

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *DIAPORTHE* SPP. E
DIAPORTHE PHASEOLORUM VAR. *MERIDIONALIS**

M.H. Vechiato¹, A.C. Maringoni², E.M.F. Martins¹, E.Y. Kohara¹

¹Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail vechiato@biologico.br

RESUMO

Considerando a grande variabilidade apresentada pelo complexo *Diaporthe/Phomopsis*, os métodos rotineiros de sanidade de sementes, empregados na detecção do gênero *Diaporthe* não são confiáveis visto que, para sua identificação são utilizadas as características morfológicas das colônias que se desenvolvem sobre as sementes. Diante disso, este trabalho teve como objetivo comparar as características morfológicas de diversos isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Dphs) e *Diaporthe* spp. (Dph) com as de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm) em meios de cultura batata ágar dextrose (BDA), Czapeck e soja. Testes de patogenicidade, bem como técnicas de PCR também foram utilizadas para comparar os diferentes isolados de *Diaporthe* spp. Nestes estudos verificou-se que: a) todos os isolados de Dphm desenvolveram conídios somente do tipo α . Entretanto, em vários isolados de *Diaporthe* spp., também foi observada somente a presença de conídios tipo α ; b) pela coloração das colônias nos meios de cultura BDA e Czapeck, os isolados de Dphm e Dph foram agrupados em 9 classes. Em meio Czapeck, todas as colônias identificadas como Dphm, foram agrupadas nas classes 8 e 9, apresentando um padrão micelial lanoso (tipo feltro), exceto o isolado 43; c) pelo crescimento micelial não foi possível distinguir Dphm de Dph; d) todos os isolados foram patogênicos à soja cv. IAC 14, com diferença de agressividade; e) apenas o DNA de dois isolados (3 e 44) não foram amplificados quando se utilizou a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR), entretanto apresentaram alta homologia na região do ITS com as variedades *caulivora* e *meridionalis* de *Diaporthe phaseolorum*.

PALAVRAS-CHAVE: *Glycine max*, *Diaporthe* spp., caracterização, morfológica, PCR.

ABSTRACT

CARACTERIZATION OF *DIAPORTHE* SPP. AND *DIAPORTHE PHASEOLORUM* VAR. *MERIDIONALIS* ISOLATES. Considering the great variability presented by the *Diaporthe/Phomopsis* complex, analysis of seeds for health, used in the detection of the *Diaporthe* spp., is not reliable because for its identification are used morphological characters of the colonies growing on the seed. The objective of this research was to compare morphological characters of the conidia, mycelial growing and coloration of the isolates proceeding from stem and soybean seeds of *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Dphs) and *Diaporthe* spp. (Dph) with isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm). Tests of pathogenicity, as well as techniques of PCR were used to compare different isolates of (Dph). In this study it was verified that: a) all the isolates of Dphm had only developed alfa conidia, however in some isolates of Dph there was also observed only the presence of alfa conidia; b) Mycelial coloration in PDA and Czapeck media, Dphm and Dph were grouped in 9 classes. In Czapeck medium, all isolates identified as Dphm were grouped in classes 8 and 9, showing woolled micelial pattern (like felt), except isolate 43; c) considering the mycelial growth it was not possible to distinguish Dphm from Dph; d) all isolates were pathogenic to cultivar IAC14, showing different aggressivity percentage in soybean plants; e) two DNA isolates (3 and 44) were not amplified using polymerase chain reaction (PCR), however these isolates showed high homology within the ITS region for the *caulivora* and *meridionalis* varieties of *Diaporthe phaseolorum*.

KEY WORDS: *Glycine max*, *Diaporthe* spp., characterization, morphological, PCR.

²Depto de Produção Vegetal, FCA/UNESP, Botucatu, SP, Brasil.
Parte da tese de doutorado do 1^a autor

*Projeto financiado pela Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP.

INTRODUÇÃO

Entre os fatores que afetam a produtividade da soja, as doenças denominadas podridão de sementes, queima da haste e da vagem e o cancro da haste são consideradas as mais importantes, causadas por espécies de fungos do complexo *Diaporthe/Phomopsis* (PLOSSER, 1989).

A queima da haste e da vagem e o cancro da haste da soja são doenças causadas *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (S.G. Lehman) Wehmeyere e *Diaporthe phaseolorum* (Cke & Ell. Sacc.) var. *meridionalis* Morgan-Jones, respectivamente e também podem causar podridão de sementes (HOBBS & PHILLIPS, 1985; MORGAN-JONES, 1989; PLOSSER, 1989; SINCLAIR & BACKMAN, 1989).

O cancro da haste da soja, inicialmente, teve duas denominações: cancro da haste da soja do sul "southern stem canker" e do norte "northern stem canker" dos EUA e tinham como agente causal *D. phaseolorum* var. *caulivora*. Em 1989, novas propostas de nomenclatura foram feitas por MORGAN-JONES, que contestou a classificação das entidades fúngicas a nível de variedade, após observar grande variabilidade nas relações patógeno-hospedeiro e características morfológicas e fisiológicas.

Este autor propôs, dentro de *Diaporthe phaseolorum*, entidades fúngicas distintas denominada forma especiais (f.sp.), o que anteriormente era variedade (var.). O agente causal do cancro da haste da soja do sul dos EUA passou a ser denominado f.sp. *meridionalis* e do norte f.sp. *caulivora*.

O cancro da haste da soja era considerado como sintoma de queima da haste e da vagem, entretanto, ATHOW & CARDELL (1954) demonstraram diferenças consistentes no que se refere à morfologia, características culturais e patogenicidade entre os isolados, sugerindo *D. phaseolorum* var. *sojae* ATHOW & CARDELL, para soja e *D. phaseolorum* var. *batatais* para batata.

Esta classificação não foi aceita por THREINN *et al.* (1959), que constataram mutantes da var. *caulivora*, produzidos em laboratório, provocando sintomas idênticos aos da var. *sojae* em plantas de soja.

Alguns pesquisadores têm dado ênfase especial na especificidade de hospedeiros e consideram que *caulivora* e *meridionalis* podem ser consideradas como forma especiais (KULIK, 1984; MORGAN-JONES, 1989). Entretanto, LUTTRELL (1947) cita que a forma especiais não é apropriada, desde que tem se demonstrado que a var. *sojae* possui ampla gama de hospedeiros. Características morfológicas têm sido freqüentemente utilizadas subjetivamente para distinguir variedades de *D. phaseolorum*.

No Brasil, segundo YORINORI (1996), colheitas foram inviabilizadas devido a ocorrência do cancro da haste em plantas de soja, atingindo perdas de 80 a 100% e, apesar da severidade atingir 100%, o nível

de incidência do patógeno nas sementes é baixo; dificilmente detecta-se o patógeno em análise sanitárias de sementes, empregando-se os métodos usuais.

Com o desenvolvimento de variedades resistentes, no momento o cancro da haste e da vagem da soja não vêm causando danos à cultura da soja, entretanto, se houver quebra de resistência, a escassez de informações na literatura sobre Dphm, no que se refere à morfologia e fisiologia, métodos de detecção e transmissão do patógeno em sementes, pode dificultar o seu controle, facilitando sua disseminação com conseqüentes perdas à cultura da soja.

YORINORI (1991) relata que os estudos por ele realizados, sobre as características diferenciadoras entre *Phomopsis* do cancro e *Phomopsis* da semente, principalmente, no que se refere à morfologia, coloração das colônias e picnídios, são considerados preliminares, uma vez que há também grande variabilidade entre as colônias de *Phomopsis* da semente, no método do papel de filtro e nenhum estudo intensivo e detalhado foi realizado no Brasil com esses patógenos.

FERNÁNDEZ & HANLIN (1996) questionam a confiabilidade da identificação quando se utilizam características morfológicas de *D. phaseolorum*, visto que elas não têm sido estudadas e descritas em detalhes. Estes autores, estudando características morfológicas e culturais, complementadas com técnicas de biologia molecular do complexo *Diaporthe/Phomopsis*, verificaram diferenças morfológicas entre os isolados de *caulivora* e *meridionalis*, propondo assim mudança na nomenclatura de forma especiais *meridionalis* para variedade *meridionalis*. Esta nomenclatura parece ter sido aceita visto que, trabalhos mais recentes têm citado o fungo *D. phaseolorum* var. *meridionalis* como um dos agentes causais do cancro da haste da soja.

Diante disso, visando dar subsídios para identificação de Dphm em sementes de soja em métodos de sanidade com incubação das sementes, este trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm) utilizando-se: a) meios de cultura de ágar batata dextrose, Czapeck e soja, comparando-se as características morfológicas destes isolados com os de *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Dphs) e *Diaporthe* spp. (Dph); b) a técnica molecular da de reação de polimerase em cadeia (PCR)

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos isolados de *Diaporthe* spp.

Os isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* (Dphm) e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (Dphs), listados na Tabela 1, identificados e cedidos pelo Dr. José Tadashi Yorinori, EMBRAPA-SOJA e pela Dra. Margarida F. Ito, do Instituto Agrônomo de

Campinas. Os demais foram isolados no laboratório de Patologia de Sementes do Instituto Biológico, a partir de plantas de soja com sintomas de cancro da haste e de sementes.

Para o isolamento de Dphm em plantas, fragmentos das áreas limítrofes entre o tecido lesado e o sadio foram retirados e submetidos à desinfestação superficial com hipoclorito de sódio a 1%. O material desinfestado foi colocado em placas de Petri contendo ágar-água. Após crescimento, pequenas porções de micélio e ágar foram retiradas das bordas das colônias e transferidas para placas contendo meio de batata-dextrose-ágar-(BDA).

O isolamento a partir das sementes, previamente incubadas por oito dias, foi feito retirando-se fragmentos de micélio ou conídios, com auxílio de uma agulha sob microscópio estereoscópico e uma agulha, transferindo-os para placas de Petri contendo meio BDA.

Culturas monospóricas e preservação de *Diaporthe* spp.

A partir dos isolamentos, foram obtidas culturas monospóricas de Dphm, Dphs e Dph, espalhando-se uma suspensão diluída de conídios sobre superfície de meio de ágar-água, em placas de Petri. Após 24 horas de incubação, à temperatura ambiente, as placas foram examinadas ao microscópio óptico e os esporos individuais foram transferidos para placas contendo BDA.

Após a obtenção da cultura monospórica, os isolados foram preservados a 10° C, em tubos de ensaio contendo BDA e em água destilada e esterilizada pelo método de Castellani modificado (FIGUEIREDO, 1967).

Características dos conídios, coloração e crescimento das colônias de *Diaporthe phaseolorum* spp.

Para os estudos das características conidiais, coloração e crescimento micelial, *in vitro*, dos isolados de Dphm, Dphs e Dph foram utilizados meios de cultura BDA, Czapeck (TUIITE, 1969) e de soja (farelo de soja - 60 g, ágar - 20 g e água destilada - 1 L).

Nos experimentos de características conidiais, coloração e crescimento micelial foram utilizados os isolados de números 1 a 39. Para os experimentos de coloração micelial, em meio Czapeck, foram acrescentados nove isolados de Dphm (40 a 48), listados no Tabela 1.

Discos de micélio de 9 mm de diâmetro, provenientes das culturas monospóricas dos isolados, foram repicados para meios BDA, Czapeck e soja, contidos em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, colocando-se um disco de cada isolado no centro da placa, incubando-se à temperatura de 25° C. As avaliações foram feitas aos 10, 20 e 30 dias, para verificar ao microscópio óptico a presença de conídios dos tipos alfa e beta.

Tabela 1 - Isolados de fungos provenientes de sementes e plantas de soja, utilizados nos experimentos.

N ^o	Isolado	Procedência
1	Dphm/6093-EMBRAPA (haste)	Londrina-PR
2	Dphm/CH8-EMBRAPA (haste)	Brasil
3	Dphm-03/99-EMBRAPA (haste)	Bolívia
4	Dphm-45/95-EMBRAPA (haste)	Cascavel-PR
5	Dph-49/98-EMBRAPA (haste)	Argentina
6	Dphm-01/96-(IB semente)	Goíás
7	Dphm-01/96-IB (haste)	Orlândia-SP
8	Dphs-36/94-EMBRAPA (haste)	Uruçui-PI
9	Dph -03/96-IB (haste)	Avaré-SP
10	Dphm-04/97-IB (haste)	Avaré-SP
11	Dphm-05-IB/97-(haste)	Guairá-SP
12	Dph -06/96-IB- (semente)	Formosa-GO
13	Dph -07/96-IB (semente)	Formosa-GO
14	Dph -08/96-IB (semente)	Formosa-GO
15	Dph -09-96-IB (semente)	Goíás
16	Dph -10/96-IB (semente)	Goíás
17	Dph -11/96-IB (semente)	Goíás
18	Dph -12/96-IB (semente)	Goíás
19	Dph -13/96-IB (semente)	Goíás
20	Dph -14/96-IB (semente)	Goíás
21	Dph -15/96-IB (semente)	Goíás
22	Dph -16/96-IB (semente)	Goíás
23	Dph -17/96-IB (semente)	Goíás
24	Dph -18/96-IB (semente)	Goíás
25	Dph -19/96-IB (semente)	Goíás
26	Dph -20/96-IB (semente)	Goíás
27	Dphm-83/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
28	Dph. 99/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
29	Dphm-42/95-EMBRAPA (haste)	Cascavel-PR
30	Dph.-96/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
31	Dphm-44/95-EMBRAPA (haste)	Guarapuava-PR
32	Dphm-109/97-EMBRAPA (haste)	Argentina
33	Dphm-47/95-EMBRAPA (haste)	Ponta Grossa-PR
34	Dphm-59/97-EMRAPA (haste)	Brasil
35	Dphm-60/97-EMBRAPA (haste)	Brasil
36	Dphm-65/97-EMBRAPA (haste)	Luiziana-GO
37	Dph -21/97-IB (semente)	Formosa-GO
38	Dph -22//97-IB (semente)	Formosa-GO
39	Dph -23/97-IB (semente)	Goíás
40	Dphm/8498-IAC	Colômbia-SP
41	Dphm-8493-IAC	Colômbia-SP
42	Dphm-8497-IAC	Colômbia-SP
43	Dphm -8496-IAC	Faz. Mundo Novo
44	Dphm-8505-IAC	Frutal-MG
45	Dphm-8509-IAC	Ipauçu-SP
46	Dphm-9093-IAC	Tarumã-SP
47	Dphm-9983-IAC	Assis-SP
48	Dphm-10057-IAC	Mococa-SP

Dphm-*Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* identificados e enviados pelo Dr José Tadashi Yorinori EMBRAPA-Soja e Dra. Margarida F. Ito do Instituto Agrônomo de Campinas.

*Dphs- *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* identificado e enviado pelo Dr José Tadashi Yorinori EMBRAPA-Soja

Nos estudos de coloração e crescimento micelial foram avaliadas quatro colônias de cada isolado, nos três meios. Em relação ao crescimento foram efetuadas avaliações, aos 3 e 7 dias de incubação; para coloração, foram feitas também, avaliações aos 10, 20 e 30 dias de incubação, agrupando-as de acordo com tipo e coloração do micélio. O crescimento linear foi avaliado aferindo-se o diâmetro médio de cada colônia, com auxílio de uma régua milimetrada. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado no esquema fatorial 3 x 39 (3 meios e 39 isolados).

Patogenicidade de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* e *Diaporthe* sp.

O experimento foi instalado em casa de vegetação do Centro de Sanidade Vegetal, do Instituto Biológico. Inicialmente, preparou-se vasos com capacidade de 7 litros, contendo terra vegetal autoclavada, semeando-se em cada vaso 15 sementes de soja, cultivar IAC14. Antes da inoculação, foi efetuado desbaste, mantendo dez plantas por vaso. Foram utilizados dois vasos para cada isolado, totalizando 20 plantas por isolado.

O inóculo, previamente preparado em meio BDA, foi produzido em palitos de dente colonizados com os isolados listados na Tabela 5, segundo técnica descrita por KEELING (1982), modificada por YORINORI (1991). As plantas foram inoculadas no estágio V1 (COSTA & MARQUEZAN, 1982), cerca de dez dias após a semeadura. As inoculações foram feitas inserindo-se o palito colonizado pelo micélio do fungo a 1cm abaixo das folhas cotiledonares das plantas, evitando a perfuração do caule, para descartar a possibilidade de que a perfuração fosse responsável pela morte das plantas, mascarando os sintomas induzidos pelo patógeno.

As plantas, após inoculadas, foram cobertas com sacos plásticos transparentes, e mantidas em câmara úmida por 72 horas, permanecendo em bancadas de casa de vegetação até a data da avaliação, com duas regas diárias por aspersão durante 3 minutos, com oscilação de temperatura de 18° C a 35° C

Foram feitas três avaliações aos 20, 30 e 60 dias após inoculação, observando-se os sintomas da doença nas plantas inoculadas.

Utilização da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR), para identificação dos isolados de *Diaporthe* spp.

Os DNAs de isolados de *Diaporthe* spp. listados na Tabela 1, foram utilizados na reação de PCR com os iniciadores projetados (VECHIATO *et al.*, 2001), DphLe (TCGGCCTTGGAAGTAGAAAG) e DphRi (ACTGAATGCGTTGCGATTCT).

As extrações de fragmentos de DNA dos isolados e estudo foram feitas pelo método da resina de sílica gel da Wizzard (Promega).

Para um volume final de reação de 20 µL foram utilizados 2,0 µL de solução tampão 1783 (sacarose/cresol/red, 10x, MgCl₂ 20mM, Idaho Technologies), 2,0 µL de dNTP mix (2mM.cada), 0,3µL de Taq-DNA polimerase, 1 µL da mistura dos iniciadores (10 µM) e 1 µL de DNA (30 ng/µL).

A reação foi processada em um termociclador PTC-100- MJ Research Inc., utilizando o seguinte programa de temperatura: 3 seg a 94° C; 40 ciclos de 30 seg a 94° C e 1 min a 60° C, 1 min a 72° C e um alongamento final de 7 min a 72° C.

A separação dos fragmentos de DNA amplificados por PCR foi realizada através de eletroforese horizontal em gel agarose a 2%, com tampão TE e brometo de etídio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das avaliações das características conidiais feitas aos 10, 20 e 30 dias, encontram-se na Tabela 2.

Observou-se a presença apenas de conídios do tipo a em todos os isolados de Dphm. A presença deste tipo de conídio, também foi observada nos trabalhos realizados por YORINORI (1991) e FERNANDEZ & HANLIN (1996). Estes autores citam esta característica como um dos parâmetros para diferenciar a var. *meridionalis*, de outras espécies de *Diaporthe*. No que se refere a *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, LUTTRELL (1947) e KULLIK (1984) citam que este patógeno pode ser identificado como variedade em relação a outras espécies de *Diaporthe*, por produzir peritécios típicos e conídios a e b. Entretanto, na maioria dos isolados não caracterizados como variedade *meridionalis* e no isolado 8 (36/94), da variedade *sojae*, foram constatados somente conídios do tipo α.

Estes resultados mostram que pode haver uma identificação equivocada de Dphm com outras espécies de Dph, quando se utiliza apenas o tipo de conídio como parâmetro na diferenciação do complexo *Diaporthe/Phomopsis*.

Em relação à coloração das colônias de Dphm de Dph foram separadas em 9 grupos, de acordo com o aspecto e coloração do micélio, em meio BDA e Czapeck. O meio de soja não foi considerado porque apresentou grande variação na coloração e forma de crescimento, dentro dos mesmos isolados.

Analisando-se a Tabela 3, observa-se que tanto os isolados de Dphm como os de Dph foram agrupados quanto ao tipo de micélio e coloração, nos grupos 2 e 3, em meio BDA.

Em meio Czapeck, todas os isolados identificados como Dphm, exceto o isolado 44 (Dphm-8496) foram classificados nos grupos 8 e 9, apresentando um padrão micelial lanoso (tipo feltro) e de coloração diferente dos isolados de Dphs e Dph., os quais foram agrupa-

dos em diferentes grupos, devido à variabilidade apresentada não só neste meio, mas também em BDA.

Apesar da maioria das colônias dos isolados de Dphm, provenientes de várias regiões, apresentarem um padrão semelhante quanto ao tipo e coloração do micélio em meio Czapeck, o isolado 43 (Dphm-8496) apresentou características bem distintas dos isolados de Dphm, enquadrando-se no grupo 4, onde foram agrupadas outras espécies de *Diaporthe*.

Tabela 2 - Tipos de conídios de diferentes isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., isolados de sementes e plantas com sintomas de cancro da haste, em meio BDA.

N ^o	Isolado	Diagnóstico	Tipo conídio
1	Dphm-6093	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
2	Dphm-CH8	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
3	Dphm.-03/99	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i> .	α
4	Dphm-45/95	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
5	Dph-49/98-	<i>Diaporthe</i> sp.	α
6	Dphm-01/96	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
7	Dphm-02/96	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
8	Dphm-36/94	<i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i> .	α
9	Dph-03/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
10	Dphm-04/96	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
11	Dph-05/96	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
12	Dph-06/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
13	Dph-07/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
14	Dph-08/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
15	Dph-09/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
16	Dph-10/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
17	Dph-11/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
18	Dph-12/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
19	Dph-13/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
20	Dph-14/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
21	Dph-15/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
22	Dph-16/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
23	Dph-17/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
24	Dph-18/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
25	Dph-19/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
26	Dph-20/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α
27	Dph-83/97	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
28	Dph 99/97	<i>Diaporthe</i> sp.	α
29	Dphm-42/95	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
30	Dph 96/97	<i>Diaporthe</i> sp.	α
31	Dphm-44/95	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
32	Dphm-109/97	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
33	Dphm-47/95	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
34	Dphm-59/97	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
35	Dphm 60/97	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
36	Dphm-65/97	<i>D. phaseolorum</i> var. <i>meridionalis</i>	α
37	Dph-21/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
38	Dph-22/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α e β
39	Dph-23/96	<i>Diaporthe</i> sp.	α

As características de coloração de micélio apresentadas pelo isolado 43, bem diferente dos outros isolados de Dphm, pode ser atribuída à grande variabilidade existente entre os isolados do fungo causador do cancro da haste e da vagem da soja (KEELING, 1985a; KEELING, 1985b; HIGLEY & TACHIBANA, 1987, MORGAN-JONES, 1989). Segundo AZEVEDO (1997), a ocorrência de grupos de anastomose entre hifas de Dphm, com possível processo heterocariótico dentro desta espécie, elucidam fenômenos como o surgimento de novas raças fisiológicas, bem como poderia explicar as alterações na coloração do micélio.

Em relação à esporulação dos isolados estudados, não foi possível sua constatação até a avaliação efetuada aos 30 dias. Esta demora na obtenção desta característica evidencia a limitação do meio de Czapeck para a detecção e identificação do patógeno, utilizando-se o método do plaqueamento em ágar, em testes de rotina de análise de sanidade de sementes.

De acordo com os resultados expressos na Tabela 3, na avaliação feita aos três dias, mostraram que em BDA a maioria dos isolados apresentou crescimento micelial superior em relação aos meios de soja e de Czapeck.

O crescimento micelial, em meio Czapeck, dos isolados número 3, 10, 27, 32 e 33 foram significativamente inferiores aos demais isolados da var. *meridionalis* e das outras espécies de *Diaporthe*. Observou-se também que, apesar da maioria dos isolados de Dphm apresentarem os menores valores de crescimento micelial, eles não diferiram de outros isolados de Dph. Não foi constatada diferença de crescimento micelial entre os isolados de Dphm, nos meios de soja e de BDA, os quais se comportaram de maneira semelhante à maioria dos isolados de Dph.

Na avaliação, aos sete dias (Tabela 4), observou-se que no meio Czapeck, 17 isolados, entre estes Dphm e Dph, apresentaram crescimento micelial inferior, quando comparados com o obtido nos meios de soja e BDA. Não foi constatada diferença de crescimento micelial nos meios de soja e BDA entre os isolados, exceto para os de número 12, 24 e 36 para BDA e 12, 20 e 24 para soja. Em relação ao meio Czapeck, somente o isolado de número 17 (Dph), apresentou crescimento micelial inferior em relação aos isolados de Dphm, comportando-se de maneira semelhante aos dos isolados de Dph 5, 12, 14, 21 e 30.

Analisando-se as Tabelas 3 e 4, observa-se que os isolados de Dphm não apresentaram um padrão de crescimento micelial semelhante entre si para cada meio de cultura estudado, apresentando variações dentro destes meios, não havendo possibilidade, por esta característica, de separa-los de outras espécies de Dph que colonizam sementes de soja, quando se usa o método do plaqueamento em ágar.

Tabela 3 - Diâmetro médio de colônias, em cm, de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., incubados à temperatura de 25° C, em diferentes meios de cultura, avaliados aos 3 dias de incubação.

Nº	Isolado	Meio de cultura								
		Czapeck		Soja		BDA				
		3 dias								
1	Dphm-8498	1,53	lmn	C	2,20	efjhi	B	2,66	bcdef	A
2	Dphm-CH8	1,77	ijkl	C	2,35	bcdefg	B	2,76	abcde	A
3	Dphm-03/99	1,00	o	C	2,47	abcde	B	2,73	bcde	A
4	Dphm-45/95	1,54	lm	C	2,16	fghi	B	2,82	abc	A
5	Dph-49/98	2,16	abcde	C	2,56	abc	B	2,84	abc	A
6	Dph-01/96	1,53	lm	C	2,19	efghi	B	2,53	cdefg	A
7	Dph-01/96	1,90	defghijk	B	2,30	bcdefgh	A	2,40	fgh	A
8	Dphs-36/94	2,20	abcd	C	2,48	abcde	B	2,80	abcd	A
9	Dph-03/97	2,44	a	B	2,43	abcdef	B	2,77	abcde	A
10	Dph-04/97	1,22	no	B	2,23	defghi	A	2,46	efg	A
11	Dph 05/96	1,62	klm	C	2,27	bcdefghi	B	2,83	abc	A
12	Dph-06/96	1,86	efghij k	B	2,07	ghi	AB	1,96	j	A
13	Dph-07/96	2,17	abcde	B	2,23	defghi	B	2,50	defg	A
14	Dph-08 /96	2,11	bcdefg	B	2,30	bcdefgh	B	2,49	defg	A
15	Dph-09/96	1,93	cdefghi	B	2,12	fghi	AB	2,29	ghi	A
16	Dph-10/96	2,23	abc	B	2,23	defghi	B	2,71	bcdef	A
17	Dph-11/96	1,80	ghijkl	C	2,41	abcdef	B	2,89	ab	A
18	Dph-12/96	2,06	cdefghi	B	2,48	abcde	A	2,60	bcdef	A
19	Dph-13/96	2,11	bcdefg	C	2,31	bcdefgh	B	2,65	bcdef	A
20	Dph-14/96	2,06	cdefghij	A	1,97	i	A	1,98	ij	A
21	Dph-15/96	2,17	abcde	B	2,58	ab	A	2,76	abcde	A
22	Dph-16/96	2,19	abcd	C	2,40	abcdef	B	2,77	abcde	A
23	Dph-17/96	2,13	abcdef	C	2,34	bcdefg	B	2,72	bcde	A
24	Dph-18/96	1,87	efghijk	A	2,20	hi	A	1,98	j	A
25	Dph-19/96	2,24	abc	B	2,36	abcdefg	B	2,75	bcde	A
26	Dph-20/96	2,10	bcdefgh	C	2,42	abcdef	B	2,70	bcdef	A
27	Dphm-83/97	1,00	o	C	2,29	bcdefgh	B	2,85	ab	A
28	Dph 99/97	2,12	abcdef	C	2,34	bcdefg	B	2,68	bcdef	A
29	Dphm-42/95	1,80	hijkl	C	2,40	defghi	B	2,91	ab	A
30	Dph-96/97	2,04	cdefghij	C	2,41	abcdef	B	2,66	bcdef	A
31	Dphm-44/95	1,40	mn	C	2,33	bcdefgh	B	2,88	ab	A
32	Dphm-109/97	1,00	o	C	2,26	cdefghi	B	2,73	bcde	A
33	Dphm-47/95	1,00	o	C	2,30	bcdefgh	B	2,80	abcd	A
34	Dphm-59/97	1,98	cdefghij	C	2,41	abcdef	B	3,07	a	A
35	Dphm 60/97	1,75	jkl	C	2,27	cdefghi	B	2,89	ab	A
36	Dphm-65/97	1,83	fghij k	C	2,66	a	B	2,12	hij	A
37	Dph-21/97	2,09	bcdefgh	C	2,52	abcd	B	2,86	ab	A
38	Dph-22/97	2,22	abc	B	2,37	abcdefg	B	2,85	ab	A
39	Dph -23/97	2,38	ab	B	2,48	abcde	B	2,79	abcd	A

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e de maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Os resultados dos testes de patogenicidade realizados em casa de vegetação com diferentes isolados de *Diaporthe* estão expressos na Tabela 5.

Na avaliação feita aos 30 dias após a inoculação, constatou-se uma variação de 60 a 100% de plantas mortas inoculadas com Dphm exceto para os isolados 6 (Dphm-01/96) e 7 (Dphm-02/96). Apesar de não ter sido constatada morte das plantas inoculadas com

estes isolados, foram observadas no local da inoculação, lesões necróticas maiores que nas plantas testemunhas. Estes isolados apresentaram as mesmas características morfológicas dos Dphm e foram agrupados juntos aos Dphm, em meio Czapeck, dentro das classes 8 e 9, além disso, foram amplificados com os iniciadores específicos para diferenciação da var. *meridionalis* de outros fungos presentes nas sementes

Tabela 4 - Diâmetro médio de colônias, em cm, de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., incubados à temperatura de 25° C, em diferentes meios de cultura, avaliados aos 7 dias de incubação.

Nº	Isolado	Meio		
		Czapeck	Soja	BDA
7 dias				
1	Dphm-8498	3,06 a A	3,08 a A	3,08 a A
2	Dphm-CH8	3,04 abcdef A	3,08 a A	3,08 a A
3	Dphm-03/99	3,01 abcdef A	3,08 a A	3,08 a A
4	Dphm-45/95	2,90 fghj B	3,08 a A	3,08 a A
5	Dph-49/98	2,80 jk B	3,08 a A	3,08 a A
6	Dph-01/96	3,01 abcdef A	3,08 a A	3,08 a A
7	Dph-01/96	2,90 defghij B	3,08 a A	3,08 a A
8	Dphs-36/94	3,05 abc A	3,08 a A	3,08 a A
9	Dph-03/97	3,08 a A	3,08 a A	3,08 a A
10	Dph-04/97	3,03 abcdef A	3,08 a A	3,08 a A
11	Dph 05/96	3,03 abcdef A	3,08 a A	3,08 a A
12	Dph-06/96	2,77 jk A	2,83 bc A	2,80 b A
13	Dph-07/96	3,00 abcdef A	3,04 a A	3,08 a A
14	Dph-08 /96	2,78 hijk B	3,08 a A	3,08 a A
15	Dph-09/96	3,00 abcdef AB	2,95 a B	3,06 a A
16	Dph-10/96	3,08 a A	3,05 a A	3,08 a A
17	Dph-11/96	2,73 k B	3,08 a A	3,08 a A
18	Dph-12/96	3,05 abcd A	3,08 a A	3,08 a A
19	Dph-13/96	3,06 abc A	3,08 a A	3,08 a A
20	Dph-14/96	3,01 abcdef A	2,70 c B	2,98 a A
21	Dph-15/96	2,79 hijk B	3,08 a A	3,08 a A
22	Dph-16/96	2,99 abcdef B	3,08 a A	3,08 a A
23	Dph-17/96	3,01 abcdef A	3,08 a A	3,08 a A
24	Dph-18/96	2,92 bcdefgh A	2,80 bc B	2,77 bc B
25	Dph-19/96	2,90 efghij B	3,08 a A	3,08 a A
26	Dph-20/96	2,92 cdefghi B	3,08 a A	3,08 a A
27	Dphm-83/97	2,96 abcdef B	3,08 a A	3,08 a A
28	Dph 99/97	3,08 a A	3,08 a A	3,08 a A
29	Dphm-42/95	3,04 abcdef A	3,08 a A	3,08 a A
30	Dph-96/97	2,80 ghijk B	3,08 a A	3,08 a A
31	Dphm-44/95	3,07 a A	3,08 a A	3,08 a A
32	Dphm-109/97	2,95 abcdef B	3,08 a A	3,08 a A
33	Dphm-47/95	3,06 ab A	3,08 a A	3,08 a A
34	Dphm-59/97	3,05 abcde A	3,08 a A	3,08 a A
35	Dphm 60/97	3,02 abcdef A	3,08 a A	3,08 a A
36	Dphm-65/97	2,94 abcdefg B	3,08 a A	2,65 c C
37	Dph-21/97	3,06 abc A	3,08 a A	3,08 a A
38	Dph-22/97	2,97 abcdef B	3,08 a A	3,08 a A
39	Dph -23/97	2,97 abcdef B	3,08 a A	3,08 a A

*Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna e de maiúscula, na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

(Fig. 1). A baixa virulência dos isolados 6 e 7, pode ser atribuída à perda de patogenicidade devido ao procedimento de repicagens sucessivas durante o período de manutenção do fungo de 1996 a 1999, em tubos contendo meio de BDA.

Os isolados 3 e 44, que não amplificaram com os iniciadores projetados, apresentaram sintoma de cancro da haste nos testes de patogenicidade, realizados

em casa de vegetação, comportando-se de maneira bastante agressiva com porcentagem de 90 a 100% de plantas mortas (Tabela 5), além de apresentarem características como tipo e coloração de micélio, semelhante a isolados de Dphm em meio Czapeck (Tabela 6).

Resultados obtidos por VECHIATO (2002) do sequenciamento dos fragmentos de DNA da região do

ITS destes isolados e de *Diaporthespp.* utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5, evidenciaram que a seqüência da região do ITS dos isolados 3 e 44, possuem alta homologia tanto com os isolados das variedades *meridionalis* como os de *caulivora*, de *Diaporthe phaseolorum*. O mesmo não ocorreu com a seqüência de outras espécies de *Diaporthe* que não são agentes causais do cancro da haste da soja.

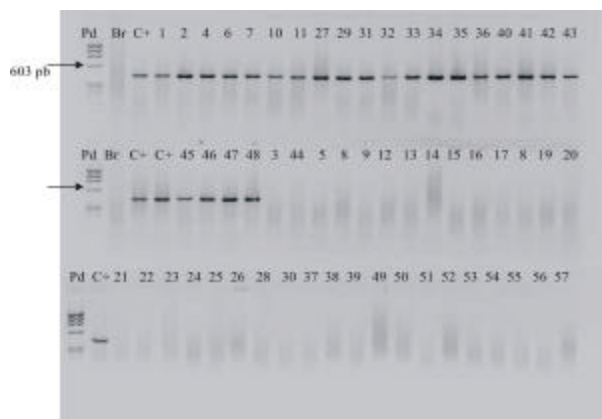


Fig. 1 - Gel agarose, 2%, do PCR com os iniciadores DphmLe e DphmRi e DNAs de micélio de isolados listados Tabela 1 e de Dph isolados de sementes, extraídos com STE e purificados em resina de sílica gel da Wizard-Promega. C+ (controle positivo) = DNA do micélio do isolado 2 (Dphm-CH8) Br - (Branco) = todos os reagentes da mistura de reação de PCR tendo H₂O destilada estéril no lugar de DNA. Pd - (Padrão) = Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) marker 9 (MBI Fermentas) fragmentos de 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194 e 178 bp.

Embora os resultados acima sugeriram que os isolados 3 (Dphm-03/99 EMBRAPA), e o isolado 44 (Dphm 8505-IAC), provenientes da Bolívia e Frutal/SP, respectivamente, pertençam à variedade *meridionalis*, existe uma diferença entre eles e os isolados utilizados na região do DNA reconhecida pelos iniciadores projetados DphLe e DphRi, tendo em vista a ausência de produtos de amplificação desses dois isolados com os iniciadores citados.

Estudos de caracterização do complexo *Diaporthe/Phomopsis* realizados por ZHANG et al. (1998), mostraram que existe diferença entre isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* e entre isolados da var. *meridionalis*, ambos agentes causais do cancro da haste da soja, provenientes de diferentes países e também entre isolados de diferentes regiões dos EUA. Estes autores citam que há possibilidade destas variedades e *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*, pertencerem a um ancestral comum e que a var. *caulivora* e *meridionalis* formam um grupo monofilético.

Os resultados obtidos permitem concluir que não é possível distinguir *Diaporthe phaseolorum* var.

meridionalis de outras espécies de *Diaporthespp.* baseando-se em características como tipo de conídio, coloração e crescimento micelial em meios de BDA, Czapeck e soja. Entretanto, a var. *meridionalis* pode ser diferenciada das outras espécies de Dph, quando se utiliza a técnica de PCR.

Tabela 5 - Teste de patogenicidade do fungo *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* e *Diaporthe spp.*, em plantas de soja da cultivar IAC 14.

Nº Isolado	Prcedência	Plantas mortas (%)
1 Dphm-6093- EMBRAPA	Paraná	100
2 Dphm- CH8- EMBRAPA	Brasil	100
3 Dphm-03/99 -EMBRAPA	Bolívia	70
4 Dphm-45/95- EMBRAPA	Cascavel-PR	90
5 Dph-49/98- EMBRAPA	Argentina	0
6 Dphm -01/96	Goiás	*
7 Dphm -01/96 IB	Orlândia-SP	*
8 Dphs 36/94-EMBRAPA	Uruçui-PI	0
10 Dphm -04/97IB	Avaré-SP	80
11 Dphm -05-IB/97	Guairá-SP	80
27 Dphm-83/97-EMBRAPA	Argentina	60
28 Dph. 99/97-EMBRAPA	Argentina	0
29 Dphm-42/95-EMBRAPA	Cascavel-PR	100
30 Dph.-96/97-EMBRAPA	Argentina	0
31 Dphm-44/95-EMBRAPA	Guarapuava-PR	70
32 Dphm-109/97-EMBRAPA	Argentina	80
33 Dphm-47/95-EMBRAPA	Ponta Grossa-PR	80
34 Dphm-59/97-EMRAPA	Brasil	70
35 Dphm 60/97-EMBRAPA	Brasil	80
36 Dphm-65/97-EMBRAPA	Luiziana-GO	100
37 Dphm/8498-IAC	Colômbia-SP	100
38 Dphm-8493-IAC	Colômbia-SP	100
39 Dphm-8497-IAC	Colômbia-SP	80
40 Dphm -8496-IAC	Faz. Mundo Novo	100
41 Dphm-8505-IAC	Frutal-MG	100
42 Dphm-8509-IAC	Ipauçu-SP	70
43 Dphm-9093-IAC	Tarumã-SP	100
44 Dphm-9983-IAC	Assis-SP	100
45 Dphm-10057-IAC	Mococa-SP	100
46 Dph -89/01 - IB	Dourados-MS	0
47 Dph -90/01 - IB	Dourados-MS	0
48 Dph-91/01 - IB	Formosa-GO	0
49 Dph -92 /01- IB	Formosa-GO	0
Testemunha		0

* sintomas de cancro da haste nas plantas.

Dphm- *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* identificado e enviados pelo Dr. José Tadashi Yorinori EMBRAPA-Soja e Dra. Margarita F. Ito do Instituto Agronômico de Campinas.

Dphs- *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* identificado pela EMBRAPA-Soja. Dph.- *Diaporthe spp.*

Tabela 6 - Agrupamento de isolados de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* e *Diaporthe* spp., segundo características miceliais e coloração em meios de cultura batata ágar dextrose e Czapeck.

Grupos	Meios de cultura	
	Batata dextrose-ágar	Czapeck
1	16 e 32	-
2	01, 04, 07, 25, 27, 29, 30, 33, e 34	13, 25, 28, 38 e 39
3	02, 03, 06, 09, 10, 13, 15, 19, 26, 35, 36 e 39	05, 15, 26, 30 e 37
4	12, 14, 17, 28, 37, e 38	09, 12, 14, 17, 19 e 43
5	11 e 31	16
6	05, 08, 21 e 22	8, 21 e 22
7	18, 20, 23 e 24	18, 20, 23 e 24
8		01, 02, 03, 04, 07, 10, 11, 27, 29, 31, 33 e 36, 41, 45, 46, 47 e 48
9		06, 32, 34, 35, 40, 42 e 44

1. micélio cotonoso castanho; **2.** micélio cotonoso esbranquiçado a castanho claro; **3.** micélio cotonoso castanho claro a castanho; **4.** micélio cotonoso castanho a castanho escuro; **5.** micélio cotonoso castanho claro; **6.** micélio cotonoso bege esverdado; **7.** micélio cotonoso bege avermelhado; **8.** micélio lanoso (tipo feltro) castanho; **9.** micélio lanoso (tipo feltro) castanho, com pouco de micélio aéreo castanho escuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATHOW, A.L. & CARDWELL, R.M. A comparative study of *Diaporthe* stem canker and pod and stem blight of soybeans. *Phytopathol.*, v.44, p.319-325, 1954.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. *Summa Phytopathol.*, v.2, p.3-15, 1997.
- BATISTA, M.F. Métodos moleculares para a identificação de patógenos. *Rev. Annu. Patol. Plant.*, v.1, p.165-196, 1993.
- COSTA, J.A. & MARQUEZAN, E. *Característica dos estádios de desenvolvimento da soja*. Campinas: Fundação. Cargill, 1982. 30p.
- FERNANDEZ, F.A. & HANLIN, R.T. Morphological and RAPD analyses of *Diaporthe phaseolorum* from soybean. *Mycologia*, v.88, p.425-440, 1996.
- FIGUEIREDO, M.B. Estudos sobre a aplicação do método de Castellani para preservação de fungos patógenos em plantas. *Biológico*, São Paulo, v.33, p.9-13, 1967.
- HIGLEY, P.M. & TACHIBANA, H. Physiologic specialization of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in soybean. *Plant Dis.*, v.71, p.815-817, 1987.
- HOBBS, T.W. & PHILLIPS, D.V. A identification of *Diaporthe* and *Phomopsis* isolates from soybean. *Phytopathol.*, v.75, p.500, 1985.
- KEELING, B.L. A seedling test for resistance to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *culivora*. *Phytopathol.*, v.77, p.807-809, 1982.
- KEELING, B.L. Observations on pathotypes of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Phytopathol.*, v.75, p.510, 1985a.
- KEELING, B.L. Soybean cultivar reactions to soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and pathogenic variation among isolates. *Plant. Dis.*, v.69, p.132-133, 1985b.
- KEELING, B.L. Influence of temperature on growth and pathogenicity of geographic isolates of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*. *Plant Dis.*, v.72, p.200-202, 1988.
- KULIK, M.M. Symptomless infection, persistence, and production of picnidia in host and non-host plants by *Phomopsis batatae*, *Phomopsis phaseoli* and *Phomopsis sojiae*, and the taxonomic implications. *Mycologia*, v.76, p.274-291, 1984.
- LUTTRELL, E.S. *Diaporthe phaseolorum* var. *sojiae* on crop plants. *Phytopathol.*, v.37, p.127-150, 1947.
- MORGAN-JONES, G. The *Diaporthe/Phomopsis* complex: taxonomic considerations. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., 1989, Buenos Aires. *Proceedings*. Buenos Aires: Asociación Argentina de la Soya, 1989. v.4, p.1699-1706.
- PLOFFER, L.D. The *Diaporthe/Phomopsis* disease complex of soybean. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 4., 1989, Buenos Aires. *Proceedings*. Buenos Aires: Asociación Argentina de la Soya, 1989. v.4, p.1695-1697.
- SINCLAIR, J.B. & BACKMAN, P.A. *Compendium of soybean diseases*. 3. ed. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1989.
- THREINEN, J.T.; KOMMEDAHL, T.; KLUG, R.J. Hibridization between radiation induced mutants of two varieties of *Diaporthe phaseolorum*. *Phytopathol.*, v.49, p.797-801, 1959.
- TUITE, J. *Plant pathological methods - Fungi and Bacteria*. Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.
- VECHIATO, M.H. Detecção e identificação de *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis* em sementes de soja por PCR. Botucatu: 2002. 115p. [Tese (Doutorado) - UNESP Campus de Botucatu].
- VECHIATO, M.H.; MARTINS, E.M.F.; MARINGONI, A.C.; CARVALHO, A.C.S. Uso de PCR na identificação de *Diaporthe phaseolorum* f.sp. *meridionalis* em sementes de soja. *Summa Phytopathol.*, v.27, n.1, p.125, 2001.
- YORINORI, J.T. Detecção do agente causador do cancro da haste em sementes de soja. In: MENTEN, J.O.M. (Ed). *Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Universidade de São Paulo/FEALQ, 1991. p.109-113.
- YORINORI, J.T. *Cancro da haste da soja: epidemiologia e controle*. Londrina: Embrapa - Soja, 1996. 75p. (Circular Técnica, 14).
- ZHANG, A.W.; RICCIONI, L.; PEDERSEN, W.L.; KOLLIPARA, K.P.; HARTMANG, G.L. Molecular identification and phylogenetic grouping of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* isolates from soybean. *Phytopathol.*, v.88, p.1306-1314, 1998.

Recebido em 7/1/03

Aceito em 17/4/03