

067

SELEÇÃO DE MARCADORES RAPD PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Alternaria solani*. KLAUS K. SCHEUERMANN¹, BEATRIZ A. S. FALLEIRO¹, AILTON REIS², SÉRGIO H. BROMMONSCHENKEL¹, EDUARDO S. G. MIZUBUTI¹ - (1-DFP/UFV, 36570-000, VIÇOSA, MG) (2-CNPH, 70359-970, BRASÍLIA - DF). mizubuti@ufv.br. RAPD markers selection for genetic diversity analysis of *Alternaria solani*.

A seleção de marcadores moleculares é passo importante em estudos

de estrutura genética de populações de fitopatógenos. Estes estudos podem subsidiar o estabelecimento de táticas de manejo de doenças importantes como a pinta preta (*A. solani*) do tomateiro e batateira. Este trabalho teve como objetivo selecionar marcadores RAPD para estudo de diversidade genética de *A. solani* e testar os marcadores selecionados em um conjunto de isolados. Foram testados 55 oligonucleotídeos, sendo 50 do kit Operon Technologies e 5 já descritos. Treze oligonucleotídeos resultaram em locos polimórficos, amplificando de 4-8 fragmentos de DNA com tamanho entre 400 e 2500 pb. Os oligonucleotídeos OPC20, OPE04, OPE06, OPE14, OPE15, OPZ19, P284 e P285 foram selecionados para analisar uma população de 45 isolados de *A. solani* provenientes de batata e tomate. Trinta e quatro fragmentos de DNA foram analisados. Construiu-se uma matriz binária, calculou-se o coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA. Foram formados dois grandes grupos, um constituído por isolados provenientes de batata, e outro constituído por isolados provenientes de tomate. Há evidências de que os marcadores selecionados foram eficientes em discriminar populações de *A. solani*. O emprego de marcadores moleculares associados a testes de patogenicidade torna mais rápida e eficiente a caracterização de populações de fitopatógenos.

No ensaio de ferrugem, as variedades suscetíveis (IAC83-4104 e RB735275) foram plantadas ao lado dos genótipos em teste, funcionando como linhas dispersoras do patógeno. Nesse ensaio as avaliações foram feitas em março de 2004 por meio de escala de notas variando de 0 (resistente) a 9 (suscetível). Sintomas de ferrugem ocorreram intensamente nas linhas dispersoras, agindo satisfatoriamente como inóculo para os demais genótipos. Verificou-se que 12 clones testados comportaram-se como resistentes, sendo que cinco deles apresentaram-se sem sintomas da doença. Os resultados foram bem semelhantes aos obtidos em cana-planta, excetuando o clone IACSP93-6035 que se comportou como suscetível nesse ensaio e os clones IACSP94-5041 e IACSP94-5072 que se classificaram como intermediários. No ensaio de carvão, inocularam-se os toletes por sua imersão em suspensão de *U. scitaminea* antes do plantio. A avaliação foi realizada em janeiro de 2004 determinando-se a porcentagem de perfilhos apresentando chicotes. Verificou-se na soqueira que 11 clones apresentaram-se com elevado nível de resistência, sendo que os clones IACSP93-3050 e IACSP94-6087 sofreram severo ataque de *U. scitaminea*.

* Parcialmente financiado pela FAPESP e FUNDAG.

064

Crotalaria paulinea: UM NOVO HOSPEDEIRO NATURAL DO Cowpea severe mosaic virus. ALINE KELLY Q. DO NASCIMENTO, GILSON SOARES, JOSÉ ALBERSIO DE A. LIMA & ROSA FELICIA E. A. CAMARÇO. (1 Laboratório de Virologia Vegetal, UFC, Campus do Pici, Fortaleza-CE, e-mail: albersio@ufc.br, 2 Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, MA). Crotalaria paulinea: a new natural host of Cowpea severe mosaic virus.

Amostras foliares de Crotalaria paulinea apresentando um destacado mosaico foram coletadas no município de São Luiz, MA, e enviadas para o Laboratório de Virologia Vegetal, da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram testadas por "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) indireto, contra anti-soros específicos para Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), família Potyviridae, gênero Potyvirus e Cucumber mosaic virus (CMV), família Bromoviridae, gênero Cucumovirus. As amostras foram testadas, também, por dupla difusão em agar contra anti-soro para Cowpea severe mosaic virus (CpSMV) família Comoviridae, gênero Comovirus. De acordo com os resultados dos testes sorológicos, as amostras reagiram somente com o anti-soro para CpSMV, indicando ser C. paulinea mais um hospedeiro natural do vírus. Extratos das folhas de C. paulinea foram mecanicamente inoculados em plantas de caupi (*Vigna unguiculata*) mantidas em casa de vegetação. Dez dias após a inoculação, as plantas passaram a exibir sintomas de mosaico e a presença do CpSMV foi confirmada por sorologia. Nos estudos de gama de hospedeiro envolvendo oito espécies botânicas, o isolado de CpSMV obtido de C. paulinea (CpSMV-Cp) infetou somente cultivares de caupi. O CpSMV-Cp foi multiplicado em caupi 'Pitiúba' e purificado por clarificação com n-butanol, e precipitação viral com PEG e ultracentrifugação. A preparação purificada apresentou um espectro de absorção ultravioleta típico de núcleo proteína com uma razão A_{260}/A_{280} de 1,7, característico de vírus do gênero Comovirus. Coelho da raça Nova Zelândia branca imunizado com a preparação viral purificada, através das patas traseiras, produziu anti-soro policlonal reativo com CpSMV em dupla difusão em agar. Esta se trata da primeira referência sobre a infecção natural de CpSMV em C. paulinea.

065

MONITORAMENTO DE ISOLADOS DE Lettuce mosaic virus NOS CAMPOS DE PRODUÇÃO DE ALFACE DO ESTADO DE SÃO PAULO. ANA CAROLINA FIRMINO^{1,2}, RENATE KRAUSE-SAKATE¹, MARCELO AGENOR PAVAN¹. (1 FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS - UNESP, DEPTO. DE PRODUÇÃO VEGETAL, SETOR DE DEFESA FITOSSANITÁRIA, CP 237, CEP 18.603-970, BOTUCATU, SP; 2 BOLSISTA PIBIQ). renatekrause@fca.unesp.br. SURVEY OF Lettuce mosaic virus ISOLATES IN LETTUCE CHAMPS OF SÃO PAULO STATE. APOIO FINANCEIRO: FAPESP. O mosaico da alface causado pelo Lettuce mosaic virus, LMV é uma

das principais doenças na cultura da : disseminado em diferentes regiões intercâmbio de sementes contaminadas. Os isolados de LMV podem ser divididos em dois sub-grupos: LMV-Common compreendendo os isolados que não são capazes de contornar a resistência conferida pelos genes mo1¹ e mo1² presentes em alface e o sub-grupo LMV-Most que engloba os isolados que contornam a resistência dos genes mo1¹ e mo1² e são capazes de serem transmitidos pela semente nestes cultivares. Os LMV-Most constituem um sério entrave à produção de alface, uma vez que não existem até o momento cultivares de alface resistentes. A fim de se realizar um monitoramento para a presença de isolados de LMV-Most e Common no Estado de São Paulo, amostras de diferentes cultivares de alface das regiões de Bauru, Campinas e Mogi das Cruzes foram coletadas trimestralmente durante dois anos consecutivos. As amostras foram analisadas em RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos universais para LMV e específicos para LMV-Most (Krause-Sakate et al., 2004). Os resultados indicam que durante o ano de 2002 prevaleceu nas amostras coletadas isolados pertencentes ao sub-grupo Most, enquanto que durante o ano de 2003 houve um aumento expressivo de isolados do sub-grupo Common. Isolados de LMV dos sub-grupos Most e Common são encontrados praticamente durante o ano todo nestas três regiões, existindo, porém uma tendência de encontrar maior número de amostras de alface infectadas pelo LMV na época de início da primavera, época favorável para a proliferação do pulgão no campo.

066

METODOLOGIA DE PRESERVAÇÃO DE ESTRUTURAS DE RESISTÊNCIA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS HABITANTES DO SOLO. CÉSAR J. BUENO, MÁRCIA M. de Q. AMBRÓSIO & NILTON L. de SOUZA - (FCA/UNESP, FAZ. EXP. LAGEADO, C.P. 237, 18603-970, BOTUCATU/SP - Bolsista de doutorado da FAPESP). cjmbueno@zipmail.com.br. Methodology for the preservation resistance structures of soil fungal pathogens.

Apreservação de fungos fitopatogênicos por longos períodos de tempo é importante para que pesquisas possam ser realizadas a qualquer tempo. No entanto, o método de preservação precisa manter as características de esporulação, vigor e patogenicidade dos organismos. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver procedimentos de preservação das estruturas de resistência de três fungos fitopatogênicos habitantes do solo. O experimento consistiu de um método de produção das estruturas de resistência para cada fungo, sendo estas mantidas em temperatura de geladeira, freezer e em ambiente de laboratório. Foram avaliados por um ano a sobrevivência e o vigor das colônias. A produção das estruturas de Sclerotium sclerotiorum se deu em meio de feijão+fubá, de Macrophomina phaseolina em substrato areno-orgânico e de Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici raça 2 em pó de talco. Após um ano de avaliação, os escleródios de S. sclerotiorum sobreviveram melhor em temperatura de "freezer" (100% de sobrevivência (S) e 3 na escala de vigor das colônias (V)), enquanto que os microescleródios de M. phaseolina em temperatura de "geladeira" (100% S e 3 V), sendo que para ambos os fungos houve a preservação da patogenicidade. Os clamidósporos de F. oxysporum f.sp. lycopersici sobreviveram em quantidade significativamente maior em temperatura de "geladeira" ($5,2 \times 10^3$ ufc/g de talco) seguida pela do "freezer" ($2,9 \times 10^3$ ufc/g de talco), mantendo a patogenicidade para ambos ambientes. Estes métodos mostram-se como uma nova alternativa de preservação para os três fungos habitantes do solo estudados.

067

SELEÇÃO DE MARCADORES RAPD PARA ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE Alternaria solani. KLAUS K. SCHEUERMANN¹, BEATRIZ A. S. FALLEIRO¹, AILTON REIS², SÉRGIO H. BROMMONSCHENKEL¹, EDUARDO S. G. MIZUBUTI¹ - (1-DFP/UFV, 36570-000, VIÇOSA, MG) (2-CNPH, 70359-970, BRASÍLIA - DF). mizubuti@ufv.br. RAPD markers selection for genetic diversity analysis of Alternaria solani.

A seleção de marcadores moleculares é passo importante em estudos



de estrutura genética de populações de fitopatógenos. Estes estudos podem subsidiar o estabelecimento de táticas de manejo de doenças importantes como a pinta preta (*A. solani*) do tomateiro e batateira. Este trabalho teve como objetivo selecionar marcadores RAPD para estudo de diversidade genética de *A. solani* e testar os marcadores selecionados em um conjunto de isolados. Foram testados 55 oligonucleotídeos, sendo 50 do kit Operon Technologies e 5 já descritos. Treze oligonucleotídeos resultaram em locos polimórficos, amplificando de 4-8 fragmentos de DNA com tamanho entre 400 e 2500 pb. Os oligonucleotídeos OPC20, OPE04, OPE06, OPE14, QPE15, OPZ19, P284 e P285 foram selecionados para analisar uma população de 45 isolados de *A. solani* provenientes de batata e tomate. Trinta e quatro fragmentos de DNA foram analisados. Construiu-se uma matriz binária, calculou-se o coeficiente de Jaccard e a análise de agrupamento foi realizada pelo método UPGMA. Foram formados dois grandes grupos, um constituído por isolados provenientes de batata, e outro constituído por isolados provenientes de tomate. Há evidências de que os marcadores selecionados foram eficientes em discriminar populações de *A. solani*. O emprego de marcadores moleculares associados a testes de patogenicidade torna mais rápida e eficiente a caracterização de populações de fitopatógenos.

068

CHARACTERIZAÇÃO DE *Rhizoctonia* spp. AGENTE CAUSAL DE PODRIDÃO DE RAÍZ EM MORANGUEIRO (*Fragaria x ananassa*). ANDREIA K. NAKATANI, ROSAM. VALDEBENITO SANHUEZA, EIKO E. KURAMAE, NILTON L. DE SOUZA (FCA/UNESP, FAZ. EXP. LAGEADO, C.P. 237, 18603-970, BOTUCATU/SP). aknakata@fca.unesp.br CHARACTERIZATION OF *RHIZOCTONIA* spp. THE CAUSAL AGENT OF ROOT ROT OF STRAWBERRY.

A podridão da coroa causada por *Rhizoctonia* spp. em morangueiro tem ocorrido com frequência em algumas áreas de cultivo no estado do Rio Grande do Sul. Os sintomas são caracterizados pela necrose e morte das raízes finas e escurecimento da raiz principal e em infecções mais graves, leva à podridão da coroa e a morte das plantas. A infecção pode atingir as gemas terminais e os frutos, causando a decomposição e a coloração marrom-clara nos tecidos. Na maioria dos países, não se conhece, ainda, quais os grupos de anastomoses (AGS) de *Rhizoctonia* spp. que estão envolvidos nesse patossistema. Isolados de *Rhizoctonia* spp. obtidos da base da raiz principal de morangueiro, provenientes do estado do Rio Grande do Sul foram caracterizados quanto às sequências ITS-5.8S rDNA e quanto à patogenicidade. De acordo com o teste de patogenicidade na cultivar 'Camarosa', os isolados causaram sintomas típicos de podridão da coroa da planta sendo, então, reisolados. A análise filogenética de sequências de ITS-rDNA mostraram que os mesmos agrupam-se com os padrões de *Rhizoctonia* spp. binucleada AG-A e AG-Bo.

069

ESTUDO COMPARATIVO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES EM DIFERENTES ÉPOCAS DE COLETA E CRESCIMENTO POR *Trichoderma viride* (TSM1) EM ESPÉCIES DE *Achyrocline satureioides* LAM. COMPOSITAE (MARÇELA) Geovana Gomez de Oliveira, Elisandra da Silva Fraga, Antonio Carlos Ferreira da Silva, Solange Bosio Tedesco. (Departamento de Biologia, CCNE, UFMS, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Email: geovanabio@mail.ufsm.br). Comparative study of seed germination at different harvesting times and growth by *Trichoderma viride* (TSM1) in species of *Achyrocline satureioides*

Achyrocline satureioides é uma erva anual, pertencente à família Compositae e é uma opção dentre as plantas de usos medicinais para a obtenção de matéria prima de interesse farmacêutico. Entretanto, os estudos nessa área são escassos e o uso de microrganismos na promoção de germinação e crescimento pode representar uma alternativa na busca da maximização de produção de ervas medicinais. O presente trabalho visou estudar o grau de germinação e desenvolvimento vegetativo de populações de marcela em diferentes épocas de coleta, com a interação de isolados de *Trichoderma* spp. Os testes para avaliar a germinação de sementes

de marcela foram realizados com as populações seguintes do Rio Grande do Sul: (P1) Júlio de Castilhos (ano de coleta 2002); (P2) Santa Maria/Boca do Monte (ano de coleta 2003) e (P4) São Sepé (ano de coleta 2004). Utilizou-se 400 sementes, divididas em quatro séries de 100 sementes para cada população que foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-água. As placas ficaram acondicionadas em câmara climática com temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12h luz/ 12h escuro. Após 30 dias foi feita a avaliação das sementes germinadas, os resultados foram os seguintes: (P1) Júlio de Castilhos 0%, (P2) Santa Maria/Boca do Monte 14,75% e (P3) São Sepé 35,25%. Após a germinação as plântulas foram medidas com o auxílio de régua milimétrica e transferidas para a terra vegetal para avaliar o seu crescimento na presença e ausência do isolado *Trichoderma viride* (TSM1). Foram selecionadas as plântulas mais vistosas e distribuídas em vasos plásticos contendo terra vegetal com *Trichoderma viride* inoculado 3 dias antes e terra vegetal sem a presença do isolado. Para cada população foram organizadas oito séries, sendo quatro na presença do isolado e quatro testemunhas, foram transferidas cinco plântulas por vaso. Após sete dias, as plântulas foram medidas e foi feita análise da porcentagem de crescimento vegetativo através da comparação com a controle (sem o inóculo). O tamanho médio das plântulas do controle de P2 foi 0,55 cm antes do transplante (ca) e 0,59 cm depois (cd), já nas plântulas em presença do isolado a média foi 0,5 cm antes (ta) e 0,7 cm depois (td). Na P3 o ca foi 0,97 cm e o cd 1,0 cm, já o ta foi 0,83 cm e o td 0,92 cm. Após a medição foi feita a diferença entre ca e cd e entre ta e td e calculou-se a porcentagem de crescimento através da fórmula $(cd-ca/td-ta) \times 100$. A porcentagem de crescimento para P2 foi 20% e para P3 33,33%. Para os tratamentos em solo vegetal, 20 sementes foram separadas e semeadas por copo plástico contendo terra vegetal. Sendo os seguintes tratamentos: (T1) Terra vegetal autoclavada com *Trichoderma viride* inoculado 3 dias antes e (T2) Terra vegetal autoclavada sem a presença do isolado. Foram realizadas quatro séries para cada população. Foram obtidos resultados apenas para a P3 sendo que as sementes semeadas em solo na presença do isolado germinaram chegando a um total de 20%. Pelos resultados obtidos, observa-se diferenças de germinação para as diferentes populações com diferentes épocas de coleta em ágar-água. Como foi observado a cada ano o grau de viabilidade das sementes cai, ocorrendo inclusive a não obtenção de germinação de uma população. Em relação a promoção de germinação os valores foram baixos e apenas a P3 (São Sepé) obteve resultados positivos. Conclui-se que nas condições em que foi realizado este trabalho, o isolado de *Trichoderma viride* TSM1 promoveu o crescimento de plântulas de marcela nas populações P2 e P3.

Apoio: PIBIC-CNPq/UFMS, FIPE/UFMS, PRAE/UFMS

070

SEVERIDADE DA BACTÉRIA *Xylella fastidiosa* EM CAFEEIRO. B. B. QUEIROZ-VOLTAN, L.P. CABRAL & O. PARADELA FILHO. - (NPDJB/CEC/IAC/APTA/SA, Caixa Postal 28, 13001-970, Campinas-SP). Rachelqv@iac.sp.gov.br SEVERITY SYMPTOMS OF *Xylella fastidiosa* ON COFFEE PLANTS.

A bactéria *Xylella fastidiosa* tem sido estudada no cafeeiro desde que foi relatada pela primeira vez nessa cultura, entretanto, não sabemos ainda avaliar o seu efeito uma vez que o cafeeiro, que convive com essa bactéria há muitos anos, parece suportar este patógeno em determinadas situações. O objetivo deste trabalho foi avaliar a severidade dos sintomas de infecção provocados pela *X. fastidiosa* sobre cultivares de *Coffea arabica*, enxertados ou não, de modo a se estimar os níveis dos sintomas externos em diferentes materiais genéticos desenvolvidos numa mesma condição edafoclimática, ao longo de diferentes períodos do ano com variação na disponibilidade de água e locais. A severidade da bactéria foi avaliada utilizando-se uma escala de notas de 1 a 4, de acordo com a porcentagem de danos à planta, sendo a nota 4 a mais severa. Quando comparou-se a severidade ocorrida no período de estresse hídrico de 1998 em Mococa com o avaliado em Garça nos anos de 2000 e 2002, observou-se que a Catuaí enxertada sobre ela mesma e a Catuaí pé franco apresentaram severidade maior em Mococa do