

056-BA
INSTABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS MONOSPÓRICAS DE *Metarhizium anisopliae*
GENETIC INSTABILITY OF *Metarhizium anisopliae* MONOSPORIC STRAINS

C.F.C. Gavião¹; P.W.Inglis²; I. Martins¹; M.C.V.Inglis¹.

¹Centro Universitário de Brasília, Brasília-DF, camilagavião@yahoo.com.br; ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* apresenta eficiência no controle de inúmeros insetos pragas de importância agrícola. O desenvolvimento de produtos e o sucesso no uso de fungos em campo dependem de uma formulação apropriada, que garanta a estabilidade e viabilidade do produto durante o processo de produção e estocagem. Transferências seriadas de fungos *in vitro* podem gerar instabilidade genética observada pela formação de setores, redução na esporulação e variação na morfologia e pigmentação. Degeração fenotípica, via formação de setores, em linhagens do fungo *M. anisopliae*, é frequentemente acompanhada por mudanças na produção de metabólitos secundários e enzimas. A compreensão dos mecanismos relacionados a estabilidade genética de fungos, agentes de biocontrole, são essenciais para o desenvolvimento de produtos estáveis para uso em campo. Colônias monospóricas das linhagens CG34, que apresenta monomorfismo na região subtelomérica e CG100, que apresenta polimorfismo, foram produzidas a partir de isolados mantidos em nitrogênio líquido, liofilizados e re-isolados do inseto *Callisobruchus maculatus*. Dez colônias de cada linhagem, nas diferentes condições de tratamento, foram inoculadas em meio líquido para produção de micélio, o qual foi utilizado para extração de DNA com as enzimas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* e *BamHI*, e hibridizados com sonda telomérica. Observou-se variabilidade na região subtelomérica das linhagens obtidas dos mesmos isolados, mantidos na mesma condição de armazenamento, mostrando a existência de variações na região associada a telômeros, na linhagem CG34. A linhagem CG100 apresentou maior homogeneidade entre as colônias monospóricas o que sugere a existência de mecanismos específicos relacionados à estabilidade de linhagens. Observaram-se e também variações morfológicas entre as colônias monospóricas obtidas a partir dos isolados, no entanto o nível de setorização das colônias foi pequeno, comparado com outro fungos.

Palavras-chave: Monomorfismo, PCR, RFLP.

058-BA
PROSPEÇÃO DE GENES POTENCIAIS A SEREM APLICADOS NO CONTROLE DO BICUDO DO ALGODOEIRO (*Anthonomus grandis*) E DA LAGARTA DO CARTUCHO DO MILHO (*Spodoptera frugiperda*)
SCREENING OF POTENTIAL GENES WHICH WILL BE APPLIED TO CONTROL THE COTTON BOLLWEEVIL (*Anthonomus grandis*) AND THE FALL ARMYWORM (*Spodoptera frugiperda*)

Brunetta, P.S.F; Oliveira, G.R; Figueira, E.L.Z; Cavalcante, K.L; Dias, S.C; Silva, M.C.M; Grossi-de-Sá, M.E.
 EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF. fatimasa@cenargen.embrapa.br

Nos últimos dez anos a cotonicultura aumentou significativamente a sua participação na economia agrícola, atingindo principalmente a região Centro-Oeste e implementando uma nova realidade nos sistemas de cultivo utilizando tecnologias avançadas de produção, o que contribuiu para o restabelecimento do fornecimento de fibra no mercado interno e a participação nas exportações agrícolas nacionais. No entanto, o cultivo intensivo em grandes extensões por vários anos consecutivos tem gerado altos índices de infestação por pragas, como o bicudo e a lagarta do cartucho do milho, demandando grandes volumes de inseticidas, que além de dispendiosos, apresentam eficiência variável, já que são pragas endofíticas, que se alimentam dos botões florais e maçãs, comprometendo a produtividade e/ou a qualidade da fibra. O presente trabalho tem por objetivo a prospecção de genes, que codificam proteínas que apresentem toxicidade e especificidade contra estas pragas. Uma biblioteca de clones contendo 10⁶ transformantes foi construída através do uso das técnicas de evolução molecular *in vitro* (DNA Shuffling) e *Phage Display*. A metodologia consistiu na amplificação dos genes originais (*cry3Aa*, obtido do B.G.S.C. e *cry8Ga*, isolado e caracterizado no Laboratório de Interação Molecular Plantas-Pragas - Cenargem), fragmentação destes genes em DNase I, recominação dos fragmentos em reação de PCR sem a utilização de oligonucleotídeos e amplificação dos mutantes, que foram selecionados através de ligantes presentes no intestino do bicudo e da lagarta do cartucho. Os genes mutantes selecionados (21 para o bicudo e 16 para a lagarta do cartucho) foram sequenciados e expressos em *Escherichia coli*, TOP10F⁺, cuja atividade inseticida esta sendo avaliada em bioensaios.

Palavras Chave: Bicudo do Algodoeiro, DNA Shuffling, Phage Display
 Financiamento: Fapual, Fialgo, Embrapa, CNPq

057-BA
ESTUDO DA VARIABILIDADE DE LINHAGENS DE *Dicyma* sp. e *Alternaria* sp. UTILIZANDO SONDA TELOMÉRICA
STUDY OF VARIABILITY AMONG *Dicyma* sp. E *Alternaria* sp. STRAINS USING TELOMERIC PROBE

M.A.G.Jerônimo¹; C.F.C. Gavião¹; P.W.Inglis²; S.C.M.Mello¹; M.C.V.Inglis¹.
¹Universidade Politécnica de Bragança, Portugal, adjeironimo@yahoo.com.br; ²Centro Universitário de Brasília, Brasília-DF; ³Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

O fungo *Dicyma* sp. tem se mostrado promissor no controle do mal-das-folhas, que é principal doença da seringueira do Brasil. Vários estudos têm se mostrado o elevado potencial de uso desse micoparasita em condições de campo. Já o fungo *Alternaria* sp. vem sendo utilizado no controle de *Senna brasiliensis* L., que é uma das principais plantas daninhas infestantes dos cultivos de soja. Linhagens de *Dicyma* sp. e *Alternaria* sp. pertencentes à coleção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foram analisadas quanto à variabilidade genética, utilizando-se DNA fingerprinting com sonda telomérica. Sessenta e uma linhagens de *Dicyma* sp. e vinte e oito linhagens de *Alternaria* sp. foram cultivadas em meio líquido para a produção de micélio e utilizado para extração de DNA. Southern blot das amostras foram preparados após digestão de DNAs com as enzimas *EcoRI*, *HindIII* e *PstI*. Utilizou-se sonda telomérica preparada a partir de PCR com primers específicos, marcada com ³²PdCTP. Os resultados mostram intensa variabilidade entre as linhagens de *Dicyma* sp. ao contrário de publicação anteriores, que mostraram grande similaridade entre as linhagens. Monomorfismo na região subtelomérica foi observado em algumas linhagens de *Dicyma* e *Alternaria*, sugerindo duplicações nestas regiões, semelhantemente ao descrito anteriormente para *Metarhizium* sp. Utilizando-se sonda telomérica, foi possível observar a variação no número de cromossomos de cada linhagem dos fungos utilizados neste estudo.

Palavras-Chave: Southern blot, RFLP, Fingerprinting.

059-BA
ISOLAMENTO DE DOIS GENES *cry* , CODIFICADORES DE TOXINAS ENTOMOTÓXICAS COM ATIVIDADE PARA O BICUDO DO ALGODOEIRO, *Anthonomus grandis*.

ISOLATION OF TWO *cry* GENES ENCODING FOR ENTOMOTOXIC PROTEINS EFFECTIVE TO THE COTTON BOLL WEEVIL, *Anthonomus grandis*.

Figueira, E.L.Z., Magalhães, M.T.Q., Batista, J.A.N., Oliveira, G.R., Fragozo, R.I., Silva, S.M.B., Oliveira-Neto, O.B., Dias, S.C., Monnerat, R.G., Grossi-de-Sá M.U.
 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - Brasília - DF, Universidade Católica de Brasília, Brasília-DF. fatimasa@cenargen.embrapa.br

As δ-endotoxinas, produzidas por *Bacillus thuringiensis*, de ampla atividade inseticida e inovadoras a manufatores, são amplamente utilizadas no desenvolvimento de plantas transgênicas visando o controle de insetos-praga da agricultura de importância econômica. Dentre estas, podemos destacar a cotonicultura que tem como uma das principais pragas, o bicudo-do-algodoeiro, um inseto de hábitos endofíticos causador de grandes prejuízos econômicos. Neste contexto, foi isolado de uma estirpe de Bt, que apresenta atividade entomotóxica para o bicudo-do-algodoeiro, três genes (*cry1Ab*, *cry1a* e *cry8Ga*). O gene *cry8Ga* contém 2688bp e codifica para uma proteína de 896 aminoácidos que apresenta 58% de identidade com outras toxinas Cry desta classe. As extremidades N e C-terminal são extremamente conservadas, enquanto que os três domínios estruturais (I, II, III), envolvidos com a atividade, apresentam baixa identidade, confirmando a presença de uma nova toxina. O gene *cry1a* contém 2160bp, cuja sequência de nucleotídeos apresenta 99% de identidade com outros genes *cry1a* descritos, enquanto o gene *cry1Ab* apresenta 100% de identidade com outros genes *cry1Ab*. Os genes *cry1a* e *cry8Ga* foram expressos em sistemas homólogo (*Bt* acristalífero) e heterólogo (*Escherichia coli*) e as proteínas recombinantes Cry8Ga e Cry1a de aproximadamente 100kDa e 80kDa, respectivamente, foram avaliadas quanto a atividade inseticida sobre o desenvolvimento do bicudo do algodoeiro. As sequências dos genes *cry1a* e *cry8Ga* foram modificadas segundo o código de expressão de plantas e serão introduzidas em plantas de algodão visando a obtenção de plantas geneticamente modificadas com resistência a essa importante praga da cotonicultura.

Palavras chave: bicudo do algodoeiro, toxina Cry, genes cry
 Financiamento: Embrapa, FACUAL, FIALGO.