

0440

Expression in *Escherichia coli*, purification, and production of a polyclonal antiserum for a recombinant 29K protein of *Pepper ringspot virus* (PepRSV). Regatieri, L.J.¹; Gaspar, J.O.¹; Rezende, J.A.M.². ¹UNESP, São José do Rio Preto, SP. 2ESALQ/USP, Piracicaba, SP. E-mail: gaspar@ibilce.unesp.br. Expressão em *Escherichia coli* e purificação da possível proteína do movimento 29K do *Pepper ringspot virus* (PepRSV).

The expression of viral proteins in *E. coli* allows the production of sufficient quantities to obtain antisera. This study describes the expression, purification, and production of polyclonal antiserum for the putative 29K movement protein of PepRSV. Viral RNA and specific oligonucleotides were used in PCR reactions. The amplified fragment and the pET 28a expression vector, cut with *Bam*HI/*Hind*III, were used in a ligation reaction with T4 DNA ligase. After selection, the recombinant vector was used in the transformation of *E. coli* BL 21, and expression was induced with 1mM IPTG for 4 hours. Expression was confirmed by SDS-PAGE, and the recombinant protein was purified in Ni-NTA-affinity resin. The expressed protein showed a molecular mass of ~35 kDa (5 kDa from the vector's 5 histidine residues + 29 kDa from the viral protein) and a concentration of 300 mg/liter of culture medium. When injected in rabbit (300 µg per injection), it induced the formation of antibodies that were specific for the 29K recombinant protein in a Western Blot, and did not react with heterologous proteins. Experiments to detect the protein in infected-leaf extracts are underway. This antiserum will have great importance in future studies toward a better understanding about the function of this protein.

0441

Deteção molecular do fungo fitopatogênico *Chalara elegans* em substratos. Markoski¹, M. M.; Dal Bosco¹, M.; Finger¹, G.; Duarte¹, V. ¹Laboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS. E-mail: melmarkoski@gmail.com. Detection of phytopathogenic fungus *Chalara elegans* in substrates.

A detecção de fitopatógenos em amostras de solo e substratos é laboriosa mesmo empregando-se técnicas sensíveis como a PCR, principalmente porque estas amostras contêm compostos que dificultam a obtenção do DNA molde. Assim, o fungo de solo *Chalara elegans*, agente causal da podridão negra de raiz em cenoura, foi utilizado como modelo para a padronização de um protocolo de detecção molecular otimizado. Os cultivos foram feitos em diferentes substratos contendo variadas proporções de turfa, areia, casca de pinheiro ou bagaço de cana. Após 7, 10 ou 17 dias, 0,25 g de cada substrato foram hidratados e 10 µL transferidos para cartões FTA Classic Cards (FTA C) ou Elute (FTA E) (Whatman®), que aprisiona o DNA lisando os restos celulares. Discos de 1,2 mm de diâmetro de FTA C tratados e 1 µL do produto de eluição de FTA E foram utilizados em PCR com oligonucleotídeos iniciadores projetados para seqüências ITS de *C. elegans*. Ambos os métodos geraram resultados positivos, onde o FTA C foi mais sensível, detectando até 1000 esporos/g de substrato, e o FTA E foi o mais eficiente com frequência de resultados positivos superior a 66% para os substratos testados. Utilizando-se os substratos artificialmente infestados, e não sendo necessário o cultivo em meio de cultura, o tempo para a execução do protocolo foi de 24 a 48 h indicando que o procedimento foi eficiente e rápido.

0442

Deteção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* em plantas de batata através de PCR com oligonucleotídeos projetados para os genes *pnl* e *rdg*. Ribas¹, A. D.; Markoski¹, M. M.; Duarte¹, V. ¹Laboratório de Fitobacteriologia, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, UFRGS. E-mail: aicha.ribas@souzacruz.com.br. Detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in potato plants using oligonucleotides designed to *pnl* and *rdg* genes.

A canela-preta, causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* (Pcbr), está entre as principais doenças bacterianas da batata. Como a principal característica das *pectobactérias* é a produção de enzimas pectolíticas em grande quantidade, os genes *pnl* e *rdg* relacionados à pectina liase foram selecionados para a projeção de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para Pcbr. Os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos dos genes *pnl* e *rdg* mostraram a existência de

seqüências conservadas entre as estirpes de Pcbr, diferenciais em relação *P. carotovorum* subsp. *atroseptica* e *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, a partir das quais foram projetados os *primers* PcbrPnlF/ PcbrPnlR e PcbrRdgF/PcbrRdgR, que amplificam fragmentos de 130 e 180 pb, respectivamente. Para a avaliação dos *primers*, 10 hastes de plantas de batata, apresentando sintomas de canela-preta, foram coletadas em quatro lavouras do município de São Francisco de Paula, RS. A obtenção do DNA molde foi feita através das técnicas de fervura e utilizando cartões FTA (Whatman®). Pcbr foi detectada através de PCR, confirmando a especificidade dos *primers* para as estirpes coletadas a campo, onde a técnica de obtenção do DNA molde por FTA apresentou-se mais sensível.

0443

Potencial de aplicação de *Trichoderma* sp. em manejo integrado de doenças com carboxim e thiram. Ribas, P.P.^{1,2}; Matsumura, A.T.S.^{2,3}; Oliveira, A.M.R.¹; Almança, M.A.K.³; Paz, I.C.P.³; Santin, R.C.M.³; Silva, M.E.³; Prade, C.A.³, priscila-ribas@uergs.edu.br. ¹Universidade Estadual do Rio Grande do Sul. ²ICB BIOAGRITEC Ltda. ³Departamento de Fitossanidade – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Potential of application of *Trichoderma* sp. in integrated management of diseases with carboxim and thiram.

O manejo integrado de doenças constitui-se no uso de práticas harmonicamente coordenadas, como o uso de *Trichoderma* sp. em combinação com fungicidas. Como este fungo tem comportamento variável a diferentes princípios ativos, foi avaliada a sua compatibilidade com os princípios ativos carboxim e thiram. Utilizou-se um produto comercial à base de *Trichoderma* sp. em 3 meios distintos: sólido BDA em placas, líquido BD em frascos sob agitação e substrato (2 vermiculita : 1 areia), com 10 repetições e 3 tratamentos: apenas o produto comercial à base de *Trichoderma* sp.; apenas carboxim e thiram, na dose recomendada pelo fabricante; e carboxim e thiram concomitantemente ao produto comercial. Incubados a 28°C e fotoperíodo de 12h. Na presença dos fungicidas houve crescimento de *Trichoderma* sp. em 50% das placas, 70% substrato e em meio líquido não foi verificado crescimento de *Trichoderma* sp.. Nas testemunhas somente com *Trichoderma* sp. o crescimento foi de 100% e de 0% nas tratadas apenas com os fungicidas. Em função do crescimento significativo de *Trichoderma* sp. em meio de cultura sólido e substrato com fungicidas, podemos considerar viável a aplicação de *Trichoderma* sp. em manejo integrado concomitantemente ao carboxim e thiram.

0444

Relação entre teor de clorofila nas folhas e a severidade de brusone nas panículas em arroz de terras altas Prabhu, A.S., Filippi, M.C., Silva-Lobo, V., Silva, G. B., Venâncio, W.L. Embrapa Arroz e Feijão, C.P. 179, 75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO; e-mail: prabhu@cnfap.embrapa.br. Relation between chlorophyll content in leaves and panicle blast in upland rice.

A época de plantio e o nível de adubação nitrogenada determinam o grau de severidade da brusone nas panículas causada por *Pyricularia grisea*, em arroz de terras altas. Foi realizado um experimento de campo com a cultivar BRS Bonança visando determinar a relação entre conteúdo de clorofila nas folhas superiores e a severidade de brusone nas panículas. O delineamento foi blocos ao acaso em esquema de parcelas subdivididas com três repetições. Os tratamentos consistiram de 12 épocas de plantios semanais iniciando 09/11/2005 e cinco níveis de nitrogênio (0, 15, 30, 60 e 120 kg⁻¹ de N). As leituras do teor de clorofila foi feita na folha bandeira de 20 perfilhos por parcela com um clorofilometro (Minolta SPAD-501). A brusone nas panículas foi avaliada 15 dias após emissão e 10 dias antes de colheita. A brusone nas panículas o teor de clorofila aumentaram significativamente com o aumento de níveis de nitrogênio. Houve uma correlação significativa e positiva entre os níveis de N e conteúdo de clorofila na folha bandeira ($r = 0,98$; $p \leq 0,01$). A relação entre a severidade de brusone nas panículas e o teor de clorofila foi linear e positivo ($r = 0,99$; $p \leq 0,01$). Estes resultados mostraram que o teor de clorofila deve ser incluído como variável independente no desenvolvimento de modelo matemática para previsão de brusone nas panículas.