

em Ciências Biológicas/UFS<sup>1</sup>, Av Marechal Rondon s/n, São Cristóvão/SE; (Embrapa Tabuleiros Costeiros<sup>2</sup>, Caixa Postal 44, 49025-040, Aracaju, SE). [jcosta@cpatc.embrapa.br](mailto:jcosta@cpatc.embrapa.br). Genetic variability on *Phyllachora torrendiella* e *Sphaerodothis acrocomiae* disclosed by ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis).

Os fungos *Phyllachora torrendiella* (Batista) Subileau e *Sphaerodothis acrocomiae* (Montagne) von. Arx & Muller são patógenos do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) causando a lixa pequena e lixa grande, respectivamente, ocasionando enfraquecimento dos folíolos e levando a queda prematura dos frutos. Este trabalho teve como objetivo analisar a similaridade genética entre estes patógenos procurando caracterizar sua filogenia por análise de DNA Ribossomal. Para isso foram obtidos 7 isolados de lixas originários das variedades de coqueiro Anão Vermelho da Malásia, Anão Vermelho dos Camarões, Anão Verde Jiqui, Anão Vermelho Gramame, Anão Amarelo Gramame, Gigante da Malásia e Anão Amarelo Malásia. Destes foram extraídos esporos individuais que foram cultivados em meio de cultura contendo glucos (0,5%), tiamina (0,1CEg/ml), riboflavina (0,05CEg/ml), piridoxina (0,5CEg/ml), pantotenato de cálcio (0,2CEg/ml), inositol (0,4CEg/ml), ácido nicotínico (0,2CEg/ml), elementos essenciais e soluções de sais (Holliday, 1979), com pH ajustado em 3. Estes permaneceram sob gitação contínua por quinze dias a 130 rpm à 25 ± 2°C. Os micélio formados foram secos com o auxílio de uma bomba a vácuo, sendo psteriormente armazenados em freezer a -20°C. A extração do DNA genômico foi realizada a partir do método de Roeder & Broda (1985). Utilizou-se a técnica ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restrictioct on Analysis) para análise da região 18S, amplificada com os 2 prime s, NS1 e NS4. Os produtos amplificados foram digeridos utilizando-se *H* f I, *M*SP I e *Hae* III como enzima de restrição. A análise do dados foi realizada a partir do gel de Agarose a 1,4% + 10ng/CEg de Brometo de Etídio a 110 V, fotodocumentada em sistema Polaroyd. A análise *Hinf* I revelou baixa similaridade genética entre os fungos indicando serem organismos geneticamente distintos.

\*Bolsista PQ do CNPq.

Apoio CNPq e FINEP

090

ROLE OF THE *Pth1* GENE IN APPRESSORIUM MATURATION IN *Magnaporthe grisea*. M. CRISTINA de FILIPPI<sup>1</sup>, JANNA BECKERMAN, CARLOS CORTES, JIM SWEIGARD, BARBARA VALENT and DANIEL EBBOLE<sup>2</sup>. (Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375, Goiânia,GO)<sup>1</sup>. [cristina@cnpaf.embrapa.br](mailto:cristina@cnpaf.embrapa.br) (Plant Pathology & Microbiology, Texas A&M University, College Station, TX)<sup>2</sup>

*M. grisea pth1* mutants form defective appressoria, which are unable to generate sufficient cellular turgor to penetrate the host leaf surface. The deduced protein sequence from these gene display extensive internal homology within the leucine-rich repeat and are most closely related to *Grr1p* in *S. cerevisiae*. The phenotype of the *pth1* mutant was characterized and compared with its orthologue from *N. crassa*. *pth1* mutants were able to infect plant only after wound inoculation. The appressorial resistance to osmotic pressure from *pth1* mutant was statistic different from wild type strains. The amount of glycogen and lipid were quantified in the conidia, during germination and during appressorium foramtion with glycogen and lipid specific dyes. The *N. crassa* orthologue gene *nfb1* complemented the *M. grisea pth1* mutation. The complemented strain recovered the ability to form normal appressoria, and penetrate the leaf surface for further colonization of the tissue. This suggests that the biochemical function of *pth1* has not evolved specifically to play a role in appressoria development. This result points out the principle that pathogenic fungi may adapt functions used for non-pathogenic processes for roles in pathogenesis.

091

SOBREVIVÊNCIA DE LASIODIPLODIA THEOBROMAE EM RESTOS CULTURAIS DE COQUEIRO. MÔNICA SOUZA DA COSTA<sup>1</sup> E JEFFERSON LUIS DA SILVA COSTA<sup>2\*</sup> - (Estudante de Graduação em Ciências Biológicas/UFS<sup>1</sup>, Av Marechal Rondon s/n, São Cristóvão/SE; Embrapa Tabuleiros Costeiros<sup>2</sup>, Caixa Postal 44, 49025-040,

Aracaju, SE). [jcosta@cpatc.embrapa.br](mailto:jcosta@cpatc.embrapa.br). Survival of *Lasiodiplodia theobromae* on Crop Residues of Coconut.

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* Pat. (Griffon & Maubl) agente etiológico da queima das folhas, é um dos responsáveis pela redução da produtividade de coqueiros no Brasil. O manejo ou eliminação da palhada é incipiente e considerada onerosa. Sua utilidade profilática como redutor de fonte de inóculo de doenças tem sido questionada pelos produtores. Desta forma, objetivou-se neste trabalho estudar o período de sobrevivência de *L. theobromae* em restos culturais de coqueiro. Utilizaram-se folíolos senescentes que apresentavam os sintomas da doença em sua fase terminal. No interior da tampa da caixa tipo gerbox foi fixado um papel toalha umedecido, de modo a formar uma câmara úmida, e sobre este, segmentos de folíolos de aproximadamente 6cm de comprimento, originários do campo e com sintomas severos da doença. Na superfície interna da base da caixa foram fixadas três fitas plásticas tipo Melinex, para coleta dos esporos liberados por esses folíolos. As fitas foram untadas com solução adesiva a base de Gelvatol 10% e sobre esta foi aplicada uma camada de vaselina mais parafina dissolvidas em tolueno. Foram montadas um total de 12 caixas, que ficaram expostas a uma temperatura de 28°C ± 2°C e umidade interna da caixa superior a 85%. Quatro dessas caixas foram submetidas a um regime contínuo de luz (24 horas); quatro, sob escuro contínuo e quatro, expostas a um regime de fotoperíodo 12x12 horas. A cada três dias as fitas eram retiradas das caixas gerbox e remontadas em lâminas para quantificação de esporos em microscópio óptico. O experimento foi repetido por duas vezes. Constatou-se que o patógeno presente nos restos culturais, constituídos por folíolos senescentes de coqueiro, liberou esporos por até quinze dias após a sua incubação. Estes resultados preliminares indicam que a palhada do coqueiro pode servir de fonte de inóculo para a queima das folhas.

\*Bolsista PQ do CNPq.

092

BIOACTIVE INHIBITION OF APPRESSORIUM FORMATION IN *Magnaporthe grisea*. M. CRISTINA de FILIPPI<sup>1</sup>, DANIEL EBBOLE<sup>2</sup>, CARLOS GONZALEZ<sup>2</sup>. Embrapa Arroz e Feijão, Caixa Postal 179, 75375, Goiânia,GO)<sup>1</sup>. [cristina@cnpaf.embrapa.br](mailto:cristina@cnpaf.embrapa.br)

*Magnaporthe grisea*, rice blast agent causes losses all around the world. Molecular biology offers powerful tools to develop anti-blast agents with new and specific modes of action with environmental safety in mind. Many plant pathogenic fungi differentiate a highly specialized infection structure, the appressorium. The signalling pathway controlling the pheromone response in *S. cerevisiae*, and the environmental and chemical response on *M. grisea* leading to appressorium formation share the same pathways based on cAMP and MAP Kinase. The main objective of this work was to identify a bioactive hexapeptide capable of blocking appressorium formation on artificial inductive surface. The specific objectives were to identify chemicals able to overcome the inhibitory effect of the hexapeptide; test the effect of the hexapeptide on mutants for appressoria formation with known genetic lesions; study the effect of the hexapeptide on the signalling pathway for appressorium formation. The hexapeptide D-CYRFTW is able to block appressorium formation in artificial hydrophobic surface, and projected the same blocking effect when tested against field isolates. The effect of D-CYRFTW can be blocked by the chemicals cAMP and 1, 16-hexadecanediol. Among the mutants for appressorium formation, DA-99 was shown to be resistant to the blocking effect of D-CYRFTW. *MagB*<sup>G42</sup> proved to be susceptible to the blocking effect of D-CYRFTW. The results of these studies indicate that the peptide acts above adenylate cyclase and/or at the level of the G-alpha subunit, preventing activation of cAMP signaling in response to surface cues. Preliminary studies of total PKA activity revealed changes in PKA activity during the time course of appressorium development.

093

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF SECRETED PROTEINS FROM *Magnaporthe grisea*. GUODONG LU<sup>1</sup>, CRISTINA FILIPPI<sup>2</sup>, DAN LI<sup>1</sup> and DANIEL EBBOLE<sup>1</sup> <sup>2</sup>(Department of Plant

Pathology & Microbiology, Texas A & M University, College Station, TX 77843, U.S.A)

Secreted proteins are the most likely candidates for being elicitors of resistance gene products in rice and other host plants. To identify the candidate secreted protein genes in *M. grisea*, the 5' ends of genes in the *M. grisea* EST databases, and genes from genomic sequences were analyzed using the SIGNALP-2.0 program. Additionally, were analyzed homolog of predicted secreted proteins of *N. crassa*. We identified 642 potentially secreted proteins from 10082 *N. crassa* ORFs. Then it was used PSORT ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)) to further assess this set to identify 377 genes predicted to be secreted in *N. crassa*. Of these 377 putative secreted proteins, 271 matched with *M. grisea* genes (TBLASTN). To functionally test the predicted protein, the candidate genes are being expressed in *M. grisea*, strain 70-15, with an RGS-His tag and green fluorescent protein (GFP) by fusion to analyze the location of the gene products. Transformants were screened rapidly by PCR. Western blotting was used to examine protein expression in cells or in culture medium filtrate (secreted proteins). Fluorescence microscopy was used to observe the GFP fusion proteins. Western blot results showed that extracellular gene-His tag (anti-His) and gene::GFP (anti-GFP) proteins were detected in culture filtrates of young mycelia, which confirmed that they are secreted.

094  
DESCRIÇÃO E ILUSTRAÇÃO DO AGENTE CAUSAL, DIDYMELLA BRYONIAE. ADALBERTO C. CAFÉ-FILHO<sup>1</sup> E GIL RODRIGUES DOS SANTOS<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Fitopatologia, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF; <sup>2</sup>Universidade Federal de Tocantins/Agronomia, 77410-000, Gurupi, TO). [gilrsan@uol.com.br](mailto:gilrsan@uol.com.br). Occurrence of gummy stem blight in watermelon in the state of Tocantins, description and illustration of the causal agent, *Didymella bryoniae*.

A principal doença da melancia no Tocantins é o crestamento gomoso do caule. Em 2003, plantas de melancia cv. Crimson Sweet foram coletadas no Projeto Formoso, TO, para análise no laboratório de Fitopatologia da Universidade de Brasília. Lesões velhas e novas presentes em caule e folhas foram cortadas, fixadas e observadas ao microscópio eletrônico de varredura JEOL®, JSM-840A. Também foram feitos cortes do tecido afetado ao microtomo manual, Micron®, HM 505E. As frutificações do fungo foram mensuradas ao microscópio óptico. Foram observadas as fases anamórfica e teleomórfica do fungo. O teleomorfo, presente em lesões mais velhas, apresentou pseudotécio com diâmetro variando de 125-147 (X= 135,3Çem), formando ascos com dimensão média de 62,4 Çem, contendo ascósporos hialinos, bicelulares, com septo mediano, apresentando ou não constricção, de formato oval a fusiforme com dimensões de 12,2-17,1 (X = 13,7) Çem por 4,9 Çem. O anamorfo, presente em lesões mais jovens, apresentou picnídio com diâmetro variando de 147 a 183,7 Çem (X= 167,2 Çem), e conídios adultos bicelulares de 9,8-12,2 (X= 11,6) Çem por 3,6 Çem. O fungo foi identificado como *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. O anamorfo foi identificado como *Ascochyta cucumis* Fautr. & Roum. A partir de lesões de haste apresentando frutificações de *A. cucumis*, o patógeno foi isolado em BDA, obtendo-se um micélio acinzentado. Teste de patogenicidade foi realizado com a inoculação com disco de micélio em caule previamente ferido. Decorridos cinco dias da inoculação foram constatados os sintomas da doença. Figueiredo & Cardoso (O Biológico, 30: 324-325, 1964), haviam registrado a ocorrência desta doença em melancia, como causada por *Mycosphaerella melonis*, porém não mencionaram, descreveram ou ilustraram as estruturas do patógeno. As observações deste trabalho indicam que os isolados do Tocantins classificam-se como *D. bryoniae* e *A. cucumis*. Este é o primeiro registro da descrição e ilustração da fase perfeita do patógeno no Brasil.

095  
REAÇÃO DE CULTIVARES DE ALGODOEIRO A *Pratylenchus brachyurus*. ANDRESSA C. Z. MACHADO<sup>1</sup>; LUIZ CARLOS C. B. FERRAZ & MÁRIO M. INOMOTO. (Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/UPS, Av. Pádua Dias, 11,

C.P. 9, 13418-900, Piracicaba-SP). <sup>1</sup>Bolsista FAPESP. E-mail: [andressa@esalq.usp.br](mailto:andressa@esalq.usp.br) Reaction of cotton cultivars to *Pratylenchus brachyurus*.

A alta frequência de *Pratylenchus brachyurus* configura-se novidade e também motivo de preocupação em áreas de produção de algodão, devido à escassez de informações sobre as relações entre esse nematóide e a cultura. Além disso, outras culturas importantes para os sistemas de produção de grãos nos principais Estados produtores de algodão, tais como milho e soja, também são suscetíveis ao nematóide. Até o momento, aparentemente, não há fontes de resistência em nenhuma dessas plantas a *P. brachyurus*. Visando determinar a reação de algumas cultivares de algodão, dentre as mais plantadas atualmente, a *P. brachyurus*, realizaram-se dois experimentos de casa de vegetação. As cultivares testadas foram: Delta Opal, BRS Ipê, Coodetec 405, BRS Cedro, Makina, Fabrika e FMT Saturno, no experimento 1, e Acala 90, Delta Penta, DP 4049, BRS Aroeira, IAC 24, ITA 90 e SM, no experimento 2. A densidade populacional inicial (Pi) de *P. brachyurus* utilizada foi de 1.000 nematóides/planta. A avaliação foi realizada através da extração dos nematóides do solo e das raízes e posterior contagem em lâmina de Peters. O fator de multiplicação do nematóide (Pf/Pi) foi estimado tomando-se a sua população final (Pf substrato + Pf raízes) e dividindo-se esse valor pela população inicial (Pi). Os resultados encontrados mostraram que as cultivares nacionais, como BRS Cedro, BRS Ipê, BRS Aroeira, FMT Saturno apresentaram-se como as mais desfavoráveis à multiplicação de *P. brachyurus*, enquanto que as cultivares Delta Opal e Coodetec 405 permitiram as maiores taxas de multiplicação do nematóide.

096  
CONTROLE QUÍMICO DO CRESTAMENTO GOMOSO DO CAULE NA CULTURA DA MELANCIA NO PROJETO FORMOSO, TOCANTINS. ADALBERTO C. CAFÉ-FILHO<sup>1</sup>; GIL RODRIGUES DOS SANTOS<sup>1,2</sup> E LUCIANO MARCELO F. SABOYA<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Dept. Fitopatologia, Universidade de Brasília, 70910-900, Brasília, DF; <sup>2</sup>Universidade Federal de Tocantins/Agronomia, 77410-000, Gurupi, TO). [gilrsan@uol.com.br](mailto:gilrsan@uol.com.br). Chemical control of gummy stem blight in watermelon in the Formoso Project, Tocantins State, Brazil.

O crestamento gomoso do caule (CGC) é uma das doenças mais importantes da melancia. O objetivo deste trabalho foi estudar o controle químico do CGC na cultura da melancia no Projeto Formoso, Tocantins. Foram conduzidos dois ensaios em condições de campo e delineamento de blocos ao acaso com 4 repetições. As parcelas experimentais mediram 30 x 10 m. Para o ensaio I, os tratamentos (fator a) constaram dos seguintes ingredientes ativos de fungicidas/100 l de água ou ha: 1-Mancozeb (MANC)-160,2 ml, 2-Tiofanato Metílico (TM)-49 g, 3-Carbendazin-500 ml, 4-Tebuconazole-20g, 5-Difenoconazole (DIFE)-75 ml, 6-Tiofanato Metílico-40 g + Clorotalonil-100 g, 7-Oxicloreto de cobre-168 g, 8-Trifloxistrobina-87,5 g + Propiconazole-87,5 g, 9-Mancozeb-80 ml + Difenoconazole-37,2 ml e 10-Testemunha. No fator b, estudou-se a adubação de cobertura (N-K) nos níveis de 30-20 e 90-60 kg/ha. A severidade da doença nas folhas foi avaliada com uma escala de notas de 0 a 9. Para o ensaio II, utilizou-se a mesma metodologia e tratamentos do ensaio I, diferindo-se o fator (b, níveis de adubação), onde testou-se 60-40 e 120-80 kg/ha de N-K. Nos dois ensaios menores Áreas Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD) foram obtidas com MANC + DIFE, TM + Clorotalonil, MANC, Trifloxistrobina + Propiconazole e Oxicloreto de cobre que diferiram dos demais tratamentos. Não houve diferença estatística entre os tratamentos no controle do cancro no caule. A adubação de cobertura não influenciou a incidência da doença. As mais altas produtividades foram obtidas com TM + Clorotalonil, MANC + DIFE e MANC que diferiram estatisticamente do DIFE, Testemunha e Trifloxistrobina + Propiconazole. Nos dois ensaios, o tratamento Trifloxistrobina + Propiconazole controlou bem a doença nas folhas, porém, não resultou em boa produtividade devido ter provocado fitotoxicidez. Menores produtividades foram obtidas com 30-20 kg/ha e 60-40 kg/ha de N-K, quando comparado com a cobertura de 90-60 kg/ha e 120-80 kg/ha. Houve correlação negativa entre AACPD e a produtividade dentro dos quatro níveis de adubação testados.