

483

ISOLATION, IDENTIFICATION AND POSSIBLE ROLE OF PHYTOALEXINS ON THE RESISTANCE OF COCOA (*Theobroma cacao* L.) TO VERTICILLIUM WILT (*Verticillium dahliae* Kleb.). M. L. V. Resende¹, R. M. Cooper², J. Flood², M. G. Rowan³ & M. H. Beale⁴. ¹CEPLAC/CEPEC, C. P. 07, 45600-000-Itabuna-BA; ²School of Biology and Biochemistry and ³School of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Bath, BA2 7AY, U.K.; ⁴Long Ashton Research Station, University of Bristol, Bristol, BS18 9AP, U.K. Isolamento, identificação e possível função de fitoalexinas na resistência do cacauzeiro a murcha-de-Verticillium.

Four inhibitory compounds, here designated C-1, C-2, C-3 and C-4 were extracted from *V. dahliae* inoculated cocoa stems, using diethyl ether as a solvent. Separation was achieved by repeated flash chromatography combined with silica gel thin layer chromatography (TLC) and monitoring by colour reagents, UV light or using *V. dahliae* as tester in TLC bioassays. Mean Rf values in diethyl-ether: petroleum ether: methanol (6:3:1) were: C-1= 0.77, C-2= 0.46, C-3=0.38 and C-4= 0.26. Following purification, their structures were investigated by NMR and GC-MS spectroscopy. C-4 was identified as the triterpenoid, arjunolic acid; C-3 and C-2 as the phenolics, 3,4-dihydroxyacetophenone and 4-hydroxyacetophenone, respectively. The least polar substance (C-1) was unambiguously identified as elemental sulphur, by GC-MS and X-ray crystallography. This is the first report of sulphur accumulation in plants linked with disease resistance. Respective toxicities to *V. dahliae* (ED₅₀ for conidial germination in µg/ml) were: C-1=4.6, C-2=7.8, C-3=118.7, C-4=10.3. Accumulation of C-1 and C-4 was detected only after infection; C-2 and C-3 were induced by either, infection or wounding. All four substances accumulated to maximum inhibitory levels in stems of the resistant cultivar Pound-7 by 15 days after inoculation, but did not reach detectable antifungal levels in the susceptible cv. ICS-1. Elemental sulphur and arjunolic acid are potentially more powerful substances involved in cocoa defence, considering their presence in vascular tissues of a resistant cv., in amounts well above respective toxic levels to conidia *in vitro*.

484

WATER STRESS AND ETHYLENE PRODUCTION BY COCOA (*THEOBROMA CACAO* L.) SEEDLINGS INFECTED WITH DEPOLIATING AND NON-DEPOLIATING ISOLATES OF *VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB. M. L. V. Resende¹, R. Mepsted², W. S. Silva¹, R. M. Cooper² & J. Flood². ¹CEPLAC/CEPEC, C. P. 07, 45600-000-Itabuna-BA, Brazil; ²School of Biology and Biochemistry, University of Bath, Bath, BA2 7AY, U.K. Estresse hídrico e produção de etileno em mudas de cacauzeiro (*T. cacao*) infectadas com isolados desfolhantes e não-desfolhantes de *V. dahliae*.

Some isolates of *V. dahliae* (T-9 and COL-1) induced severe defoliation on cocoa and others led to a complete wilt of the leaves, without defoliation (BA-3, ES-1 and SS-4). The underlying mechanisms that precede the occurrence of these two distinct responses were studied in seedlings of cv. ICS-1 inoculated by soil drenching with isolates T-9 and BA-3, under glasshouse conditions.

Total transpiration, stomatal diffusive resistance and leaf water potential were determined 14, 17 and 21 days after inoculation (or not), each time using the oldest and the youngest fully developed leaf from the canopy of each plant (total of nine replicates/treatment). Ethylene production from respective petioles was measured in a gas chromatograph fitted with a flame ionization detector and an alumina column, 21 days after inoculation.

Rapid and significant (Mann-Whitney U-test; p<0.05) decreases in total transpiration, stomatal conductance and midday leaf water potential of inoculated seedlings were closely associated with the onset of foliar symptoms, indicating that water stress is a major cause of symptom development. Water stress was even more pronounced on the top of the canopies of those plants inoculated with the 'non-defoliating isolate'. By contrast, the 'defoliating isolate' induced higher accumulation of ethylene in newly developed leaves, where the first symptoms commonly appeared. This plant hormone was responsible for the accelerated senescence and defoliation, as demonstrated by application of the ethylene inhibitor, silver thiosulphate.

*Part of the Ph.D. thesis of the first author.

485

METODOLOGIA DE SELEÇÃO PARA RESISTÊNCIA À *Septoria lycopersici* EM TOMATEIRO. SANTOS, J.R.M. (EMBRAPA/CNPH, Cx Postal 0218, 70359-970, Brasília-DF). Methodology to select tomato resistance to *Septoria* leaf spot.

Pescar com alça bacteriana cirros de esporos e riscar em placa-de-Petri contendo meio de BDA+clorofenicol (batata = 250 g; agar = 20 g; água = 1 l e clorofenicol = 100 ppm). Crescer o fungo em luz contínua, a 20°C, por 21 dias. Remover os esporos em água estéril, filtrar em gaze dupla e calibrar para 10⁵ esporos/ml. Cultivar as plantas em vasos (15 x 13 cm) contendo 1,5 litro de solo e inocular com 30 dias após o semeio. Pulverizar bem a superfície das folhas, deixar 48 horas em câmara úmida e transferir para casa de vegetação. Inocular 15 plantas por genótipo, com 3 plantas por vaso e 5 repetições. Avaliar aos 10 dias após a inoculação, nos 5 folíolos terminais da 3ª, 4ª e 5ª folha, os seguintes parâmetros: a) número de lesões por folíolo; b) diâmetro da lesão (medir uma lesão típica por folíolo); c) número de picnídios por lesão (contar 40 lesões típicas por genótipo); d) produção de picnídiosporos (recortar as lesões avaliadas no item "c" e colocar 10 lesões por tubo em 4 tubos de ensaio contendo 1ml de água. Adicionar 0,5 ml de álcool por tubo para evitar germinação. Agitar e contar em hemacitômetro); e) tipo de lesão (S=centro opaco; R=centro escuro). Os genótipos IPA-5, Kada e Ponderosa (susceptíveis) e CNPH 416, CNPH 423 e CNPH 946 (resistentes) são boas

testemunhas padrões para a doença. Genótipos com reação igual ou superior às testemunhas resistentes são considerados resistentes e devem ser avaliados também em campo sob condições de alta infecção natural da doença. O protocolo de "screening", bem como isolados virulentos do fungo e sementes das testemunhas padrões estão disponíveis no CNPH aos interessados.

486

PODRIDÃO DO COLETO DO MARACUJEIRO (*PASSIFLORA EDULIS*) ÂNGELA MARIA LEITE NUNES¹ & FERNANDO CARNEIRO DE ALBUQUERQUE¹ (EMBRAPA-CPATU, Caixa Postal, 48, 66095-100, Belém, PA). Collar rot on passion fruit (*Passiflora edulis*).

No período de outubro a novembro de 1994, constatou-se no município de Santa Izabel, uma doença não relatada no Brasil em plantas de maracujá com um ano de idade, caracterizada pela podridão do coleto. Os sintomas manifestam-se pelo estancamento do desenvolvimento da planta, murcha e secamento rápido das folhas, as quais permanecem presas aos ramos por algum tempo. Na região do coleto e nas raízes laterais pode ser observado o apodrecimento do cortex, inicialmente de consistência dura, evoluindo para cortical esponjosa. A podridão pode se estender de 2 a 10 centímetros acima do nível do solo. Nas áreas de tecidos necrosados mais velhas pode-se observar mucilo branco e peritécios avermelhados do fungo. Dos tecidos infectados foi isolado o fungo *Nectria hamatococca* (*Fusarium solani*). As inoculações artificiais em mudas sadias pelo método de imersão de raízes em suspensão de esporos resultaram em infecções positivas. Dos tecidos infectados de mudas inoculadas o fungo foi reisolado, confirmando a sua patogenicidade. Práticas culturais adequadas à cultura, reduzindo ferimentos e estresse na planta controlam a doença. Aplicações preliminares de benomyl a 500 ppm e captan a 1500 ppm têm contribuído para prevenir o avanço das infecções.

487

DIVERSIDADE GENÉTICA DE RAÇAS DE *COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM* QUE OCORREM NO BRASIL*. A. L. ALZATE-MARIN¹, G. S. BAÍA¹, F. G. FALEIRO¹, G. A. CARVALHO¹, T. J. PAULA JR.¹, M. A. MOREIRA¹, E. G. BARRROS¹ (¹BIOAGRO/UFV; ²EPAMIG/Viçosa; ³DBB/BIOAGRO/UFV; ⁴DBG/BIOAGRO/UFV, 36571-000, Viçosa, MG). Genetic diversity of races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil.

Colletotrichum lindemuthianum, o agente causal da antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), possui um alto nível de diversidade de virulência, o que explica o elevado número de patótipos existentes. Trabalhos recentes indicam que essa diversidade é resultado, em grande parte, de uma co-evolução hospedeiro-patógeno. Portanto, espera-se que para cada região produtora exista um certo número de raças associadas com as variedades plantadas. Para se avaliar a diversidade genética de 22 patótipos isolados em diferentes regiões do Brasil e já classificados por inoculação em variedades diferenciadoras, foi utilizada a metodologia de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). DNA micelial dos 22 materiais foi extraído e amplificado com o auxílio de 21 oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Foram obtidos 112 produtos de amplificação, sendo 56 deles polimórficos. Os dados permitiram o cálculo das distâncias genéticas entre os vários patótipos, as quais variaram entre 3 e 23%. A análise de agrupamentos separou os materiais em 3 grupos distintos. As raças previamente agrupadas por testes de virulência não apresentaram correlação com a classificação obtida por marcadores RAPD. Não foi observada correlação entre os grupos de patótipos com a origem geográfica. Estes resultados podem ser explicados pelos tipos de métodos de melhoramento do feijoeiro empregados no Brasil, que se baseiam na introdução e avaliação de grande número de linhagens de diferentes origens, criando uma alta variabilidade do fungo nos locais de cultivo. Por outro lado, os loci utilizados na classificação molecular podem não ter correlação com os genes de virulência, uma vez que a diversidade genética medida por marcadores moleculares baseia-se na análise aleatória de todo o genoma do fungo.

*Suporte financeiro: PADCT/FINEP, CAPES. Apoio: BIOAGRO/UFV.

488

MANCHA FOLIAR EN ZAPALLO (*CUCURBITA* SP.) OCACIONADA POR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CUCURBITAE*. P. Mondino, M. Banchoer, P. González, E. Silveira, V. Gepp. (Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Avda. Garzón 780, CP 12900, Montevideo, Uruguay). Leaf spot of squash (*Cucurbita* sp.) caused by *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*.

En 1994 y 1995 se encontró un ataque generalizado de una nueva enfermedad sobre zapallo, especie *C. moschata* y *C. pepo*, y sobre la variedad Tetsukabuto (*C. moschata* x *C. pepo*) en la zona de producción del Dpto. de Canelones. La sintomatología observada fue: pequeñas manchas foliares de color amarillento a grises, angulosas, con halo traslúcido, centro necrosado, pudiendo cribar el limbo foliar. Las manchas tienden a confluír y a necrosar, especialmente en el borde de las hojas. En los frutos se observó cancro seguido por pudrición que progresó hasta la cavidad seminal. De hojas y frutos se aisló en medio agar nutriente dextrósado obteniéndose colonias bacterianas con las siguientes características: circulares, elevación convexa baja, mucoides de bordes enteros, con colocación amarillenta, olor fuerte, y con estructura interna opaca. Se realizaron pruebas de identificación con los siguientes resultados: hipersensibilidad en tabaco positivo, Gram negativo, metabolismo oxidativo, crecimiento adecuado en agar extracto de levadura con dextrosa y carbonato de calcio, inhibición de crecimiento por O₂, TTC, catalasa positivo, oxidasa negativo y crecimiento mucoso amarillo en cilin