo, 2007. 23 p. Disponível em: < http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do79.htm >. Acesso em 20 nov. 2012.

COSTAMILAN, L. M.; BONATO, E. R. Identificação de raça de *Phytophthora sojae* e avaliação da resistência de cultivares de soja à podridão da raiz e da haste. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1996. Campo Grande. **Anais...** Brasília: Fitopatologia Brasileira, 1996, p. 353.

DEACON, J. W. **Modern Mycolgy**. 3 ed. Cambridge: Blackwell Science, 1997, p. 303.

DORRANCE, A. E. et. al. Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean. **Plant Health Progress**, Plant Management Network. Saint Paul, 2008. 10p. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

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**, Saint Paul, v. 87, n.3, p. 308, mar. 2003.

DORRANCE, A. E.; SCHMITTHENNER, A. F. New sources of resistance to *Phytophthora sojae* in the soybean plant introductions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 1303-1308, 2000.

DORRANCE, A. E.; JIA, H.; ABNEY, T. S. Evaluation of soybean differentials for their interaction with *Phytophthora sojae*. **Plant Health Progress**, Plant Management Network. Saint Paul, 2004. Disponível em: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2004/psojae/>>. Acesso em 10 nov. 2013.

DORRANCE, A. E.; MILLS, D. *Phytophthora* Damping Off and Root Rot of Soybean. **FACT SHEET**: Agriculture and Natural Resources, Ohio, 2009. 4p. Disponível em: < <http://ohioline.osu.edu>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, Irvine, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRAPER, M. A.; CHASE, T. *Phytophthora* Root and Stem Rot (PRR) of Soybean. **South Dakota Extension Fact Sheet**, Brookings, v. 902-B, p. 4, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - **EMBRAPA SOJA**. Tecnologias de Produção de Soja- Região Central do Brasil, Londrina, 2011. 255p. Disponível em: < <http://www.cnpso.embrapa.br> >. Acesso em: 02 out. 2012.

EPPO. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Paris, 2009. Disponível em:< <http://www.eppo.int/>>. Acesso em 15 dez. 2012.

ERWIN, D. C., BARTNICKI-GARCIA, S., TSAO, P.H., *Phytophthora*: its biology, taxonomy, ecology, and pathology. Saint Paul: The American Phyttopathological Society, 1983.

ERWIN, D. C.; RIBEIRO, O. K. **Phytophthora diseases worldwide**. Saint Paul: The American Phyttopathological Society, 1996. 592 p.

FREITAS, E. A Expansão da soja no Brasil, s.d Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/brasil/a-expansao-soja-no-brasil.htm>>. Acesso em: 25 outubro de 2012.

FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.3, p. 12-16, 2000.

GIJZEN, M.; QUTOB, D. *Phytophthora sojae* and soybean. In: LAMOUR, K.; KAMOUN, S. (Org.). **Oomycetes genetics and genomics**: diversity, interactions and research tools. Hoboken: John Wiley & Sons, 2008, p. 303-329.

HAMM, P. B., HANSEN, E. M. Host specificity of *Phytophthora megasperma* from Douglas fir, soybean, and alfalfa. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 65-68, 1981.

HARTMAN, G. L., SINCLAIR, J. B., RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. St. Paul: The American Phyttopathological Society, 1999.

HENNING, A.A. Manejo de doenças da soja (*Glycyne max* L. Merrill). Informativo ABRATES- Associação Brasileira de Tecnologia de Sementes, v. 19, n. 3, p. 4, 2009.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. C. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, 1993.

- HILDEBRAND, A. A. A root and stalk rot of soybean caused by *Phytophthora megasperma* Drechsler var. *sojae* var. nov. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 37, p. 927–957, 1959.
- HOBE, M. A. **Pathogenic variability of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* isolated from norwest Ohio soils**. 1981. 32f. Dissertação (Mestrado). Ohio State University, Columbus, 1981.
- KAUFMANN, M. J.; GERDEMANN, J. W. Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthora sojae* n. sp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 48, p. 201-208, 1958.
- KUAN, T. –L.; ERWIN, D. C. Formae speciales differentiation of *Phytophthora megasperma* isolates from soybean and alfafa. **Phytopathology**, Saint Paul, v.70, p. 333-338, 1980.
- LUZ, E. D. M., et al. **Glossário ilustrado de *phytophthora*: técnicas especiais para o estudo de oomicetos**. Itabuna: FAPESB, 2008.
- LUZ, E. D. M., MATSUOKA, K. *Phytophthora*: fungo, protista ou chromista? In: LUZ, E. D. M. N. et al. (Org.). **Doenças causadas por *Phytophthora* no Brasil**. Campinas: Livraria Rural, 2001. p. 1-22.
- LUZ, E. D. M., MATSUOKA, K. Taxonomia e sistemática do gênero *Phytophthora*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 4, p. 297- 328, 1996.
- MALVICK, D. K.; GRUNDEN, E. Traits of soybean-infecting *Phytophthora* populations form Illinois agricultural fields. *Plant Disease*, Saint Paul, v. 88, n.10, p. 1139-1145, out. 2004.
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Política Agrícola: Estatísticas. Brasília, 2012. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola>>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.
- MIDEROS, S.; NITA, M.; DORRANCE, A. E. Characterization of components of partial resistance, *Rps2*, and root resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, p. 655-662, 2007.
- Motic Images Plus, versão 2.0: Microscope and Microscopy Solutions, Software: MOTIC, 2012. 1 CD-ROM.
- O'BRIEN, P. A.; WILLIAMS, N.; STJ HARDY, G. E. Detecting *Phytophthora*. **Critical Reviews in Microbiology**, Londres, v. 35, n. 3, p. 169-181, 2009.
- PACHECO, A. C. Registro de *Phytophthora* em soja em Santa Catarina. In: Reunião de Pesquisa de Soja da Região Sul, 26. 1998, Cruz Alta. **Anais...** Passo Fundo: EMBRAPA TRIGO, p. 124, 1998.

REESER, P.; HANSEN, E. A root rot of soybean (*Glycine max*) caused by *Phytophthora sansomeana* sp. nov. In: APS Annual Meeting, 2009. Portland, Oregon. **Anais...** Saint Paul: Phytopathology, 2009. p.107.

RIBEIRO, O. K. **A source book of the genus *Phytophthora***. Lehre: J. Cramer, 1978.

SCHMITTHENNER, A. F. *Phytophthora Rot of Soybean*. In: HARTMAN. G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **The American Phytopathological Society: Compendium of soybean diseases**. Saint Paul, 1999. p. 39-42. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/management/phytophthora/>>. Acesso em 25 de outubro de 2012.

SCHMITTHENNER, A. F. Problems and progress in control of *Phytophthora* root rot of soybean. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 69, n. 4, p. 362-368, 1985.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. SEAB. Departamento de economia Rural – Soja – Análise da conjuntura agropecuária. Curitiba, 2012. 17p. Disponível em:< <http://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em: 15 dez. 2012.

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

SMITH, D.L. New *Phytophthora* spp. causing root rot on soybean in Wisconsin. Integrate Pests and Crop Management. Wisconsin: IPCM, 2012. Disponível em: <<http://ipcm.wisc.edu/blog/2012/10/new-phytophthora-spp-causing-root-rot-on-soybean-in-wisconsin/>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

SOARES, R. M.; COSTAMILAN, L. M.; JANEGITZ, T. Resistência parcial e completa de genótipos de soja à *Phytophthora sojae*. In: Congresso Brasileiro de soja, 5., 2009, Goiânia. **Anais...** Londrina: EMBRAPA SOJA, 2009.

STEWART, S. M. **Characterization and management of genetic diversity in *Phytophthora sojae* populations**. 2011. 154 f. Tese (Doutorado em Fisiologia). Iowa State University, Ames, 2011.

SUGIMOTO, T. et al. Pathogenic diversity of *Phytophthora sojae* and breeding strategies to develop *Phytophthora*-resistant soybeans. **Breeding Science**, Tokio, v. 61, n.5, p. 511-522, jan. 2012.

TANG, Q. H. et al. First report of root rot caused by *Phytophthora sansomeana* on soybean in China. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, n.3, p. 378.1, mar. 2010.

TUCKER, C.M. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. **Missouri Agricultural Experimental Station Research Bulletin**, Columbia, v. 153, p. 208, 1931.

TYLER, B. M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2007.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Data and Statistics**. Washington, D.C., 2012, 40 p. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Acesso em 18 de novembro de 2012.

WANG, Y. et al. Rapid and sensitive detection of *Phytophthora sojae* in soil and infected soybeans by species-specific polymerase chain reaction assays. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 96, p. 1315-1321, 2006.

WATERHOUSE, G. M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. **Mycological papers**, Kew, n. 92, p. 22, 1963.

WATERHOUSE, G. M. Taxonomy in *Phytophthora*. **Phytophthora Symposium**, Kew, p. 1141-1143, jul. 1970.

WATERHOUSE, G. M.; NEWHOOK, F. J.; STAMPS, D. J. Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: Erwin, D.C.; Bartnic-Garcia, S.; Tsao P.H. (Org.) **Phytophthora, its biology, taxonomy, ecology and pathology**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1983, p. 139-147.

WRATHER J. A.; KOENNING, S. R.; ANDERSON, T. R. **Effect of diseases on Soybean yields in the United States and Ontario (1999–2002)**. Plant Health Progress, 2003. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/2003/soybean/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

WRATHER, J. A.; KOENNING, S. R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003-2005. **Journal of Nematology**, Loudonville, v. 38, p.173-180, jun. 2006.

YORINORI, J. T. **Cancro da haste da soja**: epidemiologia e controle. Londrina: EMBRAPA SOJA, Circular Técnica, v. 14, 75 p., 1996.

ZELAYA-MOLINA, L. X. et al. First report of *Phytophthora sansomeana* causing wilting and stunting of corn in Ohio. **Plant Disease**: Saint Paul, v. 94, p. 125, 2010.