

# VII TALENTO ESTUDANTIL

RESUMOS DOS TRABALHOS



ANAIS  
2002

Embrapa

**VII ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA  
EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E  
BIOTECNOLOGIA  
2002**

**Anais**

**Resumos dos Trabalhos**

**Brasília, DF  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
2002**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70.770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Responsabilidade dos autores

Normalização bibliográfica: Miraci de Arruda Câmara Pontual

Tratamento de ilustrações da capa: Gustavo Coelho de Souza & Cristiano Spohr

Criação & Design: Paulo Euler Teixeira Pires & Gustavo Coelho de Souza

Editoração Eletrônica: Tiago da Silva Ramos

Alysson Messias da Silva

**1ª edição**

1ª impressão (2002): tiragem 500

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

---

ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA, 7., 2002, Brasília. **Anais:** Resumos dos trabalhos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002. 135p.

ISBN 85-876971-15-3

1. Controle Biológico. 2. Recurso. Genético. 3. Biotecnologia.  
I. Título.

CDD 575.1

---

**VII ENCONTRO DO TALENTO ESTUDANTIL DA EMBRAPA RECURSOS  
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA - 2002**

**COMISSÃO ORGANIZADORA**

**PRESIDENTE: João Batista Tavares da Silva  
Maria Abadia Fernandes Solino  
Miraci de Arruda Camara Pontual  
Mônica Athayde Ferreira  
Zilda Maria de Araújo Ribeiro**

**COMISSÃO DE SELEÇÃO DOS TRABALHOS**

**PRESIDENTE: João Batista Tavares da Silva  
Edson Junqueira Leite  
Margot Alves Nunes Dode  
Maria de Fátima Batista  
Vera Tavares de Campos Carneiro**

**CORPO EDITORIAL: João Batista Tavares da Silva  
Miraci Arruda Camara Pontual  
Zilda Maria de Araújo Ribeiro**

## **COMISSÃO JULGADORA**

**Prof. José do Nascimento da Silva Junior**  
**FTB - Faculdade da terra de Brasília**

**Prof<sup>a</sup>. Ivone Diniz**  
**UnB - Universidade de Brasília**

**Prof<sup>a</sup>. Elizabeth Maria Mamede da Costa**  
**UniCEUB - Centro Universitário de Brasília**

**Dr. Juan Rolon Spinola**  
**FAP/DF - Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal**

**Dr. Eduardo Alfonso Cadavid Garcia**  
**Embrapa Sede**

**Dr. Wellington Pereira**  
**Embrapa Hortaliça**

**Dr. José de Ribamar N. dos Anjos**  
**Embrapa Cerrados**

## APRESENTAÇÃO

Como parte de comemoração do aniversário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, desde 1996 vem sendo promovido o Encontro do Talento Estudantil. O evento visa mostrar a produção e a capacidade científica dos estudantes de graduação e de pós-graduação, nas áreas de recursos genéticos e biotecnologia, e valorizar os resultados das pesquisas por eles desenvolvidos, orientados por pesquisadores e técnicos do Centro. O interesse na participação dos Encontros tem sido crescente, principalmente entre os estudantes de iniciação científica.

Neste ano de 2002, em seu 28º aniversário, mais uma vez os pesquisadores e técnicos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia estimularam seus orientandos a participarem do VII Encontro do Talento Estudantil. É através da participação nessas reuniões que o estudante pode complementar as suas atividades científicas que iniciaram com a integração em um grupo de trabalho e orientação no seu desenvolvimento teórico-prático em pesquisa. Por outro lado, a presença de estudantes vinculados ao grupo de pesquisa possibilita o aumento da capacidade de produção científica do Centro.

Estas reuniões são organizadas por uma comissão que estabelece os procedimentos e regras para realização de cada evento. Os estudantes fazem suas inscrições acompanhadas do resumo do trabalho a ser apresentado no evento. Os resumos são avaliados e selecionados por um comitê de seleção, formado por pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Já a apresentação do conteúdo pelo estudante é avaliada por uma comissão julgadora, formada por pesquisadores de outras unidades da Embrapa e instituições de pesquisa e professores de universidades, utilizando critérios como: qualidade gráfica do trabalho, capacidade didática, aprofundamento científico adquirido e interpretação dos resultados apresentados. Os estudantes que demonstram melhor desempenho recebem uma premiação a título de incentivo.

Foram inscritos 105 resumos, sendo 73 elaborados por estudantes de iniciação científica (69,5%), 7 de recém graduados (6,7%), 12 de mestrandos (11,4%), 4 (3,8%) que haviam concluído o mestrado recentemente e 9 de doutorandos (8,6%). Os resultados de pesquisa dos trabalhos inscritos, cujos resumos estão incluídos nestes anais, serão apresentados, durante o

Encontro, sob a forma de pôsteres, para apreciação da comissão julgadora e do público interessado.

Parabenizamos e agradecemos, antecipadamente, a todos que participaram da organização do evento, da seleção e do julgamento dos trabalhos. Um agradecimento especial à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por continuar patrocinando a realização anual do Encontro Talento Estudantil e à Embrapa Sede pelo apoio na concessão do espaço físico e painéis. Agradecemos também as pesquisadoras Abi Soares dos Anjos Marques, Marta Aguiar Sabo Mendes, Olinda Maria Martins e Vera Lúcia de Almeida Marinho pela colaboração na seleção dos trabalhos, bem como à Universidade Católica de Brasília - UCB pela edição dos Anais e ao Centro Universitário de Brasília - UniCEUB e a Faculdade da Terra de Brasília - FTB, pelo co-patrocínio. Enfatizamos a grande contribuição que todos estão prestando ao desenvolvimento científico e tecnológico e à formação de profissionais nas importantes áreas de Recursos Genéticos e Biotecnologia e a expectativa da Embrapa realizar eventos como esse a nível regional ou mesmo nacional, motivando ainda mais a participação e integração da comunidade científica e acadêmica.

**JOÃO BATISTA TAVARES DA SILVA**

Presidente do Comitê Organizador  
VII Encontro do Talento Estudantil  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>BIOLOGIA CELULAR</b> .....   | 23 |
| <b>001 - AMIDO DE MILHO COMO SUBSTITUTO DO ÁGAR EM MEIO DE CULTURA (Corn starch as agar media substitute).</b> Abreu, L.A., Souza, G.A.B. de, Santos, H. de F., Mendes, R.A. ....   | 23 |
| <b>002 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ANTIBIÓTICOS TIMENTIN E CEFOTAXIMA EM EXPLANTES FOLIARES DE <i>COFFEA ARABICA</i> SP. E <i>C. CANEPHORA</i> SP (An Evaluation of the antibiotics Timentin and Cefotaxim on leaf explants of <i>Coffea arabica</i> sp. and <i>C. canephora</i> sp).</b> Guimarães, C.R.S., Cruz, A.R.R., Teixeira, J.B., Barros, E.V.S.A. ....                  | 24 |
| <b>003 - AVALIAÇÃO DOS FATORES QUE INFLUENCIAM NA FERTILIZAÇÃO IN VITRO EM <i>BRAQUIÁRIA</i> (Evaluation of factors affecting the in vitro fertilization in <i>Brachiaria</i>).</b> Alves, E.R., Willemse, M.T.M., Carneiro, V.T.C., Dusi, D.M.A. ....  | 25 |
| <b>004 - ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES DE <i>CYRTOPODIUM HOLSTII</i> L.C.MENEZES (ORCHIDACEAE) USANDO SERINGA DE INJEÇÃO (Sterilization of <i>Cyrtopodium holstii</i> L.C.Menezes (Orchidaceae) seeds with the use of injection syringes).</b> Santos, H. de F., Souza, G.A.B. de, Cardoso, L.D., Abreu, L., Mendes, R.A. ....  | 26 |
| <b>005 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E PH NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>CYRTOPODIUM HOLSTII</i> L.C.MENEZES (ORCHIDACEAE) (Influence of the concentration of the culture media and the pH on the germination of <i>Cyrtopodium holstii</i> L.C.Menezes (Orchidaceae).</b> Souza, G.A.B. de, Cardoso, L.D., Abreu, L.A., Santos, H. de F., Mendes, R.A. .... | 27 |
| <b>006 - O USO DE BENOMIL EM CULTURA DE TECIDOS (Benomyl use in tissue culture).</b> Abreu, L.A., Santos, H. de F. Souza, G.A.B. de, Mendes, R.A. ....  | 28 |



BIOLOGIA MOLECULAR.....29

**007 - AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR E CLONAGEM DE UM GENE DE  $\alpha$ -AMILASE DE *RHYZOPERTHA DOMINICA* (L.) (Amplification by RT - PCR and cloning of the gene encoding *Rhyzopertha dominica* (L.)  $\alpha$ -amylase).** Castro, F.C., Valle, F.S., Batista, J.A.N., Grossi-de-Sá, M.F., Mello, L.V.....29

**008 - ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DE *EUCALYPTUS GRANDIS* COM BASE EM SEQUENCIAMENTO "SHOTGUN" POR AMOSTRAGEM ("SAMPLE SEQUENCING") (Analysis of the *Eucalyptus* Genome based on Sample Sequencing).** Lourenço, R.T., Cunha, A.F., Tsukumo, F., Pereira, G.A.G., Grattapaglia, D.....30

**009 - ANÁLISE DA INFECÇÃO VIRAL E DO PRODUTO DE EXPRESSÃO DE *ROLA* EM SISTEMA DE BACULOVÍRUS (Viral infection and *rolA* product expression analysis in the baculovirus system).** Oliveira, M.S., Sihler, W., Carneiro, M., Souza, M.L.....31

**010 - ANÁLISE DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E DE DNA DE ISOLADOS TEMPORAIS DE *BOMBYX MORI* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (Structural proteins and DNA analysis of seasonal isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus).** Dalmolin, C.C., Vivan, A.L., Ribeiro, Z.M.A., Castro, M.E.B.....32

**011 - A PRIMEIRA GERAÇÃO DE ESTs DE *ARACHIS* (The first generation of *Arachis* ESTs).** Proite, K., Sá, S., Leal-Bertioli, S.C.M., Bertioli, D.J., Guimarães, P.M.....33

**012 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CLONAGEM DE GENES *CRY* DE UMA ESTIRPE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EFETIVA CONTRA O BICUDO DO ALGODOEIRO (*ANTHONOMUS GRANDIS*) (Biochemical characterization and cloning of *Cry* genes of a *Bacillus thuringiensis* strain effective against cotton boll weevil - *Anthonomus grandis*).** Magalhães, M.T.Q., Silva, S.M.B., Fragoso, R.R., Batista, J.A.N., Oliveira-Neto, O.B., Monnerat, R., Grossi-de-Sá, M.F.....34

- 013 - CLONAGEM DE UMA PROTEINASE SERÍNICA DE LARVAS DE ZABROTES SUBFASCIATUS (Cloning of an serine proteinase from larvae of *Zabrotes subfasciatus*). Magalhães, C.P., Grossi-de-Sá, M.F.....35**
- 014 - CLONAGEM DE UM INIBIDOR DE  $\alpha$ -AMILASE DE *PHASEOLUS COCCINEUS* (Cloning of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus coccineus*). Pereira, R.A., Lima, L.M., Guimarães, M.L., Coutinho, M.V., Batista, J.A.N., Grossi-de-Sá, M.F.....36**
- 015 - CLONAGEM DO GENE *GP64* DO NUCLEOPOLIEDROVIUS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* PARA CONSTRUÇÃO DE CÉLULAS CAPAZES DE EXPRESSAR A GLICOPROTEINA GP64 (Cloning of the *gp64* gene of *Anticarsia gemmatalis Nucleopolyhedrovirus* for construction of cells able to express the GP64 glycoprotein). Mendes, D.N., Sihler, W., Ribeiro, B.M., Souza, M.L.....38**
- 016 - CLONAGEM E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *SERK* DE *COFFEA CANEPHORA* E *THEOBROMA CACAO* L. (Cloning and evaluation of the *Serk* gene expression of *Coffea canephora* and *Theobroma cacao* L.). Tinoco, M.L.P., Santos, M.O., Romano, E., Aragão, F.J.L.....38**
- 017 - CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO FRAGMENTO DE VAPAG CORRESPONDENTE AO GENE INIBIDOR DE APOPTOSE (*IAP-3*) DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (Cloning and partial sequencing of a vApAg fragment correspondent to apoptosis-inhibiting gene (*iap-3*) of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus). Soares, E.F., Santos, A.C., Villela, A.G., Ribeiro, B.M., Castro, M.E.B. ....39**
- 018 - CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE DADOS STADEN DE ANÁLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA (RGAS) DO TIPO TIR E NÃO-TIR DE *ARACHIS CARDENASII* (Construction of a Staden database of RGAs TIR and non-TIR of *Arachis cardenasii*). Santos, V.L., Bertoli, D.J., Guimarães, P.M., Leal-Bertoli, S.C.M.....40**
- 019 - CONSTRUÇÕES DE VETORES COM GENES DE INIBIDORES DE PROTEINASES PARA TRANSFORMAÇÃO DE ALGODÃO VISANDO O CONTROLE DO BICUDO DO ALGODOEIRO (Constructions of vectors with proteinase inhibitors genes for genetic transformation of cotton aiming the control of cotton boll weevil). Evangelista, I.B.R., Batista, J.A.N., Oliveira-Neto, O.B., Grossi de Sá, M.F.....41**

- 020 - DESENVOLVIMENTO DE MAMOEIROS TRANSGÊNICOS COM GENE DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (Development of transgenic papayas with an anti-microbial peptide gene).** Alves, P.C.M., Carmo, L.S.T. do, Coelho, M.C.F., Souza Jr., M.T. .... 42
- 021 - DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO RAÍZES DE CENOURA TRANSFORMADAS POR *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* INFECTADAS PELO NEMATÓIDE *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* (The development of a methodology for evaluation of carrot roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infected with the nematode *Ditylenchus destructor*).** Costa, G.R.T., Dias, J.G.O., Leal-Bertioli, S.C.M., Araújo, A.C.G., Bertioli, D.J., Tenente, R.C.V., Guimarães, P.M. .... 43
- 022 - EFEITO DO PERÍODO DE REATIVAÇÃO CELULAR NA EXPRESSÃO DO GENE GUS EM EMBRIÕES DE *BRACHIARIA BRIZANTHA* (Cell reactivation period effect on the gus gene expression in *Bracharia brizantha* embryos).** Lacerda, A.L.M., Cabral, G.B., Rodrigues, J.C.M., Araújo, A.C.G., Carneiro, V.T.C. .... 44
- 023 - ESTRATÉGIA MOLECULAR PARA CONTROLE DO NEMATÓIDE *HETERODERA GLYCINES* (Molecular strategy for control of the nematode *Heterodera glycines*).** Silva, F.B., Del-Sarto, R.P., Monteiro, A.C.S., Grossi-de-Sá, M.F. .... 45
- 024 - ESTUDOS PRELIMINARES PARA A LOCALIZAÇÃO DO GENE DA GRANULINA DE GRANULOVÍRUS DE *ERINNYIS ELLO* (EEGV) (Preliminary studies for the *Erinnyis ello* Granulovirus granulin gene localization).** Santos, R.F., Sihler, W., Rodrigues, J.C.M., Souza, M.L. .... 46
- 025 - EXPRESSÃO DA REGIÃO PRO DE PROTEINASE CISTEÍNICA DE *ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* (Expression of pro-region of cysteine-proteinase of *Acanthoscelides obtectus*).** Del-Sarto, R.P., Silva, F.B., Monteiro, A.C.S., Grossi-de-Sá, M.F. .... 47
- 026 - EXPRESSÃO DO INIBIDOR DE SOJA BOWMAN-BIRK EM SISTEMA HETEROLÓGO DE *ESCHERICHIA COLI* (Expression of soybean Bowman-Birk Inhibitor in *E. coli* Heterologous system).** Lisboa, E.D.M., Batista, J.A.N., Grossi-de-Sá, M.F. .... 48
- 027 - IDENTIFICAÇÃO DO GENE *DNAPOL* DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (Identification of an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus *dnapol* gene).** Dalmolin, C.C., Santos, A.C.B., Ribeiro, Z.M.A., Castro, M.E.B. .... 49

- 028 - INTRODUÇÃO DE POPULAÇÕES TRANSGÊNICAS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE MAMOEIROS DA EMBRAPA (Introduction of transgenic populations in the papaya breeding program at Embrapa).** Carmo, L.S.T. do, Nickel, O., Gonsalves, D., Souza Jr., M.T. .... 50
- 029 - INTRODUÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *LACK* DO ANTÍGENO DA LEISHMANIOSE EM ALFACE (*LACTUCA SATIVA*) (Introduction and expression of the *Lack* gene from *Leishmania* in lettuce (*Lactuca sativa*)).** Bonfim, K., Lacorte, C., Aragão, F.J.L., Oliveira, S.C., Rech, E.L. .... 51
- 030 - OBTENÇÃO DE POPULAÇÕES SEGREGANTES DE ACESSOS SELVAGENS DE AMENDOIM PARA A PROSPECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A FUNGOS E NEMATÓIDES (The production of segregating populations of wild peanut for prospection of resistance genes against fungi and nematodes).** Costa, G.R.T., Dias, J.G.O., Valls, J.F.M., Leal-Bertioli, S.C.M., Bertioli, D.J., Guimarães, P.M. .... 52
- 031 - TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ENTRE ESPÉCIES DE *ARACHIS* (Transferability of microsatellite markers between *Arachis* species).** Welzel, A., Ramiro, C.A., Moretzsohn, M.C., Bertioli, D.J. .... 53
- 032 - TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DE *COFFEA ARABICA* VIA BIOBALÍSTICA E SELEÇÃO EM CANAMICINA (Genetic transformation of *Coffea arabica* through bombardment of embryogenic calli and selection with kanamycin).** Cunha, W.G., Barros, E.V.S.A. .... 54
- 033 - UM NOVO INIBIDOR DE  $\alpha$ -AMILASE DE SEMENTES *PHASEOLUS VULGARIS* COM ATIVIDADE QUITINOLÍTICA (A novel  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* seeds with chitinolytic activity).** Dayler, C.D.A., Mendes, P.A., Franco, O.L., Bloch Jr., C., Prates, M.V., Silva, P.R.Q., Lima, L.H.C., Grossi-de-Sá, M.F. .... 55
- 034 - USO DE CHAGASINA, UM INIBIDOR DE CISTEÍNO-PROTEINASE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, NA PRODUÇÃO DE FEIJÃO RESISTENTE A CARUNCHO (The use of Chagasin, a *Tripanosoma cruzi* inhibitor of cysteine proteinases to produce insect-resistant transgenic bean).** Paes, N.S., Lima, J.N., Osório, R., Monteiro, A.C.S., Grossi-de-Sá, M.F. .... 56

|  |    |
|--|----|
| <b>CARACTERIZAÇÃO</b> .....  | 57 |
| <b>035 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>DALBERGIA NIGRA</i> (JACARANDÁ-DA-BAHIA) UTILIZANDO RAPD (Genetic variability analysis of <i>Dalbergia nigra</i> (Jacaranda-da-Bahia) populations based on RAPD molecular markers).</b> Olegário, R.M.B.N., Silva, V.P., Machado, F.R.B., Azevedo, V.C.R., Ciampi, A.Y. ....  | 57 |
| <b>036 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE PIMENTAS E PIMENTÕES (<i>CAPSICUM SPP.</i>) (Genetic variability analyses and molecular characterization of Pepper (<i>Capsicum spp.</i>) accessions of Germplasm Bank).</b> Lins, T.C.L., Tavares, H.M.F., Lourenço, R.T., Reifschneider, F.J.B., Buso, G.S.C., Ferreira, M.E. .... | 58 |
| <b>037 - ANÁLISE GENÉTICA DE NOVAS ESPÉCIES DE <i>CAPSICUM</i> E SUA RELAÇÃO COM ESPÉCIES CULTIVADAS DO GÊNERO, ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES (Genetic analysis through molecular markers of <i>Capsicum</i> new species and their relationship with cultivated species of the genus).</b> Lopes, F.F.R., Kratka, P.C., Bianchetti, L., Ferreira, M.E., Amaral, Z.P., Buso, G.S.C. ....      | 59 |
| <b>038 - ANÁLISE GENÉTICA DE <i>TABEBUIA IMPETIGINOSA</i> UTILIZANDO MARCADORES RAPD (Genetic analysis of <i>Tabebuia impetiginosa</i> based on RAPD markers).</b> Azevedo, V.C.R., Silva, V.P., Machado, F.R.B., Olegário, R.M., Ciampi, A.Y. ....  | 60 |
| <b>039 - ANÁLISE GENÉTICA POPULACIONAL DE <i>CEDRELA FISSILIS</i> - CEDRO (MELIACEAE) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES (Population genetic analysis of <i>Cedrela fissilis</i> - Cedro (Meliaceae) based on microsatellites markers).</b> Machado, F.R., Gaiotto, F.A., Silva, V.P., Almeida, T.N.S., Ciampi, A.Y. ....   | 61 |
| <b>040 - AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE MELÃO (<i>CUCUMIS MELO</i>) INTRODUZIDOS EM COLEÇÃO DE GERMOPLASMA UTILIZANDO MARCADORES RAPD (Genetic variability assessment of melon (<i>Cucumis melo</i>) accessions introduced in germoplasm collection, using RAPD markers).</b> Tavares, H.M.F., Lins, T.C.L., Buso, J.A., Buso, G.S.C. ....                                 | 62 |

- 041 - AVALIAÇÃO DE DOMINÂNCIA E SEGREGAÇÃO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS EM UM HÍBRIDO INTERSECCIONAL FÉRTIL DO GÊNERO *ARACHIS* (LEGUMINOSAE)** (Evaluation of dominance and segregation of morphological traits in a fertile intersecional hybrid of the genus *Arachis* (Leguminosae)). Rodrigues, L.S., Valls, J.F.M. .... 63
- 042 - AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A FITONEMATÓIDES E A FUNGOS EM DIVERSAS ESPÉCIES DE *ARACHIS* SILVESTRES** (Analysis of resistances of plant parasitic nematodes to several species of wild *Arachis*). Proite, K., Dias, J.G.O., Guimarães, P.M., Bertoli, D.J., Carneiro, R.G., Valls, J.F.M., Leal-Bertoli, S.C.M. .... 64
- 043 - CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *ARACHIS* (LEGUMINOSAE)** (Cytogenetic characterization of brazilian *Arachis* species (Leguminosae)). Lima, J.A.G., Peñaloza, A.P.S., Valls, J.F.M. .... 65
- 044 - CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MORFOLÓGICA DE ACESSOS DE GERMOPLASMA DE *PASPALUM*, GRUPO NOTATA** (Cytogenetic and morphological characterization of *Paspalum*, Notata group, germplasm accessions). Vieira, F.N., Valls, J.F.M., Peñaloza, A.P.S. .... 66
- 045 - CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE FITONEMATÓIDES, *MELOIDOGYNE* SPP., ATRAVÉS DA ANÁLISE DE RAPD** (Characterization of plant parasite nematodes populations, *Meloidogyne* spp., by RAPD analysis). Souza, H.J.M., Tigano, M.S., Carneiro, R.G., Tiago, R.T. .... 67
- 046 - CONTAGEM DE CROMOSSOMOS EM ACESSOS DE GERMOPLASMA DE *PASPALUM* (GRAMINEAE) DO SUL DO BRASIL** (Chromosome counts in Southern Brazilian germplasm accessions of *Paspalum* (Gramineae)). Soto-Araya, M.E., Valls, J.F.M., Peñaloza, A.P.S. .... 68
- 047 - DESENVOLVIMENTO DE MARCACADORES MICROSSATÉLITES PARA *JACARANDA COPAIA* (LEGUMINOSAE), UMA ESPÉCIE ARBÓREA MADEREIRA TROPICAL** (Development of microsatellite markers for *Jacaranda copaia* (Leguminosae), arboreal timber specie of the Amazon forest). Vinson, C.C., Amaral, A.C., Proite, K., Silva, V. P., Ciampi, A.Y., Sampaio, I. .... 69

- 048 - DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *DIPTERIX ODORATA* (LEGUMINOSAE), UMA ESPÉCIE MADEIREIRA DA FLORESTA AMAZÔNICA (Development and optimization of microsatellite markers for *Dipterix odorata* (Leguminosae), a tropical timber specie of the Amazon Forest).** Amaral, A.C., Vinson, C.C., Proite, K., Silva, V. P., Ciampi, A.Y., Sampaio, I. .... 70
- 049 - DETERMINAÇÃO DO MODO REPRODUTIVO DE *BACCHARIS CAPRARIIFOLIA* ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ÓVULOS CLAREADOS (Determination of the mode of reproduction of *Baccharis caprariifolia* through analyses of cleared ovules).** Cruz, D.R.O., Falcão, R., Werpachowski, J.S., Goldenberg, R., Araujo, A.C.G., Dusi, D.M.A. .... 71
- 050 - ESPÉCIES NOVAS DE *PASPALUM* L., GRUPO PLICATULA (POACEAE) DO BRASIL (New Brazilian species of *Paspalum* L., Plicatula group (Poaceae)).** Oliveira, R.C., Valls, J.F.M. .... 72
- 051 - MAPEAMENTO DE UM QTL DE MAIOR EFEITO PARA FLORESCIMENTO PRECOCE EM EUCALIPTO UTILIZANDO GENOTIPAGEM SELETIVA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DETECTADOS EM MULTIPLEXES FLUORESCENTES (A major effect QTL for early flowering in *Eucalyptus* mapped by selective genotyping of microsatellite markers detected in fluorescent multiplexes).** Missiaggia, A.A., Piacezzi, A., Grattapaglia, D. .... 73
- 052 - MARCADORES MICROSSATÉLITES EM COCO (*COCOS NUCIFERA* L.) (Microsatellite markers for coconut (*Cocos nucifera* L.)).** Ramiro, C.A., Silva, C.R.B., Amaral, Z.P.S., Moretzsohn, M.C. .... 74
- 053 - UTILIZAÇÃO DE MARCADORES RAPD PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES E HÍBRIDOS DE *ARACHIS* SPP (The use of RAPD markers for the differentiation of *Arachis* SSP wild species and híbridos).** José, A.C.V.F., Guimarães, P.M., Bertoli, D.J., Leal-Bertoli, S.C.M. .... 75
- 054 - VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *PASTEURIA PENETRANS* ATRAVÉS DA ANÁLISE DE RAPD (Genetic variability of *Pasteuria penetrans* isolates by RAPD analysis ).** Teixeira, A.C.O., Tigano, M.S., Carneiro, R.M.D.G. .... 76

|  |    |
|--|----|
| <b>CONSERVAÇÃO</b> .....   | 77 |
| <b>055 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE SOJA (<i>GLYCINE MAX</i> (L.) MERRIL) CONSERVADOS POR VINTE E DOIS ANOS (Evaluation of physiological and sanitary quality on soybean seeds (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill) preservd for twenty-two years).</b><br>Godoi, A.G. de, Faiad, M.G.R., Wetzal, M.M.V., Rocha, L.M.T. .... | 77 |
| <b>056 - CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO DE SEMENTES DE <i>VIGNA UNGUICULATA</i> (Long term seed storage of <i>Vigna unguiculata</i>).</b><br>Mundim, R.A., Faiad, M.G.R., Wetzal, M.M.V. da S., Rocha, L.M.T. ....  | 78 |
| <b>057 - CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE <i>COFFEA ARABICA</i> COM DIFERENTE QUALIDADE INICIAL (Conservation of <i>Coffea arabica</i> seed lots of different initial quality).</b> Sousa, M.A.F., Reis, R.B., Eira, M.T.S. ....   | 79 |
| <b>058 - CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE <i>COFFEA RACEMOSA</i> EM BANCO DE GERMOPLASMA (<i>Coffea racemosa</i> seed conservation in genebanks).</b> Ribeiro, F.N.S., Sousa, M.A.F., Soares, F.Q., Souza, C.W., Reis, R.B., Eira, M.T.S. ....   | 80 |
| <b>059 - CONTROLE DE ÁCARO EM LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS (Controlling mites in plant tissue culture laboratory).</b><br>Abreu, L.A., Cardoso, L.D., Santos, H. de F., Souza, G.A.B. de, Mendes, R.A. ....  | 81 |
| <b>060 - CRIOPRESERVAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE ESPÉCIES DE <i>COFFEA</i> (Cryopreservation of embryonic axes of <i>Coffea</i> species).</b><br>Mundim, I.P., Ribeiro, F.N.S., Mundim, R.C., Santos, I.R.I., Salomão, A.N. ....  | 82 |
| <b>061 - ESTUDO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE UMA PLANTA ISOLADA DE <i>MANIHOT CECROPIAEFOLIA</i> POHL (EUPHORBIACEAE) (Study on seed viability from a solitary <i>Manihot cecropiaefolia</i> Pohl (Euphorbiaceae) plant).</b> Soares, D.T., Abiorana, A.F., Mendes, R.A. ....   | 83 |
| <b>062 - GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>CYRTOPODIUM HOLSTII</i> L.C.MENEZES (ORCHIDACEAE) SOB TRÊS TEMPERATURAS (<i>Cyrtopodium holstii</i> L.C.Menezes (Orchidaceae) seed germination under three temperatures).</b> Santos, H. de F., Abreu, L.A., Souza, G.A.B. de, Cardoso, L.D., Mendes, R.A. ....  | 84 |
| <b>063 - LONGEVIDADE DE SEMENTES DE <i>COFFEA ARABICA</i> E <i>COFFEA CANEPHORA</i> (Longevity o seeds of <i>Coffea arabica</i> e <i>Coffea canephora</i>).</b><br>Soares, F.Q., Sousa, M.A.F., Ribeiro, F.N.S., Reis, R.B., Eira, M.T.S. ....   | 85 |



**064 - USO DE FOTOGRAFIA NA AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *CYRTOPODIUM HOLSTII* L.C.MENEZES (ORCHIDACEAE) (Photograph use on *Cyrtopodium holstii* L.C.Menezes (Orchidaceae) seeds germination evaluation).** Santos, H. de F., Abreu, L.A., Souza, G.A.B. de, Mendes, R.A. .... 86

**CONTROLE BIOLÓGICO** ..... 87

**065 - ANÁLISE FISIOLÓGICA E SECREÇÃO ENZIMÁTICA DE *DICYMA PULVINATA* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO (Physiologic analysis and enzymatic secretion of *Dicyma pulvinata* under different growth conditions).** Lago, W.N.M., Queiroz, P.R., Goretti, V., Melo, S.C.M. de, Lima, L.H.C. .... 87

**066 - AVALIAÇÃO DE DOIS PRODUTOS À BASE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER E UM À BASE DE *SACCHAPOLYSPORA SPINOSA* NO CONTROLE DE *PLUTELLA XYLOSTELLA* (LEP.: PLUTELLIDAE) (Evaluation of two products based on *Bacillus thuringiensis* Berliner and one based on *Sacchapolyspora spinosa* in control of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae)).** Dias, D.G.S., Silva, S.F., Martins, E.S., Soares, C.M.S., Monnerat, R.G. .... 88

**067 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EFICAZES CONTRA O BICUDO DO ALGODOEIRO (*ANTHONOMUS GRANDIS* BOHEMAN, 1843) (Biochemical, molecular and morphological characterization of *Bacillus thuringiensis* strains effective against to bolweevil *Anthonomus grandis* Boheman, 1843).** Martins, E.S., Dias, D.G.S., Falcão, R., Gomes, A.C.M.M., Praça, L.B., Monnerat, R.G. .... 89

**068 - COMPARAÇÃO DE ISOLADOS TEMPORAIS DO NUCLEOPOLIEDROVIRUS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* POR ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO DNA COM AS ENZIMAS *ECO* RI E *PST* I (Comparison of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus seasonal isolates by *Eco* RI and *Pst* I DNA restriction analysis).** Pereira, E.R., Siqueira, C.B., Moscardi, F., Souza, M.L. .... 90

**069 - COMUNIDADES DE ARTRÓPODOS EM PLANTIOS DE SOJA CONVENCIONAL E ORGÂNICO (Arthropods communities in organic and conventional soybean crops).** Pantaleão, D.C., Pires, C., Sujii, E., Schmidt, F. .... 91

- 070 - ECOLOGIA DE POPULAÇÕES DE CRISOMÉLÍDEOS-PRAGA APLICADA AO USO DE SEMIOQUÍMICOS (Population ecology of pest-chrisomelid applied on use of semiochemicals).** Carvalho, R.M.V., Pires, C., Schmidt, F., Laumann, R.A.E., Sujii, E. .... 92
- 071 - IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EFETIVAS CONTRA LEPIDÓPTEROS (Identification of effective strains of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran).** Batista, A.C., Barros, P.C., Praça, L.B., Monnerat, R.G. .... 93
- 072 - INFLUÊNCIA DA IDADE DE CONÍDIOS NO ARMAZENAMENTO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS (Influence of conidial age on the storage of entomopathogenic fungi).** Melo, D.F., Magalhães, B.P., Frazão, H., Faria, M.R. de ..... 94
- 073 - INFLUÊNCIA DO TEOR DE ÁGUA NO ARMAZENAMENTO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (Influence of water content on the storage of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*).** Chagas, M.J.L., Magalhães, B.P., Frazão, H., Faria, M.R. de ..... 95
- 074 - ISOLAMENTO DE NOVAS ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* E DETERMINAÇÃO DE SUA PATOGENICIDADE CONTRA MOSQUITOS (Isolation of new strains of *Bacillus thuringiensis* and determination of their pathogenicity against mosquitoes).** Barros, P.C., Batista, A.C., Praça, L.B., Dias, D.G.S., Monnerat, R.G. .... 96
- 075 - LEVANTAMENTO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PROVENIENTES DO ESTADO DE GOIÁS EFETIVAS CONTRA DíPTEROS (Survey of *Bacillus thuringiensis* strains effective against dipteran, from the Goiás state).** Batista, A.C., Praça, L.B., Luz, C., Monnerat, R.G. .... 97
- 076 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA INTERAÇÃO *DICYMA PULVINATA* X *MICROCYCLUS ULEI* EM SERINGUEIRA (Scanning Electronic Microscopy of the Interaction *Dicyma pulvinata* Vs *Microcyclus ulei* in rubber tree).** Santos, C.E.E., Mello, S.C.M. de ..... 98
- 077 - PROSPECÇÃO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* NO CONTROLE DE LARVAS DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* E *Aedes AEGYPTI* (Prospection of *Bacillus thuringiensis* strains to control of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae).** Dias, D.G.S., Silva, S.F., Falcão, R., Martins, E.S., Soares, C.M.S., Monnerat, R.G. .... 99

**078 - VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE MOSCA BRANCA (*BEMISIA TABACI*) PRESENTES EM REGIÕES DO BRASIL (Genetic variability of whitefly (*Bemisia tabaci*) populations occurring in Brazil).** Queiroz, P.R., Lago, W.N.M., Oliveira, M.R.V., Lima, L.H.C. .... 100

**079 - VIABILIDADE DE OVOS DE *EUSCHISTUS HEROS* PARA PARASITISMO POR *TELENOMUS PODISI* APÓS CRIOPRESERVAÇÃO EM N Í T R O G Ê N I O LÍQUIDO (Viability of *Euschistus heros* eggs for parasitism by *Telenomus podisi* after cryopreservation in liquid nitrogen).** Pantaleão, D.C., Moreira, R.O., Santos, I.R.I., Sujii, E., Pires, C. .... 101

**ETNOBIOLOGIA** ..... 102

**080 - CULTIVO DE ROÇAS NA ALDEIA PEDRA BRANCA, TOCANTINS - UMA VISÃO ETNOBIOLÓGICA (Indigenous field crops in Pedra Branca village, TO - an ethnobiological view).** Rancan, D.C., Alves, R.B.N., Kraho, A.Y., Kraho, O.K., Kraho, J.M., Zarur, S.B.B.C., Dias, T.A.B. .... 102

**081 - POVO INDÍGENA KRAHÔ: DEMANDAS POR GERMOPLASMA VEGETAL (Indigenous Krahô people: the need for plants germplasm).** Camargo, W.R., Souza, L.E., Dias, T.A.B., Goes, M.G., Souza, C.C., Correia, J.R., Costa, I.R.S. .... 103

**082 - RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS CULTIVADOS NOS QUINTAIS DA COMUNIDADE INDÍGENA KRAHÔ (Genetic Resources from Krahô Indigenous Community Back Yard).** Souza, L.E., Camargo, W.R., Dias, T.A.B., Goes, M.G., Souza, C.C., Correia, J.R., Costa, I.R.S. .... 104

**INFORMÁTICA** ..... 105

**083 - BANCO DE DADOS DOS “FUNGOS RELATADOS EM PLANTAS NO BRASIL” (Database of plant fungi registered in Brazil).** Rodrigues Jr., A.J.G., Barros, P.C., Mendes, M.A.S., Santos, C.E.N., Melo, L.A.M.P. de, Hiragi, G.O., Urben, A.F. .... 105

**084 - DESENVOLVIMENTO DA HOME PAGE PARA DIVULGAÇÃO DO LABORATÓRIO DE NEMATOLOGIA DO CENARGEN, E SEUS SERVIÇOS (Development of home page to divulge the Nematological Laboratory of Cenargen, and its activities).** Nascimento, G.A.M., Rissoli, V.R.V., Tenente, R.C.V. .... 106

**085 - DESENVOLVIMENTO DE BANCO DE DADOS DE MODELOS TRIDIMENSIONAIS DE  $\delta$ -ENDOTOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* (Delta-endotoxins structure database).** Silveira, A.R., Martins, N.F., Batista, J.A.N., Fragoso, R.R., Dias, O.B.N., Grossi-de-Sá, M.F. .... 107

**INTERCÂMBIO E QUARENTENA**..... 108

**086 - ANTRACNOSE EM *DRACAENA FRAGANS* NO DISTRITO FEDERAL (Antracnose on *Dracaena fragans* in Distrito Federal).** Rodrigues Jr., A.J.G., Santos, J.K.P., Oliveira, A.S., Mendes, M.A.S., Gutierrez, A.H. .... 108

**087 - AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DA SECA DOS PONTEIROS DA GOIABEIRA EM PROPRIEDADES INDIVIDUAIS PELA CORRELAÇÃO PLANTAS SINTOMÁTICAS - ISOLAMENTO DE *ERWINIA PSIDII* (Evaluation of guava bacterial blight incidence in individual orchards by a correlation between symptoms and isolation).** Vasconcelos, C.M.A., Santos, J.P. dos, Vieira, T.M., Caldas Filho, A.E., Guth, T.L.F., Bispo, A., Marques, A.S. dos A. .... 109

**088 - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA O ESTABELECIMENTO DE UM TESTE DE PATOGENICIDADE PARA *ACIDOVORAX AVENAE* SUBSP. *CITRULLI* (Comparing methods to the development of a pathogenicity test to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*).** Vieira, T.M., Santos, J.P. dos, Marques, A.S. dos A. .... 110

**089 - EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO DE SEMENTES DE MELÃO IMPORTADAS E INFESTADAS POR FITONEMATÓIDE (Effect of Thermal Treatment of Imported Melon Seeds Infested by Plant-Parasitic Nematode).** Sousa, A.I. de M., Gomes, V.F., Tenente, R.C.V. .... 111

**090 - FUNGOS DE IMPORTÂNCIA QUARENTENÁRIA PARA FRUTEIRAS NO BRASIL (Fungi of quarantine importance on fruit-plants in Brazil).** Felix, A.A.A., Santos, C.E.N., Mendes, M.A.S., Santos, M.F., Urben, A.F. .... 112

**091 - MANCHA DE *PHYLLOSTICTA* SP. EM *DRACAENA DEREMENSIS* (Leaf Spot of *Phyllosticta* sp. on *Dracaena deremensis*).** Felix, A.A.A., Fonseca, J.N.L., Oliveira, A.S., Mendes, M.A.S., Gutierrez, A.H., Urben, A.F. .... 113

|   |     |
|---|-----|
| <b>092 - QUARENTENA DE PÓS-ENTRADA: VIROLOGIA (Post-entry quarantine virology).</b> Hercos, A.P., Marinho, V.L.A., Batista, M.F. ....   | 114 |
| <b>093 - REAÇÃO DE CLONES DE BANANEIRA (<i>MUSA SPP.</i>) AO NEMATÓIDE <i>MELOIDOGYNE INCOGNITA</i> RAÇAS 1 E 3 (Reaction of banana clones (<i>Musa spp.</i>) to nematode <i>Meloidogyne incognita</i> races 1 and 3).</b> Costa, G.R.T., Silva, R.D.C., Tenente, R.C.V., Carrijo, O.A., Silva Neto, S.P. ....  | 115 |
| <b>094 - RISCO DE INTRODUÇÃO DE FUNGOS EM ESPÉCIES FLORESTAIS ASSOCIADOS A INSETOS (Risk of Introduction of fungi associated with insects on forestry species).</b> Felix, A.A.A., Santos, C.E.N. dos, Mendes, M.A.S., Oliveira, M.R.V. de, Urben, A.F. ....  | 116 |
| <b>095 - SISTEMA DE VISUALIZAÇÃO DE PRAGAS QUARENTENÁRIAS PARA O BRASIL (A database of quarantine pests of concern to Brazil).</b> Souza, W.R., Marinho, V.L.A., Ofugi, K. ....   | 117 |
| <b>REPRODUÇÃO ANIMAL</b> .....  | 118 |
| <b>096 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE TÉCNICA DE PARTOS GEMELARES EM BOVINOS COM ÊNFASE NA PRODUÇÃO DE CARNE - DADOS PRELIMINARES (Evaluation of technical feasibility of twinning birth in cattle for beef production - preliminary dates).</b> Lucas, L.A., Campos, H.C.F., Rumpf, R. ....  | 118 |
| <b>097 - AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA O CULTIVO DE UM ÚNICO EMBRIÃO BOVINO PRODUZIDO <i>IN VITRO</i> (Evaluation of different methods for <i>In vitro</i> culture of a single bovine embryo).</b> Pereira, D.C., Dode, M.A.N., Rumpf, R. ....   | 119 |
| <b>098 - AVALIAÇÃO DE FIBROBLASTOS DE BOVINOS ADULTOS DAS RAÇAS CURRALEIRO, JUNQUEIRA E PANTANEIRO, EM DIFERENTES PASSAGENS NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> (Evaluation of adult bovine fibroblasts in different passages of culture in Curraleiro, Junqueira, and Pantaneiro Breed).</b> Carrijo Jr., O.A., Oliveira, R.R., Martins, C.F., Rumpf, R., Dode, M.A.N. .... | 120 |
| <b>099 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> (Evaluation of the cell number of bovine embryos cultures <i>in vitro</i>).</b> Corrêa, G.A., Rumpf, R., Dode, M.A.N. ....   | 121 |

**100 - CARACTERIZAÇÃO DE LOCAIS DE INTEGRAÇÃO DE TRANSGENES EM FIBROBLASTOS BOVINOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (Characterization of transgene integration sites of genetically modified bovine fibroblasts).** Lisauskas, S., Oliveira, R.R., Carvalho, D.M., Melo, E.O., Rech, E.L., Aragão, F.J.L. .... 122

**101 - CLONAGEM E RECLONAGEM DE ANIMAIS DE CONSERVAÇÃO A PARTIR DE FIBROBLASTOS ISOLADOS DA PELE DA ORELHA DE BOVINOS ADULTOS (Cloning and recloning from ear fibroblast of adult conservation bovines).** Iguma, L.T., Sousa, R.V., Carrijo Jr., O., Pereira, D.C., Dode, M.A.N., Rumpf, R. .... 123

**102 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE ANORMALIDADES DO ACROSSOMA EM BOVINOS (Comparison among different methods of acrosome abnormalities in bovine).** Melo, N.S.S., Martins, C.F., Rumpf, R., Dode, M.A.N. .... 124

**103 - CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PELO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO - ESPERMATOZÓIDES EM PÓ (Spermatozoa conservation by liofilization process - sperm dried).** Martins, C.F., Dode, M.A.N., Rumpf, R. .... 125

**104 - EFEITO DA IDADE UTERINA E DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA (P4) NA TAXA DE GESTAÇÃO EM RECEPTORAS MANGALARGA MARCHADOR - DADOS PRELIMINARES (Effect of the uterine age and of the progesteron supplementation on pregnancy rate of Mangalarga Marchador recipients - Preliminary date).** Silveira, L.L., Rumpf, R. .... 126

**105 - USO DE MARCADOR MOLECULAR RAPD NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO REBANHO DE CONSERVAÇÃO DA OVELHA CRIOLA LANADA (Genetic characterization of the crioula wool sheep through RAPD markers).** Carvalho, D.D., Castro, S.T.R., Vaz, C.M.S.L., Egito, A.A., Moura, R.D., Klautau-Guimarães, M.N. .... 127

**ÍNDICE DE AUTORES** ..... 128

**ÍNDICE DE ORIENTADORES** ..... 135

**OBS: A REDAÇÃO DOS RESUMOS É DE INTEIRA RESPONSABILIDADE DOS AUTORES**

## BIOLOGIA CELULAR

### 001 - AMIDO DE MILHO COMO SUBSTITUTO DO ÁGAR EM MEIO DE CULTURA (Corn starch as agar media substitute)

Abreu, L.A.<sup>1</sup>, Souza, G.A.B. de<sup>2</sup>, Santos, H. de F.<sup>3</sup>, Mendes, R.A.<sup>4</sup>

Em cultura de tecidos *in vitro*, o produto mais caro da constituição do meio de cultura é o ágar. Com a finalidade de diminuir os custos no preparo do meio de cultura foi testado o uso do amido de milho na substituição parcial ou total do ágar. Foram realizados 6 tratamentos utilizando o meio de cultura MS (Murashige e Skoog). No primeiro tratamento foi adicionado 7,0g.L<sup>-1</sup> de ágar e 0,0g.L<sup>-1</sup> de amido. Nos tratamentos subsequentes foi subtraído 1,4g.L<sup>-1</sup> de ágar de cada tratamento e adicionado 10,0g.L<sup>-1</sup> de amido de milho até atingir, no sexto tratamento, 0,0g.L<sup>-1</sup> de ágar e 50,0g.L<sup>-1</sup> de amido. Cada tratamento teve 10 repetições de 10mL de meio de cultura por tubo de ensaio. O amido foi um ótimo substituto do ágar na solidificação do meio de cultura em todas combinações. Nas substituições onde ele foi usado em maior proporção, o meio apresentou alguma dificuldade na sua distribuição nos tubos de ensaio, pois esta não foi realizada diretamente no recipiente definitivo. Isto porque este meio com amido de milho não retorna ao estado pastoso/líquido após sua solidificação. Os meios de cultura com maiores proporções de amido foram também mais eficientes no enraizamento de plântulas de mandioca, desenvolvidas por meio de inoculação de pequenas estacas. O desenvolvimento da parte aérea foi bastante uniforme para todos tratamentos, não havendo diferença entre eles. A ocorrência ocasional de contaminação, por fungo em um tubo, e por bactéria em outro tubo, foi facilmente detectada visualmente apesar da cor leitosa do meio com amido de milho. Mesmo sendo utilizado em uma quantidade maior por volume do meio em comparação ao ágar, o mais importante foi a redução do custo quando o amido de milho foi usado como agente solidificante.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Nível Médio, CEM 01 Sobradinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 002 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ANTIBIÓTICOS TIMENTIN E CEFOTAXIMA EM EXPLANTES FOLIARES DE *COFFEA ARABICA* SP. E *C. CANEPHORA* SP (An Evaluation of the antibiotics Timentin and Cefotaxim on leaf explants of *Coffea arabica* sp. and *C. canephora* sp)

Guimarães, C.R.S.<sup>1</sup>, Cruz, A.R.R.<sup>2</sup>, Teixeira, J.B.<sup>3</sup>, Barros, E.V.S.A.<sup>4</sup>

O estabelecimento de protocolos de transformação genética por meio de *Agrobacterium* requer a eliminação da bactéria após o período de co-cultura mediante uso de antibióticos no meio de cultivo. Estudos do efeito de antibióticos no cultivo *in vitro* de diferentes espécies vegetais revelaram efeitos tanto negativos quanto positivos na regeneração de embriões somáticos. Dessa forma, faz-se necessária a avaliação de diferentes antibióticos na regeneração de embriões somáticos em *Coffea* sp. visando estabelecimento de procedimentos eficientes de transformação via *Agrobacterium*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de regeneração de embriões somáticos de *C. arabica* e *C. canephora* em condições de cultivo descritos para embriogênese indireta (meio C modificado). Segmentos foliares foram cultivados na presença de Timentin ou Cefotaxima 200mg/L ou 400 mg/L, bem como da combinação de ambos na concentração de 200mg/L cada. Os explantes foram avaliados após 90 dias de cultivo mediante atribuição de valores de acordo com o grau de formação de calos embriogênicos em comparação com o controle positivo, ou seja, sem a presença de antibióticos. Observou-se que a formação de massa embriogênica em ambas as espécies é menos afetada pela presença de Cefotaxima. Além disso, pode-se observar que o aumento da concentração dos antibióticos inibe a formação de calos embriogênicos.

Apoio financeiro: Embrapa e PNP&D-Café.

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



### 003 - AVALIAÇÃO DOS FATORES QUE INFLUENCIAM NA FERTILIZAÇÃO IN VITRO EM *BRAQUIÁRIA* (Evaluation of factors affecting the in vitro fertilization in *Brachiaria*)

Alves, E.R.<sup>1</sup>, Willemse, M.T.M.<sup>2</sup>, Carneiro, V.T.C.<sup>3</sup>, Dusi, D.M.A.<sup>4</sup>

A braquiária é uma gramínea forrageira cultivada para alimentar o rebanho bovino no Brasil. Os programas de melhoramento genético de braquiária objetivam, através de cruzamentos, melhorar a qualidade nutricional e a resistência a pragas e doenças. Entretanto, o melhoramento genético convencional é muitas vezes dificultado por fatores de incompatibilidade genética inter e intraespecífica, observada pela não ocorrência de fertilização em plantas sexuais ou pelo aborto do embrião nos estádios iniciais de desenvolvimento. A fertilização *in vitro* pode ser uma solução para os problemas de incompatibilidade, oferecendo a possibilidade de eliminar barreiras químicas e morfológicas que impedem a penetração do tubo polínico e, conseqüentemente, a fertilização. Além disso, essa técnica permite o controle refinado dos processos envolvidos na fertilização. O estabelecimento de um protocolo eficiente de fertilização *in vitro* envolve conhecimentos básicos de biologia reprodutiva e cultura de tecidos. Em gramíneas, existem poucos trabalhos de fertilização *in vitro*, devido à grande dificuldade de se conseguir germinar pólen ou à sua baixa taxa de germinação *in vitro*, somado ao fato de as gramíneas possuírem um único ovário de tamanho pequeno e óvulo anatrópico coberto pela parede ovariana. Com o objetivo de estabelecer um protocolo eficiente de fertilização *in vitro* para espécies de *Brachiaria*, foi determinada a qualidade e a taxa de germinação *in vivo* do pólen. Foram testados polens coletados de anteras abertas e fechadas em diferentes condições. Ensaios de germinação do grão de pólen e penetração do tubo polínico foram feitos em botões florais, pistilos e ovários. Os melhores resultados de germinação foram obtidos com a coleta do pólen logo antes da antera se abrir. Para desenvolvimento de pistilos polinizados o meio de Rodrigues-Otubo *et al.* (Plant Cell, Tissue and Organ Culture 61: 175-182, 2000) modificado foi o mais eficiente. Até o momento, os ensaios de crescimento do tubo polínico em presença de ovários alcançaram melhores resultados utilizando-se o meio contendo 33% de sacarose, 0,03 g/l de nitrato de cálcio, 0,03 g/l de ácido bórico e Agar 0,19%.

---

<sup>1</sup> Bióloga, doutoranda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D., Wageningen University/IICA.

<sup>3</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **004 - ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES DE *CYRTOPODIUM HOLSTII* L.C.MENEZES (ORCHIDACEAE) USANDO SERINGA DE INJEÇÃO (Sterilization of *Cyrtopodium holstii* L.C.Menezes (Orchidaceae) seeds with the use of injection syringes)**

Santos, H. de F.<sup>1</sup>, Souza, G.A.B. de<sup>2</sup>, Cardoso, L.D.<sup>3</sup>, Abreu, L.A.<sup>4</sup>, Mendes, R.A.<sup>5</sup>

As sementes das espécies de orquídeas são muito pequenas e apresentam um pequeno embrião envolto por um tegumento transparente. Para sua germinação assimbiótica é feito o seu cultivo *in vitro*, havendo necessidade que elas estejam totalmente estéreis para não contaminarem o meio de cultura. Com esse objetivo foi usada uma seringa de injeção descartável de 10 ml de capacidade. Uma pequena bola de algodão molhado foi colocada na agulha de injeção do lado que conecta à seringa. O êmbolo da seringa foi retirado, as sementes foram colocadas dentro e o êmbolo recolocado deixando as sementes com espaço de ar, com cuidado para não serem comprimidas e danificadas. A seguir, visando induzir a germinação das estruturas de resistência dos microrganismos, deixando-os vulneráveis, foi succionada uma solução de sacarose a 10%, ficando as sementes em imersão por um período de 24 horas, retirando todo ar interno da seringa. Após este período a solução de sacarose foi drenada e as sementes foram enxaguadas três vezes com água esterilizada, no processo de sucção e drenagem. A solução de hipoclorito de sódio a 2% foi succionada, ficando as sementes imersas dentro da seringa por 20 minutos. A solução de hipoclorito foi drenada e as sementes foram enxaguadas três vezes com água esterilizada. No último enxague, quando da drenagem, foi deixada quantidade de água suficiente para facilitar a distribuição das sementes no meio de cultura MS (Murashige e Skoog) na metade de sua concentração nas placas de petri. Foram inoculadas 12 placas de petri que foram incubadas a 25°C e, ao fim de 35 dias, 69% das sementes estavam germinando e nem uma placa apresentou sinais de contaminação, seja por fungo ou bactéria.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, CEM 01 Sobradinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Assistente de Operações, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng.Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**005 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO MEIO DE CULTURA E PH NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *CYRTOPODIUM HOLSTII* L.C.MENEZES (ORCHIDACEAE) (Influence of the concentration of the media and the culture pH on the germination of *Cyrtopodium holstii* L.C.Menezes (Orchidaceae)**

Souza, G.A.B. de<sup>1</sup>, Cardoso, L.D.<sup>2</sup>, Abreu, L.A.<sup>3</sup>, Santos, H. de F.<sup>4</sup>, Mendes, R.A.<sup>5</sup>

Sementes de *C. holstii* obtidas de fruto maduro e próximo a deiscência foram submetidas ao teste de tetrazólio (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) em solução com concentração de 0,75% por 72 horas e sob temperatura de 30°C. Por observações em microscópio estereoscópico com aumento mínimo de 8 vezes, exceto as sementes que não possuíam embrião, 100% delas apresentaram coloração vermelha, indicando que eram viáveis. Para o estudo da influência da concentração do meio de cultura e do pH do mesmo foram estabelecidos os seguintes tratamentos: 1/3 da concentração do meio MS (Murashige e Skoog), 2/3 da concentração do meio MS e MS integral, todos eles com pH de 4,7, 5,2 e 5,7. Foram utilizadas placas de petri na distribuição dos tratamentos e foram feitas para cada um 4 repetições, em um total de 36 placas. As sementes, antes de serem esterilizadas, foram submetidas ao pré-tratamento com solução de sacarose a 10% pelo período de 4 horas, ao fim do qual foram enxaguadas três vezes com água esterilizada e submetidas por 20 minutos a ação de uma solução de hipoclorito de sódio a 2%. Após tratamento com hipoclorito as sementes foram novamente enxaguadas em água esterilizada antes de serem inoculadas. Todo processo de esterilização e inoculação das sementes ao meio de cultura foi realizado com o uso de uma seringa de injeção descartável de 10 mL de capacidade. Os tratamentos aqui descritos foram levados para cultivo em câmara a 25°C, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 3000 lux. Em avaliação, 25 dias após a inoculação, foi possível concluir que para *C. holstii* não houve diferença na germinação das sementes nas diversas concentrações do meio de cultura MS. No entanto comprovou-se maior eficiência na germinação quanto utilizado o meio mais ácido, de pH igual a 4,7, já que este apresentou 34,7% de sementes germinadas enquanto que os meios de pH igual a 5,2 e 5,7 apresentaram somente 21,5 e 17,3%, respectivamente.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Assistente de Operação, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biologia, graduando, FTB Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Nível Médio, CEM 01 Sobradinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 006 - O USO DE BENOMIL EM CULTURA DE TECIDOS (Benomyl use in tissue culture)

Abreu, L.A.<sup>1</sup>, Santos, H. de F.<sup>2</sup> Souza, G.A.B. de<sup>3</sup>, Mendes, R.A.<sup>4</sup>

Um problema para a conservação de germoplasma vegetal *in vitro*, utilizando da técnica da cultura de tecidos, sempre foi a contaminação do meio de cultura por bactérias e/ou fungos. A contaminação por bactérias geralmente acontece devido a contaminação endógena dos explantes e plântulas. A contaminação por fungo ocorre devido a deficiência na manipulação durante o subcultivo, a presença de esporos no ambiente onde o subcultivo é realizado ou a infestação por ácaros. Visando o controle da ocorrência de fungos em meio de cultura foi utilizado o fungicida sistêmico na formulação pó molhável benomil [metil-1(butilcarbomil)-2-benzimidazolcarbonato], do grupo benzimidazol, em 5 tratamentos. O meio de cultura utilizado foi uma modificação do MS (Murashige e Skoog), com adição de benomil nas concentrações de 0, 5, 10, 15 e 20 mg.l<sup>-1</sup>. Os respectivos tratamentos foram distribuídos em placas de petri na razão de 20 ml por placa em cinco repetições por tratamento. O fungo *Penicillium* sp., de ocorrência mais freqüente, foi cultivado para aumentar a quantidade de inóculo, em meio MS modificado sob temperatura de 25 °C pelo período de 10 dias. Da colônia originada foi feita uma solução que foi inoculada nas placas de petri na proporção de 0,12 ml por placa. Todo conjunto foi levado para cultivo a 25 °C. Um dia após a inoculação já foi possível observar o desenvolvimento da colônia nas cinco repetições do tratamento sem benomil e aos 10 dias após inoculação as colônias ocupavam a área de todas placas da testemunha. Não houve desenvolvimento do fungo inoculado nos outros tratamentos com benomil no meio de cultura. Apesar da diluição do benomil ao meio de cultura em concentrações mais elevadas apresentar alguma dificuldade e não ter sido completa, ele foi efetivo no controle do fungo de ocorrência mais freqüente no laboratório.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Nível Médio, CEM 01 Sobradinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## BIOLOGIA MOLECULAR

### 007 - AMPLIFICAÇÃO POR RT-PCR E CLONAGEM DE UM GENE DE $\alpha$ -AMILASE DE *RHYZOPERTHA DOMINICA* (L.) (Amplification by RT-PCR and cloning of the gene encoding *Rhyzopertha dominica* (L.) $\alpha$ -amylase)

Castro, F.C.<sup>1</sup>, Valle, F.S.<sup>2</sup>, Batista, J.A.N.<sup>3</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>4</sup>, Mello, L.V.<sup>4</sup>

Num estágio de desenvolvimento do país onde se procura a obtenção de qualidade e eficiência na produção de grãos, tornam-se cada vez mais importante os esforços no processo de armazenagem, no sentido de reduzir o alto nível de perdas existentes. A perda causada por insetos é de 13%, sendo que os coleópteros são o grupo mais importante das pragas de armazenagem. *Rhyzopertha dominica* é considerada a pior praga que ataca cereais armazenados em nosso país, sendo classificada como uma praga primária por ser capaz de atacar grãos inteiros, intactos e aptos para a armazenagem. Uma forma de proteção dos grãos é o uso de produtos químicos, de forma a controlar a população de insetos. Uma outra tecnologia para manter a qualidade dos grãos durante seu armazenamento é o desenvolvimento de cereais recombinantes que possuíam proteínas ativas que impedem o crescimento de insetos, reduzindo a população das pestes. Proteínas bioativas, tais como inibidores de amilases são alvo de estudo visando proteção contra *R. dominica*. No entanto, existe uma certa especificidade dos inibidores em relação às enzimas. Dados existentes mostram que a atividade deste inseto apresenta propriedades atípicas de inibição por inibidores conhecidos. Assim, é necessário um melhor conhecimento das bases moleculares das amilases, de forma a se obter controle desta praga. Para tal, este projeto visa o isolamento de um ou mais genes e expressão da  $\alpha$ -amilase de *R. dominica* a ser utilizada em futuros experimentos de atividade contra diferentes inibidores, bem como para a determinação de sua estrutura. Numa primeira etapa foram desenhados 'primers' baseados em várias amilases de insetos, utilizando-se regiões de consenso entre elas. Um fragmento interno de 600pb foi obtido por RT-PCR. Em seguida, a extremidade 5' do gene foi amplificada pela técnica de 5' RACE utilizando-se três 'primers' antisense desenhados a partir do primeiro fragmento obtido pelo RT-PCR. Nesta etapa totalizou-se cerca de 2/3 do gene. O cDNA completo será obtido através da técnica de 3' RACE utilizando-se 'primers' desenhados para a extremidade 5' do cDNA, oligo dT e Pfu DNA polimerase.

<sup>1</sup> Bióloga, graduanda, CEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biólogo, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **008 - ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DE *EUCALYPTUS GRANDIS* COM BASE EM SEQUENCIAMENTO “SHOTGUN” POR AMOSTRAGEM (“SAMPLE SEQUENCING”) (Analysis of the *Eucalyptus* Genome based on Sample Sequencing)**

Lourenço, R.T.<sup>1</sup>, Cunha, A.F.<sup>1</sup>, Tsukumo, F.<sup>1</sup>, Pereira, G.A.G.<sup>2</sup>, Grattapaglia, D.<sup>3</sup>

Florestas industriais de *Eucalyptus* têm importância fundamental no setor florestal brasileiro, sendo que há cerca de 4 milhões de hectares cobertos por esta cultura no país, a maior parte destinada a produção de pasta de celulose. Nas últimas três décadas, os programas empresariais e públicos de melhoramento genético de *Eucalyptus* geraram ganhos extraordinários para a cultura. O desafio no momento é o melhoramento das propriedades tecnológicas da madeira visando maiores rendimentos dos processos industriais. Neste contexto novas possibilidades são vislumbradas pela integração das metodologias clássicas de melhoramento e os conhecimentos e tecnologias derivadas da pesquisa genômica. Este trabalho tem por objetivo investigar detalhadamente a estrutura e organização do genoma de *Eucalyptus*. A estratégia utilizada foi o sequenciamento por amostragem (“sample sequencing”) de uma biblioteca genômica “shotgun”, construída a partir de DNA de *Eucalyptus grandis* L’Herit. As sequências foram comparadas com sequências depositadas em bancos de dados públicos, principalmente de *Oryza* e *Arabidopsis*, com o intuito de identificar genes candidatos, principalmente aqueles ligados à formação da madeira e resistência a doenças. Estas sequências foram então analisadas quanto ao seu conteúdo codante e não-codante e quanto ao seu conteúdo nucleotídico. Também foram caracterizadas quanto ao conteúdo de DNA repetitivo, procurando-se por elementos genéticos transponíveis e por seqüências microssatélites, as quais foram identificadas e quantificadas em suas principais classes. Microssatélites tri e tetranucleotídicos tiveram especial atenção, por seu valor e utilização em mapeamento genético. Finalmente, procurou-se também identificar ilhas CpG e determinar se este tipo de padrão, em *Eucalyptus*, está relacionado com regiões gênicas. A partir destas análises foi possível determinar algumas características do genoma de *Eucalyptus*. A descrição de sua estrutura e organização será utilizada, juntamente com os outros dados obtidos principalmente no mapeamento genético e físico de genes expressos.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., mestrando, Unicamp, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Unicamp, Campinas, SP.

<sup>3</sup> Eng. Florestal, Ph.D., UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 009 - ANÁLISE DA INFECÇÃO VIRAL E DO PRODUTO DE EXPRESSÃO DE *ROLA* EM SISTEMA DE BACULOVÍRUS (Viral infection and *rolA* product expression analysis in the baculovirus system)

Oliveira, M.S.<sup>1</sup>, Sihler, W.<sup>2</sup>, Carneiro, M.<sup>3</sup>, Souza, M.L.<sup>4</sup>

As características morfológicas conferidas à plantas infectadas com *Agrobacterium rhizogenes* tem como principal responsável o gene *rolA*. Dentre as anomalias causadas por esse gene estão a redução de porte da planta, inibição do crescimento da raiz e retardamento da floração. O entendimento do modo molecular de ação dessa proteína pode ser de utilidade na manipulação da estatura das plantas. O principal impedimento no estudo de *ROLA* é sua baixa concentração nos tecidos onde é funcional. A fim de obtermos quantidades maiores da proteína, escolhemos o sistema de expressão de baculovírus, o qual fornece um ambiente apropriado para a síntese de proteínas heterólogas. O gene *rolA* foi clonado no vetor pFastBac HTb e transformado em células DH10Bac (Life Technologies), contendo o genoma viral do AcMNPV. Esse DNA foi cotransfectado em células SF 9, resultando em vírus recombinantes defectivos de poliedrina. Um recombinante foi escolhido para exame de expressão, denominado *vrolA*. Células controle e infectadas com o vírus foram coletadas após 48h de incubação e o perfil de proteínas analisado em gel de poliacrilamida desnaturante 13%. Foi observada na amostra viral a presença de uma banda de peso molecular de 11Kda, conforme esperado para *ROLA*. A observação das amostras por microscopia óptica mostrou a evolução da infecção. Após 24h de infecção observa-se a hipertrofia do núcleo e aparecimento de corpos densos, relativos à formação do estroma virogênico. Estudos de “western blotting” de detecção da hibridização por luminescência foram realizados, utilizando um anticorpo policlonal contra *ROLA* desenvolvido em coelho. A afinidade do anticorpo pela amostra celular infectada sugere que o produto expresso pelo gene *rolA* clonado no vírus apresenta as características da proteína encontrada naturalmente em plantas infectadas.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biólogo, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biologia, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 010 - ANÁLISE DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS E DE DNA DE ISOLADOS TEMPORAIS DE *BOMBYX MORI* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (Structural proteins and DNA analysis of seasonal isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus)

Dalmolin, C.C.<sup>1</sup>, Vivan, A.L.<sup>2</sup>, Ribeiro, Z.M.A.<sup>3</sup>, Castro, M.E.B.<sup>4</sup>

A sericicultura constitui uma importante atividade agroindustrial no Brasil, que ocupa o quinto lugar como produtor mundial de fios da seda. Contudo a produção brasileira ainda é baixa, principalmente, devido à alta incidência de doenças nas criações do bicho-da-seda, *Bombyx mori*, dentre as quais destacam-se as de etiologia viral. Nesse aspecto a família *Baculoviridae*, em especial o gênero *Nucleopolyhedrovirus*, constitui um de seus importantes agentes patogênicos. Portanto, considerando como de fundamental importância a caracterização desses agentes, este trabalho teve como objetivo caracterizar, por meio de técnicas moleculares, dois isolados temporais de BmMNPV, referentes aos anos 2000 (I-00) e 2001 (I-01). Para análise de proteínas estruturais, partículas virais (PIBs) foram purificadas a partir de macerados de larvas de *B. mori* infectadas e o extrato cru obtido foi submetido à centrifugação em gradiente contínuo de sacarose 40-63%. A suspensão de PIBs purificados, correspondentes aos dois isolados, foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 15%, seguida de coloração por Coomassie blue. Para melhor detecção das bandas, e portanto visualização das proteínas, o gel foi tratado com solução de nitrato de prata, por apresentar maior sensibilidade de detecção. A análise revelou similaridade entre as proteínas virais identificadas em ambos os isolados virais, verificando-se uma forte banda na região de 30 kDa correspondente a poliedrina, principal proteína dos baculovírus. Para purificação do DNA viral, PIBs purificados numa concentração inicial de  $3 \times 10^8$  PIBs/mL foram submetidos à tratamento com solução alcalina, SDS e proteinase K, seguida de extração por ciclos sucessivos de fenol, clorofórmio e álcool isoamílico e precipitação por etanol absoluto. O DNA viral foi então clivado com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BamHI*, *KpnI* e *SmaI*, e os fragmentos resultantes separados por eletroforese em gel de agarose 0,7%. A análise genômica não revelou diferenças nos perfis de restrição, apresentando em ambos o mesmo número de fragmentos clivados. O padrão de clivagem produzido foi similar ao relatado no mapa físico do genoma de BmNPV (Maeda e Majima, 1990) com 18, 18, 19, 6, 4 e 3 fragmentos respectivamente, o que indica estabilidade dos isolados, uma vez que não foram detectadas variações em seu genoma.

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, mestranda UFRGS, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## 011 - A PRIMEIRA GERAÇÃO DE ESTs DE *ARACHIS* (The first generation of *Arachis* ESTs)

Proite, K.<sup>1</sup>, Sá, S.<sup>2</sup>, Leal-Bertioli, S.C.M.<sup>3</sup>, Bertioli, D.J.<sup>4</sup>, Guimarães, P.M.<sup>5</sup>

*ESTs* (*Expressed Sequence Tag*) são seqüências curtas e parciais produzidas a partir de clones de cDNA selecionados aleatoriamente que têm sido bastante explorados na identificação e na formação de extensos catálogos de genes. *ESTs* são um método rápido de amostragem do transcriptoma de organismos e também complementares aos programas de sequenciamento de genomas. Isto se deve ao fato de serem frequentemente feitas inferências sobre a provável função de um gene novo isolado, tendo como base a sua seqüência nucleotídica ou a seqüência de aminoácidos deduzida a partir de seqüências homólogas de genes conhecidos. A geração de um banco de dados de *ESTs* de *Arachis* auxiliará na busca de genes envolvidos com resistência. Uma primeira investida foi a construção de uma biblioteca de cDNA de folha de uma espécie silvestre diplóide de *Arachis*. A espécie escolhida foi *A. stenosperma* (V10309), que tem mostrado resistência tanto aos fungos *Cercospora arachidicola* e *Cercosporidium personatum* quanto aos fitonematóides *Meloidogyne arenaria* (raça 2) e *M. javanica* em bioensaios preliminares. Foi obtida uma titulação de  $6,8 \times 10^9$  pfu/mL de possíveis clones desta biblioteca, ou seja, a priori a biblioteca está bem representada. Os primeiros clones já estão sendo seqüenciados e PCR destes demonstrou que são de tamanhos diferentes. Uma segunda etapa deste trabalho será a construção de uma biblioteca de cDNA de folha inoculada com um dos fungos, para então fazer uma subtração eletrônica das seqüências de genes expressos diferencialmente quando a planta é sujeita ao tratamento. As seqüências de clones que se mostrarem interessantes serão convertidas em marcadores moleculares que serão utilizados na construção de um mapa genético de *Arachis* que está sendo produzido. Uma vez criado um banco de dados de *ESTs* de *Arachis*, este banco servirá para futuras comparações entre genomas e também como outra referência de leguminosa, ao lado de *Lotus japonicus* e *Medicago truncatula*.

---

<sup>1</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, mestranda, Universidade Católica de Brasília.

<sup>3</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biólogo, Ph.D., Universidade Católica de Brasília.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 012 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E CLONAGEM DE GENES *Cry* DE UMA ESTIRPE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EFETIVA CONTRA O BICUDO DO ALGODOEIRO (*ANTHONOMUS GRANDIS*) (Biochemical characterization and cloning of *Cry* genes of a *Bacillus thuringiensis* strain effective against cotton boll weevil - *Anthonomus grandis*)

Magalhães, M.T.Q.<sup>1</sup>, Silva, S.M.B.<sup>2</sup>, Fragoso, R.R.<sup>3</sup>, Batista, J.A.N.<sup>4</sup>, Oliveira-Neto, O.B.<sup>5</sup>, Monnerat, R.<sup>6</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>6</sup>

O bicudo do algodoeiro, *Anthonomus grandis*, é considerado uma das pragas de maior importância na cotonicultura do continente americano. O combate a estes insetos é realizado pelo uso de produtos químicos os quais causam danos ambientais e riscos de intoxicação ao homem. Assim, o desenvolvimento de agentes de controle biológico e plantas transgênicas surgem como uma alternativa eficaz. Importantes agentes contra esta praga são os *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), bactérias gram-positivas, aeróbicas encontradas no solo. O cristal produzido pelo *Bt* composto por proteínas denominadas d-endotoxina ou proteínas cristal (*Cry*) apresentam ação tóxica a diferentes ordens de insetos e não nocivas ao homem. Com a finalidade de isolar genes específicos para insetos da ordem Coleóptera, foi feita a caracterização bioquímica e a clonagem de genes *Cry* de uma estirpe do banco de germoplasma de *Bt* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, previamente caracterizada com atividade contra o bicudo do algodoeiro. A caracterização bioquímica dos cristais através de eletroforese uni e bi-dimensional mostrou predominantemente uma proteína de 68 kDa e outra de 30 kDa, enquanto por microscopia eletrônica foram visualizados cristais bipiramidais e esféricos. Amplificação de genes *Cry* foi realizada a partir de DNA total e *primers* específicos para várias classes destes genes. Foram amplificados fragmentos gênicos correspondendo aos genes já descritos *Cry1A* e *Cry1I*, e um novo gene da classe *Cry8*, a qual apresenta atividade descrita contra insetos da ordem Coleóptera. A clonagem da sequência completa do novo gene *Cry8* está sendo realizada pela combinação das técnicas de *Tail-PCR* e *PCR inverso*. A disponibilidade do gene completo permitirá sua expressão em sistema homólogo ou heterólogo e a análise da atividade da proteína recombinante sobre o bicudo do algodoeiro.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduanda, UnB, Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Ms.C., UCB, Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., mestrando, UnB, Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia.

<sup>4</sup> Biólogo, Ph.D., Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., doutorando, UnB, Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia.

<sup>6</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos genéticos e biotecnologia.

## 013 - CLONAGEM DE UMA PROTEINASE SERÍNICA DE LARVAS DE *ZABROTES SUBFASCIATUS* (Cloning of an serine proteinase from larvae of *Zabrotes subfasciatus*)

Magalhães, C.P.<sup>1</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>2</sup>

Insetos pragas causam danos a feijões tanto na América Latina quanto na África, sendo os carunchos os mais. Diversas estratégias têm sido utilizadas para a diminuição do ataque destas pragas, incluindo a produção de variedades mais resistentes e a determinação bioquímica de fatores em sementes que promovam esta resistência. Acrescenta-se também a identificação de proteínas antinutricionais que atuem contra as enzimas digestivas destas pragas. O feijão comum possui uma família de proteínas de defesa que compreende as fitohemaglutininas, as arcelinas, e os inibidores de  $\alpha$ -amilases. Estes inibidores denominados  $\alpha$ -A11, encontrado em variedades comerciais, e o  $\alpha$ -A12 encontrado em variedades selvagens, se diferenciam em relação a suas especificidades. Apenas o  $\alpha$ -A12 é ativo contra *Z. subfasciatus*. O trabalho desenvolvido por Ishimoto & Chrispells (1996) demonstrou que o  $\alpha$ -A11 sofre clivagem proteolítica por enzimas do trato digestivo de *Z. subfasciatus*. Na caracterização, esta protease se mostrou ser do tipo serínica. Através do seqüenciamento de aminoácidos foi determinada a presença do sítio de clivagem na subunidade b do  $\alpha$ -A11, que compreende resíduos de tripitofano, serina e tirosina, típicos para serino proteases. Com o objetivo de estudar a ação desta serino proteinase sobre  $\alpha$ -A11 e buscar inibidores específicos para esta enzima, foi realizada a clonagem do gene responsável pela sua expressão a partir do cDNA extraído de larvas de *Z. subfasciatus*. Para isso, foram analisadas 12 seqüências de aminoácidos de serino protease e alinhadas utilizando o programa ClustalW para produção dos oligonucleotídeos degenerados. Estes nucleotídeos foram usados para amplificação em reação de polimerase de cadeia (PCR) utilizando como molde DNA de larvas de *Z. subfasciatus*. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% onde se obteve um fragmento em torno de 450 pb. Este fragmento foi inserido no plasmídeo pGEN T easy e utilizado para transformação em células de *E. coli* XL1 Blue. As células transformadas foram selecionadas e crescidas em meio líquido contendo ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído e submetido ao seqüenciamento utilizando o oligonucleotídeo T7 que flanqueia a região de inserção do fragmento. A análise da seqüência demonstrou similaridade com outras proteinases de insetos do tipo tripsina. Oligonucleotídeos específicos foram produzidos para o uso na obtenção das extremidades 5' do DNA através de PCR, utilizando a técnica 5' RACE. O gene expresso em sistema heterólogo será utilizado para análise da atividade sobre  $\alpha$ -A11 e na presença de inibidores de proteinases serínicas.

<sup>1</sup> Biólogo, doutorando, USP, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 014 - CLONAGEM DE UM INIBIDOR DE $\alpha$ -AMILASE DE *PHASEOLUS COCCINEUS* (Cloning of an $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus coccineus*)

Pereira, R.A.<sup>1</sup>, Lima, L.M.<sup>1</sup>, Guimarães, M.L.<sup>2</sup>, Coutinho, M.V.<sup>3</sup>, Batista, J.A.N.<sup>4</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>4</sup>

*Phaseolus* ssp. contém uma família de proteínas de defesa que inclui as fitohemaglutininas, as arcelinas e os inibidores de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI) que são codificadas por uma família multigênica. A atividade destas proteínas vem sendo testada contra várias espécies de inseto-praga, pois possuem um enorme potencial para serem incluídos dentro do programa de melhoramento genético e biotecnológico. Estudos recentes têm mostrado que um inibidor de  $\alpha$ -amilase do feijão selvagem *Phaseolus coccineus* apresenta atividade contra a  $\alpha$ -amilase da principal praga do cafeeiro, *Hypothenemus hampei* (broca do café). Este trabalho tem como objetivo clonar e caracterizar genes codificadores de inibidores de  $\alpha$ -amilases de *P. coccineus* que apresentem atividade contra a broca do café. Amplificações por PCR foram feitas utilizando DNA total de *P. coccineus* e três conjuntos de "primers" internos construídos a partir de regiões conservadas presentes em inibidores do gênero *Phaseolus*. No total foram amplificados fragmentos gênicos correspondentes a seis diferentes genes. Um destes, denominado *Pc2*, com uma seqüência aberta de leitura de 512 pb, apresentou 64% de identidade com outros  $\alpha$ -AI. Os outros fragmentos apresentaram maior similaridade com fitohemaglutininas ou códons de terminação internos, indicando tratar-se de pseudogenes. O trabalho será agora direcionado para obter a seqüência completa do gene *Pc2* através das técnicas de 5' e 3' RACE e testar a atividade da proteína recombinante contra a broca do café.

---

<sup>1</sup> Bióloga, doutoranda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, graduanda, UNICEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biólogo, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 015 - CLONAGEM DO GENE *GP64* DO NUCLEOPOLIEDROVIUS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* PARA CONSTRUÇÃO DE CÉLULAS CAPAZES DE EXPRESSAR A GLICOPROTEINA GP64 (Cloning of the *gp64* gene of *Anticarsia gemmatalis* Nucleopolyhedrovirus for construction of cells able to express the GP64 glycoprotein)

Mendes, D.N.<sup>1</sup>, Sihler, W.<sup>2</sup>, Ribeiro, B.M.<sup>3</sup>, Souza, M.L.<sup>4</sup>

Além de seu potencial pesticida devido principalmente à sua especificidade a invertebrados, baculovirus tem sido utilizado como vetor de expressão gênica em sistema eucarioto, sendo atualmente uma importante ferramenta em biotecnologia. Isso se tornou possível após o estabelecimento de linhagens celulares de insetos e o avanço dos estudos moleculares com o protótipo Nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV). Como característica peculiar aos baculovirus dois fenótipos são produzidos: o “budded virus” (BVs), responsável pela infecção sistêmica no inseto, e o “occluded virus” (OVs), responsável pela infecção de inseto para inseto e disseminação da doença no meio ambiente. O gene viral *gp64* expressa uma glicoproteína presente em estruturas chamadas peplomêros dos budded virus (BVS) e essencial para transmissão da infecção de célula para célula. Atualmente estudos estão em andamento visando a construção de células de *Anticarsia gemmatalis* (UFL-AG-286) capazes de expressar constitutivamente a proteína viral GP64, com a finalidade de se construir um sistema de clonagem para o Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* - AgMNPV (“sistema de resgate”). Inicialmente um fragmento de 1.6 Kb foi amplificado por PCR utilizando-se primers de regiões adjacentes ao gene *gp64* e inserido no plasmídeo pGEM T easy (Promega). Após transformação em células XL-Blue o plasmídeo foi amplificado e o DNA purificado através de coluna de troca iônica (Quiagen). Após digestão com as enzimas *Pst* I e *Bam* HI para liberação de um fragmento de 1550 pb, o gene *gp64* foi clonado em um plasmídeo contendo o promotor *ie-1* do AgMNPV (pBSAgIE1). O cassete gênico *prie-1gp64*, presente no plasmídeo recombinante (pBSAgIE1GP64) deverá ser removido, em etapa posterior, com o auxílio de enzimas de restrição específicas e clonado no plasmídeo pBSIE1Gpac, contendo o gene da puomicina. Este plasmídeo, por sua vez, será transfectado em células de UFL-AG-286 e, 24 h pós-transfecção, será adicionada puomicina ao meio (2 mg/ml) para seleção de células resistentes ao antibiótico. As células selecionadas serão isoladas e analisadas para a expressão da proteína de GP64 usando ensaios de fusão. As linhagens celulares de inseto UFLAG 2.86 e BTI-Tn5B1-4 serão utilizadas por serem altamente susceptíveis a infecção com o vírus AgMNPV.

<sup>1</sup> Farmácia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biólogo, Ph.D., UnB.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 016 - CLONAGEM E AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *SERK* DE *COFFEA CANEPHORA* E *THEOBROMA CACAO* L. (Cloning and evaluation of the *Serk* gene expression of *Coffea canephora* and *Theobroma cacao* L.)

Tinoco, M.L.P.<sup>1</sup>, Santos, M.O.<sup>2</sup>, Romano, E.<sup>3</sup>, Aragão, F.J.L.<sup>4</sup>

Embriogênese somática é o processo pelo qual células somáticas adquirem características meristemáticas e dão origem a embriões que podem se desenvolver em indivíduos adultos. Pelo processo de embriogênese somática, milhares de embriões podem ser obtidos a partir de um único explante em cultura *in vitro*. Esta enorme capacidade de obtenção de embriões tem grande importância para micropropagação e transformação genética. Várias espécies têm um sistema de embriogênese somática bem desenvolvido. *C. canephora* e *T. cacao* apresentam diferentes respostas a partir de aplicação exógena do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em condições apropriadas. O controle deste processo passa pela identificação de genes que conferem a competência de embriogênese somática. O gene *serk* é um desses genes altamente expressos durante a formação de células embriogênicas em cultura. Este gene é um dos componente de uma via de transdução de sinal de embriogênese somática e a sua expressão tem sido relatada como estando estritamente relacionada com a competência para embriogênese somática. No presente estudo foram usados primers degenerados desenhados a partir de regiões conservadas de acordo com análises no Clustal-W. Foram obtidos clones com cinco combinações desses primers. Estes clones foram sequenciados e apresentaram mais de 87% de homologia no domínio quinase de cacao e café quando comparados com seqüências de milho, arroz e arabidopsis usando Blastn. Foi extraído mRNA de dois tipos de tecido para avaliação, através de RT-PCR, da expressão desse gene durante a embriogênese somática em cacao e café. A expressão do gene *serk* foi analisada em folhas não induzidas e calos embriogênicos originados de folhas induzidas de café, e estaminóides não-induzidos e estaminóides induzidos de cacao. A expressão do gene *serk* foi observada em tecidos induzidos e não foi observada em tecidos primários. Futuros estudos serão concentrados no processo de embriogênese somática com objetivo de entender o processo biológico de formação de embriões em cacao e café.

---

<sup>1</sup> Biólogo, graduado, CNPq.

<sup>2</sup> Biólogo, doutorando, UnB, CNPq.

<sup>3</sup> Biólogo, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

## 017 - CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO FRAGMENTO DE VAPAG CORRESPONDENTE AO GENE INIBIDOR DE APOPTOSE (*IAP-3*) DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (Cloning and partial sequencing of a vApAg fragment correspondent to apoptosis-inhibiting gene (*iap-3*) of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus)

Soares, E.F.<sup>1</sup>, Santos, A.C.<sup>2</sup>, Villela, A.G.<sup>3</sup>, Ribeiro, B.M.<sup>4</sup>, Castro, M.E.B.<sup>5</sup>

O baculovirus *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), um importante agente de controle da lagarta-de-soja, possui um gene inibidor de apoptose que permite que a sua replicação em células hospedeiras gere uma infecção altamente produtiva. Em recentes estudos, o gene responsável por esta inibição, *iap-3*, foi localizado, clonado e sequenciado. Isto deveu-se principalmente à descoberta de um mutante, durante a construção de um recombinante de AgMNPV, que é capaz de induzir apoptose, em células de inseto derivadas de *A. gemmatalis* (UFL-AG-286), e replicar normalmente em uma outra linhagem celular derivada de *Tricloplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4). Esse mutante foi denominado de vApAg. Diferentemente do vírus tipo selvagem AgMNPV, a análise de fragmentação do DNA total e de restrição do DNA do mutante vApAg indicam que o(s) gene(s) inibidor(es) de apoptose deve(m) estar inativado(s), deletado(s) ou sob regulação alterada. Diante disso, o fragmento de vApAg, correspondente ao gene *iap-3* de AgMNPV, foi identificado, clonado e está sendo sequenciado. Para clonagem, o fragmento de vApAg foi amplificado por PCR resultando em um fragmento de 3.500 pb. Este fragmento foi clonado e clivado com diversas enzimas de restrição. Alguns subclones foram sequenciados e a seqüência parcial do fragmento mostrou a inserção de um fragmento de DNA de 2.500 pb no nucleotídeo +59 (com relação ao ATG) do gene *iap-3* de AgMNPV. Os nucleotídeos TTAA (posições +56 a +59) foram duplicados na extremidade 3' da inserção e uma seqüência de 16 nucleotídeos repetida e invertida foi também localizada nas extremidades da inserção. Esses dados indicam que o gene *iap-3*, no mutante vApAg, foi interrompido por um transposon presente nas células de *A. gemmatalis*. Além disso, a análise da seqüência usando o programa Blast mostrou que o fragmento possui uma possível ORF com homologia de seqüência com uma ORF de um transposon presente nas células de *T. ni*. Outros fragmentos estão sendo sequenciados para a obtenção da seqüência completa do possível transposon de *A. gemmatalis*. O gene *iap-3* de AgMNPV foi clonado em um plasmídeo "downstream" ao promotor *ie-1* de AgMNPV. O plasmídeo resultante será usado em testes de expressão transiente para verificação da atividade anti-apoptótica em células de inseto em cultura.

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, graduanda, UnB.

<sup>4</sup> Biólogo, Ph.D., UnB.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 018 - CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE DADOS STADEN DE ANÁLOGOS DE GENES DE RESISTÊNCIA (RGAS) DO TIPO TIR E NÃO-TIR DE *ARACHIS CARDENASII* (Construction of a Staden database of RGAs TIR and non-TIR of *Arachis cardenasii*)

Santos, V.L.<sup>1</sup>, Bertoli, D.J.<sup>2</sup>, Guimarães, P.M.<sup>3</sup>, Leal-Bertoli, S.C.M.<sup>4</sup>

Espécies silvestres de *Arachis* têm sido caracterizadas devido ao seu alto polimorfismo genético. Entre estas espécies está *Arachis cardenasii* conhecida por apresentar resistências a diferentes pragas. Os produtos dos genes que conferem resistência a diversas espécies de plantas possuem domínios altamente conservados, que podem ser utilizados para a construção de “primers” que amplificam regiões genômicas relacionadas à resistência. A maioria dos R genes conhecidos são classificados pela presença do domínio TIR (com homologia ao *Toll* de *Drosophila* e a interleucina de mamíferos) ou pela presença do domínio “Coiled-coil”, também chamados não-TIR. Este trabalho tem como objetivo o isolamento de RGAs de *Arachis cardenasii* para incremento de um banco de dados onde já são depositados RGAs do tipo TIR de diversas espécies silvestres de *Arachis*. Primers degenerados desenhados a partir de “motifs” conservados do domínio NBS (nucleotide binding site) foram usados para amplificação das sequências de interesse via PCR (polimerase chain reaction). Os “motifs” selecionados para a construção dos “primers” são denominados P-loop, GLPL e RNBS-D. Os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor pGEM-T e inseridos em *Escherichia coli* por eletroporação. Os clones gerados foram submetidos a lise alcalina para extração do DNA plasmidial. Aproximadamente 543 amostras de DNA foram sequenciadas. As sequências obtidas foram analisadas através do programa Blast-x (NCBI) para se verificar homologia com sequências depositadas no banco de dados local da espécie *Arabidopsis thaliana*. Entre as sequências analisadas, 136 foram identificadas como RGAs, além de diversos retroelementos. As sequências classificadas como RGAs estão sendo analisadas com a utilização do programa Staden Package onde ocorre a montagem dos *contigs* e a edição das sequências-consenso as quais serão depositadas no banco de dados de RGAs de *Arachis*. Os RGAs serão convertidos em marcadores moleculares e utilizados em um mapa genético de *Arachis*, juntamente com marcadores SSR, RAPD e AFLP, sendo desenvolvidos neste mesmo projeto. Futuramente, poderão ser usados como marcadores no melhoramento assistido do amendoim cultivado (*A. hypogaea*).

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda, Universidade Católica de Brasília.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D., Universidade Católica de Brasília.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## 019 - CONSTRUÇÕES DE VETORES COM GENES DE INIBIDORES DE PROTEINASES PARA TRANSFORMAÇÃO DE ALGODÃO VISANDO O CONTROLE DO BICUDO DO ALGODOEIRO (Constructions of vectors with proteinase inhibitors genes for genetic transformation of cotton aiming the control of cotton boll weevil)

Evangelista, I.B.R.<sup>1</sup>, Batista, J.A.N.<sup>2</sup>, Oliveira-Neto, O.B.<sup>3</sup>, Grossi de Sá, M.F.<sup>4</sup>

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) destaca-se como uma das principais pragas que mais causa prejuízos à cultura do algodão no Brasil. O controle com defensivos químicos é particularmente dificultado pelo hábito endofítico das larvas do inseto, de modo que a expressão de proteínas bioativas em plantas transformadas de algodão constitui uma alternativa promissora de controle. Trabalhos anteriores têm demonstrado que a incorporação do inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SKTI) e do inibidor trípico e quimotríptico de feijão de corda (BTCl) pertencente à família do inibidor Bowman-Birk (BBI), resulta em uma alta taxa de mortalidade de larvas e insetos adultos do bicudo, apresentando assim potencial para o controle desse inseto. Neste trabalho foram realizadas construções gênicas utilizando os genes dos inibidores SKTI e BBI visando o desenvolvimento de vetores para a transformação de plantas de algodão. Para a montagem dos cassetes de expressão, para cada gene foram utilizados o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (35S CaMV) e o terminador do gene octopina sintase de *Agrobacterium*. Os cassetes de expressão de cada gene foram clonados no vetor pAC321, para serem utilizados na transformação via biobalística, contendo também o gene *ahas* como marca de seleção. As construções finais com o SKTI e BBI foram denominadas de pACSKTI4 e pACBBI8, respectivamente. Além disso, os cassetes de expressão também estão sendo transferidos para um vetor contendo as seqüências flanqueadoras do T-DNA, para a transformação pelo método de *Agrobacterium*. Como próximo passo estes vetores serão usados para a transformação e a expressão dos inibidores em algodoeiros, através do qual se poderá avaliar o real potencial destes inibidores para o controle do bicudo.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 020 - DESENVOLVIMENTO DE MAMOEIROS TRANSGÊNICOS COM GENE DE PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO (Development of transgenic papayas with an anti-microbial peptide gene)

Alves, P.C.M.<sup>1</sup>, Carmo, L.S.T. do<sup>2</sup>, Coelho, M.C.F.<sup>3</sup>, Souza Jr., M.T.<sup>4</sup>

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é hospedeiro de diversos fungos fitopatogênicos, com destaque para os agentes causais da “Pinta Preta” (*Asperisporium caricae* (Speg) Maubl.) e da “Antracnose” (*Colletotrichum gloesporioides* (Penz.) Penz. & Sacc). Plantas transgênicas resistentes a fungos apresentam-se como uma nova forma de controle de doenças. Genes que expressam peptídeos antimicrobianos têm sido utilizados para obter transgênicos de diversas espécies vegetais. Este estudo objetivou gerar mamoeiros ‘Sunrise’, expressando o gene *Magainin2* ou o seu análogo sintético *MSI99*, que codificam peptídeos com atividade antimicrobiana de amplo espectro, com vistas ao futuro desenvolvimento de variedade resistente aos principais fungos fitopatogênicos desta cultura no Brasil. Um total de 74 placas de petri com embriões somáticos foram submetidas a transformação por biobalística. O gene *npt II* foi utilizado como marcador. Noventa e um “putative transgenic embryo clusters” (PTECs) foram selecionados em meio de cultura suplementado com canamicina. Destes, 52 regeneraram plantas; uma eficiência de regeneração de 57,15%. Análises de PCR e Southern blot estão sendo realizadas para confirmar a presença do gene de interesse e do marcador no genoma destas plantas.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**021 - DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO RAÍZES DE CENOURA TRANSFORMADAS POR *AGROBACTERIUM RHIZOGENES* INFECTADAS PELO NEMATÓIDE *DITYLENCHUS DESTRUCTOR* (The development of a methodology for evaluation of carrot roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes* infected with the nematode *Ditylenchus destructor*)**

Costa, G.R.T.<sup>1</sup>, Dias, J.G.O.<sup>2</sup>, Leal-Bertioli, S.C.M.<sup>3</sup>, Araújo, A.C.G.<sup>3</sup>, Bertioli, D.J.<sup>4</sup>, Tenente, R.C.V.<sup>5</sup>, Guimarães, P.M.<sup>5</sup>

A utilização de plantas resistentes a nematóides é a maneira mais eficiente de controlar estas pragas. No Brasil, nematóides migradores e parasitas causam grandes danos econômicos. Com o objetivo de desenvolver um modelo *in vitro* para avaliação de proteínas que causam danos a nematóides ecto e endoparasitas e insetos radiculares, foram transformadas raízes de cenoura (*Daucus carota*) com *Agrobacterium rhizogenes* cepas 2659 e 1724. As raízes transformadas foram multiplicadas em placa de Petri em meio MS e inoculadas com 100 juvenis de *Ditylenchus destructor* previamente esterilizados com estreptomicina. Raízes inoculadas foram mantidas em estufa a 25°C. A avaliação da penetração dos nematóides foi feita após 20 dias. Para análise por microscopia de luz, usando o contraste de interferência diferencial (DIC), foram utilizados os seguintes métodos: coloração com fucsina ácida seguida de clareamento com glicerol ou etanol; clareamento com xilol e glicerol. Foi verificado que os nematóides não infectaram as raízes, mas a maior parte se encontrava no meio de cultura, consequentemente, o método de inoculação deverá ser modificado e a quantidade de indivíduos aumentada. O método da fucsina ácida, que é eficiente para avaliação de nematóides na planta, não foi adequado para avaliar os danos causados na raiz, pois colore todas as estruturas celulares. O método mais simples e adequado para este experimento é o clareamento com xilol e glicerol e observação em DIC. Serão feitas novas inoculações para se avaliar a penetração e desenvolvimento desta espécie nas raízes transformadas de cenoura.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, Universidade Católica de Brasília.

<sup>2</sup> Prestadora de serviços, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biólogo, Ph.D., Universidade Católica de Brasília.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 022 - EFEITO DO PERÍODO DE REATIVAÇÃO CELULAR NA EXPRESSÃO DO GENE GUS EM EMBRIÕES DE *BRACHIARIA BRIZANTHA* (Cell reactivation period effect on the gus gene expression in *Brachiaria brizantha* embryos)

Lacerda, A.L.M.<sup>1</sup>, Cabral, G.B.<sup>2</sup>, Rodrigues, J.C.M.<sup>3</sup>, Araújo, A.C.G.<sup>4</sup>, Carneiro, V.T.C.<sup>5</sup>

*Brachiaria* é um gênero de gramíneas, introduzido da África, e largamente utilizado no Brasil como forrageira tropical por sua ampla adaptação a diferentes condições edafo-climáticas, sendo cultivada em uma área de aproximadamente 40 milhões de ha. *Brachiaria*, assim como outras gramíneas, apresenta plantas de modo de reprodução sexual e modo de reprodução apomítico. Apomixia é um modo de reprodução assexual, ocorrendo clonagem através de sementes, o que ocasiona baixa variabilidade genética. Uma grande demanda do programa de melhoramento genético desta forrageira é a introdução de genes de interesse por técnicas de transformação genética. O objetivo deste trabalho foi testar o período de reativação celular em embriões maduros, antes do bombardeamento de partículas, visando otimizar o método de transformação por biobalística, de *B. brizantha* cv. Marandu, BRA 000591. O período de reativação celular foi definido como o tempo de cultivo de embrião maduro em meio de embriogênese somática, anterior ao bombardeamento. Os embriões bombardeados após diferentes períodos, tiveram a expressão do gene gus avaliada. A quantidade do produto da reação histoquímica da GUS com X-Gluc, visualizada pela ocorrência de áreas azuis, aumentou com o período de reativação celular até o 5º dia, decaindo em embriões bombardeados após 7 dias de cultura. Os embriões apresentando áreas azuis foram selecionados, fixados em FAA e emblocados em Paraplast para análise histológica. A análise foi feita em microscópio de luz, para a visualização dos tecidos e células expressando o gene gus e de áreas com potencial para regeneração através da identificação de calos friáveis e embriogênicos. O estudo sugere que o período de reativação celular ideal para o bombardeamento está entre o 1º e 3º dia de cultura, pois é quando as células do escutelo iniciam a formação de calos.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biólogo, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 023 - ESTRATÉGIA MOLECULAR PARA CONTROLE DO NEMATÓIDE *HETERODERA GLYCINES* (Molecular strategy for control of the nematode *Heterodera glycines*)

Silva, F.B.<sup>1</sup>, Del-Sarto, R.P.<sup>2</sup>, Monteiro, A.C.S.<sup>3</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>4</sup>

Nematóides fitoparasitas causam grandes perdas na agricultura, mas o mecanismo celular e molecular que envolve a resistência de plantas a nematóides é pouco conhecido. Tem sido relatado o envolvimento de enzimas digestivas no processo de invasão no tecido do hospedeiro. A obtenção de genes que codificam inibidores específicos contra as proteases digestivas de nematóides e posterior expressão em plantas, consiste numa estratégia potencial para a produção de plantas resistentes. Assim, o trabalho tem como objetivo primário a expressão de uma proteinase cisteínica de *H. glycines* recentemente clonada. As proteinases digestivas são sintetizadas como pre-pro-proteínas. Tem sido demonstrado que as regiões pro atuam como inibidores específicos *in vitro* das enzimas correlatas. Desta forma, nosso objetivo secundário é o uso da região pro como inibidor específico de sua proteinase. Para a expressão desses genes, os fragmentos foram gerados por PCR com extremidades cegas e clonados em fusão com a tiorredoxina no vetor de expressão em bactérias pET 102 TOPO<sup>®</sup>. O vetor possui uma cauda de polihistidina na extremidade amino que possibilita a purificação em cromatografia por afinidade e revelação com anticorpos específicos. A linhagem utilizada para expressão foi BL21 Star<sup>™</sup>. As condições padrões de expressão foram estabelecidas: 37° C, agitação 200 rpm, indução em OD<sub>600</sub> 0,6 com 0,5 mM de IPTG. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes. A fração solúvel foi purificada em cromatografia por afinidade para detecção através de métodos imunológicos utilizando anticorpo primário contra cauda de histidina e anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Após a revelação, foi confirmada a expressão das proteínas recombinantes. É sabido que as proteinases cisteínicas são sintetizadas como pre-pro-proteínas e que suas regiões pro atuam como inibidores específicos até que as mesmas sejam secretadas. Além disso, tem sido relatado o envolvimento das regiões pro no dobramento e direcionamento das proteínas correlatas. Se a região pro for inibitória *in vitro* e tiver atividade específica, ela poderá ser utilizada como uma importante ferramenta biotecnológica no controle de nematóides. Além disso, o peptídeo codificado pela região pro poderá ser utilizado como modelo no estudo das interações com sua proteína.

<sup>1</sup> Química, doutoranda, UnB, CNPq.

<sup>2</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Farmacêutica/Bioquímica, D.Sc., UFRJ.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 024 - ESTUDOS PRELIMINARES PARA A LOCALIZAÇÃO DO GENE DA GRANULINA DE GRANULOVÍRUS DE *ERINNYIS ELLO* (EEGV) (Preliminary studies for the *Erinnyis ello* Granulovirus granulin gene localization)

Santos, R.F.<sup>1</sup>, Sihler, W.<sup>2</sup>, Rodrigues, J.C.M.<sup>2</sup>, Souza, M.L.<sup>3</sup>

O Granulovírus de *Erinnyis ello* (EeGV) vem sendo usado para o controle do mandarová da mandioca no Brasil desde a década de 80, sendo o terceiro maior programa utilizando vírus como agente de controle biológico no país. A granulina é a proteína principal do cristal viral, protegendo os vírions contra inativação no meio ambiente e sendo veículo de liberação dos mesmos no sítio primário de infecção. Apesar de seu uso como bioinseticida, quase nada é conhecido sobre sua biologia molecular. É convencional utilizar o gene da granulina como aquele inicial no mapeamento genômico de baculovírus. Isso torna importante sua localização no EeGV. Nesse trabalho visa-se amplificar o gene da granulina do EeGV por PCR, usando oligonucleotídeos desenhados a partir de regiões conservadas desse gene em outros Granulovírus, para posterior clonagem. Inicialmente, grânulos puros de EeGV foram obtidos através de ultracentrifugação em gradientes de sacarose de macerados de larvas naturalmente infectadas no campo (cedidas pelo Dr. Renato Pegoraro - Epagri, SC). As partículas virais foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão, confirmando a natureza e pureza da amostra. Em seguida o DNA viral foi purificado e clivado com a enzima de restrição *Xba*I. O perfil de restrição do DNA viral foi analisado em gel de agarose corado com brometo de etídio, observando-se 15 bandas. Após otimização das condições de PCR, uma banda de 800 pb foi obtida com os primers para a granulina. Uma vez clonado e sequenciado será possível confirmar a similaridade do fragmento amplificado com regiões conservadas da granulina de outros Granulovírus e realizar experimentos de hibridização do mesmo contra o perfil de restrição do EeGV. Isso fornecerá informações da localização desse gene e, a partir disso, poderá ser feita uma proposta de mapeamento do genoma do EeGV. Isso favorecerá sua caracterização em nível bioquímico e molecular a fim de criar estratégias cada vez mais seguras e eficientes para sua manipulação e aplicação.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, M. Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 025 - EXPRESSÃO DA REGIÃO PRO DE PROTEINASE CISTEÍNICA DE *ACANTHOSCELIDES OBTECTUS* (Expression of pro-region of cysteine-proteinase of *Acanthoscelides obtectus*)

Del-Sarto, R.P.<sup>1</sup>, Silva, F.B.<sup>2</sup>, Monteiro, A.C.S.<sup>3</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>4</sup>

O armazenamento de grãos é um processo importante para agricultura, mas grãos armazenados estão susceptíveis a diversas pragas que comprometem a sua comercialização. O bruquídeo *Acanthoscelides obtectus* é um dos causadores de perdas significativas nos grãos de feijão e diversas leguminosas. Estas pragas iniciam seu ataque com a oviposição no interior das vagens verdes. Ao nascer as larvas penetram no interior dos grãos, digerindo-o completamente. A larva transforma-se em pupa e o adulto, usando o aparelho bucal, recorta um pequeno orifício na casca, para emergir do grão. Uma estratégia para controlar essa praga é produção de plantas resistentes. *Acanthoscelides obtectus* utiliza uma proteinase cisteínica para seu processo de digestão na infestação dos grãos. Essa enzima é expressa como um zimogênio na forma de pre-pro-proteína. Estudos demonstram que a região pro age como inibidor da forma madura da enzima correlata. O objetivo deste trabalho foi expressar a região pro da proteinase cisteínica do *Acanthoscelides obtectus* em sistema procariótico e testar sua atividade inibitória *in vitro* contra a proteína específica. O fragmento nucleotídico foi gerado através de reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonado no vetor de expressão pQe40 utilizando os sítios de restrição *KpnI* e *HindIII*. Células bacterianas de *Escherichia coli* da linhagem BL 21 Star™ foram transformadas por choque térmico e analisadas. Para a expressão, um transformante foi inoculado em meio LB com ampicilina na concentração final de 100 mg/ml e crescida 37° C no agitador na velocidade de 200 rpm até OD<sub>600</sub> 0.6. A cultura foi induzida com IPTG na concentração final de 1 mM. Alíquotas de 1ml foram retiradas no tempo de 2, 4 e 24 horas. Um fragmento de 40 kDa foi visualizado em *SDS-PAGE* correspondente ao tamanho esperado para a proteína de fusão. Até o momento ensaios de purificação e detecção por métodos imunológicos estão sendo realizados. Sabendo-se que região pro age como inibidor da proteína correlata, a expressão e purificação desta região na forma ativa, possibilitará a realização de ensaios inibitórios *in vitro* determinando sua especificidade. Partindo desta premissa, a região pro poderá ser utilizada em dietas artificiais para determinar sua eficiência em inibir as proteinases digestivas do bruquídeo *Acanthoscelides obtectus*, possibilitando, desta forma, o controle da praga.

<sup>1</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Química, doutoranda, UnB, CNPq.

<sup>3</sup> Farmacêutica/Bioquímica, D.Sc., UFRJ.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 026 - EXPRESSÃO DO INIBIDOR DE SOJA BOWMAN-BIRK EM SISTEMA HETEROLÓGO DE *ESCHERICHIA COLI* (Expression of soybean Bowman-Birk Inhibitor in *E. coli* Heterologous system)

Lisboa, E.D.M.<sup>1</sup>, Batista, J.A.N.<sup>2</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>3</sup>

O bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*) é uma praga de grande importância econômica devido a sua rápida capacidade reprodutiva e de destruição de botões florais e maçã da planta de algodão, podendo ocasionar perdas de até 100% da produção. Inibidores de proteinases serínicas de plantas desempenham importante papel nos mecanismos de proteção contra parasitas e insetos. A manipulação dos inibidores de serino proteinases torna-se assim uma alternativa promissora para controle de pragas, incluindo o bicudo do algodoeiro. O BBI (*Bowman-Birk Inhibitor*) é um inibidor de tripsina e quimotripsina isolado das sementes de soja, caracterizado por apresentar baixa massa molecular (9 kDa) e elevado conteúdo de resíduos de cisteínas. O BBI apresenta grande similaridade de seqüência gênica com o BTCl (inibidor trípico e quimotríptico de feijão de corda) que, em bioensaios anteriores, apresentou alta taxa de mortalidade e retardamento do desenvolvimento larval do bicudo. Devido a esta alta identidade entre BBI e o BTCl, resolveu-se analisar o efeito do BBI sobre o bicudo. Para tal, o BBI foi subclonado em um vetor de expressão (pQE30) usando "primers" específicos. A proteína madura resultante do gene (BBI) foi expressa e analisada em SDS-Page 15% onde apresenta massa molecular de aproximadamente 10 kDa. Com o intuito de analisar a atividade deste inibidor recombinante sobre o *A. grandis*, a expressão e purificação da proteína estão sendo feitos. Sendo confirmada a atividade do BBI sobre o bicudo, o gene do inibidor de proteinase poderá ser usado para transformar plantas de algodão, visando o controle desta praga.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UniCEUB, Fundação Dalmo Giacometti.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## 027 - IDENTIFICAÇÃO DO GENE *DNAPOL* DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (Identification of an *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus *dnapol* gene)

Dalmolin, C.C.<sup>1</sup>, Santos, A.C.B.<sup>2</sup>, Ribeiro, Z.M.A.<sup>3</sup>, Castro, M.E.B.<sup>4</sup>

*Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) é um membro da família *Baculoviridae*, que devido ao seu potencial de infecção, especificidade e estabilidade em campo, é amplamente empregado no controle da lagarta da soja, *A. gemmatalis*. Assim como na maioria dos baculovírus, seu ciclo de replicação é bastante complexo e atualmente pouco se conhece sobre a estrutura e replicação do seu genoma. Dentre os elementos chave deste processo, a DNA polimerase tem papel essencial na determinação tanto em nível de replicação como de especificidade ao hospedeiro. Visando caracterizar o gene *dnapol*, responsável pela expressão dessa proteína, experimentos para sua localização física e sequenciamento estão sendo conduzidos. Para este fim, uma sonda heteróloga foi sintetizada através de amplificação por PCR, utilizando primers específicos para regiões conservadas do gene em AcMNPV. Posteriormente, o genoma de AgMNPV foi digerido com enzimas de restrição e os fragmentos gerados foram hibridizados com a sonda de AcMNPV por Southern Blot. O resultado obtido através desta técnica revelou alta homologia com o fragmento *HindIII*-Q de aproximadamente 2,5 Kb, o qual foi então amplificado e suas extremidades seqüenciadas para uma localização precisa do gene. A região de 1,4 Kb seqüenciada foi analisada usando o programa BLAST NCBI, blastx, revelando alta homologia com o gene *dnapol* de *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus e *Choristoneura fumiferana* nucleopolyhedrovirus. Os fragmentos da biblioteca genômica, AgMNPV/*HindIII*, S e R, além de outras regiões de sobreposição também estão sendo seqüenciados. Os estudos prosseguem para determinar a seqüência completa e análise transcricional do gene.

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **028 - INTRODUÇÃO DE POPULAÇÕES TRANSGÊNICAS NO PROGRAMA DE MELHORAMENTO GENÉTICO DE MAMOEIROS DA EMBRAPA (Introduction of transgenic populations in the papaya breeding program at Embrapa)**

Carmo, L.S.T. do<sup>1</sup>, Nickel, O.<sup>2</sup>, Gonsalves, D.<sup>3</sup>, Souza Jr., M.T.<sup>4</sup>

A mancha anelar é o principal problema fitossanitário do mamoeiro (*Carica papaya* L.) no Brasil. Esta doença é causada pelo *Papaya ringspot vírus* (PRSV), da família *Potyviriidae*, gênero *Potyvirus*. A Embrapa e a Cornell University iniciaram em 1992 cooperação objetivando a produção de mamoeiros transgênicos resistentes aos isolados brasileiros de PRSV. No primeiro semestre de 1999, 34 linhas transgênicas foram transferidas para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Em janeiro de 2000, com o consentimento da CTNBio e MAPA, foi instalado em Brasília o primeiro campo com mamoeiros transgênicos do Brasil. Finalmente, em abril de 2001, 13 populações R1 e R2 de mamoeiros transgênicos foram transferidas, na forma de sementes, do Cenargen para a Embrapa Mandioca e Fruticultura (CNPMPF). Estas populações foram produzidas a partir de plantas Ro, previamente caracterizadas para presença e expressão do gene de interesse e do gene marcador, formato de fruto, cor da polpa, e resposta ao desafio com o vírus. Com a introdução destes no programa de melhoramento genético de mamoeiro liderado pelo CNPMPF, inicia-se a última etapa no desenvolvimento de mamoeiros transgênicos, antes da solicitação de permissão para plantio e comercialização no Brasil. Nesta fase, serão priorizadas as análises agrônomicas e de biossegurança, com o intuito de se obter uma variedade transgênica de mamoeiro com amplo espectro de resistência aos isolados deste vírus no Brasil.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, Ph.D., Embrapa Uva e Vinhos.

<sup>3</sup> Biólogo, Ph.D., Cornell University.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 029 - INTRODUÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *LACK* DO ANTÍGENO DA LEISHMANIOSE EM ALFACE (*LACTUCA SATIVA*) (Introduction and expression of the *Lack* gene from *Leishmania* in lettuce (*Lactuca sativa*))

Bonfim, K.<sup>1</sup>, Lacorte, C.<sup>2</sup>, Aragão, F.J.L.<sup>3</sup>, Oliveira, S.C.<sup>4</sup>, Rech, E.L.<sup>5</sup>

As vacinas são essenciais nos programas para intervenção da saúde para os seres humanos e animais. Entretanto, em alguns casos sua larga aplicação é limitada por altos custos de fabricação e distribuição. As plantas apresentam grande potencial como sistemas de produção de proteínas recombinantes, principalmente devido a larga escala e ao baixo custo de produção. A proteína Lack (antígeno da leishmaniose) é capaz de provocar a formação do anticorpo contra a doença quando apresentada ao organismo. O objetivo deste trabalho é obter plantas transgênicas com o gene *lack*, potencialmente responsável pela imunização à leishmaniose; uma doença infecciosa, não contagiosa, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. Este gene foi introduzido em alface (*Lactuca sativa*) via *Agrobacterium tumefaciens*. Foram obtidas plantas de alface (*Lactuca sativa*) que possuem em seu genoma o gene (*lack*). Cotilédones foram co-cultivados com a linhagem EHA 105 transformada com o vetor pCAMBIA 1390 onde foi introduzido o gene *lack* sob o controle do promotor UBQ3. Plantas de alface foram selecionadas em 10 mg/L higromicina e posteriormente analisadas por PCR utilizando “primers” específicos. Experimentos de Southern Blot confirmaram a integração do gene no genoma da planta. Testes de ELISA e Western Blot (PAGE) estão sendo realizados para detecção e quantificação dos níveis de expressão do antígeno. Estas plantas têm como propósito permitir a inoculação pela ingestão direta e indução da resposta imune oral, sem a necessidade do envolvimento de métodos complexos de purificação e processamento. Este trabalho poderá contribuir para a eliminação de doenças por meio de plantas-vacina, o que ajudará consideravelmente os países em desenvolvimento.

---

<sup>1</sup> Biólogo, mestrando, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Ph.D., Universidade Federal de Minas Gerais.

<sup>5</sup> Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### 030 - OBTENÇÃO DE POPULAÇÕES SEGREGANTES DE ACESSOS SELVAGENS DE AMENDOIM PARA A PROSPECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A FUNGOS E NEMATÓIDES (The production of segregating populations of wild peanut for prospection of resistance genes against fungi and nematodes)

Costa, G.R.T.<sup>1</sup>, Dias, J.G.O.<sup>2</sup>, Valls, J.F.M.<sup>3</sup>, Leal-Bertioli, S.C.M.<sup>4</sup>, Bertioli, D.J.<sup>5</sup>, Guimarães, P.M.<sup>6</sup>

A espécie cultivada de amendoim *Arachis hypogaea*, e seus parentes silvestres, têm, como centro de origem, a América do Sul, e em especial, o Brasil. Espécies silvestres são uma fonte valiosa de caracteres potencialmente úteis e passíveis de transferência para seu parente cultivado. Alguns genes de resistência a patógenos já foram transferidos para plantas cultivadas a partir de parentes silvestres através do melhoramento tradicional. Entretanto, as barreiras de compatibilidade sexual impedem a transferência de genes de interesse entre espécies distantes. Neste contexto, a biotecnologia se apresenta como uma alternativa viável, uma vez que genes de interesse tenham sido isolados. Para o isolamento de genes de interesse, é necessário o conhecimento básico do genoma da espécie, e para tal, mapas genéticos são de grande valia. Neste trabalho, foi produzida uma população segregante de parentes silvestres de amendoim *A. stenosperma* e *A. duranensis*. Estes dois acessos se mostraram contrastantes para resistência e susceptibilidade aos fungos de mancha foliar: *Cercospora arachidis*, *Cercosporidium personatum* e aos nematóides das galhas: *Meloidogyne arenaria* raça 2 e *M. javanica* raça *pintoi*. Híbridos foram produzidos em casa de vegetação e multiplicados através de estaquia. Plantas foram obtidas e autopolinizadas. Das duas principais plantas híbridas, um total de 2143 sementes foram obtidas. Estas sementes estão agora sendo germinadas para realização de bioensaios com os mesmos patógenos, para se verificar a segregação das resistências. Marcadores moleculares baseados em regiões análogas a genes de resistência (RGAs) estão sendo desenvolvidos e serão utilizados em um mapa, juntamente com marcadores SSR, RAPD e AFLP. A segregação de marcadores com resistências permitirá a localização de genes de resistência.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Prestadora de serviços, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Biólogo, Ph.D., Universidade Católica de Brasília.

<sup>6</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### 031 - TRANSFERIBILIDADE DE MARCADORES MICROSSATÉLITES ENTRE ESPÉCIES DE *ARACHIS* (Transferability of microsatellite markers between *Arachis* species)

Welzel, A.<sup>1</sup>, Ramiro, C.A.<sup>2</sup>, Moretzsohn, M.C.<sup>3</sup>, Bertoli, D.J.<sup>4</sup>

A família Leguminosae engloba diversas espécies de grande interesse econômico. Um dos destaques é o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), sendo o legume mais difundido no mundo, contribuindo para a nutrição humana. O gênero *Arachis* contém aproximadamente 70 espécies, das quais em torno de seis são cultivadas, sendo *A. hypogaea* a de maior importância econômica. Algumas espécies silvestres de *Arachis* têm-se mostrado resistentes a pragas e doenças, podendo ser utilizadas para introgressão de genes de resistência em variedades cultivadas, através de melhoramento tradicional. Embora o melhoramento tradicional tenha obtido sucesso, em muitos casos é limitado pela complexidade no processo de cruzamentos e seleção. Estes processos são facilitados com o uso de marcadores moleculares e mapas genéticos ("marker assisted selection"). Microssatélites ou SSR (Seqüências Simples Repetidas) constitui uma das técnicas mais indicadas, por serem codominantes, multialélicos e abundantes na maioria dos genomas de eucariotos. Os SSR Possuem seqüências pequenas de nucleotídeos, repetidas em tandem, amplificados através de PCR com a utilização de um par de "primers" específicos complementares às seqüências únicas que flanqueiam a região repetida. O objetivo deste trabalho foi estudar a transferibilidade e o polimorfismo em espécies silvestres de marcadores microssatélites desenvolvidos para *A. hypogaea*, visando a construção de um mapa de ligação para *Arachis*. Foram incluídos acessos de *A. duranensis* e *A. stenosperma*, que serão utilizados como plantas parentais da população de mapeamento. Um total de 53 pares de "primers" microssatélites foi analisado. Destes, 43 pares de "primers" amplificaram nas duas espécies (75%), mas 22 mostraram-se polimórficos para *A. duranensis* e *A. stenosperma*. A transferibilidade de marcadores SSR entre espécies aparentadas é consequência da homologia das regiões que flanqueiam os microssatélites. A possibilidade de usar os mesmos marcadores SSR em mais de uma espécie reduzirá grandemente o custo e o tempo necessário para realização das análises. Novos "primers" estão sendo testados visando a construção de um mapa de ligação para *Arachis*.

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biólogo, Ph.D., Universidade Católica de Brasília.

## 032 - TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE CALOS EMBRIOGÊNICOS DE *COFFEA ARABICA* VIA BIOBALÍSTICA E SELEÇÃO EM CANAMICINA (Genetic transformation of *Coffea arabica* through bombardment of embryogenic calli and selection with kanamycin)

Cunha, W.G.<sup>1</sup>, Barros, E.V.S.A.<sup>2</sup>

A transformação genética surge como uma importante ferramenta para o melhoramento genético do *Coffea arabica*, uma vez que esta permite o aumento do *pool* gênico bem como a redução do tempo de introdução de características desejáveis em genótipos-elite. Entretanto os últimos resultados de transformação de *C. arabica*, visando a melhoria da qualidade do produto e resistência a pragas e doenças, precisam ser incrementados devido a inexistência de um protocolo eficiente de transformação. Desta forma, torna-se interessante o estudo da transformação de *C. arabica* através do processo biobalístico como processo alternativo aos recentemente descritos. No presente trabalho foram utilizados calos embriogênicos derivados de segmentos foliares de *C. arabica* variedade Catuai Vermelho, cultivados em meio C modificado. Após uma semana de cultivo sobre papel de filtro em meio C modificado, os calos foram submetidos a pressão osmótica em meio contendo manitol 0,5M e então bombardeados. O vetor utilizado foi o PBI426 contendo o gene *gus*, que codifica para a enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS), e o gene *nptII*, que confere resistência à canamicina. Os calos bombardeados foram transferidos para o meio C modificado depois de 24 horas, onde permaneceram durante 1 semana. Transcorrido este período, os explantes foram subcultivados a cada 7 dias em meio C modificado acrescido de canamicina 200, 300 e 400 mg/L, sucessivamente. O teste histoquímico dos calos embriogênicos regenerantes em meio seletivo revelou a atividade da enzima GUS, indicando assim que a técnica utilizada é viável para a transformação de calos embriogênicos. Com base nestes resultados, novos experimentos estão sendo realizados a fim de otimizar o processo de transformação de calos embriogênicos de *C. arabica* via biobalística.

Apoio financeiro: Embrapa e PNP&D-Café.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduado, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### 033 - UM NOVO INIBIDOR DE $\alpha$ -AMILASE DE SEMENTES *PHASEOLUS VULGARIS* COM ATIVIDADE QUITINOLÍTICA (A novel $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* seeds with chitinolytic activity)

Dayler, C.D.A.<sup>1</sup>, Mendes, P.A.<sup>2</sup>, Franco, O.L.<sup>3</sup>, Bloch Jr., C.<sup>4</sup>, Prates, M.V.<sup>5</sup>, Silva, P.R.Q.<sup>6</sup>, Lima, L.H.C.<sup>7</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>8</sup>

As plantas tem co-evoluído, apresentando um certo grau de resistência a insetos através da produção de compostos de defesa, como os inibidores de  $\alpha$ -amilase. Esses inibidores podem impedir a digestão do amido através de sua atividade sobre as amilases digestivas presentes no intestino do inseto, causando uma redução no desenvolvimento larval e um aumento na mortalidade. Por essas razões inibidores de  $\alpha$ -amilases são fortes candidatos para o controle de pragas de grãos armazenados, pois estas pragas são dependentes de amido para a produção de energia. Dois inibidores diferentes ( $\alpha$ -AI1 e  $\alpha$ -AI2), foram previamente purificados de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), mostrando alta atividade inibitória contra as enzimas de importantes pragas de sementes armazenadas. Este trabalho descreve a purificação de um novo inibidor de  $\alpha$ -amilase de sementes de *P. vulgaris* cv. Arc-4 (PvAIC) pelo uso de HPLC de fase - reversa (Vydac C-18TP). Análises de atividade inibitória mostraram que este novo inibidor protéico foi capaz de inibir eficientemente as  $\alpha$ -amilases do intestino médio do bruquídeo de feijão *Zabrotes subfasciatus*, como previamente observado com o  $\alpha$ -AI2. O PvAIC apresentou um monômero de massa molecular de 30.666 Da, quando analisado em SDS-PAGE e MALDI-TOF. Na seqüência de N-terminal, obtida por degradação de Edman, observou-se uma identidade de 65% com quitinase de sementes de feijão e alta identidade com quitinases de outras plantas. O PvAIC puro demonstrou alta capacidade de hidrolisar quitina, um polímero  $\beta$ -1,4 N-acetil-D-glucosamina, mostrando em uma mesma molécula uma dupla função (inibidor de  $\alpha$ -amilase e atividade quitinolítica). Esta dupla função indica que esse fator poderá ser importante na produção de sementes resistentes contra *Zabrotes subfasciatus*.

Apoio financeiro: CNPq, Embrapa e CAPES.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., graduando, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biólogo., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biólogo., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Biólogo., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>7</sup> Bióloga., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>8</sup> Bióloga., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 034 - USO DE CHAGASINA, UM INIBIDOR DE CISTEÍNO-PROTEINASE DE *TRYPANOSOMA CRUZI*, NA PRODUÇÃO DE FEIJÃO RESISTENTE A CARUNCHO (The use of Chagasin, a *Trypanosoma cruzi* inhibitor of cysteine proteinases to produce insect-resistant transgenic bean)

Paes, N.S.<sup>1</sup>, Lima, J.N.<sup>2</sup>, Osório, R.<sup>3</sup>, Monteiro, A.C.S.<sup>4</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>5</sup>

O feijão representa uma importante fonte de proteína para a maioria da população brasileira. Entretanto, as perdas ocasionadas pelo ataque de insetos durante o armazenamento podem chegar a 20% da produção. A utilização de plantas transgênicas resistentes tem se tornado uma importante forma alternativa para o controle de patógenos e insetos-praga. Desse modo, grande ênfase tem sido dada à prospecção de genes que conferem resistência natural às plantas e sua possível transferência para espécies ou variedades cultivadas. O método biobalístico mostrou ser o mais viável para a transformação de *Phaseolus vulgaris*. Ultimamente, evidências mostraram que as plantas, embora não possuam um sistema imunológico verdadeiro, são capazes de acumular, em estruturas celulares especializadas, uma série de proteínas com função de defesa. Dentre as mais conhecidas estão as lectinas, inibidores de proteases e inibidores de amilases de insetos. A chagasina constitui um novo inibidor de proteinase isolado de *T.cruzi*, ativo contra as proteinases cisteínicas de diferentes espécies de insetos, incluindo o caruncho do feijão *Acanthoscelides obtectus*. Até o momento nenhum fator de resistência a este bruquídeo foi transferido para *Phaseolus vulgaris*. Este trabalho visa a introdução do gene codificante da chagasina em *P. vulgaris* via biobalística. A região codificante da chagasina foi amplificada por RT-PCR usando o "primer" SPINH, correspondente à seqüência peptídeo sinal do inibidor de  $\alpha$ -amilase-2 ( $\alpha$ -ai2) de *P.vulgaris* e a extremidade 5' da chagasina, e um segundo "primer" CHACT, correspondente à extremidade 3' codificante da chagasina. Nesta construção foi utilizado o promotor semente-específico da fitohemaglutinina (PHA) de *P. vulgaris*. Tal inserto foi subclonado no vetor de expressão em planta pUC bar, que permite a seleção de plantas tolerantes a herbicida.

---

<sup>1</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Farmacêutica, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## CARACTERIZAÇÃO

### 035 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE *DALBERGIA NIGRA* (JACARANDÁ-DA-BAHIA) UTILIZANDO RAPD (Genetic variability analysis of *Dalbergia nigra* (Jacaranda-da-Bahia) populations based on RAPD molecular markers)

Olegário, R.M.B.N.<sup>1</sup>, Silva, V.P.<sup>2</sup>, Machado, F.R.B.<sup>3</sup>, Azevedo, V.C.R.<sup>4</sup>, Ciampi, A.Y.<sup>5</sup>

O Jacarandá-da-Bahia, pertencente a família Fabaceae, possui importância econômica devido às suas propriedades madeireiras. Utilizado em larga escala, principalmente para revestimento de móveis fundo de violões e acabamentos internos em construção civil, sua constante exploração em florestas tropicais tem contribuído para a redução dos recursos naturais. O projeto visa a manutenção da maior variabilidade genética possível, uma vez que, perdas desta variabilidade podem resultar em uma flexibilidade evolutiva reduzida e em uma diminuição do valor adaptativo e visa também a geração de subsídios aos programas de coleta e conservação *ex situ* e *in situ*. Para esta análise foi utilizada a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), um marcador molecular dominante, ideal para determinação de sistemas de cruzamento, variabilidade entre e dentro populações. Foram coletadas na Mata Atlântica, amostras de caules e folhas de indivíduos de duas populações de *Dalbergia nigra*. Numa análise prévia foram comparados 16 amostras da população 1 em Marliéria-MG e 4 da população 2 em Dionísio-MG. Os DNAs de caules e folhas adultas foram extraídos utilizando protocolo CTAB 2% e, posteriormente, foram purificados com Cloreto de Sódio (NaCl) em alta concentração e submetidos a reações RAPDs. Da seleção de 39 primers, foram escolhidos 25 primers com maior número de bandas polimórficas. Foram obtidos 183 marcadores RAPD polimórficos, os quais foram analisados pelo programa NTSYS, utilizando o coeficiente DICE pelo método de agrupamento UPGMA. Ambas as populações ainda se encontram em fase de análise e os resultados das duas populações serão quantificadas quanto à variabilidade entre e dentro de populações utilizando-se Análise de Variância Molecular (AMOVA).

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCeub, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 036 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ACESSOS DO BANCO DE GERMOPLASMA DE PIMENTAS E PIMENTÕES (*CAPSICUM SPP.*) (Genetic variability analyses and molecular characterization of Pepper (*Capsicum spp.*) accessions of Germplasm Bank)

Lins, T.C.L.<sup>1</sup>, Tavares, H.M.F.<sup>2</sup>, Lourenço, R.T.<sup>3</sup>, Reifschneider, F.J.B.<sup>4</sup>, Buso, G.S.C.<sup>5</sup>, Ferreira, M.E.<sup>6</sup>

Pimentas e pimentões (*Capsicum spp.*) representam importante segmento do mercado de hortaliças para tempero e consumo *in natura* no Brasil e no mundo. O cultivo brasileiro é extenso e demanda novas variedades mais produtivas, bem como diferentes tamanhos, cores, sabores e pungências de frutos. O programa de melhoramento visa atender a essas demandas utilizando dados de variabilidade genética obtidos em estudos de caracterização morfológica, agrônômica, genética e molecular de acessos mantidos em bancos de germoplasma. O trabalho teve como objetivo a caracterização molecular de variedades cultivadas conservadas no Banco de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Hortaliças. O germoplasma analisado incluiu 521 acessos de pimenta separados em quatro espécies: *C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. frutescens* e *C. chinense*. O DNA do material foi amplificado por PCR em reações RAPD utilizando 21 primers previamente selecionados. Centenas de fragmentos polimórficos foram identificados, mas somente 103 foram selecionados. O dendrograma gerado possibilitou visualizar o germoplasma em conjuntos de acessos agrupados de acordo com cada espécie estudada. O grupo de *C. baccatum* var. *pendulum* foi o que mais se distanciou das outras espécies, com o coeficiente de similaridade médio (Jaccard) estimado em 0,34 e ampla variabilidade genética entre os acessos. Os acessos agrupados como *C. frutescens* apresentaram baixa similaridade genética média com os demais grupos (0,40). Entretanto a variabilidade genética dentro do grupo é extensa, com coeficientes de similaridade variando de 0,44 e 0,86. Os acessos de *C. chinense* também apresentaram grande variabilidade (0,46). O grupo de *C. annuum* var. *annuum*, espécie intensamente domesticada, apresentou formação de vários subgrupos revelando uma base genética estreita, com coeficientes acima de 0,70. Esta alta similaridade sugere que fontes comuns de resistência ou de genes de interesse econômico foram utilizadas no desenvolvimento de variedades comerciais deste grupo. A disponibilidade destes dados facilita o uso do germoplasma em programas de conservação e de melhoramento genético para o desenvolvimento de genótipos de interesse do agronegócio brasileiro.

<sup>1</sup> Química, graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., B.Sc., Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Hortaliças.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia.

### 037 - ANÁLISE GENÉTICA DE NOVAS ESPÉCIES DE *CAPSICUM* E SUA RELAÇÃO COM ESPÉCIES CULTIVADAS DO GÊNERO, ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES (Genetic analysis through molecular markers of *Capsicum* new species and their relationship with cultivated species of the genus)

Lopes, F.F.R.<sup>1</sup>, Kratka, P.C.<sup>2</sup>, Bianchetti, L.<sup>3</sup>, Ferreira, M.E.<sup>4</sup>, Amaral, Z.P.<sup>5</sup>, Buso, G.S.C.<sup>6</sup>

O gênero *Capsicum* é composto de 20-25 espécies das quais cinco são domesticadas: *C. annum*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, e *C. pubescens*. Em todo o continente americano estão distribuídas populações silvestres de *Capsicum*, todavia, há pouco conhecimento sobre as espécies brasileiras. Para se fazer uma utilização eficiente dos recursos genéticos é necessário o conhecimento da extensão e distribuição da variabilidade genética das espécies domesticadas e seus parentes silvestres. Noventa e seis acessos foram selecionados. Na análise, foram utilizadas quatro espécies diferentes como grupo externo: *Atropa belladonna*, *Lycopersicon esculentum*, *Physalis* sp e *Nicotina tabaccum*. Foram utilizados 126 marcadores RAPD para a análise de similaridade genética entre os indivíduos. A análise aglomerativa hierárquica pelo método UPGMA tornou possível a observação de grupos de acessos correspondentes às espécies domesticadas, semi-domesticadas e silvestres. Os agrupamentos de *C. frutescens* e *C. chinense* se aproximaram mais do grupo de *C. annum* do que os acessos de *C. baccatum*. As espécies silvestres formaram um grupo de baixa similaridade com as espécies domesticadas. Três acessos coletados na região Amazônica ainda não classificados ficaram mais próximos do grupo *C. chinense*. As espécies *C. flexuosum*, *C. chacoense* e *C. parvifolium* agruparam-se proximamente e são as espécies silvestres mais próximas do grupo das espécies domesticadas e semi-domesticadas. O grupo das espécies recém-coletadas na Mata Atlântica ficou próximo ao das espécies silvestres já descritas, *C. dusenii*, *C. vilosum*, *C. buforum* e *C. campylopodium*.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduando, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Téc. Laboratório, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### **038 - ANÁLISE GENÉTICA DE *TABEBUIA IMPETIGINOSA* UTILIZANDO MARCADORES RAPD (Genetic analysis of *Tabebuia impetiginosa* based on RAPD markers)**

Azevedo, V.C.R.<sup>1</sup>, Silva, V.P.<sup>2</sup>, Machado, F.R.B.<sup>3</sup>, Olegário, R.M.<sup>4</sup>, Ciampi, A.Y.<sup>5</sup>

Estudos de análise genômica têm sido feitos para espécies arbóreas nativas como o Ipê, com a finalidade de avaliar a variabilidade genética entre e dentro das populações naturais, com vistas a fornecer subsídios aos programas de conservação. A *Tabebuia impetiginosa*, Bignoniaceae (Ipê-roxo) ocorre desde estados do Nordeste como o Piauí e Ceará, até o Sudeste e o Sul, tanto na mata pluvial atlântica como na floresta semidecídua e ocasionalmente no cerrado e na caatinga. Apesar dessa grande distribuição, essa espécie está ameaçada de extinção principalmente devido ao uso indiscriminado como planta medicinal. Além disso, é de grande importância econômica, podendo ser usada na construção e no paisagismo em geral. Sua importância ecológica está ligada principalmente ao fato de ser uma espécie usada para compor reflorestamento. Um dos métodos de análise genética muito utilizado consiste na utilização de marcadores moleculares RAPD de amplificação ao acaso, que utiliza primers curtos e de seqüência arbitrária. Estes são marcadores dominantes e o polimorfismo se apresenta de forma binária, ou seja, pela presença ou ausência da banda. Baseado nisso, nossos estudos consistem numa análise genética de 6 (seis) populações de Ipê-roxo, das Florestas Estacionais Decíduas da Região do Vale do Paranã, GO, totalizando 164 indivíduos. Da seleção de 100 primers, foram escolhidos 25 primers com maior número de bandas polimórficas. Com as amplificações com 18 primers RAPD foram obtidos 50 marcadores RAPD polimórficos, os quais foram analisados pelo programa NTSYS, utilizando o coeficiente DICE pelo método de agrupamento UPGMA. Nessa análise, verificou-se uma similaridade de 60% e não foi evidenciado nenhum agrupamento consistente separando as populações mais perturbadas. A análise com mais 40 marcadores polimórficos está sendo realizada para quantificar a variabilidade genética entre e dentro de populações de Ipê das Florestas Estacionais Decíduas da Região do Vale do Paranã, GO.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biologia, graduanda, UniCeub, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

### 039 - ANÁLISE GENÉTICA POPULACIONAL DE *CEDRELA FISSILIS* - CEDRO (MELIACEAE) UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES (Population genetic analysis of *Cedrela fissilis* - Cedro (Meliaceae) based on microsatellites markers)

Machado, F.R.<sup>1</sup>, Gaiotto, F.A.<sup>2</sup>, Silva, V.P.<sup>3</sup>, Almeida, T.N.S.<sup>4</sup>, Ciampi, A.Y.<sup>5</sup>

A criação de unidades de conservação de uso indireto no Brasil, iniciada com o Parque Nacional do Itatiaia, em 1937, visam a proteção da diversidade biológica do país. Todavia, tem-se procurado identificar áreas prioritárias para a conservação, principalmente nos biomas mais ameaçados, entre eles a Mata Seca, com base na evolução dos conhecimentos técnicos. Uma das áreas prioritárias escolhidas para estudo foram as Florestas Estacionais Decíduas da Região do Vale do Paranã (GO), com diferentes áreas de perturbação. Nessa região, foi escolhida para análise genética a espécie *Cedrela fissilis* - cedro (Família Meliaceae), planta característica das florestas semidecíduas e pluvial Atlântica, na qual apresenta madeira largamente empregada em compensados, esquadrias, móveis em geral e paisagismo de parques e grandes jardins. Visando avaliar a estrutura genética das populações, foram coletados indivíduos de cinco populações dentre áreas perturbadas e intactas: Fazenda Flor da Ermo Perturbada - 30 indivíduos; Fazenda Olhos d'Água (intacta) - 30 indivíduos; Fazenda São Domingos (intacta) - 30 indivíduos; Fazenda São Domingos Perturbada - 17 indivíduos; Fazenda Traçadal Intacta - 30 indivíduos. A fazenda que apresentou menos número de indivíduos é devido ao fato da grande perturbação nessa área. Foram coletadas amostras de caule das quais os DNAs foram extraídos de acordo com o protocolo CTAB 2% e submetidos à análise genética por marcadores moleculares codominantes microssatélites (SSR) desenvolvidos para cedro na Embrapa Cenargen. A detecção de polimorfismo nos 4 (quatro) locos analisados foi feita através do gel desnaturante de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata. Utilizando-se o programa GDA (Genetic Data Analysis versão 1.0), obtivemos alelos polimórficos de 7,5 a 10, estimativa de Heterozigosidade Esperada (He) variando de 0,79 a 0,86 e Heterozigosidade Obtida (Ho) de 0,46 a 0,65. A diferenciação entre populações foi de 0,042 e o índice de fixação foi de zero, 343, ambas significativas (CI 95%). Estes dados retratam a possível perturbação das populações verificadas pelo alto índice de endogamia.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., ESALQ/USP.

<sup>3</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **040 - AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE MELÃO (*CUCUMIS MELO*) INTRODUZIDOS EM COLEÇÃO DE GERMOPLASMA UTILIZANDO MARCADORES RAPD (Genetic variability assessment of melon (*Cucumis melo*) accessions introduced in germoplasm collection, using RAPD markers)**

Tavares, H.M.F.<sup>1</sup>, Lins, T.C.L.<sup>2</sup>, Buso, J.A.<sup>3</sup>, Buso, G.S.C.<sup>4</sup>

Grande parte da produção de melão brasileira é exportada. Há a preocupação dentre os exportadores, com possíveis perdas de mercado devido à baixa qualidade dos frutos, principalmente ao insatisfatório teor de açúcares, expresso como teor de sólidos solúveis presente no fruto no momento da comercialização nos países importadores. Uma das formas de aumentar a competitividade do produto brasileiro no mercado internacional e incrementar o consumo interno desta fruta é através do melhoramento genético, com a obtenção de frutos de melhor qualidade. Desta forma, foram selecionados 65 acessos de melão (*Cucumis melo*) da coleção de germoplasma da Embrapa Hortaliças, sendo que aproximadamente 50% representam acessos de introdução recente, e tiveram seu DNA extraído pelo método CTAB. Para gerar conhecimento sobre a variabilidade genética, os acessos foram comparados por meio do "fingerprint" de DNA, obtido com marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA). Esta técnica permitiu a identificação de 62 marcadores moleculares polimórficos, possibilitando a construção de um dendrograma, mostrando graficamente a variabilidade entre os acessos da coleção. A análise destas informações permitiu verificar que vários acessos, alguns de introdução recente, apresentam alta dissimilaridade genética, por exemplo, os acessos 0.79, 0.24 e 0.90, 0.16. Dentre os 22 acessos introduzidos da Hungria, 23% apresentam dissimilaridade maior ou igual a 20%. Entre os acessos do tipo Valenciano ou Amarelo também foram identificados acessos bastante divergentes. Já entre os acessos do tipo melão Caipira, coletados na região de Pelotas, a maior parte se agrupou proximamente, mostrando baixa variabilidade. Outro aspecto interessante é a presença de agrupamentos próximos entre acessos de regiões bastante distintas, indicando uma estreita base genética entre eles. Estas informações podem ser importantes na orientação de novos cruzamentos visando o enriquecimento da variabilidade genética, importante no processo e obtenção de frutos com melhores características.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Química, graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Hortaliças.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 041 - AVALIAÇÃO DE DOMINÂNCIA E SEGREGAÇÃO DE CARACTERES MORFOLÓGICOS EM UM HÍBRIDO INTERSECCIONAL FÉRTIL DO GÊNERO *ARACHIS* (LEGUMINOSAE) (Evaluation of dominance and segregation of morphological traits in a fertile interseccional hybrid of the genus *Arachis* (Leguminosae))

Rodrigues, L.S.<sup>1</sup>, Valls, J.F.M.<sup>2</sup>

O gênero *Arachis* é subdividido em nove seções taxonômicas. Além de características morfológicas, a compatibilidade em cruzamentos e a viabilidade do pólen de híbridos interseccionais orientam a distribuição das espécies pelas seções. Conforme a literatura, híbridos interseccionais são estéreis. Desde 1997, vem sendo realizado um programa de hibridações interespecíficas, no Banco Ativo de Germoplasma de *Arachis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, incluindo a hibridação entre *A. paraguariensis* (acesso V 7677), da seção *Erectoides*, e *A. pflugeae*, nova espécie (V 13589), da seção *Procumbentes*. A eficiência neste cruzamento foi de 34,21%, resultando em 14 indivíduos  $F_1$ . A viabilidade de pólen desses híbridos variou de 10 a 68% e foram produzidas sementes  $F_2$  de quase todos os indivíduos  $F_1$ , documentando a primeira hibridação interseccional fértil no gênero. Neste trabalho, analisou-se alguns caracteres morfológicos dos dois progenitores, de 13 híbridos  $F_1$  e de 87 indivíduos da população  $F_2$ , na busca de informações quanto à dominância e quanto à segregação. Analisou-se a presença de antocianina no cálice e no hipanto, a cor do cálice e das asas, a relação comprimento/largura de folíolo e a presença de pêlos na folha. Observou-se, em  $F_1$ , a dominância de presença de antocianina no cálice e no hipanto e da presença de pêlos na folha, com segregação destas características na proporção de 3:1 em  $F_2$ . A cor do estandarte em  $F_1$  foi intermediária à dos progenitores e houve segregação acima de 15:1 em  $F_2$ , sugerindo a influência de mais de um gene para a determinação deste caráter. A relação comprimento/largura do folíolo mostrou-se próxima à média (4,50) dos progenitores, variando de 3,96 a 5,64 em  $F_1$  e de 3,44 a 8,60 em  $F_2$ . Alguns indivíduos mostraram comprimento/largura do folíolo acima dos valores do progenitor de maior relação (*A. pflugeae*). Novas hibridações testarão a possibilidade de transferência interseccional de caracteres ainda mais ampla, em *Arachis*, pela utilização das espécies citadas como pontes, em cruzamentos com mais espécies das seções citadas e com espécies da seção *Arachis*, em que se situa o amendoim.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., doutoranda, UNESP/Botucatu, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 042 - AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA A FITONEMATÓIDES E A FUNGOS EM DIVERSAS ESPÉCIES DE *ARACHIS* SILVESTRES (Analysis of resistances of plant parasitic nematodes to several species of wild *Arachis*)

Proite, K.<sup>1</sup>, Dias, J.G.O.<sup>2</sup>, Guimarães, P.M.<sup>3</sup>, Bertoli, D.J.<sup>4</sup>, Carneiro, R.G.<sup>3</sup>, Valls, J.F.M.<sup>3</sup>, Leal-Bertoli, S.C.M.<sup>5</sup>

O amendoim cultivado, *Arachis hypogaea* L., é uma leguminosa amplamente cultivada no Brasil e no mundo para a obtenção de óleo e proteína. Apesar de haver uma grande diversidade morfológica entre suas variedades, a diversidade genética é restrita. Por isso tem sido despertado grande interesse pela prospecção, resgate e caracterização de germoplasma das espécies silvestres de *Arachis*. Nestas espécies, residem genes de resistência a doenças e pragas que podem ser utilizados em programas de melhoramento do amendoim. Entre as doenças foliares mais importantes do amendoim cultivado estão as causadas pelos fungos *Cercospora arachidicola* e *Cercosporidium personatum*, que provocam lesões e posterior desfolia. *Meloidogyne arenaria* raça 2 e *Meloidogyne javanica* são patógenos economicamente importantes para várias culturas. No intuito de avaliar resistências em diversas espécies silvestres de *Arachis* aos fitonematóides *M. arenaria* (raça 2) e *M. javanica* (raça desconhecida isolada de *A. pintoii*) e de testar e confirmar a resistência e a susceptibilidade de *A. stenosperma* (V10309) e *A. duranensis* (K7988), foram efetuados bioensaios. Para os bioensaios com os nematóides, foram inoculados 6.000 ovos e J<sub>2</sub> e foram feitos bioensaios de folha de destacada com dois isolados dos fungos *C. arachidicola* (11576-1) e *C. personatum* (11576). Apenas *A. duranensis*, entre outras 17 espécies de *Arachis*, demonstrou uma susceptibilidade moderada aos dois nematóides, os demais mostraram resistência. A susceptibilidade de *A. duranensis* e a resistência de *A. stenosperma* se confirmaram aos isolados de fungo. É interessante ressaltar que estes dois acessos de *Arachis* têm mostrado respostas semelhantes em todos patógenos testados. A literatura mostra que genes envolvidos em resistências encontram-se ligados geneticamente e até o momento isto parece se confirmar nas avaliações. Estes acessos foram cruzados e a geração de uma F<sub>2</sub> servirá para estudos de segregação dos genes de resistência. E juntamente com o isolamento de genes análogos de resistência e de microssatélites proporcionará a criação de marcadores moleculares que facilitarão no mapeamento genético.

<sup>1</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Prestadora de serviços, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Botânico, Ph.D., Universidade Católica de Brasília.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## 043 - CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *ARACHIS* (LEGUMINOSAE) (Cytogenetic characterization of brazilian *Arachis* species (Leguminosae))

Lima, J. A G<sup>1</sup>.; Peñaloza, A. P. S.<sup>2</sup>; Valls, J. F. M.<sup>3</sup>, Santos, S.<sup>4</sup>

O gênero *Arachis*, nativo da América do Sul, possui 81 espécies, incluindo diplóides com  $2n=18$  e 20 cromossomos e tetraplóides com  $2n=40$ . Suas espécies foram classificadas em nove diferentes seções taxonômicas, com base em características morfológicas, na compatibilidade para cruzamentos interespecíficos e na viabilidade de pólen desses híbridos. A morfologia cromossômica das espécies de *Arachis* também contribuiu para tal classificação taxonômica. Desde então, novos acessos foram coletados e o novo número cromossômico,  $2n=18$ , foi encontrado em 4 espécies do gênero. Entre estas, *A. decora*, *A. palustris* e *A. praecox* pertencem à seção *Arachis*, a mesma do amendoim, e despertaram grande interesse por sua precocidade. São espécies muito semelhantes no aspecto morfológico, fato que se acentuou com a obtenção de novos acessos, pondo em dúvida sua circunscrição. Neste estudo realizou-se a contagem cromossômica de oito novos acessos de *A. decora* e de um novo acesso de *A. praecox*, e aplicou-se o fluorocromo DAPI (4'-6'-diamidino-2-phenylindole), com afinidade para regiões ricas em bases AT, em um dos acessos de *A. praecox*, um de *A. palustris*, e em dois de *A. decora*, na tentativa inicial de encontrar bandas cromossômicas específicas. As raízes foram pré-tratadas em 8-hidroxiquinoleína 0,002 N e fixadas em solução Carnoy. Para a determinação do número cromossômico, logo após a fixação, realizou-se a hidrólise em HCl 5N, por 20 minutos, seguida de coloração com Schiff, por 1 hora, ambas à temperatura ambiente. Os meristemas radiculares foram macerados na lâmina, com carmim acético 2%. Para a aplicação de DAPI 2ig/ml, logo após a fixação, as raízes passaram por digestão enzimática e os meristemas foram macerados em ácido acético 45%. Após envelhecimento por três dias, aplicou-se o DAPI às lâminas. Todos os acessos analisados apresentaram  $2n=18$ . A marcação revelou a presença de regiões DAPI positivas em oito dos nove pares cromossômicos de *A. praecox* V 14682, de *A. palustris* V 13023 e de *A. decora* V9955. Para *A. decora* W 648 foram observadas bandas DAPI positivas em todos os 18 cromossomos.

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Assistente de Operações, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 044 - CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E MORFOLÓGICA DE ACESSOS DE GERMOPLASMA DE *PASPALUM*, GRUPO NOTATA (Cytogenetic and morphological characterization of *Paspalum*, Notata group, germplasm accessions)

Vieira, F.N.<sup>1</sup>; Valls, J. F. M.<sup>2</sup>; Peñaloza, A. P. S.<sup>3</sup>, Santos, S.<sup>4</sup>

*Paspalum* é o gênero mais importante das gramíneas brasileiras. Suas espécies ocorrem em todo o país e destacam-se pela importância forrageira. O grupo Notata reúne *P. notatum* e suas espécies afins, bem representadas nos campos sul-brasileiros, onde mostram interesse pela densa cobertura do solo. Quanto à citogenética, o grupo mostra espécies diplóides, tetraplóides, pentaplóides, hexaplóides e octoplóides, com apomixia e/ou sexualidade. Neste trabalho, realizou-se a contagem cromossômica de novos acessos de *P. notatum*, *P. conduplicatum*, *P. barretoii*, *P. minus*, *P. pumilum* e *P. nummularium* e fez-se uma análise morfológica de *P. pumilum*, *P. barretoii* e *P. minus*. *Paspalum pumilum* e *P. minus* tem morfologia similar, o que tem originado identificações incorretas em bancos de germoplasma. *Paspalum barretoii* destaca-se das demais espécies estudadas pelos ramos reflexos da inflorescência, com uma nítida distância entre seus pontos de inserção, enquanto *P. pumilum* e *P. minus* tem inflorescência em forma de "V", com ramos inseridos à mesma altura. Para a análise morfológica, mediu-se o comprimento do colmo, da folha bandeira, da lâmina e bainha da segunda folha, dos ramos da inflorescência e da espiguetta. Foram analisadas exsiccatas documentais de acessos das três espécies em estudo. A determinação de seu número somático contribui para distinguir *P. minus*, pentaplóide, das duas outras, que são diplóides. As raízes foram coletadas, pré-tratadas em 8-hidroxinoleína 0,002N e fixadas em solução Carnoy. Seguiu-se a hidrólise em HCl 5N, por 20 minutos, à temperatura ambiente, e a digestão enzimática. A coloração foi realizada com Shiff e carmim acético 2%. *Paspalum minus* (V 14573) mostrou  $2n = 50$  cromossomos. Acessos de *P. notatum* (V 14783 e V 14828, com  $2n = 40$  e V 14829, com  $2n = 20$ ), mostraram a variação de ploidia já relatada para a espécie. *Paspalum conduplicatum* (V 14838 e V 14859) mostrou  $2n = 60$  e *P. pumilum* (V 14847)  $2n = 20$ . A contagem de  $2n = 20$  para *P. nummularium* é original. Em dois novos acessos de *P. barretoii* (V 14846 e V 14853), a contagem de  $2n = 20$  confirmou resultados anteriores. A associação dos dados morfológicos e citogenéticos contribuiu para a nítida diferenciação entre *P. minus*, *P. pumilum* e *P. barretoii*, confirmando a circunscrição distinta dessas espécies.

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Assistente de Operações, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 045 - CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE FITONEMATÓIDES, *MELOIDOGYNE* SPP., ATRAVÉS DA ANÁLISE DE RAPD (Characterization of plant parasite nematodes populations, *Meloidogyne* spp., by RAPD analysis)

Souza, H.J.M.<sup>1</sup>, Tigano, M.S.<sup>2</sup>, Carneiro, R.G.<sup>3</sup>, Tiago, R.T.<sup>4</sup>

Os nematóides das galhas, gênero *Meloidogyne*, estão entre as principais pragas da cultura do cafeeiro no Brasil e na América Central. A grande variabilidade entre espécies e populações desses nematóides tem dificultado a seleção de genótipos resistentes nos programas de pesquisa desenvolvidos nesses países. Neste trabalho foram analisadas, através da técnica de RAPD, 16 isolados de *Meloidogyne* spp. provenientes do Brasil, América Central e EUA. Esses isolados incluíram populações já identificadas e isoladas atípicos quanto ao perfil de esterases. Populações de *M. arenaria* e *M. javanica* obtidas de outras culturas foram utilizadas na análise como referência para essas espécies. Vinte e dois oligonucleotídeos foram utilizados e 346 fragmentos foram selecionados para a análise dos resultados. A análise fenético dos dados indicou distinta separação das espécies encontradas em café: *M. exigua*, *M. incognita*, *M. paranaensis*, *M. arabicida* e *M. mayaguensis*. O isolado identificado como *M. konaensis*, proveniente do Havaí, EUA, mostrou alta homogeneidade (similaridade >90%) com as populações brasileiras de *M. paranaensis*. Os isolados MGUA6 e MGUA7, provenientes da Guatemala, apresentaram alta similaridade entre si e também se agruparam (similaridade >85%) com *M. paranaensis*, *M. konaensis* e MGUA3. Três isolados não identificados (MS4, MSAO1 e MASO2), provenientes de El Salvador, apresentaram variações entre si, e foram agrupados com os isolados de *M. arenaria* e *M. javanica*. A variabilidade intraespecífica entre as populações de *M. paranaensis* foi inferior às observadas para *M. exigua* e *M. incognita*.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Florestal, graduanda, UNB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 046 - CONTAGEM DE CROMOSSOMOS EM ACESSOS DE GERMOPLASMA DE *PASPALUM* (GRAMINEAE) DO SUL DO BRASIL (Chromosome counts in Southern Brazilian germplasm accessions of *Paspalum* (Gramineae))

Soto-Araya, M.E.<sup>1</sup>; Valls, J.F.M.<sup>2</sup>; Peñaloza, A.P.S.<sup>3</sup>, Santos, S.<sup>4</sup>

*Paspalum* (Gramineae) é dividido em 20 grupos, com cerca de 400 espécies forrageiras tropicais e subtropicais. A maioria delas ocorre no Brasil, onde muitas poderiam ser aproveitadas em cultivo e no melhoramento. No grupo Dilatata, importante na área subtropical, convivem, no Brasil, biótipos sexuais e apomíticos de *P. dilatatum*, *P. urvillei* e *P. pauciciliatum*, além de híbridos naturais. Conforme a literatura, *P. dilatatum* tem vários biótipos, como "Vacaria" e "Virasoro", que são formas sexuais, com  $2n = 4x = 40$ ; o biótipo "Torres", apomítico, mostra  $2n = 60$ . *Paspalum pauciciliatum* tem  $2n = 40$  e é apomítico. A caracterização citogenética dos acessos de *Paspalum*, que atesta seu enquadramento nos biótipos conhecidos, é essencial para a investigação adicional nos bancos de germoplasma. Além disto, o número somático, associado à morfologia, pode confirmar a presença de híbridos naturais de Dilatata com espécies de outros grupos. O objetivo deste trabalho foi a contagem do número somático de novos acessos de germoplasma de *Paspalum* dos grupos Dilatata, Virgata e Paniculata, obtidos no Sul do Brasil. A contagem foi realizada em pontas de raiz de plantas mantidas em telado, com pré-tratamento em hidroxiquinoleína 0,002 N, seguido de fixação em Carnoy por 24 horas. Fez-se a hidrólise em HCl 5N, seguida de digestão enzimática, ambas por 20 minutos e à temperatura ambiente. A coloração foi feita com solução de Schiff e as raízes maceradas em carmim acético 2%. Os biótipos "Vacaria" (V14814) e "Virasoro" (V14806) de *P. dilatatum*, assim como *P. pauciciliatum* (V14817), mostraram  $2n = 40$  e *P. dilatatum* "Torres" (V14774) mostrou  $2n = 60$ . *Paspalum regnelli*, do grupo Virgata (V14778) e *P. juergensii*, de Paniculata (V14810), mostraram, respectivamente,  $2n = 40$  e  $2n = 20$ . Os dados confirmam as identificações de campo de cada acesso, coincidindo com contagens anteriores das mesmas espécies e biótipos. Contagens adicionais confirmaram o número esperado para um provável híbrido de *P. urvillei* x *P. regnelli* (V14779), e ainda foi constatado o nível triploide ( $2n = 30$ ) em um acesso com morfologia intermediária entre *P. urvillei* x *P. juergensii* (V14811), atestando sua condição híbrida. Este acesso é importante para estudos filogenéticos do grupo Dilatata, que inclui um genoma JJ de Paniculata.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Assistente de Operações, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **047 - DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA JACARANDA COPAIA (LEGUMINOSAE), UMA ESPÉCIE ARBÓREA MADEREIRA TROPICAL (Development of microsatellite markers for *Jacaranda copaia* (Leguminosae), arboreal timber specie of the Amazon forest)**

Vinson, C.C.<sup>1</sup>, Amaral, A.C.<sup>2</sup>, Proite, K.<sup>3</sup>, Silva, V. P.<sup>4</sup>, Ciampi, A.Y.<sup>5</sup>, Sampaio, I.<sup>6</sup>

A espécie *Jacaranda copaia* (Leguminosae), conhecida como Parapará, é uma espécie madeira da Floresta Amazônica, com estrutura genética das populações e sistema reprodutivo desconhecido. O entendimento dos parâmetros genéticos populacionais fundamentais para definir estratégias de conservação e manejo depende da disponibilização de marcadores moleculares informativos. Marcadores moleculares baseados em Sequências Simples Repetitivas (SSR) ou Microsatélites são abundantes e uniformemente distribuídos no genoma, codominantes e altamente multialélicos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares, sendo ideais para estudo de relação de parentesco, fluxo gênico e diversidade genética. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma bateria de marcadores microsatélites para a espécie *Jacaranda copaia*. O DNA genômico foi digerido com a enzima de restrição, Tsp 509 I. Fragmentos entre 300 a 800 bp foram purificados no gel e ligados a adaptadores específicos. O processo de enriquecimento foi realizado por hibridização com dinucleotídeos (TC)<sub>13</sub> ligados a biotina e recuperados por contas magnéticas ligadas a estreptavidina. Esta fração de fragmentos foi utilizada como insertos para a construção de bibliotecas genômicas: os insertos foram amplificados por PCR, ligados em um plasmídeo pGEM-T e transformados em *E.coli*, cepa XL1-Blue. Os clones foram transferidos para uma membrana de N-bond e selecionados por hibridização com sondas poli AG/TC, sendo feitas PCR da região M13 do plasmídeo e um total de 237 clones positivos foram sequenciados, dos quais 30 primers foram desenhados. Estes SSRs serão utilizados para estudos de genética de populações que serão conduzidos com os indivíduos das populações de Santarém e Paragominas, na região Amazônica no Pará.

---

<sup>1</sup> Bióloga, mestranda, UFPA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia..

<sup>2</sup> Bióloga, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Med. Vet., Ph.D., UFPA.

**048 - DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *DIPTERIX ODORATA* (LEGUMINOSAE), UMA ESPÉCIE MADEIREIRA DA FLORESTA AMAZÔNICA (Development and optimization of microsatellite markers for *Dipterix odorata* (Leguminosae), a tropical timber specie of the Amazon Forest)**

Amaral, A.C.<sup>1</sup>, Vinson, C.C.<sup>2</sup>, Proite, K.<sup>3</sup>, Silva, V. P.<sup>4</sup>, Ciampi, A.Y.<sup>5</sup>, Sampaio, I.<sup>6</sup>

Marcadores baseados em Seqüências Simples Repetitivas (SSR) ou Microssatélites são abundantes e uniformemente distribuídos no genoma, codominantes e altamente multialélicos sendo ideais para estudo genético. Estes foram desenvolvidos para a espécie *Dipterix odorata*, pertencente a família Leguminosae-Papilionoidae, conhecida como cumaru, cumaru amarelo, cumaru de cheiro, com ocorrência na região Amazônica, do estado do Acre até o Maranhão, e se destaca devido a produção madeireira e suas propriedades medicinais, principalmente o *comarium* extraído das sementes. Visando o manejo e a conservação da espécie, com um futuro trabalho com análise da diversidade genética, da estrutura de populações e estimativas de sistemas reprodutivos objetivou-se desenvolver marcadores moleculares genéticos informativos. Biblioteca genômica foi enriquecida e ligada em um plasmídeo pGEM-T e transformada em *E.coli*, cepa XL1-Blue. Os clones positivos foram selecionados por hibridização com sondas poli AG/TC. Após PCR da região M13 do plasmídeo, um total de 256 clones foi sequenciado. Foram desenhados os primers pelo programa software primer 3, sendo 42 foram sintetizados, dos quais 25% amplificaram fragmentos robustos na temperatura de anelamento de 54°C. Na otimização dos primers os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 3,5% com brometo de etídio e UV, evidenciando cerca de 75% dos primers polimórficos. Na detecção de polimorfismo por meio do gel desnaturante de poliacrilamida 4% corado com nitrato de prata, estão sendo verificados os números de alelos/locos em 12 indivíduos, provenientes da região Amazônica, próxima da cidade de Santarém-PA, local de estudo para manejo. A estimativa da heterozigiosidade, calculada com uso de SSR tem mostrado alto potencial desses marcadores nos estudos de estrutura de genética populacional da espécie.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, mestranda, UFPA, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Med. Vet., Ph.D., UFPA.

## 049 - DETERMINAÇÃO DO MODO REPRODUTIVO DE *BACCHARIS CAPRARIIFOLIA* ATRAVÉS DA ANÁLISE DE ÓVULOS CLAREADOS (Determination of the mode of reproduction of *Baccharis caprariifolia* through analyses of cleared ovules)

Cruz, D.R.O.<sup>1</sup>, Falcão, R.<sup>2</sup>, Werpachowski, J.S.<sup>3</sup>, Goldenberg, R.<sup>4</sup>, Araujo, A.C.G.<sup>5</sup>, Dusi, D.M.A.<sup>6</sup>

A família Asteraceae possui cerca de 20.000 espécies, muitas com reprodução apomítica, ou seja, reprodução assexual através de sementes. Resultados de testes de campo indicaram apomixia em espécies subtropicais de Asteraceae, dentre elas *Baccharis caprariifolia*, que formou frutos na ausência de polinização. *B. caprariifolia* é uma espécie arbustiva dióica, com flores reunidas em capítulos. Cada flor possui um ovário ínfero, unilocular, uniovolado e com óvulo basal. O objetivo desse trabalho é caracterizar morfológicamente o óvulo de *B. caprariifolia* em diferentes estágios de desenvolvimento, visando determinar o seu modo de reprodução. As coletas foram efetuadas entre setembro e novembro, em um indivíduo com flores pistiladas pertencente a uma população ocorrente em vegetação ruderal no Campus do Centro Politécnico da UFPR. Os capítulos foram coletados antes e após a antese, neste caso após isolamento com sacos de papel, e fixados em FAA. Flores foram isoladas, clareadas e observadas em microscopia de contraste de interferência diferencial. Em cada ovário, o óvulo continha um saco embrionário, com organização semelhante ao saco embrionário meiótico do tipo Polygonum. Foram encontrados na célula central dois núcleos polares distintos, núcleos em processo de fusão ou somente um único núcleo polar grande, provavelmente resultante da fusão. As antípodas que se dispõem em fileiras longitudinais na região chalazal e a oosfera na região micropilar, foram claramente identificadas na maioria dos sacos embrionários enquanto as sinérgides dificilmente foram observadas. Em nenhum saco embrionário foi observado embrião ou endosperma nem tampouco embriões adventícios ou células iniciais apospóricas no nucelo ou no tegumento interno do óvulo. Conclui-se que nas amostras de *B. caprariifolia* observadas, não há indícios da ocorrência de aposporia ou embrionia adventícia. Entretanto não se descarta a possibilidade de ocorrência de diplosporia uma vez que os sacos diplospóricos são similares ao do tipo Polygonum.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., graduando, UFPR.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., UFPR.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 050 - ESPÉCIES NOVAS DE *PASPALUM* L., GRUPO PLICATULA (POACEAE) DO BRASIL (New Brazilian species of *Paspalum* L., *Plicatula* group (Poaceae))

Oliveira, R.C.<sup>1</sup>, Valls, J.F.M.<sup>2</sup>

*Paspalum* é um gênero tropical e subtropical, sempre presente nas formações campestres brasileiras, com cerca de 220 espécies no país. A correta identificação de suas espécies e acessos de germoplasma é essencial para o estudo das pastagens naturais e para a busca de espécies com potencial agrônomo, adaptáveis ao cultivo ou para uso no melhoramento genético. O gênero é dividido em grupos de espécies afins, sem categoria taxonômica formalizada, mas bem aceitos pelos especialistas. As novas espécies são do grupo *Plicatula*, caracterizado por espiguetas com antécio castanho-escuro brilhante, de convexidade muito pronunciada e com lema estéril plicado. Este trabalho contribui para o levantamento e coleta de germoplasma das espécies brasileiras de *Paspalum*, iniciado no Rio Grande do Sul, por Ismar L. Barreto, e aqui expandido pela ampla revisão do grupo *Plicatula*. Baseia-se em coletas a campo, na revisão de herbários do Brasil e do exterior e na análise de plantas mantidas em cultivo. As ilustrações de espiguetas foram feitas em estereomicroscópio com câmara clara. *Paspalum parodii* Barreto ex Oliveira & Valls, *sp. nov.* homenageia Lorenzo R. Parodi, grande estudioso da família. Ocorre sobre solos pedregosos secos da Depressão Central do Rio Grande do Sul, onde só foi coletado uma vez, em São Gabriel. O acesso foi mantido em cultivo por vários anos, na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tendo sido constatado seu nível diplóide, raro no grupo *Plicatula*. Por não haver exsicatas recentes, realizou-se, em janeiro de 2000, intensa busca no local do tipo, com apoio do coletor original. Porém, a espécie não foi relocada e pode estar extinta, ao menos no único local documentado de ocorrência. Distingue-se das outras espécies de *Plicatula* pelas lâminas estreitas e convolutas intensamente albo-vilosas na face inferior, pelos ramos da inflorescência falcados e pela ráquis com tricomas marginais longos. *Paspalum timbiraie* Oliveira & Valls *sp. nov.* recebe o epíteto em referência aos indígenas que habitavam sua área de ocorrência. É uma espécie anual, distinta das demais do grupo pela grande dimensão da espiguetas (4,5-4,7x2,7-3,6mm). Foi recoletada várias vezes, mas sempre no mesmo local de seu encontro original, em Wanderlândia, Tocantins. O trabalho inclui a descrição, diagnose latina, prancha e comentários sobre as novas espécies.

---

<sup>1</sup> Bióloga, M.Sc., Unicamp, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## 051 - MAPEAMENTO DE UM QTL DE MAIOR EFEITO PARA FLORESCIMENTO PRECOCE UTILIZANDO GENOTIPAGEM SELETIVA DE MARCADORES MICROSSATÉLITES DETECTADOS EM MULTIPLEXES FLUORESCENTES (A MAJOR EFFECT QTL FOR EARLY FLOWERING IN EUCALYPTUS MAPPED BY SELECTIVE GENOTYPING OF MICROSATELLITE MARKERS DETECTED IN FLUORESCENT MULTIPLEXES)

Missiaggia, A.A.<sup>1</sup>, Piacuzzi, A.<sup>2</sup>, Grattapaglia, D.<sup>3</sup>

O florescimento precoce em espécies perenes é normalmente visto como uma ferramenta poderosa para acelerar ciclos de melhoramento em programas de seleção recorrente. Uma das limitações desta ferramenta é que cruzamentos entre indivíduos geneticamente próximos eventualmente resultam em depressão por endogamia. Por outro lado, o fenótipo de florescimento precoce pode ser extremamente útil para o desenvolvimento de clones superiores em cruzamentos, em tentativas de fixação de alelos favoráveis para posterior utilização na recuperação de heterose em híbridos. Um mutante para florescimento precoce de *Eucalyptus grandis* com crescimento vegetativo normal foi encontrado na Celmar S.A.. O florescimento neste clone inicia-se por volta de 90 dias. Um cruzamento entre um clone selvagem com o mutante foi feito, gerando uma progênie de 80 indivíduos, onde a característica em questão segregou em uma proporção 1:1. Foi feito um "screening" utilizando 250 primers microsatélites distribuídos por todo o genoma utilizando detecção de fluorescência em um seqüenciador automático ABI 3100. Uma genotipagem preliminar foi feita utilizando-se a estratégia de genotipagem seletiva. Para este propósito, 24 indivíduos foram selecionados, sendo 12 do tipo selvagem e 12 mutantes para florescimento precoce. Para verificar possíveis ligações entre os locos dos marcadores e a característica de florescimento precoce foi feito um teste de Qui-quadrado em cada grupo selecionado para a proporção 1:1. Possíveis ligações foram detectadas para os marcadores 247, 287, 37 e 426 baseadas em valores  $P$  altamente significativos ( $2,5 \times 10^{-4}$ ,  $1,5 \times 10^{-4}$ ,  $5,9 \times 10^{-3}$  e  $5,7 \times 10^{-5}$ , respectivamente). Para confirmar a ligação entre estes locos e o fenótipo de florescimento precoce uma análise completa de co-segregação foi desenvolvida, e novamente ligações foram detectadas baseadas em testes Qui-quadrado altamente significativos. (valores de  $P$   $6,3 \times 10^{-9}$ ,  $4 \times 10^{-10}$ ,  $8,0 \times 10^{-5}$  e  $1,5 \times 10^{-9}$ , respectivamente) confirmando os resultados encontrados pela estratégia de genotipagem seletiva. Um mapa de ligação envolvendo os quatro locos e o QTL para florescimento precoce foi construído utilizando o software Outmap.

---

<sup>1</sup> Eng. Florestal, Doutorando, ESALQ, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Florestal, M.Sc., Celmar S.A..

<sup>3</sup> Eng. Florestal, Ph.D., UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 052 - MARCADORES MICROSSATÉLITES EM COCO (*COCOS NUCIFERA L.*) (Microsatellite markers For Coconut (*Cocos nucifera L.*))

Ramiro, C.A.<sup>1</sup>, Silva, C.R.B.<sup>2</sup>, Amaral, Z.P.S.<sup>3</sup>, Moretzsohn, M.C.<sup>4</sup>

O coqueiro (*Cocos nucifera L.*) possui diversos ecotipos e duas principais variedades, gigante e anão, que diferem em diversas características. Os gigantes são preferencialmente alógamos, enquanto os anões são geralmente autógamos. Programas de melhoramento são atualmente direcionados para a obtenção de híbridos gigante x gigante (híbridos entre ecotipos) e gigante x anão, visando combinar produtividade e precocidade. Informações sobre a diversidade genética entre e dentre ecotipos são, portanto, de particular importância. Microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats) constituem uma das técnicas mais indicadas para estudos desta natureza. Marcadores SSR são baseados em PCR, têm herança codominante, são multialélicos, abundantes, aparentemente distribuídos por todo genoma de eucariotos e dependentes de pequena quantidade de DNA dos indivíduos analisados. O objetivo deste trabalho foi desenvolver primers SSR para coco. Foi utilizada uma planta resultante de um cruzamento gigante x anão, para possibilitar a amplificação nestas duas variedades. DNA genômico foi digerido com Sau3A I. Os fragmentos entre 200 e 800 pares de bases foram transferidos para membranas de nylon, ligados a adaptadores, selecionados por hibridização com dinucleotídeos (TC)<sub>13</sub> ligados a biotina e recuperados por contas magnéticas ligadas a estreptavidina. Esta fração enriquecida foi amplificada por PCR, clonada em plasmídeo pGEM-T e transformada em *E. coli*, cepa XL1-Blue. Um total de 503 clones foi submetido a PCR com primers complementares aos adaptadores e ao microssatélite, resultando em um total de 334 clones positivos (clones com regiões repetidas). Estes clones foram seqüenciados em um seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer). Destes, 72 mostraram-se adequados para o desenho de primers. O software Primer 3 foi utilizado para desenho dos primers, sendo obtido um total de 34 primers SSR. Estes locos serão caracterizados e utilizados, junto aos 10 marcadores SSR polimórficos previamente obtidos em nosso laboratório, para obtenção de informações genéticas, visando dar suporte aos programas de melhoramento genético, coleta, conservação e manejo dos recursos genéticos de coco.

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Assistente de Operações, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 053 - UTILIZAÇÃO DE MARCADORES RAPD PARA DIFERENCIAÇÃO DE ESPÉCIES SILVESTRES E HÍBRIDOS DE *ARACHIS* SPP (The use of RAPD markers for the differentiation of *Arachis* SSP wild species and híbrids)

José, A.C.V.F.<sup>1</sup>, Guimarães, P.M.<sup>2</sup>, Bertoli, D.J.<sup>3</sup>, Leal-Bertoli, S.C.M.<sup>4</sup>

Através da técnica de RAPD-PCR, foram comparados 2 acessos de parentes silvestres do amendoim cultivado (*Arachis hypogaea*) e um híbrido (cruzamento entre os dois acessos), com a finalidade de serem encontrados marcadores moleculares ligados à resistência. Os acessos, *A. stenoperma* V 10309 (S4) e *A. duranensis* K7988, foram testados em trabalhos anteriores para resistência contra espécies de nematóides das galhas (*Meloidogyne arenaria* raça 2, *M. javanica* raça não identificada, isolada de *A. pinto*) e fungos causadores de manchas foliares (*Cercospora arachidis* e *Cercosporidium personatum*). S4 se mostrou resistente, enquanto que D7, se mostrou parcialmente suscetível a todas as doenças testadas. A planta híbrida foi resultado do cruzamento entre as duas espécies, comprovado por características morfológicas e análise de microssatélite. No presente trabalho foram utilizados primers "operon" de seqüências aleatórias para RAPD, com 10 pares de base cada, testados em DNAs extraídos de plantas dos 2 acessos e híbrida. Dentre os 250 primers testados, foram encontrados 55 primers que apresentaram polimorfismo. Essas diferenças, observadas através dos tamanhos diferenciados de bandas, podem estar ligadas à resistência. Os resultados foram observados em gel de agarose a 1,5%. Em trabalhos posteriores, serão analisadas as possíveis diferenças entre seqüências dos dois acessos através de clonagem das bandas presentes em PCRs do acesso S4 e ausente no acesso D7, e marcadores SCAR serão produzidos. Baseado nesta população segregante de *Arachis*, será construído um mapa genético, no qual estes marcadores RAPD serão inseridos, assim como marcadores SSR, RGAs e AFLPs, todos sendo desenvolvidos neste projeto. A co-segregação de marcadores e resistências permitirá o isolamento de genes de resistência.

<sup>1</sup> Eng. Florestal, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Botânico, Ph.D., Universidade Católica de Brasília.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 054 - VARIABILIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DE *PASTEURIA PENETRANS* ATRAVÉS DA ANÁLISE DE RAPD (Genetic variability of *Pasteuria penetrans* isolates by RAPD analysis )

Teixeira, A.C.O.<sup>1</sup>, Tigano, M.S.<sup>2</sup>, Carneiro, R.M.D.G.<sup>3</sup>

A bactéria *Pasteuria penetrans* é um parasita obrigatório dos nematóides das galhas, *Meloidogyne* spp., que tem mostrado um grande potencial como agente de controle biológico desses organismos. A variabilidade genética de 18 isolados de *P. penetrans* de diferentes regiões geográficas foi analisada através da técnica de RAPD. Os isolados foram cultivados em *M. javanica* crescendo em vasos com tomateiro em casa de vegetação por três meses. Os endósporos de *P. penetrans* foram coletados em fêmeas infectadas e mantidos a 4°C. Aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporos foram limpos e utilizados para a extração do DNA genômico. Vinte oligonucleotídeos foram utilizados e 145 bandas foram selecionados para a análise, sendo 42 monomórficas. O coeficiente de similaridade entre isolados variou de 61% a 86%, com uma média de 76%. A análise fenética baseada nas similaridades mostrou um alto nível de homogeneidade (similaridade > 61%) entre os isolados analisados. Dos 18 isolados, 16 se agruparam com 64% de similaridade, e os subgrupos identificados não foram relacionados com a origem geográfica dos isolados. Os isolados P110 e P18 se separaram deste grupo com 62% e 61% de similaridade, respectivamente.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## CONSERVAÇÃO

### 055 - AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES DE SOJA (*GLYCINE MAX* (L.) MERRIL) CONSERVADOS POR VINTE E DOIS ANOS (Evaluation of physiological and sanitary quality on soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) preserved for twenty-two years)

Godoi, A.G. de<sup>1</sup>, Faiad, M.G.R.<sup>2</sup>, Wetzal, M.M.V.<sup>3</sup>, Rocha, L.M.T.<sup>4</sup>

A soja é da família das Leguminosas, do gênero *Glycine*, originária da China. Os centros da Embrapa responsáveis pelo germoplasma de soja são: a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, responsável pela da introdução e conservação a longo prazo (Coleção de Base) e a Embrapa Soja responsável pelo melhoramento, caracterização e a avaliação (Banco Ativo de Germoplasma). A Coleção de Base da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é de 4.650 acessos. A coleção é conservada em câmaras frias a - 20°C, em sacos de alumínio herméticamente fechados, sem controle da umidade. As sementes são secas entre 6 e 7%, antes de serem embaladas. A qualidade fisiológica e sanitária das sementes da soja é avaliada a cada 10 anos, e quando a viabilidade dos acessos estiver abaixo dos 85%, os acessos são enviados para a regeneração no Banco Ativo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência de fungos e o percentual de germinação das sementes de soja após 22 anos de armazenamento. Foram analisados 74 acessos de soja através do método de papel de filtro, utilizando-se 40 sementes de cada acesso em duas repetições. Para o teste de germinação foram avaliados 429 acessos pelo método de rolo de papel, em 4 repetições com 50 sementes cada. Após 22 anos de armazenamento os resultados indicaram que tantos fungos saprófitas quanto patogênicos sobreviveram a estas condições. A ocorrência de fungos nas sementes não é fator determinante da baixa germinação, pois quando a germinação é baixa a incidência de fungos também foi baixa. Observou-se que no teste de germinação, 88% das amostras apresentaram germinação acima de 70%. Conclui-se que as condições de armazenamento a longo prazo são boas para a manutenção da viabilidade das sementes e sobrevivência de fungos.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Assistente de Operações 1, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **056 - CONSERVAÇÃO A LONGO PRAZO DE SEMENTES DE VIGNA UNGUICULATA (Long term seed storage of *Vigna unguiculata*)**

Mundim, R.A.<sup>1</sup>, Faiad, M.G.R.<sup>2</sup>, Wetzel, M.M.V. da S.<sup>3</sup>, Rocha, L.M.T.<sup>4</sup>

O caupi (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.) é uma cultura importante na dieta da população nos trópicos. Os recursos genéticos de caupi constituem a base para seu desenvolvimento agrícola, e o seu manejo envolve atividades que vão desde a introdução, coleta, caracterização, avaliação, conservação e a documentação. O aumento da variabilidade genética de caupi foi realizada através da introdução de germoplasma do IITA, Nigéria e de coletas realizadas em diversos estados brasileiros. A caracterização e avaliação de germoplasma foi realizada no Banco Ativo. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia é responsável pela conservação a longo prazo de germoplasma de caupi e pela sua documentação no Sistema Brasileiro de Informação de Recursos Genéticos. Atualmente na coleção de caupi existem 4.875 acessos. As sementes de cada acesso são limpas, contadas, avaliadas quanto a qualidade fisiológica e sanitária, desidratadas (6%) e embaladas em sacos aluminizados, hermeticamente fechados e armazenados em câmaras a -20°C. Na grande maioria, os acessos apresentam viabilidade inicial das sementes superior a 85%, a qual está sendo mantida após 10 anos de armazenamento, indicando que as condições de armazenamento a longo prazo são boas. O objetivo deste trabalho é apresentar os recursos genéticos de caupi de que dispomos na conservação a longo prazo.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Assist de Operações I, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 057 - CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *COFFEA ARABICA* COM DIFERENTE QUALIDADE INICIAL (Conservation of *Coffea arabica* seed lots of different initial quality)

Sousa, M.A.F.<sup>1</sup>, Reis, R.B.<sup>2</sup>, Eira, M.T.S.<sup>3</sup>

O café é considerado um dos mais importantes produtos agrícolas no mercado internacional e muitos países estão envolvidos na sua produção, consumo e comercialização. As espécies de café vêm sendo conservadas *ex situ* como plantas vivas, mantidas em coleções de germoplasma a campo, já que as sementes de *Coffea* não sobrevivem por longos períodos sob as condições convencionais. Fatores como procedência das espécies, grau de maturidade e outros fatores genéticos podem estar relacionados com o comportamento de cada espécie ou cultivar. O trabalho foi conduzido no laboratório de sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com o objetivo de determinar e avaliar o vigor de dois lotes de sementes de café (cultivares Mundo Novo IAC 388-17 e Catuaí Vermelho IAC - 99), procedentes do Banco de Germoplasma de Café do Instituto Agronômico de Campinas - IAC, e a cultivar IAPAR 59 procedente do Banco de Germoplasma de Café do Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR. Logo após a recepção das sementes, o teor de água foi equilibrado sobre soluções saturadas visando atingir o grau de umidade adequado para armazenamento sob temperaturas de +5°C, -20°C e -196°C (nitrogênio líquido), onde foram armazenadas no interior de embalagens herméticas por 3 meses (criopreservação) ou um ano (+5°C, -20°C). O restante das sementes ficou armazenado em condições ambientais de laboratório por seis meses, quando o procedimento foi repetido e denominado "lote de menor vigor". Os resultados mostraram que a viabilidade das sementes de *Coffea arabica* foi mantida em todos os ambientes de armazenamento no "lote de maior vigor"; já as sementes do "lote de menor vigor" perderam viabilidade mais rapidamente durante o armazenamento a +5°C e -20°C do que em criopreservação. Foram observadas diferenças na conservação de sementes de diferentes cultivares.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Técnico de Nível Superior, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 058 - CONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE *COFFEA RACEMOSA* EM BANCO DE GERMOPLASMA (*Coffea racemosa* seed conservation in genebanks)

Ribeiro, F.N.S.<sup>1</sup>, Sousa, M.A.F.<sup>2</sup>, Soares, F.Q.<sup>3</sup>, Souza, C.W.<sup>4</sup>, Reis, R.B.<sup>5</sup>, Eira, M.T.S.<sup>6</sup>

Existem descritas atualmente cerca de cem espécies de café e o Banco de Germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) conta com cerca de vinte delas. Há espécies que tem um melhor valor de comercialização como *Coffea arabica*, *Coffea canephora*, entre outras. Existem espécies que são exploradas como importantes fontes de resistência a pragas, moléstias e condições de tempo como *Coffea racemosa*. *C. racemosa* é originada das Savanas de Moçambique e sul da Tanzânia; é uma espécie resistente à seca e temperaturas mais elevadas e é extremamente precoce em relação ao desenvolvimento e maturação dos frutos, que em Campinas é de cerca de 90 dias. A conservação de espécies silvestres de *Coffea* em Banco de Germoplasma tem exigido o estabelecimento de protocolos para conservação a médio e longo prazo. Foram avaliados dois acessos procedentes do IAC, acessos da coleção 2 e da coleção 9, que foram armazenados sob temperaturas de +5°C, -20°C e -196°C por até 12 meses. Provavelmente por ter passado por condições de chuva durante a maturação, o acesso da coleção 2 perdeu vigor e a viabilidade inicial das sementes era igual a 55%. Já o acesso da coleção 9, que passou por processo de maturação normal, mostrou poder germinativo igual a 98%. A viabilidade inicial das sementes de ambos os acessos foi mantida em criopreservação. Já sob temperaturas de +5°C e -20°C, houve perda de viabilidade durante o período de armazenamento, que foi mais acentuada no acesso de menor vigor.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Técnico de Nível Superior., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## 059 - CONTROLE DE ÁCARO EM LABORATÓRIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS (Controlling mites in plant tissue culture laboratory)

Abreu, L.A.<sup>1</sup>, Cardoso, L.D.<sup>2</sup>, Santos, H. de F.<sup>3</sup>, Souza, G.A.B. de<sup>4</sup>, Mendes, R.A.<sup>5</sup>

O LCT-I (Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais I) foi estabelecido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia com a finalidade de dar suporte a estratégia de conservação *in vitro* de germoplasma vegetal de propagação vegetativa. Recentemente, foi realizada uma reforma no PCG (Prédio de Conservação de Germoplasma), com re-estruturação das câmaras de conservação que haviam sido desativadas e permaneciam fechadas por quase uma década. Nessas câmaras houve condições para o desenvolvimento de fungos, que atraíram os ácaros que deles se alimentavam. Quando da reforma, esporos de fungo e ácaros foram espalhados por todo o prédio, atingindo diretamente o LCT-I devido a sua proximidade. Houve um aumento substancial no índice de contaminação das culturas conservadas *in vitro* e, inicialmente, não foi possível identificar o foco de tais contaminações. Os cuidados quanto a esterilização e manejo dos cultivos foram redobrados, porém o índice de contaminação não reduzia. Quando os tubos foram observados sob microscópio estereoscópico, pois já havia a suspeita da ocorrência de ácaros, foi constatada a sua presença em um grande número de tubos. Isto ocorreu principalmente naqueles cultivos que estavam em crescimento na câmara a 25°C. As culturas conservadas à temperatura de 20°C também apresentavam um alto índice de contaminação. Porém, as culturas de batata e morango, conservadas na câmara a 10°C, não apresentavam o desenvolvimento de contaminações. Para fazer frente a contaminação por ácaro, o PCG foi pulverizado com um piretróide acaricida (Lambdacyhalothrin) e todas prateleiras das câmaras foram cobertas com uma camada de óleo mineral, além da aplicação semanal de formol. Paralelamente, os tubos contaminados foram separados para descarte a medida que era identificada a presença dos ácaros, sendo colocados em sacos plásticos vedados antes de serem autoclavados. O piso de todo laboratório passou a ser limpo duas vezes por semana com pano embebido em solução diluída de lisofórmio (1,85% de formol) e os cuidados de assepsia foram aumentados. Com estas providências foi possível o controle do elevado índice de contaminação do LCT-I, havendo necessidade de vigilância constante para que a contaminação não retorne.

<sup>1</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Assistente de Operação, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Nível Médio, CEM 01 Sobradinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 060 - CRIOPRESERVAÇÃO DE EIXOS EMBRIONÁRIOS DE ESPÉCIES DE *COFFEA* (Cryopreservation of embryonic axes of *Coffea* species)

Mundim, I.P.<sup>1</sup>, Ribeiro, F.N.S.<sup>2</sup>, Mundim, R.C.<sup>3</sup>, Santos, I.R.I.<sup>4</sup>, Salomão, A.N.<sup>5</sup>

A conservação a longo prazo de germoplasma de espécies de *Coffea* ainda não é possível, porque suas sementes não sobrevivem às condições de desidratação e temperatura ideais na metodologia convencional de conservação de sementes. Atualmente, o germoplasma dessas espécies é conservado em coleções a campo, onde o material encontra-se sob risco de destruição devido aos desastres climáticos ou biológicos. Os eixos embrionários dessas sementes são com frequência tolerantes à redução a baixos teores de umidade que seriam letais para as sementes inteiras. Essa tolerância à desidratação apresentada por eixos embrionários sugere que o teor de umidade desses eixos pode ser ajustado, experimentalmente, para valores que permitem sua criopreservação em nitrogênio líquido. Com base nessa hipótese, eixos embrionários de *Coffea arabica* L. e *Coffea racemosa* L. foram isolados de sementes contendo diferentes teores de umidade, congeladas ou não em nitrogênio líquido. A viabilidade dos eixos de *C. arabica* isolados de sementes que não foram congelados em nitrogênio líquido foi de 90-100%, dependendo do seu teor de umidade inicial. A viabilidade de eixos isolados de sementes congeladas em nitrogênio líquido também foi determinada pelo seu teor de umidade inicial. Um total de 90% dos eixos isolados de sementes com 12,6% (base em peso seco, BPS) de umidade permaneceram viáveis após a criopreservação. Apenas 23% dos eixos isolados de sementes com 29,4% (BPS) de umidade permaneceram viáveis depois de congelados em nitrogênio líquido. Eixos isolados de *C. racemosa* apresentaram menores porcentagens de germinação quando comparados aos de *C. arabica*. A viabilidade dos eixos de *C. racemosa* isolados de sementes que não foram congelados em nitrogênio líquido variou de 56-90%, dependendo do seu teor de umidade inicial. Um total de 53% dos eixos isolados de sementes com 10 a 15% (BPS) de umidade permaneceram viáveis após a criopreservação; 40% dos eixos isolados de sementes com 37% (BPS) de umidade permaneceram viáveis depois de congelados em nitrogênio líquido. Os resultados obtidos indicam que a criopreservação de eixos embrionários de espécies do gênero *Coffea* é uma alternativa viável para a conservação de germoplasma desta importante cultura. O protocolo utilizado neste estudo é simples, não requer uso de crioprotetores químicos, congeladores programáveis e propicia alta porcentagem de sobrevivência.

<sup>1</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Nível Médio, Estagiária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Assistente de Operações, B.Sc.Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Florestal, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 061 - ESTUDO DA VIABILIDADE DE SEMENTES DE UMA PLANTA ISOLADA DE *MANIHOT CECROPIAEFOLIA* POHL (EUPHORBIACEAE) (Study on seed viability from a solitary *Manihot cecropiaefolia* Pohl (Euphorbiaceae) plant)

Soares, D.T.<sup>1</sup>, Abiorana, A.F.<sup>2</sup>, Mendes, R.A.<sup>3</sup>

As plantas das espécies de *Manihot* apresentam uma estrutura floral com flores unissexuais, onde as flores femininas amadurecem primeiro. Isto leva a produção de sementes oriundas de cruzamentos e com poucas possibilidades de autofecundação. De uma planta de *M. cecropiaefolia*, isolada de qualquer outra planta do gênero *Manihot* por mais de 100 metros (30 metros é a distância segura para que não haja troca de pólen em *M. esculenta*), foi possível a obtenção de 66 sementes de frutos protegidos por sacos de tecido sintético. Destas foram tomadas 30 sementes, que tiveram seus eixos embrionários extraídos com a utilização de uma pequena mocha. As sementes foram pressionadas até que um pequeno estalido fosse ouvido, indicando que a testa da semente havia sido quebrada. A extração dos eixos embrionários foi realizada com o auxílio de uma pinça e de um bisturi. Dez eixos embrionários foram imersos em solução de tetrazólio (2,3,5-cloro de trifeniltetrazólio) na concentração de 0,75%, e deixados por 24 horas no escuro e sob temperatura de 30°C. Sete eixos embrionários ficaram totalmente coloridos na cor vermelho intenso, enquanto os outros ficaram com a coloração rosa. Setenta por cento dos eixos embrionários foram considerados viáveis. Vinte eixos embrionários foram inoculados asépticamente em meio MS (Murashige e Skoog) na metade de sua concentração e incubados a 30°C no escuro por uma semana, ao fim da qual foram transferidos para câmara a 25°C, intensidade luminosa de 3.000 lux e fotoperíodo de 12 horas. Após 30 dias de cultivo 25% dos eixos embrionários haviam germinado. Vinte sementes foram semeadas, sem nenhum tratamento, em células de bandeja de isopor com terra como substrato, sendo mantidas sempre úmidas com irrigações periódicas. Ao final de 35 dias nem uma semente havia germinado. Por este estudo não foi possível constatar a origem das sementes obtidas, se por autofecundação ou apomixia. Apesar do teste de tetrazólio evidenciar uma elevada taxa de viabilidade das sementes, a dormência dos eixos embrionários não foi quebrada com a eliminação da testa.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, CEM 02 Planaltina, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Assistente de Operação, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**062 - GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *CYRTOPODIUM HOLSTII* L.C.MENEZES (ORCHIDACEAE) SOB TRÊS TEMPERATURAS (*Cyrtopodium holstii* L.C.Menezes (Orchidaceae) seed germination under three temperatures)**

Santos, H. de F.<sup>1</sup>, Abreu, L.A.<sup>2</sup>, Souza, G.A.B. de<sup>3</sup>, Cardoso, L.D.<sup>4</sup>, Mendes, R.A.<sup>5</sup>

A germinação de sementes de orquídeas se dá normalmente de maneira artificial em cultivos assimbióticos *in vitro*. Para estudar a influência da temperatura na germinação de *C. holstii* foram utilizadas sementes obtidas de um fruto desenvolvido de polinização natural, já maduro e próximo da deiscência. Uma pequena amostra de sementes foi separada para o teste de tetrazólio (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio), sendo imersas em solução na concentração de 0,75% e deixadas por 24 horas no escuro e sob temperatura de 30°C. A totalidade delas coloriu demonstrando que 100% estavam viáveis. Na germinação das sementes foram utilizadas três temperaturas, 20, 25 e 30 °C. A esterilização das sementes foi realizada com o uso de uma seringa de injeção descartável, e as sementes foram inoculadas em 12 placas de Petri com 5 cm de diâmetro em meio de cultura MS (Murashige e Skoog) na metade de sua concentração. As placas foram divididas em três lotes de 4 placas e cada lote foi levado para cultivo em uma determinada temperatura. As avaliações foram realizadas semanalmente a partir da segunda semana, quando alguns embriões se apresentavam bastante intumescidos e tomando coloração esverdeada. Foram considerados germinados aqueles embriões que aumentaram de tamanho o bastante para romperem o tegumento transparente das sementes. A melhor germinação foi obtida aos 35 dias da inoculação nas sementes sob a temperatura de 25°C, com a germinação de 69,2%. A temperatura de 20°C resultou em valor intermediário de 44,0%, e o pior resultado foi a 30°C, com a germinação de 10,8%.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, CEM 01 Sobradinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Assistente de Operação, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 063 - LONGEVIDADE DE SEMENTES DE *COFFEA ARABICA* E *COFFEA CANEPHORA* (Longevity of seeds of *Coffea arabica* e *Coffea canephora*)

Soares, F.Q.<sup>1</sup>, Sousa, M.A.F.<sup>2</sup>, Ribeiro, F.N.S.<sup>3</sup>, Reis, R.B.<sup>4</sup>, Eira, M.T.S.<sup>5</sup>

As sementes de café mantêm a viabilidade por um período relativamente curto, em condições normais, o que dificulta o planejamento das atividades de quem as utiliza e, também, o uso em épocas mais vantajosas. Fatores como procedência das espécies, grau de maturidade e outros fatores genéticos podem estar relacionados com o comportamento de cada espécie, necessitando de melhores estudos. Com o objetivo de monitorar a longevidade das sementes de acessos de *Coffea arabica* e *C. canephora*, este trabalho foi conduzido no laboratório de sementes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Sementes das duas espécies procedentes do Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, após serem avaliadas quanto a porcentagem de germinação e grau de umidade iniciais, foram mantidas em embalagens herméticas e armazenadas sob temperatura média de +25°C, +5°C e -20°C em laboratório e monitoradas por até 1 ano. Os resultados mostraram que após 6 meses de armazenamento a maior parte dos acessos de *C. canephora* já havia perdido totalmente a viabilidade, principalmente as variedades Kouillou IAC 68-8 e Robusta col. 5, enquanto que a viabilidade das sementes da variedade Apoatã foi mantida por períodos mais longos a +5°C. Apenas o acesso de Apoatã tolerou o armazenamento sob temperatura subzero, embora também tenha sido observada perda de viabilidade. Em *C. arabica* os cultivares mantiveram a viabilidade inicial por maior período de tempo, particularmente quando armazenadas em +5°C e a -20°C, com exceção do cultivar Iapar 59, que não apresentou tolerância à temperatura subzero.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Técnico de Nível Superior, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 064 - USO DE FOTOGRAFIA NA AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *CYRTOPODIUM HOLSTII* L.C.MENEZES (ORCHIDACEAE) (Photograph use on *Cyrtopodium holstii* L.C.Menezes (Orchidaceae) seeds germination evaluation)

Santos, H. de F.<sup>1</sup>, Abreu, L.A.<sup>2</sup>, Souza, G.A.B. de<sup>3</sup>, Mendes, R.A.<sup>4</sup>

A observação da germinação de sementes de orquídeas cultivadas *in vitro* só é possível com a utilização de um microscópio estereoscópico com aumentos de 8 a 20 vezes. Esta avaliação é cansativa, sujeita a erros e consome muito tempo. As sementes inoculadas ao meio de cultura são identificadas ao acaso, tendo o campo de observação marcado no vidro da placa de Petri invertida com caneta especial, cuja tinta é indelével sem a ação de algum agente químico como o álcool. Visando facilitar a avaliação, e conferir uma maior acuidade à mesma, foi testado o uso de fotografias na avaliação da germinação de sementes de orquídeas. Foram identificadas ao acaso áreas para se fazer a avaliação com o microscópio estereoscópico ajustado para um aumento de 20 vezes. Para a localização do campo a ser avaliado nas próximas observações foi utilizado pequeno pedaço de fita crepe fixado ao fundo da placa de Petri. Essa fita crepe coincidia sempre com a parte superior da cantoneira da fotografia marcada na objetiva. Isto permitiu que as fotografias tiradas semanalmente com aumento de 20 vezes coincidissem com o campo visual marcado. A utilização das fotos se mostrou bastante eficaz na avaliação da porcentagem de germinação das sementes de orquídea. Por este processo foi possível identificar as sementes germinando, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento em que as mesmas se encontravam. Além da avaliação da germinação de orquídeas *in vitro*, este método poderia se utilizado para outras sementes de pequeno tamanho.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, CEM 01 Sobradinho, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## CONTROLE BIOLÓGICO

### 065 - ANÁLISE FISIOLÓGICA E SECREÇÃO ENZIMÁTICA DE *DICYMA PULVINATA* EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO (Physiologic analysis and enzymatic secretion of *Dicyma pulvinata* under different growth conditions)

Lago, W.N.M.<sup>1</sup>, Queiroz, P.R.<sup>2</sup>, Goretti, V.<sup>3</sup>, Melo, S.C.M. de<sup>4</sup>, Lima, L.H.C.<sup>5</sup>

O mal-das-folhas, causado pelo fungo *Microcyclus ulei*, é uma das mais destrutivas doenças da seringueira (*Hevea* spp.) limitando a produção e a expansão desta cultura no Brasil. O patógeno ataca folhas jovens, tornando as plantas debilitadas e vulneráveis a fitopatógenos secundários. Uma alternativa promissora de controle é através do fungo micoparásita *Dicyma pulvinata* (= *Hansfordia pulvinata*). O micoparasitismo é definido pelo ataque direto do fungo parasita ao micélio do fungo hospedeiro. É um processo envolvendo quimiotropismo, adesão, secreção de enzimas hidrolíticas e invasão celular. Acredita-se que ocorra um sinergismo entre as enzimas hidrolíticas (quitinases, glucanases e proteases) na hidrólise e enfraquecimento da parede celular do fitopatógeno. Com o objetivo de entender melhor o processo de micoparasitismo de *D. pulvinata*, foi proposto analisar as condições fisiológicas ideais de crescimento do antagonista para uma otimização da taxa de produção de enzimas micolíticas. A faixa ideal de pH foi analisada pela medição do peso seco, em meio YG, nos pH's de 5 a 8. A secreção enzimática foi analisada através do crescimento em meio de indução contendo quitina 0,5% nos pH's 5,5 e 7,0. Analisou-se a resistência a fungicida, pela medição do peso seco do fungo, crescido em YG contendo Benlate nas concentrações de 0 a 10 mg mL<sup>-1</sup>. Determinou-se o peso seco nas temperaturas de 25 °C e 35 °C. Observou-se que a maior biomassa foi obtida em meio com pH 7. As maiores concentrações de proteína secretada e atividades enzimáticas foram obtidas em meio de indução contendo quitina no pH 5,5. Não foi detectada atividade de quitinase, mas observou-se atividade de glucanase e protease. Baixas concentrações de Benlate (1 mg mL<sup>-1</sup>) produziram 90 % de redução do peso seco, em relação ao controle, indicando sensibilidade elevada ao fungicida. A maior produção de peso seco foi determinado em torno de 25 °C. Estudos têm demonstrado o potencial de biocontrole usando *D. pulvinata* sob condições de campo. Entretanto, são necessários maiores conhecimentos em relação à fisiologia e aos mecanismos envolvidos no micoparasitismo deste potencial agente de biocontrole.

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biólogo, doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

**066 - AVALIAÇÃO DE DOIS PRODUTOS À BASE DE *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER E UM À BASE DE *SACCHAPOLYSPORA SPINOSA* NO CONTROLE DE *PLUTELLA XYLOSTELLA* (LEP.: PLUTELLIDAE) (Evaluation of two products based on *Bacillus thuringiensis* Berliner and one based on *Sacchapolyspora spinosa* in control of *Plutella xylostella* (Lep.: Plutellidae))**

Dias, D.G.S.<sup>1</sup>, Silva, S.F.<sup>2</sup>, Martins, E.S.<sup>3</sup>, Soares, C.M.S.<sup>4</sup>, Monnerat, R.G.<sup>5</sup>

Dois inseticidas biológicos à base de *Bacillus thuringiensis* (Dipel® e Xentari®) e um inseticida não sistêmico de origem biológica à base de um metabólito secundário de *Saccharopolyspora spinosa* (Tracer®) foram avaliados a campo contra a traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* (L.)(Lep.: Plutellidae), em cultivo de couve-flor. O experimento foi conduzido em Brazlândia, DF, Brasil, em uma gleba pertencente à área de produção regular de hortaliças durante os meses de julho a setembro de 2002. Foi utilizado o híbrido SilverStreak® (Asgrow). A lavoura foi conduzida segundo manejo indicado para a região, sem qualquer intervenção que não o controle da praga. O delineamento foi feito em quatro blocos ao acaso, com quatro tratamentos e quatro repetições. O parâmetro utilizado para determinar a aplicação dos produtos foi o limite de seis furos, produzidos pela praga, por planta. Estes furos foram avaliados semanalmente, nas quatro folhas centrais de três plantas escolhidas ao acaso em cada repetição. Este parâmetro foi adaptado do nível de dano econômico determinado para repolho e proporcionou redução de três aplicações de Tracer® e aplicações semanais dos produtos à base de *B. thuringiensis*. As áreas tratadas com Dipel® produziram 78,13% de cabeças comercializáveis, as tratadas com Xentari® possibilitaram uma produção de 76,56% de cabeças comercializáveis e as tratadas com Tracer® produziram 75,52% de cabeças comercializáveis. No controle houve perda de 34,47% da produção. Os resultados indicaram que apenas o inseticida biológico Dipel® diferiu significativamente da testemunha, quanto à produção, contudo, não diferiu significativamente dos outros Inseticidas. A utilização dos produtos aumentou a receita da cultura da couve-flor. O incremento de receita em relação à testemunha, proporcionado pela aplicação dos produtos por hectare, foi: Dipel® R\$ 2.505,20; Tracer® R\$ 1.960,80 e Xentari® R\$ 1.910,30. O valor de mercado dos produtos foi fator preponderante para as diferenças de receita.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, M.Sc., UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Bthek Biotecnologia Ltda.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



**067 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, MOLECULAR E MORFOLÓGICA DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EFICAZES CONTRA O BICUDO DO ALGODOEIRO (*ANTHONOMUS GRANDIS* BOHEMAN, 1843) (Biochemical, molecular and morphological characterization of *Bacillus thuringiensis* strains effective against to bolweevil *Anthonomus grandis* Boheman, 1843)**

Martins, E.S.<sup>1</sup>, Dias, D.G.S.<sup>2</sup>, Falcão, R.<sup>3</sup>, Gomes, A.C.M.M.<sup>4</sup>, Praça, L.B.<sup>5</sup>, Monnerat, R.G.<sup>6</sup>

*Bacillus thuringiensis* é uma bactéria de solo, gram-positiva anaeróbia facultativa e esporulante, que durante a esporulação produz um cristal composto por proteínas denominadas d-endotoxinas ou proteínas Cry. O cristal protéico de *B. thuringiensis*, em si, não tem ação tóxica. A sua dissolução em meio alcalino, resulta em moléculas de tamanhos variados, das quais algumas são tóxicas para insetos. Um dos insetos de possível controle pela ação do *B. thuringiensis*, é o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis*), uma das pragas de maior importância econômica para a cultura do algodão. Este coleóptero é uma praga de difícil controle, pois passa toda a sua vida larvária dentro de botões florais e maçãs do algodoeiro. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia dispõe de um banco de *Bacillus spp.*, onde estão armazenadas diferentes estirpes de *B. thuringiensis*. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar estirpes de *B. thuringiensis*, patogênicas contra o bicudo do algodoeiro. A partir dos ensaios realizados foram selecionadas seis estirpes que apresentaram melhores resultados de patogenicidade, determinados pelos valores apresentados na CL<sub>50</sub>. Foram usadas técnicas de SDS-Page, a fim de se conhecer a massa molecular das d-endotoxinas produzidas e de PCR para identificação dos genes *cry* conhecidos. A identificação morfológica dos cristais foi realizada através da microscopia eletrônica de varredura. Os perfis protéicos apresentaram variação em relação à estirpe padrão (*B. thuringiensis tenebrionis*), evidenciando a diferença entre as estirpes patogênicas para coleópteros. Dentre as seis estirpes avaliadas, algumas não apresentaram produtos de PCR ou apresentaram produtos não esperados, sugerindo que estas possam possuir genes diferentes dos atualmente descritos.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia .

<sup>2</sup> Eng. Agr., graduando, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 068 - COMPARAÇÃO DE ISOLADOS TEMPORAIS DO NUCLEOPOLIEDROVIRUS DE *ANTICARSIA GEMMATALIS* POR ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO DNA COM AS ENZIMAS *ECO* RI E *PST* I (Comparison of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus seasonal isolates by *Eco* RI and *Pst* I DNA restriction analysis)

Pereira, E.R.<sup>1</sup>, Siqueira, C.B.<sup>2</sup>, Moscardi, F.<sup>3</sup>, Souza, M.L.<sup>4</sup>

Anualmente uma área superior a 1,5 milhões de hectares de soja é tratada no Brasil com o Nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) também conhecido como baculovirus anticarsia, para o controle da lagarta da soja. Na natureza, os baculovirus apresentam populações heterólogas de vários variantes genotípicos indentificados pela presença de bandas submolares em perfis de restrição do DNA viral. Nesse trabalho foram estudados os isolados temporais do vírus AgMNPV coletados sucessivamente nas safras de 84/85, 85/86, 86/87, 87/88, 89/90, 90/91, 92/93, 93/94, 94/95, 95/96 e 96/97, na região de Londrina (Paraná) e o inoculo da safra inicial denominado AgMNPV LD 79. Esses isolados foram comparados por análise de restrição do DNA utilizando-se as enzimas *Eco* RI e *Pst* I. Na análise, como referência, foi utilizado o clone viral AgMNPV-2D cujo mapa físico encontra-se descrito na literatura (Johnson & Maruniak, 1989, J. Gen, Virol. 70: 1877-1883). Após clivagem com a enzima *Eco* RI duas bandas submolares (aprox. 25Kb e 5,5 Kb) foram observadas em todos os isolados, além daqueles dez fragmentos descritos para o protótipo AgMNPV2D. Foi também evidenciada uma banda submolar de aprox. 12 Kb e outra de aprox. 2 Kb nos isolados das diversas safras com exceção da safra 84/85. Digestão com a enzima de restrição *Pst* I também resultou em detecção de variações genéticas na população viral. A banda de 26 Kb, definida para o vírus AgMNPV-2D como banda A, esteve presente na maioria dos isolados mas ausente nas safras 85/86 e 93/94. Uma banda de 8.5Kb presente em quantidade submolar na safra LD79, foi detectada em altas concentrações (molar) na safra 84/85, e em concentrações submolares nas safras subsequentes. Além disso, uma banda de aproximadamente 3.2 Kb foi observada apenas no isolado 84/85 e outra de 10 Kb apenas no isolado 93/94. A recombinação é um importante mecanismo no aumento da variabilidade genotípica do vírus em populações de campo e os variantes aqui analisados são possivelmente recombinantes formados pela pressão de seleção causada pela aplicação do pesticida viral.

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Soja.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **069 - COMUNIDADES DE ARTRÓPODOS EM PLANTIOS DE SOJA CONVENCIONAL E ORGÂNICO (Arthropods communities in organic and conventional soybean crops)**

Pantaleão, D.C.<sup>1</sup>, Pires, C.<sup>2</sup>, Sujii, E.<sup>3</sup>, Schmidt, F.<sup>4</sup>

As práticas culturais, devido às perturbações que produz no agroecossistema, exercem um papel importante na estruturação das comunidades presentes nos cultivos. Partindo da hipótese que existem diferenças nas composições de espécies e densidades de artrópodos associados às plantas de soja cultivadas em diferentes sistemas de produção, estudou-se durante a safra de 2001/2002 as comunidades de artrópodes em três áreas de cultivo de soja: soja orgânica rodeada por cultura convencional, soja cultivada no sistema convencional e soja orgânica plantada próxima a área de vegetação natural na região do PAD-DF e do Gama (DF). O levantamento das espécies foi realizado através de quatro métodos de amostragem: armadilha de solo, armadilha de cor amarela, pano de batida e rede entomológica. Previamente através da confecção de curvas de rarefação foi estabelecido o número de amostras para cada método de coleta (esforço de coleta mínimo de 75% das morfoespécies observadas). Inicialmente, os indivíduos coletados estão sendo classificados de acordo com a ordem e depois de acordo com a morfoespécie. Nas três áreas estudadas foram encontrados organismos da classe Insecta pertencentes a dez ordens distintas, sendo que a ordem Coleoptera apresentou o maior número de morfoespécies. A classe Arachnida (Ordem Araneae) foi agrupada separadamente e tanto na área de soja orgânica rodeada por cultura convencional como na de soja orgânica plantada próxima à área de vegetação natural observou-se o mesmo número de morfoespécies dentro desta ordem. As áreas de soja orgânica rodeada por cultura convencional (308 espécies e 7.534 indivíduos) e soja cultivada no sistema convencional (333 espécies e 5.715 indivíduos) apresentaram maior riqueza de espécies e abundância de indivíduos em relação à área de soja orgânica plantada próxima à vegetação natural (área do Gama) (265 espécies e 3.540 indivíduos). Em geral para as principais ordens de insetos, foi observado número similar de indivíduos nas áreas de soja orgânica rodeada por cultura convencional e soja cultivada no sistema convencional. Os resultados não são conclusivos e o material coletado ainda está sendo analisado para o agrupamento das morfoespécies de acordo com o hábito alimentar, tipo de coleta e habitat dos indivíduos visando estabelecer o impacto das práticas agrícolas na estruturação da comunidade de insetos e aranhas.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 070 - ECOLOGIA DE POPULAÇÕES DE CRISOMÉLÍDEOS - PRAGA APLICADA AO USO DE SEMIOQUÍMICOS (Population ecology of pest-chrisomelid applied on use of semiochemicals)

Carvalho, R.M.V.<sup>1</sup>, Pires, C.<sup>2</sup>, Schmidt, F.<sup>3</sup>, Laumann, R.A.E.<sup>5</sup>, Sujii, E.<sup>4</sup>

No Brasil a “vaquinha” *Diabrotica speciosa* Germ. (Coleoptera: Chrisomelidae) é a espécie mais importante de um complexo que compreende pelo menos seis espécies do gênero *Diabrotica*, além de *Cerotoma arcuata*. Estes insetos são pragas importantes de numerosas culturas, incluindo milho, feijão, soja, batata, trigo, melão, pepino, couve, brócolis, espinafre e alface. O uso de semioquímicos usados como iscas atraentes associadas a um agente tóxico é uma alternativa de controle da praga em desenvolvimento na Embrapa. Visando gerar subsídios para o esse método de controle estão sendo realizados estudos bioecológicos como amostragens de insetos em diferentes regiões do Distrito Federal, desenvolvimento de metodologia para criação em laboratório e busca de inimigos naturais. As coletas de insetos iniciaram em abril de 2002 e continuam sendo realizadas em intervalos quinzenais. O objetivo dos levantamentos é determinar as espécies que ocorrem na região e a flutuação populacional ao longo do ano em diferentes culturas. Estão sendo visitadas propriedades nas áreas do PAD-DF e núcleos rurais do Rio Preto (APA do Descoberto), Brazlândia e Vargem Bonita. Foram coletados 1.414 espécimens que foram separados em 14 morfoespécies, montados em alfinete entomológico e enviadas para identificação no Smithsonian Museum pelo Dr. Alexander Konstantinov. Um grupo de aproximadamente 160 indivíduos da espécie *D. speciosa* foi mantido em gaiolas de oviposição. Os ovos estão sendo coletados periodicamente e as larvas estão sendo criadas em quatro dietas diferentes (dieta artificial para os lepidópteros *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis*, dieta artificial para o coleóptero *Anthonomus grandis* e dieta natural à base de raízes de milho) visando estabelecer uma colônia para uso experimental. A dieta natural à base de raízes de milho tem apresentado os melhores resultados (19% de sobrevivência de larvas). Adultos trazidos do campo e encontrados mortos na gaiola estão sendo separados, sexados e mantidos em placas fechadas para observação da ocorrência de inimigos naturais. Até o momento foi observada a emergência de uma mosca da ordem Díptera, família Tachinidae, parasita de adultos de *D. speciosa*. Foram estabelecidas metodologias de amostragens para as diferentes culturas e iniciada a criação de *D. speciosa* em laboratório.

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D, Universidade Católica de Brasília.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ph.D, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 071 - IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* EFETIVAS CONTRA LEPIDÓPTEROS (Identification of effective strains of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran)

Batista, A.C.<sup>1</sup>, Barros, P.C.<sup>2</sup>, Praça, L.B.<sup>3</sup>, Monnerat, R.G.<sup>4</sup>

Do ponto de vista técnico, econômico e ambiental, o emprego de *Bacillus spp* no controle biológico de pragas constitui-se em uma importante ferramenta. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia dispõe de um banco de germoplasma de *Bacillus* entomopatogênicos isolados a partir de amostras de solo, água e insetos oriundos de diferentes regiões do Brasil. Estes bacilos estão armazenados e são submetidos a diversos testes com o intuito de encontrar e caracterizar estirpes mais tóxicas ou que produzam toxinas diferentes das já existentes e que possam ser utilizadas na produção de bioinseticidas ou plantas transgênicas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo identificar estirpes de *B. thuringiensis* tóxicas à *A. gemmatalis* (lagarta da soja) e *S. frugiperda* (lagarta do cartucho do milho). Na primeira etapa do trabalho, 303 estirpes de *Bacillus spp* foram caracterizadas morfológicamente através de microscopia de contraste de fase, determinando-se que 79 eram *Bacillus cereus* e 224 eram *B. thuringiensis*. Em uma segunda etapa, a patogenicidade dos *B. thuringiensis* foi testada contra as lagartas acima mencionadas, através de bioensaios. Das 224 estirpes testadas, 28 apresentaram toxicidade para *A. gemmatalis* e 02 apresentaram atividade dupla, para *A. gemmatalis* e *S. frugiperda*. Essas estirpes poderão ser utilizadas para formatação de um bioinseticida para o controle desses insetos.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, bolsista de aperfeiçoamento da Fundação Dalmo Giacometti.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 072 - INFLUÊNCIA DA IDADE DE CONÍDIOS NO ARMAZENAMENTO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS (Influence of conidial age on the storage of entomopathogenic fungi)

Melo, D.F.<sup>1</sup>, Magalhães, B.P.<sup>2</sup>, Frazão, H.<sup>3</sup>, Faria, M.R. de<sup>4</sup>

O fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, mostra-se promissor no controle de gafanhotos. A impossibilidade de armazenamento a longo prazo (> 12 meses) de bioinseticidas à base de fungos, tem limitado seu potencial mercadológico. Conídios com reduzido teor de água têm vida útil superior àquela de conídios frescos. Outro parâmetro que pode estar associado à vida útil dos bioinseticidas, mas ainda carente de pesquisas, é a idade dos conídios a serem armazenados. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da idade de diferentes fungos (*M. anisopliae* var. *acridum*, *Sporothrix insectorum* e *Beauveria bassiana*) na viabilidade conidial a médio e longo prazos. Os estudos foram iniciados com *M. anisopliae* var. *acridum*, (CG 423) cultivado em arroz parboilizado cozido em sacolas plásticas. As sacolas plásticas foram abertas aos 7 dias após inoculação para permitir uma maior secagem de modo a facilitar o processo de colheita dos conídios. A colheita foi realizada através de peneiramento aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação em arroz. A secagem dos conídios foi feita após incubação em dessecador com solução saturada de NaOH por 72 horas e, em seguida, os conídios foram empacotados a vácuo. O armazenamento de conídios secos foi realizado a 4 e 25 °C. Imediatamente após a colheita por peneiramento e após a secagem em dessecador, o teor de água e a viabilidade dos conídios foram determinados. O teor de água foi estimado através de método gravimétrico, e a viabilidade conidial através da contagem dos conídios germinados em meio de cultura sólido. A maturação dos conídios por até 28 dias não afetou a viabilidade que foi de 98, 97, 96, 95% aos 7, 14, 21 e 29 dias, respectivamente. Os teores iniciais de água dos conídios de diferentes idades foram aproximadamente 70% (7 dias), 20% (14 dias), 10% (21 dias) e 10% (28 dias) O teor final de água dos conídios submetidos à secagem em dessecador, independente da idade, manteve-se próximo de 6%. Os resultados preliminares após um mês de armazenamento demonstraram que, independente da temperatura, a viabilidade dos conídios secos foi superior a 95% para conídios com 7, 14, 21 ou 28 dias de idade. As avaliações terão continuidade nos próximos 12 meses.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Administradora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 073 - INFLUÊNCIA DO TEOR DE ÁGUA NO ARMAZENAMENTO DO FUNGO ENTOMOPATOGÊNICO *METARHIZIUM ANISOPLIAE* (Influence of water content on the storage of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*)

Chagas, M.J.L.<sup>1</sup>, Magalhães, B.P.<sup>2</sup>, Frazão, H.<sup>3</sup>, Faria, M.R. de<sup>4</sup>

No Brasil, o fungo *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* destaca-se no combate às cigarrinhas (Homoptera: Cercopidae), pragas-chave em pastagens e em cana-de-açúcar. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do teor de água (TA) na viabilidade conidial e na virulência deste fungo. Os estudos estão sendo conduzidos com o isolado CG858 (=CB-10), cultivado em arroz parboilizado cozido em sacolas plásticas. A colheita foi realizada através de peneiramento aos 10 dias após a inoculação em arroz. A secagem dos conídios foi feita de diferentes maneiras: A) dessecador com solução saturada de NaOH por tempo integral; B) dessecador com solução saturada de NaOH por 3 dias, seguido de incubação em placa de Petri vedada com filme plástico; C) mistura com sílica gel não-indicadora; D) mistura com sílica gel indicadora na proporção de 1:1, com incubação em placa de Petri vedada com filme plástico; e, E) testemunha (conídios frescos armazenados conforme em D, mas sem a presença de sílica gel). O armazenamento dos conídios foi realizado à temperatura ambiente. Imediatamente após a colheita por peneiramento e por ocasião das medições da viabilidade conidial, o TA dos conídios foi determinado através de método gravimétrico. Na avaliação realizada 4 meses após o armazenamento, verificou-se que a viabilidade conidial nos tratamentos A, B, C, D e E foi, respectivamente, de 75,4, 50,6, 44,7, 13,3 e 47,8%. O TA aos 4 meses nos tratamentos A, B, C, D e E foi, respectivamente, de 4,0, 6,1, 20,4, 7,2 e 18,9%. Ou seja, houve uma relação inversa entre a viabilidade dos conídios e TA. Na avaliação preliminar do efeito do TA na virulência do isolado CG858, não foram constatadas diferenças entre o fungo seco (TA = 9%) e o fungo fresco (TA = 53,3%). Os dados demonstram a importância da secagem dos esporos na vida útil dos mesmos.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Administradora, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 074 - ISOLAMENTO DE NOVAS ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* E DETERMINAÇÃO DE SUA PATOGENICIDADE CONTRA MOSQUITOS (Isolation of new strains of *Bacillus thuringiensis* and determination of their pathogenicity against mosquitoes)

Barros, P.C.<sup>1</sup>, Batista, A.C.<sup>2</sup>, Praça, L.B.<sup>3</sup>, Dias, D.G.S.<sup>4</sup>, Monnerat, R.G.<sup>5</sup>

Os insetos são um dos maiores responsáveis por perdas de produção na área agrícola e pela transmissão de doenças na área de saúde humana e animal. A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável e bioinseticidas formulados à base de *Bacillus thuringiensis* vem apresentando um resultado satisfatório no controle de dípteros, lepidópteros e coleópteros. Uma das vantagens do emprego desta bactéria é a sua ação restrita a insetos-alvo, não afetando o ser humano e não danificando o meio ambiente. *B. thuringiensis* possui uma ampla distribuição geográfica, sendo facilmente encontrado em solo, água e insetos mortos. Cerca de 50.000 estirpes desta bactéria já foram identificadas e laboratórios do mundo todo vêm trabalhando na tentativa de descobrir novas estirpes que possuam novas toxinas. O objetivo deste trabalho foi isolar novas estirpes de *B. thuringiensis* de solo brasileiro e de testar sua patogenicidade contra *Aedes aegypti* (vetor da dengue e febre amarela) e *Culex quinquefasciatus* (vetor de filaríoses, inclusive da elefantíase). Foram coletadas 370 amostras de solo, de água e de insetos mortos, tendo sido isoladas 225 estirpes. Dentre essas, 35 apresentaram toxicidade para *A. aegypti* e 39 para *C. quinquefasciatus*. Algumas delas apresentaram perfil protéico semelhante ao *B. thuringiensis israelensis*, utilizado como padrão e relatado como uma das estirpes mais tóxicas contra dípteros. A toxicidade dos isolados foi também avaliada para a lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*) e para a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*), sendo que para primeira, 14 estirpes foram tóxicas e para a segunda 02 estirpes.

---

<sup>1</sup> Bióloga, aperfeiçoamento, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., graduando, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



**075 - LEVANTAMENTO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PROVENIENTES DO ESTADO DE GOIÁS EFETIVAS CONTRA DÍPTEROS (Survey of *Bacillus thuringiensis* strains effective against dipteran, from the Goiás state)**

Batista, A.C.<sup>1</sup>, Praça, L.B.<sup>2</sup>, Luz, C.<sup>3</sup>, Monnerat, R.G.<sup>4</sup>

O combate aos mosquitos *Aedes aegypti* transmissor da dengue e da febre amarela, e *Culex quinquefasciatus*, transmissor de filariose, tem sido realizado através de inseticidas químicos. O uso constante destes produtos pode causar danos ao ambiente, além de propiciar o surgimento de populações resistentes. Um dos métodos alternativos que pode ser empregado para o controle destes mosquitos é a utilização de bioinseticidas bacterianos à base de *Bacillus thuringiensis*. Esta bactéria gram positiva produz, durante seu processo de esporulação, inclusões cristalinas que contém proteínas denominadas delta-endotoxinas, responsáveis pela toxicidade da bactéria. O *B. thuringiensis* está amplamente distribuído na natureza e laboratórios em todo o mundo procuram novas estirpes que possam ser utilizadas como base para formatação de novos produtos. O objetivo deste trabalho foi o isolamento de estirpes de *B. thuringiensis* efetivas contra mosquitos, provenientes do estado de Goiás. 207 estirpes foram isoladas e avaliadas quanto à patogenicidade contra larvas de *A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*. Apenas a estirpe CHAP I 95 apresentou 100% de toxicidade contra as larvas dos dois mosquitos. Esta estirpe poderá ser utilizada na fabricação de um bioinseticida.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biólogo, Ph.D., Universidade Federal de Goiânia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 076 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA INTERAÇÃO *DICYMA PULVINATA* X *MICROCYCLUS ULEI* EM SERINGUEIRA (Scanning Electronic Microscopy of the Interaction *Dicyma pulvinata* Vs *Microcyclus ulei* in rubber tree)

Santos, C.E.E.<sup>1</sup>, Mello, S.C.M. de<sup>2</sup>

Dentre as alternativas de controle mais promissoras para o mal-das-folhas da seringueira, causado pelo fungo *Microcyclus ulei*, destaca-se o controle biológico através do fungo *Dicyma pulvinata* (= *Hansfordia pulvinata*). Vários estudos têm demonstrado a ação deste micoparasita contra o patógeno, impedindo sua esporulação em condições de campo. Observações sobre o processo de interação entre *D. pulvinata* e *M. ulei* são necessárias para determinar os mecanismos envolvidos, possibilitando, assim, o desenvolvimento de um programa efetivo de controle biológico da doença. Para isso, foi feita a observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV), valendo-se de seu alto poder de resolução. Mudanças de seringueira foram inoculadas com o patógeno e, após o surgimento dos sintomas da doença, inoculou-se, sobre as lesões, com o auxílio de pulverizador, suspensão de esporos de *D. pulvinata*, preparadas a partir de colônias do fungo obtidas em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). As plantas inoculadas permaneceram em câmara úmida por 24 h e, a partir daí, iniciaram-se coletas periódicas de amostras das folhas, as quais foram mantidas submersas em fixador. Após secagem ao ponto crítico, as amostras foram levadas para observação por microscopia eletrônica de varredura. Por meio das imagens produzidas ao MEV, foi observado o desenvolvimento das estruturas e interação entre os dois fungos utilizados no presente bioensaio, constatou-se a interação patógeno X micoparasita, com ação antagônica de *D. pulvinata* sobre *M. ulei*, indicando o potencial de *D. pulvinata* como agente de controle biológico para o mal-das-folhas da seringueira.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 077 - PROSPECÇÃO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* NO CONTROLE DE LARVAS DE *CULEX QUINQUEFASCIATUS* E *AEDES AEGYPTI* (Prospection of *Bacillus thuringiensis* strains to control of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* larvae)

Dias, D.G.S.<sup>1</sup>, Silva, S.F.<sup>2</sup>, Falcão, R.<sup>3</sup>, Martins, E.S.<sup>4</sup>, Soares, C.M.S.<sup>5</sup>, Monnerat, R.G.<sup>6</sup>

*C. quinquefasciatus* e *A. aegypti* são mosquitos antropofílicos e vetores de doenças como filariose, dengue e febre amarela. No último verão foram registrados mais de 750.000 casos de dengue no Brasil. O combate a esses vetores tem sido realizado com produtos químicos, que além de poluírem o ambiente podem propiciar o aparecimento de populações de insetos resistentes. Uma alternativa viável é a utilização de produtos à base de *B. thuringiensis* (Bt). Esta bactéria, além de ser altamente específica para controlar insetos, é inócua a mamíferos e não polui o ambiente. Neste ano de 2002, 360 toneladas de bioinseticidas Bt serão utilizados pela Funasa (Fundação Nacional de Saúde) para o controle de larvas do *A. aegypti*, em regiões onde foi detectada presença de mosquitos resistentes ao produto Temephos. Cabe salientar que no Brasil não há nenhuma empresa produzindo este tipo de produto, havendo, portanto necessidade de importação. A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia possui um banco de estirpes de *B. thuringiensis* oriundas de diferentes regiões do país. O objetivo deste trabalho foi à prospecção de estirpes brasileiras patogênicas a mosquitos, visando a disponibilização de novos ingredientes ativos para formatação de produtos à base de Bt, com alta eficiência e especificidade. Dentre 210 estirpes, 6 foram selecionadas por apresentarem os menores valores de  $CL_{50}$ , sendo 4 ativas contra *A. aegypti* e 2 com patogenicidade dupla (*A. aegypti* e *C. quinquefasciatus*). Como padrão foi utilizada a estirpe *B. thuringiensis israelensis* IPS-82, utilizada nos produtos comerciais. Estas 6 estirpes foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura e caracterizadas quanto à composição protéica e presença de genes codificadores de toxinas Bt ativas contra dípteros. Ainda que as estirpes sejam altamente tóxicas, nenhuma apresentou  $CL_{50}$  menor o padrão. Todas elas apresentaram cristais redondos, que são relacionados com a toxicidade a mosquitos. Os perfis protéicos foram semelhantes apenas quanto a presença de uma proteína de aproximadamente 130 kDa, entretanto, não foi detectada a presença dos genes codificadores de proteínas mosquitocidas. Essas estirpes poderão ser utilizadas em novos bioinseticidas Bt, pois são altamente eficazes e provavelmente portadoras de toxinas diferentes das já descritas.

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, M.Sc., UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ph.D., Bthek Biotecnologia Ltda.

<sup>6</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 078 - VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE MOSCA BRANCA (*BEMISIA TABACI*) PRESENTES EM REGIÕES DO BRASIL (Genetic variability of whitefly (*Bemisia tabaci*) populations occurring in Brazil)

Queiroz, P.R.<sup>1</sup>, Lago, W.N.M.<sup>2</sup>, Oliveira, M.R.V.<sup>3</sup>, Lima, L.H.C.<sup>3</sup>

As moscas brancas do gênero *Bemisia* estão entre as pragas mais prejudiciais da agricultura moderna, causando perdas em culturas comerciais. Os danos são causados tanto diretamente (pragas) quanto indiretamente (vetores de vírus). No Brasil, foram identificados dois biótipos: BR e B. Contudo, a identificação dos biótipos por caracteres morfológicos da pupa, não é suficiente, sendo necessária a utilização de marcadores moleculares (RAPD), os quais fornecem uma estratégia complementar para a identificação e o estudo de variações genéticas das populações. Em função da disponibilidade de uso de uma técnica molecular como o RAPD, esse trabalho teve como objetivos caracterizar populações de *B. tabaci* biótipo B ocorrendo em regiões do Brasil e comparar as características genéticas entre estas populações que foram coletadas em várias culturas. Os indivíduos das populações coletadas em culturas de várias regiões do país foram analisadas por RAPD com 10 primers. Os padrões de bandas produzidos foram comparados, observando-se diferenças entre os biótipos de *B. tabaci*. A análise dos padrões de bandas produzidos por RAPD pelas amostras de mosca branca, provenientes das regiões do Brasil e dos Estados Unidos, permitiu organizar as populações em 5 agrupamentos principais. Em uma segunda análise molecular das populações provenientes de novas áreas, distinguiu-se padrões de bandas diferentes entre as populações analisadas, permitindo organizar as populações em 6 agrupamentos principais. Os resultados observados fornecem indícios de que separações por cultura e distribuição geográfica possam estar ocorrendo, indicando que a diferenciação das populações de mosca branca possa estar associada com a cultura predada. Estudos bioquímicos e moleculares de *B. tabaci* têm fornecido substancial evidência no que diz respeito ao grau de polimorfismo entre populações de distintas regiões geográficas e/ou hospedeiros. Esta evidência é corroborada pela existência de biótipos. Maiores estudos poderão ser conduzidos para se obter dados que possam ser aplicados na identificação e no monitoramento destes biótipos específicos em campo, assim como, na averiguação dos fatores que são responsáveis pela sua distribuição geográfica.

---

<sup>1</sup> Biólogo, doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 079 - VIABILIDADE DE OVOS DE *EUSCHISTUS HEROS* PARA PARASITISMO POR *TELENOMUS PODISI* APÓS CRIOPRESERVAÇÃO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO (Viability of *Euschistus heros* eggs for parasitism by *Telenomus podisi* after criopreservation in liquid nitrogen)

Pantaleão, D.C.<sup>1</sup>, Moreira, R.O.<sup>2</sup>, Santos, I.R.I.<sup>3</sup>, Sujii, E.<sup>4</sup>, Pires, C.<sup>5</sup>

*Telenomus podisi*, microhimenópteros da família Scelionidae, são importantes agentes de controle dos percevejo praga da soja, *Euschistus heros* (Heteroptera:Pentatomidae). A Embrapa Soja desenvolveu um programa de controle biológico dos percevejos através de liberações massais destas vespínhas na época da floração da soja (5.000 adultos /hectare). Porém, uma das dificuldades para a ampliação deste programa é a criação massal dos parasitóides em laboratório, já que estes insetos são criados obrigatoriamente nos ovos de seus hospedeiros. Uma maneira prática e viável de contornar esta dificuldade seria armazenar ovos dos percevejos e durante a safra da soja expor estes ovos aos parasitóides. Assim os ovos parasitados poderão ser enviados aos produtores para a liberação em campo. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo de criopreservação para ovos de percevejos-praga da soja. A criopreservação compreende a conservação de material biológico à temperatura do nitrogênio líquido, à -196°C. Massas de ovos frescos de *E. heros* foram embalados em papel alumínio e em sacos plásticos duplos, vedados a quente (100 ovos/embalagem) e mergulhados diretamente em nitrogênio líquido por 12 horas. Em seguida massas de ovos foram descongeladas em banho a 25 ± 2°C e 35 ± 2°C e oferecidas ao parasitismo por *T. podisi*. Observou-se o parasitismo e eclosão de ninfas nos ovos do percevejo criopreservados em nitrogênio líquido. Os ovos embalados em papel alumínio apresentaram 33,0% de parasitismo enquanto que apenas 17,2% daqueles embalados em plástico foram parasitados. Estes valores foram menores aos observados em ovos frescos, que apresentaram 38,4% de parasitismo. Os ovos descongelados à temperatura ambiente (25 ± 2°C) apresentaram 43,5% de parasitismo, valor estatisticamente igual àquele verificado em ovos descongelados a 35 ± 2°C. Os resultados obtidos com estes experimentos indicam que os ovos criopreservados em nitrogênio líquido mantêm viabilidade e apresentam condições adequadas para o parasitismo por *T. basalis*. Entretanto, esta metodologia precisa ser aperfeiçoada para que se aumente a porcentagem de ovos viáveis.

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UnB, CNPq.

<sup>2</sup> Nível médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## ETNOBIOLOGIA

### 080 - CULTIVO DE ROÇAS NA ALDEIA PEDRA BRANCA, TOCANTINS - UMA VISÃO ETNOBIOLÓGICA (Indigenous field crops in Pedra Branca village, TO - an ethnobiological view)

Rancan, D.C.<sup>1</sup>, Alves, R.B.N.<sup>2</sup>, Kraho, A.Y.<sup>3</sup>, Kraho, O.K.<sup>3</sup>, Kraho, J.M.<sup>3</sup>, Zarur, S.B.B.C.<sup>4</sup>, Dias, T.A.B.<sup>5</sup>

Os Krahô, da família lingüística Jê, habitam uma área de Cerrado ao norte do Tocantins e têm como fonte de subsistência a agricultura, a caça, a pesca e a coleta de frutos silvestres. Possuem complexo sistema de metades que refletem sua organização social, como por exemplo, *wakmeye|katameye* no governo da aldeia na estação seca e chuvosa. Os Krahó desenvolveram formas peculiares de manejo do Cerrado a partir de uma matriz cultural e simbólica, na qual as categorias são construídas. O trabalho identificou alguns elementos etnobiológicos relacionados à agricultura Krahô. Adotou-se a observação participante, as entrevistas semi-estruturadas e o olhar e o ouvir disciplinados, como abordagem metodológica. A pesquisa vem sendo desenvolvida na aldeia Pedra Branca, com aproximadamente 300 habitantes. Os Krahô costumam plantar suas roças de coivara fora da aldeia que podem ser vistas como uma forma de mapeamento do ambiente, servindo como referência para a leitura da área. A escolha do local para fazer a roça está relacionada a alguns critérios como, relações de parentesco e tipo de solo. O *piepej* ou “terra fresca” é solo considerado ótimo para o plantio e está associado a presença de vegetação nativa, a “barraria” é um solo bom mas considerado mais fraco que a “terra fresca”. A ausência do tipo de vegetação classificada pelos nativos como capoeira seria um dos pontos importantes também na escolha da área. Para o plantio de arroz, batata e inhame “a terra de areia com barraria” é boa. Já para o plantio de banana e mamão “a terra boa é a barraria pura, sem areia”. A derrubada do mato ou “broca” ocorre nos meses de junho a julho, seguida da queimada nos meses de agosto a setembro e, geralmente, o plantio inicia-se em outubro. Após um período de 2 a 4 anos, as roças transformam-se em unidades produtivas secundárias, a capoeira ou roça antiga, fonte de alimentos como cana-de-açúcar, banana, mamão, mandioca. Os quintais parecem funcionar como outro tipo de unidade produtiva para pimenta, urucum, jenipapo, gengibre, tingui e algumas fruteiras. Neste caso o cultivo é na aldeia, próximo da casa e os produtos aí plantados são de grande valor para o grupo.

<sup>1</sup> Antropólogo, graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Especialista Krahô, Aldeia Pedra Branca.

<sup>4</sup> Antropóloga, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **081 - POVO INDÍGENA KRAHÔ: DEMANDAS POR GERMOPLASMA VEGETAL (Indigenous Krahô people: the need for plants germplasm)**

Camargo, W.R.<sup>1</sup>, Souza, L.E.<sup>2</sup>, Dias, T.A.B.<sup>3</sup>, Goes, M.G.<sup>4</sup>, Souza, C.C.<sup>5</sup>, Correia, J.R.<sup>6</sup>, Costa, I.R.S.<sup>7</sup>

O povo Krahô é composto de cerca de 2.000 indígenas, distribuídos em 16 aldeias nos municípios de Itacajá e Goiatins/TO. O sistema agrícola praticado é baseado na agricultura de coivara. Atualmente, o cultivo no entorno das casas vem assumindo importância significativa. A identificação de demandas de introdução e reintrodução de germoplasma vegetal da comunidade Krahô, atividade prevista em Contrato de Cooperação Técnica da Embrapa com a Associação União das Aldeias Krahô - Kapèy, foi realizada, através de entrevistas com 38 informantes em 4 aldeias sendo: Santa Cruz (21 informantes), Bacurí (2), Rio Vermelho (7), Cachoeira (8). Estes levantamentos foram realizados em três viagens, uma no ano 2000 e duas no ano 2001. As informações anotadas por diversos pesquisadores foram organizadas o que permitiu relacionar 12 produtos, em ordem decrescente de demanda por germoplasma: mandioca, batata-doce, café, inhame, laranja, pimenta - do - reino, milho, abóbora, coco, cebola, abacate e arroz. A demanda por germoplasma de espécies tradicionalmente cultivados como a batata-doce, inhame, mandioca entre outros, pode ser uma indicação de que a comunidade já vem sentindo a perda de variedades destas espécies. Uma das causas dessa perda, no caso desta comunidade, pode ser atribuída à política adotada pelos órgãos governamentais em meados do século passado, quando todo alimento era fornecido aos índios, e pela introdução, mais tarde, da monocultura do arroz. Toda ação de reintrodução de germoplasma na comunidade Krahô deve ser fundamentada em estudos prévios, uma vez que a este já existe um conhecimento tradicional associado. Já a introdução de germoplasma deve ser acompanhada do conhecimento necessário ao seu cultivo e manejo.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Uespi, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Fisiologista, Ph.D., Embrapa Serviço de Comunicação para Transferência de Tecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Florestal, M.Sc., UnB. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Cerrados.

<sup>7</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **082 - RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS CULTIVADOS NOS QUINTAIS DA COMUNIDADE INDÍGENA KRAHÔ (Genetic Resources from Krahô Indigenous Community Back Yard)**

Souza, L.E.<sup>1</sup>, Camargo, W.R.<sup>2</sup>, Dias, T.A.B.<sup>3</sup>, Goes, M.G.<sup>4</sup>, Souza, C.C.<sup>5</sup>, Correia, J.R.<sup>6</sup>, Costa, I.R.S.<sup>7</sup>

Os índios Krahô são um grupo Timbira da família lingüística Jê, tronco Macro-Jê, com cerca de 2.000 pessoas reunidas em 16 aldeias, que ocupam uma área de 320.000 ha no Nordeste do Estado do Tocantins, municípios de Itacajá e Goiatins. É um povo originalmente nômade e que teve seu território demarcado na década de 40. Após este período, o surgimento, fusão e extinção de aldeias obedece a um processo bastante dinâmico. Contudo, observa-se mais recentemente um processo de sedentarização das aldeias, beneficiado pela instalação gradual de infra - estrutura (escola, enfermaria, etc.). Neste contexto, o plantio de espécies no entorno das casas, em quintais, vem a cada ano, assumindo maior importância. O objetivo deste trabalho foi organizar as informações dos levantamentos das espécies cultivadas nos quintais Krahô. Os dados foram obtidos em três expedições, uma no ano 2000 e duas em 2001, levantando informações de 66 quintais de 6 aldeias Krahô sendo: Santa Cruz (22 quintais), Bacurí (2), Rio Vermelho (9), Cachoeira (13), Morro do Boi (11) e Serra Grande (9). Estas informações foram obtidas em cada quintal, através de entrevistas semi-estruturadas com os indígenas, moradores das casas, levantando as espécies cultivadas. Após cada entrevista os técnicos verificavam a ocorrência de cada espécie cultivada. O conjunto de dados anotados foi triado e organizado o que permitiu identificar 85 espécies cultivadas. Destacam-se como as mais presentes nos quintais estudados, em ordem decrescente: manga, cajú, abóbora, laranja, urucum e a mandioca.

---

<sup>1</sup> Bióloga, Uespi, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Serviço de Comunicação para Transferência de Tecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Florestal, M.Sc., UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Cerrados.

<sup>7</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## INFORMÁTICA

### 083 - BANCO DE DADOS DOS “FUNGOS RELATADOS EM PLANTAS NO BRASIL” (Database of plant fungi registered in Brazil)

Rodrigues Jr., A.J.G.<sup>1</sup>, Barros<sup>6</sup>, P.C.<sup>2</sup>, Mendes, M.A.S.<sup>3</sup>, Santos, C.E.N.<sup>4</sup>, Melo, L.A.M.P. de<sup>5</sup>, Hiragi, G.O.<sup>7</sup>, Urban, A.F.

A base de dados “Fungos Relatados em Plantas no Brasil” contém aproximadamente 4.700 fungos associados a 3.000 espécies de plantas. A referida base de dados apresenta informações sobre a distribuição geográfica do fungo por Estado ou região, nome da doença, sintomas, ocorrência ou não em sementes e referência bibliográfica abreviada. A literatura utilizada para a composição deste trabalho foi principalmente o livro “Fungos em Plantas no Brasil” (Mendes *et al.*, 1998), outros livros técnicos e periódicos nacionais e internacionais especializados, cobrindo informações a partir de 1933 até 2001. Esta base de dados dá início a um mapeamento de fungos fitopatogênicos no território nacional, definindo as regiões onde eles ocorrem. É importante mencionar que estas informações darão grande suporte ao trabalho de inspeção e quarentena vegetal, realizado pelo Laboratório de Quarentena Vegetal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia assim como servirão de apoio ao Ministério da Agricultura na elaboração das listas de Pragas quarentenárias A2 e aquelas não quarentenárias regulamentadas. Os nomes científicos, os nomes comuns e as famílias das plantas hospedeiras foram revisadas nas publicações Index Kewensis (1997), Mabbekley (1990), Joly (1976), Willis (1973), Schultz (1963) e Corrêa (1926-1978) e pelo site International Plant Name Index (<http://www.ipni.org>). A nomenclatura dos fungos foi revisada e atualizada, pelo IndexFungorum (<http://www.indexfungorum.org>), produzido pelo CAB Bioscience.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UPIS, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Florestal, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Ciência da Computação, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Ciência da Computação, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>7</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **084 - DESENVOLVIMENTO DA HOME PAGE PARA DIVULGAÇÃO DO LABORATÓRIO DE NEMATOLOGIA DO CENARGEN, E SEUS SERVIÇOS (Development of home page to divulge the Nematological Laboratory of Cenargen, and its activities)**

Nascimento, G.A.M.<sup>1</sup>, Rissoli, V.R.V.<sup>2</sup>, Tenente, R.C.V.<sup>3</sup>

No ano de 1981 foi criado o Laboratório de Nematologia na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia de Brasília. Desde então as pesquisas, análises e os acompanhamentos dos deslocamentos internos de material nacional, além das introduções de material importado ao Brasil, na área da Nematologia, passou a ser realizados por este Laboratório. Evoluindo as suas atividades continuamente no âmbito nacional, este Laboratório conquistou grande importância no cenário da agricultura nacional, assumindo responsabilidades dentro de todo o país, assim como internacionalmente. Com o aumento dos serviços e atividades nesta área, o Laboratório de Nematologia iniciou a disponibilização em meios alternativos na rede mundial de computadores (INTERNET). O desenvolvimento de um ambiente na INTERNET (site) começou a ser efetivado com recursos computacionais simples que iriam avançando de acordo com as necessidades do Laboratório e de seus usuários. Portanto, um projeto de maior amplitude foi idealizado e veio a ocorrer em três fases importantes na área computacional: levantamento dos conteúdos/serviços; desenvolvimento de uma interface amigável nas páginas usadas pelos usuários do Laboratório; e a programação computacional necessária para este ambiente. Na primeira fase foram definidos e estruturados quais seriam os conteúdos e os seus relacionamentos (*links*). Na segunda fase foi criado o visual do ambiente (site), objetivando a navegabilidade fácil e flexível aos visitantes. A última fase preocupou-se com a programação computacional necessária para este ambiente, onde foram utilizados os recursos de interface HTML, a tecnologia ASP permitindo a interação com os serviços disponibilizados, além das ferramentas de programação Flash e Java Script. Assim, devido ao grande poder de comunicação da INTERNET, a criação de um ambiente interativo e organizado para o Laboratório de Nematologia, tornou-se uma meta importante aos interesses dos profissionais desta área, agilizando e contribuindo com os esforços das pesquisas e estudos científicos.

---

<sup>1</sup> Ciência da Computação, graduando, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Analista de Sistemas, M.Sc., Universidade Católica de Brasília.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 085 - DESENVOLVIMENTO DE BANCO DE DADOS DE MODELOS TRIDIMENSIONAIS DE $\delta$ -ENDOTOXINAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* (Delta-endotoxins structure database)

Silveira, A.R.<sup>1</sup>, Martins, N.F.<sup>2</sup>, Batista, J.A.N.<sup>3</sup>, Fragoso, R.R.<sup>4</sup>, Dias, O.B.N.<sup>5</sup>, Grossi-de-Sá, M.F.<sup>6</sup>

As  $\delta$ -endotoxinas (ou proteínas Cry) são um grupo de proteínas inseticidas de alto interesse biotecnológico produzidas por *Bacillus thuringiensis*. Em sua maioria, as  $\delta$ -endotoxinas são específicas para as ordens Lepidóptera, Díptera e Coleóptera. As  $\delta$ -endotoxinas são sintetizadas como protoxinas com peso molecular entre 70 e 135 kDa que formam inclusões cristalinas de aproximadamente 1 $\mu$ m. Uma vez ingerida pelo hospedeiro, a toxina é ativada pelas proteases contidas em seu intestino e as protoxinas ativas então ligam-se aos receptores no epitélio intestinal e formam os poros de diâmetro de aproximadamente 10-20 ângstrons. Assim, o inseto é conduzido à morte por inanição e septicemia. Estudos de modelagem molecular até agora realizados não conseguiram estabelecer claramente a geometria dos poros de membrana nem tampouco detalhes sobre o seu mecanismo de ação. As estruturas tridimensionais das toxinas Bt conhecidas constam em apenas 5 arquivos no Protein Data Bank, sugerindo a dificuldade de obtenção de dados experimentais sobre a estrutura 3D das toxinas. Contudo, o banco de dados de seqüências nucleotídicas possui aproximadamente 100 genes. A estrutura 3D possui três domínios: o domínio I tóxico com um feixe de 6 alfa-hélices, o domínio II beta ao redor de um núcleo hidrofóbico e o domínio III com um sanduíche beta. O objetivo deste trabalho é a construção de um banco de dados de modelos tridimensionais validados de  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. As metodologias em uso para a construção do banco são: modelagem molecular por homologia, "treading" e alinhamentos múltiplos. Todos os modelos são construídos usando o programa MODELLER e validados pelos programas PROCHECK e PROSA II. O uso do banco de dados permitirá estudos detalhados dessas toxinas, como ação no hospedeiro, alteração da atividade e estabilidade, etc. O Banco de Dados conta com 50 modelos de  $\delta$ -endotoxinas de diferentes famílias.

---

<sup>1</sup> Med. Vet., graduanda, UNIPLAC, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biólogo, D.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Mestrando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## INTERCÂMBIO E QUARENTENA

### 086 - ANTRACNOSE EM *DRACAENA FRAGANS* NO DISTRITO FEDERAL (Antracnose on *Dracaena fragans* in Distrito Federal)

Rodrigues Jr., A.J.G.<sup>1</sup>, Santos, J.K.P.<sup>2</sup>, Oliveira, A.S.<sup>3</sup>, Mendes, M.A.S.<sup>4</sup>, Gutierrez, A.H.<sup>5</sup>

*Dracaena fragans* Ker Gawl é um arbusto originário da África, cultivado largamente no Brasil em vasos, para interiores, em pleno sol ou a meia sombra. A presença de sintomas causados por fungos nas folhas dessa planta, causam prejuízos estéticos a essa planta ornamental. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. agente etiológico da antracnose em *D. fragans*, foi relatada no Vale de São Francisco, Pernambuco e Bahia causando sintomas similares aos observados em plantas de *D. fragans* no Distrito Federal. Foram observadas plantas de *D. fragans* com lesões, de 5 a 7 mm de comprimento, na extremidade apical das folhas. As manchas eram irregulares e possuíam coloração marrom-escura e anéis concêntricos contendo pequenos pontos escuros, que correspondiam aos acérvulos do fungo. Com o seu envelhecimento, tornavam-se mais claras, até atingirem uma coloração marrom-acinzentada e aumentavam progressivamente de tamanho até ocuparem quase 50% da superfície da lâmina foliar. Nesse estágio, os tecidos sofriam necrose intensa, provocando morte da metade da folha que ficava pendurada por algum tempo apenas pela fibra da nervura principal. Procedeu-se o isolamento do fungo em meio de cultura BDA, incubação por 8 dias, sob luz fluorescente contínua e a identificação pelas características morfológicas e fisiológicas. A patogenicidade de *C. gloeosporioides* foi confirmada pela inoculação em plantas sadias de *D. deremensis* e reisolamento do fungo.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UPIS, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Fitopatologista, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 087 - AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DA SECA DOS PONTEIROS DA GOIABEIRA EM PROPRIEDADES INDIVIDUAIS PELA CORRELAÇÃO PLANTAS SINTOMÁTICAS - ISOLAMENTO DE *ERWINIA PSIDII* (Evaluation of guava bacterial blight incidence in individual orchards by a correlation between symptoms and isolation)

Vasconcelos, C.M.A.<sup>1</sup>, Santos, J.P. dos<sup>2</sup>, Vieira, T.M.<sup>3</sup>, Caldas Filho, A.E.<sup>4</sup>, Guth, T.L.F.<sup>4</sup>, Bispo, A.<sup>5</sup>, Marques, A.S. dos A.<sup>6</sup>

O Brasil é o maior produtor mundial de goiaba (*Pisidium guajava* L.), mas no Distrito Federal, o seu cultivo se caracteriza como atividade familiar, em propriedades de no máximo 8 ha. Um dos fatores que limitam a produção, é a bacteriose ou seca de ponteiros causada por *Erwinia psidii*, cujos sintomas são a seca de ramos e brotos, necrose da nervura e a mumificação de flores e de frutos imaturos. Em levantamentos anteriores identificou-se a presença ou ausência da bacteriose por propriedade e nesta etapa, determinou-se a proporção de plantas infectadas, pela correlação de sintomas e isolamento de *E. psidii*. Foram realizadas avaliações em 17 propriedades (total de 16.193 plantas), coletando-se amostras de 20 plantas com sintomas/propriedade. Os isolamentos foram realizados a partir de brotações, ramos e frutos. Os sintomas observados foram anotados, procedendo-se a seguinte técnica de isolamento: Desinfestação do material em detergente neutro e lavagem com água corrente; Esmagamento de fragmentos dos bordos das lesões em 2 mL de água estéril; Isolamento da bactéria pelo plaqueamento do extrato diluído, sobre meio de cultura sólido 523, seguido de incubação a 28°C por 48 h e repicagem das colônias individualizadas com aspecto semelhante ao descrito para *E. psidii*. Colônias com características de *E. psidii* foram submetidas aos testes nutricionais e fisiológicos para identificação. Os isolados obtidos foram preservados em água estéril e em meio sólido coberto com óleo mineral. Os resultados indicam que do total de 309 plantas coletadas, 290 apresentaram sintomas de frutos mumificados, das quais 83,44% resultaram em diagnóstico laboratorial positivo; 289 plantas com seca dos ponteiros, e 82,69% de diagnóstico positivo e 99 com necrose de nervuras e 79,79% de diagnóstico positivo. Das 88 plantas que apresentaram todos os sintomas concomitantemente, 81,81% tiveram diagnóstico positivo.

---

<sup>1</sup> Eng. Agr., graduando, UPIS, DFA/DF, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Assistente de pesquisa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Biologia, Graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Secretaria de Agricultura Pecuária e Abastecimento - DF.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

<sup>6</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 088 - COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA O ESTABELECIMENTO DE UM TESTE DE PATOGENICIDADE PARA *ACIDOVORAX AVENAE* SUBSP. *CITRULLI* (Comparing methods to the development of a pathogenicity test to *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*)

Vieira, T.M.<sup>1</sup>, Santos, J.P. dos<sup>2</sup>, Marques, A.S. dos A.<sup>3</sup>

O cultivo do melão expandiu-se no Nordeste brasileiro nos últimos anos, principalmente no Rio Grande do Norte, Pernambuco, Bahia e Ceará. A mancha-aquosa, causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* é um dos principais problemas fitossanitários da cultura, podendo provocar perdas de até 50% na colheita. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um método rápido e eficiente na avaliação da patogenicidade de isolados. Foi feita uma curva de calibração, para que o inóculo fosse ajustado a uma concentração de  $10^8$  ufc/mL. Compararam-se quatro formas de preparo da suspensão: Combinação da multiplicação da bactéria em meio sólido e líquido e da ressuspensão em água e em PBS. Para cada combinação foram estabelecidas cinco amostras cuja concentração bacteriana foi ajustada para 80%, 65%, 40%, 25% e 10% de transmitância. As amostras foram diluídas, plaqueadas, incubadas em estufa (B.O.D) e a população enumerada após 72 h. As suspensões bacterianas para o teste de patogenicidade foram ajustadas para 56,48% de transmitância ( $10^8$  ufc/mL). O experimento foi instalado em casa de vegetação telada, estabelecendo-se um lote de 30 plantas, cv. Amarelo, de um mês de idade para cada método. Inoculou-se seis isolados de *A. avenae* subsp. *citrulli*, sendo que Emb.A 11-19, 11-21, 11-22 e 11-23 foram provenientes da Fazenda São João (Baraúna - RN) e os isolados Aac 1.12 e Aac 1.31 cedidos pela UFRPE. Foram utilizados quatro métodos de inoculação: o de corte do ápice da folha e imersão na suspensão bacteriana; o molhamento da superfície abaxial da folha, pela fricção com gaze embebida em suspensão; a pulverização da suspensão na superfície abaxial das folhas e inoculação por ferimento em pecíolos de folhas desenvolvidas em placas de Petri com agar-água e deposição de 10  $\mu$ L da suspensão bacteriana. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 72 h. O resultado da calibração indica que a forma de preparo pela multiplicação em meio líquido e ressuspensão em PBS é a mais apropriada, com uma equação de regressão onde o  $r^2 = 0,97$ . Dos testes de patogenicidade, apenas os dois primeiros se encontram em fase de leitura, havendo indicação de que o método de fricção com gaze seria o mais eficiente, pois os sintomas começaram a aparecer dois dias após a inoculação.

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Assistente de pesquisa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **089 - EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO DE SEMENTES DE MELÃO IMPORTADAS E INFESTADAS POR FITONEMATÓIDE (Effect of Thermal Treatment of Imported Melon Seeds Infested by Plant-Parasitic Nematode)**

Sousa, A.I. de M.<sup>1</sup>, Gomes, V.F.<sup>2</sup>, Tenente, R.C.V.<sup>3</sup>

Sementes de melão importadas pelo Brasil apresentaram-se infestadas por *Ditylenchus* sp., e portanto houve necessidade verificar sua erradicação através de um tratamento, antes da liberação do material ao usuário. O tratamento testado foi de água aquecida agitada incluindo um tratamento prévio de 40°C por 20min., seguido de 60°C por 10min. A avaliação foi feita para verificar o poder germinativo, o vigor e o comprimento de radícula das sementes tratadas e das não tratadas (testemunha), bem como a presença e ausência do nematóide. Os resultados deste teste mostraram que o tratamento térmico aplicado erradicou o parasita das sementes comparando-o com a testemunha. Entretanto, a temperatura de 60°C, afetou o poder germinativo das sementes de melão de coloração alaranjada. O mesmo não aconteceu com as sementes de cor amarela. Resultados similares foram verificados para o vigor e comprimento da radícula. Portanto, o tratamento térmico aplicado às sementes de melão poderá ser usado para pequenas quantidades de sementes infestadas por *Ditylenchus* sp., como um procedimento de quarentena, minimizando o risco de entrada de novos parasitas no País.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, GISNO, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Assistente de Pesquisa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 090 - FUNGOS DE IMPORTÂNCIA QUARENTENÁRIA PARA FRUTEIRAS NO BRASIL (Fungi of quarantine importance on fruit-plants in Brazil)

Felix, A.A.A.<sup>1</sup>, Santos, C.E.N.<sup>2</sup>, Mendes, M.A.S.<sup>3</sup>, Santos, M.F.<sup>4</sup>, Urben, A.F.<sup>5</sup>

O aumento do intercâmbio de vegetais entre as zonas de livre comércio legitimadas pela Organização Mundial do Comércio (OMC), exige um maior rigor no controle fitossanitário para evitar a entrada e/ou a disseminação de pragas entre os países. O presente trabalho teve por finalidade compilar e disponibilizar informações sobre fungos de importância quarentenária para a fruticultura brasileira. Os fungos identificados como pragas potencialmente quarentenárias foram: *Phaeoacremonium aleophilum*, *Phaeoacremonium angustis*, *Phaeoacremonium chlamydosporum*, *Cristulariella moricola*, *Guignardia bidwellii* e *Physopella ampelopsidis*, em uva; *Cytosphaera mangiferae*, *Dothiorella mangiferae*, em manga ; *Acremonium cucurbitacearum*, *Phomopsis cucurbitae*, *Pythium spinosum*, *Sphaerotheca fusca*, em melão; *Guignardia musae*, *Marasmiellus semiustus*, em banana; *Phytophthora katsurae*, em côco e *Colletotrichum capsici*, em mamão. Os dados compilados sobre as pragas quarentenárias incluem informações sobre a taxonomia, plantas hospedeiras, bioecologia, formas de transmissão, sintomas, métodos de detecção, inspeção, distribuição geográfica e controle, que devem ser sistematicamente atualizadas e disponibilizadas para dar suporte a comercialização desses produtos.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Florestal, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## 091 - MANCHA DE *PHYLLOSTICTA* SP. EM *DRACAENA DEREMENSIS* (Leaf Spot of *Phyllosticta* sp. on *Dracaena deremensis*)

Felix, A.A.A.<sup>1</sup>, Fonseca, J.N.L.<sup>2</sup>, Oliveira, A.S.<sup>3</sup>, Mendes, M.A.S.<sup>4</sup>, Gutierrez, A.H.<sup>5</sup>, Urban, A.F.<sup>6</sup>

As plantas ornamentais vem ganhando espaço no mercado, empregando um número considerável de pessoas e movimentando milhões de dólares em todo o mundo. Foram encontradas em Brasília, plantas da espécie *Dracaena deremensis* engl., arbusto ornamental originário da África, com manchas fúngicas nas folhas comprometendo a sua beleza e estética. Os sintomas da doença foram observados inicialmente nas extremidades da folha. Neste local ocorria a formação de pequenas manchas irregulares de 7 a 8 mm de comprimento que aumentavam de tamanho e coalesciam dando origem a lesões de 2,5 a 18 cm. As lesões apicais avançam no sentido da base da folha, necrosando uniformemente todo o tecido, podendo cobrir cerca de 50% da lâmina foliar. Nos sintomas marginais, avançavam acompanhando as nervuras formando uma faixa de até 10mm de largura. No início as lesões eram marrom-escuras e, com seu envelhecimento, tornavam-se mais claras até atingirem uma coloração cinza-amarronzada, onde eram observados diminutos pontos negros, que correspondem aos picnídios do fungo *Phyllosticta* sp.. Procedeu-se o isolamento do fungo em meio de cultura BDA, incubação por 8 dias, sob luz fluorescente contínua e a identificação pelas características morfológicas e fisiológicas. A patogenicidade de *Phyllosticta* sp. foi confirmada pela inoculação em plantas sadias de *D.deremensis* e reisolamento do fungo.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Agr., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Fitopatologista, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 092 - QUARENTENA DE PÓS-ENTRADA: VIROLOGIA (Post-entry quarantine virology)

Hercos, A.P.<sup>1</sup>, Marinho, V.L.A.<sup>2</sup>, Batista, M.F.<sup>3</sup>

A introdução de germoplasma vegetal no país é importante para garantir aos melhoristas a obtenção de novos genótipos. Embora seja uma atividade de extrema importância para a agricultura brasileira, a entrada do material vegetal no Brasil pode trazer também inúmeras pragas, algumas delas exóticas ao país. Para garantir a integridade do germoplasma vegetal introduzido, o Laboratório de Quarentena Vegetal utiliza diversas técnicas para a detecção e identificação de vírus, viróides e fitoplasmas nestes materiais. As metodologias mais utilizadas são: plantio, em solo estéril, do material vegetal introduzido em quarentenário e observação de sintomas nas plântulas, inoculação mecânica em plantas hospedeiras, teste sorológico (ELISA), preparações rápidas para microscopia eletrônica (leaf-dip). No ano de 2001, foram analisados para detecção de vírus, viróides e fitoplasmas 15951 acessos de germoplasma de 127 processos de importação. Os produtos que mais foram introduzidos e conseqüentemente analisados nesse laboratório foram: milho, melão, trigo e soja respectivamente. Provenientes de 29 países sendo na sua grande maioria dos Estados Unidos, México, Colômbia e Holanda. Neste ano foram detectados e identificados pelo método de ELISA quatro vírus: Garlic virus A., Leek yellow stripe virus, Onion yellow dwarf virus e Shalot latent virus, infectando bulbos de alho (*Allium cepa*), provenientes da China. Esses vírus já estão presentes no Brasil, mas causam danos à cultura do alho. A quarentena vegetal é importante para prevenir a entrada de pragas exóticas e evitar a disseminação daquelas já presentes no Brasil.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduando, UniCEUB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **093 - REAÇÃO DE CLONES DE BANANEIRA (*MUSA SPP.*) AO NEMATÓIDE *MELOIDOGYNE INCOGNITA* RAÇAS 1 E 3 (Reaction of banana clones (*Musa spp.*) to nematode *Meloidogyne incognita* races 1 and 3)**

Costa, G.R.T.<sup>1</sup>, Silva, R.D.C.<sup>2</sup>, Tenente, R.C.V.<sup>3</sup>, Carrijo, O.A.<sup>4</sup>, Silva Neto, S.P.<sup>5</sup>

*Meloidogyne incognita*, um fitonematóide causador de galhas em raiz, é um importante parasita que vem causando perdas irreparáveis na Agricultura. Os danos provocados por este nematóide na bananeira podem comprometer parcial ou totalmente a produção, dependendo do cultivar utilizado. O objetivo deste trabalho foi estudar a reação de clones de bananeira ao nematóide *M. incognita* raças 1 e 3, sob condições de casa de vegetação. Os clones de bananeira foram desenvolvidos pelos programas de melhoramento da Embrapa Mandioca e Fruticultura e pela Companhia de Promoção Agrícola (CAMPO). Os clones foram transplantados para vasos com solo esterelizado e foram inoculados com 10.000 ovos cada. O experimento constou de 4 repetições, em dois níveis de irrigação e foi inteiramente casualizado. Após 120 dias da inoculação, foram feitas as avaliações do número de ovos e juvenis presente nas raízes e no solo, altura da planta, peso da parte aérea, peso de raiz e o Índice de Reprodução (IR), usando o clone Maçã 71 como a suscetível padrão, para as duas raças. Na raça 1, para oito cultivares testados encontramos 12,5% Altamente Suscetíveis, 18,75% Suscetíveis, 25% Pouco Resistentes e 43,75% Moderadamente Resistentes (MR). Entretanto, não encontramos clones Resistentes ou Altamente Resistentes. Para a raça 3, dos 9 cultivares testados, encontrou-se 14,3% Altamente Suscetíveis, 64,3% Suscetíveis e 21,4% Pouco Resistentes, sendo que para esta raça não encontramos clones Moderadamente Resistentes, Resistentes ou Altamente Resistentes. Com as reações de Pouco Resistente e Moderadamente Resistente, o programa de melhoramento de banana poderá buscar entre esses clones alguma resistência ao parasita e serem testados futuramente em condições de campo.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduanda, UCB, CNPq.

<sup>3</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Hortaliças.

<sup>5</sup> Eng. Agr., Ph.D., CAMPO - Companhia de Promoção Agrícola.

## 094 - RISCO DE INTRODUÇÃO DE FUNGOS EM ESPÉCIES FLORESTAIS ASSOCIADOS A INSETOS (Risk of Introduction of fungi associated with insects on forestry species)

Felix, A.A.A.<sup>1</sup>, Santos, C.E.N. dos<sup>2</sup>, Mendes, M.A.S.<sup>3</sup>, Oliveira, M.R.V. de<sup>4</sup>, Urban, A.F.<sup>5</sup>

O crescente aumento do trânsito de mercadorias, produtos e subprodutos agrícolas eleva o risco de introdução de pragas exóticas. Algumas espécies de insetos possuem relações complexas na epidemiologia de fungos fitopatogênicos importantes para espécies florestais. Desta forma o ingresso de um desses insetos potencializa os riscos de introdução de fungos por eles transmitidos e conseqüentemente os prejuízos materiais e ambientais. A transmissão de fungos via insetos merece atenção. O presente trabalho teve como objetivo compilar informações sobre pragas em espécies florestais ainda não contempladas e regulamentadas pela Organização Nacional de Proteção Fitossanitária (ONPF) do Brasil. Para as espécies florestais podemos citar as seguintes espécies de fungos, transmitidas por insetos exóticos ao Brasil: *Ophiostoma wagneri*; *Amylostereum chailletii*; *Ceratocystis polonica*; *Endocronartium pini*; *Leptographium procerum*; *Leptographium serpens*; *Nectria coccinea*; *Ophiostoma clavigerum*; *Ophiostoma minus*; *Seiridium cardinale*.

---

<sup>1</sup> Biologia, graduanda, UCB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Eng. Florestal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Eng. Agr., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **095 - SISTEMA DE VISUALIZAÇÃO DE PRAGAS QUARENTENÁRIAS PARA O BRASIL (A database of quarantine pests of concern to Brazil)**

Souza, W.R.<sup>1</sup>, Marinho, V.L.A.<sup>2</sup>, Ofugi, K.<sup>3</sup>

Diante da necessidade de modernizar o processo de fiscalização fitossanitária, o Laboratório de Quarentena Vegetal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, está desenvolvendo o “Sistema de Visualização de Pragas Quarentenárias” (SVPQ) para o Brasil. O “Sistema” abrange informações sobre pragas quarentenárias A1 e foi estruturado em duas partes: um banco de dados, com informações sobre as pragas através de textos e imagens e uma interface com o usuário. O produto-modelo para o sistema foi a batata, pelo grande número de pragas quarentenárias associadas, de acordo com o Comitê de Sanidade Vegetal dos Países do Cone Sul (COSAVE). Bancos de dados como CABI, EEPO, FAO, APS e COSAVE serviram de base para o levantamento bibliográfico. Tópicos abordados: tipo de organismo, binômio latino, posição taxonômica, sinonímia, variabilidade, hospedeiros, distribuição geográfica, bioecologia, sintomas, morfologia, fisiologia, transmissão e/ou dispersão, detecção, expressão econômica e medidas quarentenárias. O SVPQ visa a redução do efeito pouco desejável da globalização que é a dispersão de pragas quarentenárias. É um sistema especialista, tecnologicamente apropriado para atender esta demanda e auxiliar pesquisadores, agentes fitossanitários, produtores, exportadores e importadores no que concerne à sanidade dos produtos agrícolas.

---

<sup>1</sup> Nível Médio, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Bióloga, Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Economista, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## REPRODUÇÃO ANIMAL

### **096 - AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE TÉCNICA DE PARTOS GEMELARES EM BOVINOS COM ÊNFASE NA PRODUÇÃO DE CARNE - DADOS PRELIMINARES (Evaluation of technical feasibility of twinning birth in cattle for beef production - preliminary dates)**

Lucas, L.A.<sup>1</sup>, Campos, H.C.F.<sup>1</sup>, Rumpf, R.<sup>2</sup>

Os índices zootécnicos da pecuária de corte nacional são, em média, baixos e através da utilização de novas biotecnologias, é possível aumentar a produtividade dos rebanhos. A produção de gestações gemelares é uma alternativa para se proporcionar um aumento na produção. Essas podem ser obtidas pela seleção de animais e pela transferência de dois embriões para uma mesma receptora. Vários estudos já têm sido realizados para a produção de gestações gemelares através da transferência de embriões (T.E.), entretanto, há necessidade de se realizar uma avaliação econômica da utilização dessa tecnologia. O objetivo deste trabalho é avaliar a viabilidade técnica e econômica de produzir bezerros, oriundos de partos simples e gemelares em sistema de criação extensiva no Planalto Central, com ênfase na produção de carne. Foram utilizadas cento e dezessete vacas (Simental x Nelore). No tratamento 1 (T1-controle), sessenta vacas foram inseminadas artificialmente (I.A.) enquanto que no tratamento 2 (T2) cinquenta e sete vacas foram inseminadas e 6 a 9 dias após a IA, involuadas com embriões de doadora (Simental x Nelore) X touro Guzerá. O touro utilizado no experimento tanto na I.A. como na produção de embriões foi o mesmo. Ao exame ultra-sonográfico de gestação obteve-se 86,8% de prenhez em T1 e 77,19% em T2, sendo que 43,85% (n = 25) das gestações eram prenhezes gemelares. Esses dados preliminares permitem prever uma taxa de natalidade em T2 de 121,05% (n = 69 bezerros), o que refletirá um aumento significativo na produção de bezerros. Dados referentes ao nascimento, desenvolvimento e demais índices zootécnicos das crias e índices reprodutivos das mães serão avaliados e acompanhados à medida que forem ocorrendo os nascimentos.

---

1 Méd. Vet., Mestrando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2 Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 097 - AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA O CULTIVO DE UM ÚNICO EMBRIÃO BOVINO PRODUZIDO *IN VITRO* (Evaluation of different methods for *In vitro* culture of a single bovine embryo)

Pereira, D.C.<sup>1</sup>, Dode, M.A.N.<sup>2</sup>, Rumpf, R.<sup>2</sup>

Tem sido demonstrado que as taxas de blastocistos (BL) aumentam quando os embriões são mantidos em grupo, durante todo o cultivo. Entretanto, na produção *in vitro* de embriões comercial, é comum recuperar apenas um ovócito, o que requer o cultivo individual. O objetivo deste estudo foi avaliar o sistema "well of the well" (WOW), no qual o embrião é cultivado dentro de um pequeno poço cilíndrico em forma de "V" feito em uma placa de cultivo criando, desta forma, um microambiente para o embrião. No primeiro experimento foram feitas 4 repetições, utilizando-se um total de 345 embriões. Após a fecundação os zigotos foram separados em 2 tratamentos, T1: Controle - cultivo em gotas de 400 ml de meio e 25 embriões por gota; T2: 1 zigoto por "well" em gotas de 400 ml de meio, com 25 "well" por placa. No segundo experimento foram utilizados 255 ovócitos em três repetições. Após a fecundação, os zigotos foram separados em 3 tratamentos, T1: Controle - cultivo em gota de 400 ml de meio com 25 embriões; T2: Cultivo individual em "well" com gotas de 20ml de meio com 25 "well" por placa, e T3: Cultivo individual em gotas de 20 ml com 25 gotas por placa. Os embriões foram avaliados em D2 (taxa de clivagem), D7 (taxa de BL) e D8 (taxa de eclosão). Em cada réplica, uma amostra de embriões na fase de BL foi retirada de cada tratamento para determinação do número de células. Os resultados foram analisados pelo teste de  $\chi^2$ . No experimento 1 as taxas de clivagem (72,5% e 71,2%), BL (38,0% e 39,3%) e eclosão (46,1% e 52,6%) foram similares ( $P > 0,05$ ) para T1 e T2. Da mesma forma, no experimento dois não houve diferença entre T1, T2 e T3 nas taxas de clivagem (81,2%, 82,4% e 78,8%), BL (40,0%, 37,6% e 32,9%) e eclosão (54,2%, 31,8% e 27,3%). A porcentagem de embriões que apresentaram menos de 64 células, de 64 a 120 células ou mais de 120 células foram respectivamente 0,0%, 60,0% e 40,0 % para T1; 18,2%, 45,4% e 36,4% para T2 e 50,0%, 20,0% e 30,0 % para T3. Os resultados sugerem que zigotos podem ser cultivados individualmente em gota ou no sistema WOW, entretanto esses embriões tendem a apresentar um menor número de células e menor taxa de eclosão. Novos estudos deverão ser conduzidos no sentido de avaliar o potencial desses embriões em gerar prenhez e bezerros.

<sup>1</sup> Med. Vet., mestranda, UnB, CAPES, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Med. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **098 - AVALIAÇÃO DE FIBROBLASTOS DE BOVINOS ADULTOS DAS RAÇAS CURRALEIRO, JUNQUEIRA E PANTANEIRO, EM DIFERENTES PASSAGENS NO CULTIVO IN VITRO (Evaluation of adult bovine fibroblasts in different passages of culture in Curraleiro, Junqueira, and Pantaneiro Breed).**

Carrijo Jr., O.A.C.<sup>1</sup>, Oliveira, R.R.<sup>1</sup>, Martins, F.C.<sup>2</sup>, Rumpf, R.<sup>3</sup>, Dode, M.A.N.<sup>3</sup>

A clonagem por Transferência Nuclear (T.N.) é importante na estratégia de conservação de animais em vias de extinção, pois possibilita o uso de células somáticas. Fibroblastos de animais adultos são uma importante fonte de células para TN devido à facilidade de obtenção e de cultivo. O presente estudo teve por objetivo avaliar alterações cromossômicas numéricas, viabilidade e a integridade da cromatina de fibroblastos em diferentes passagens no cultivo in vitro. Foi coletada uma biópsia da orelha de três fêmeas bovinas adultas, uma da raça Junqueira, uma da Curraleira e uma da Pantaneira. Após retirada dos pêlos e separação da cartilagem, a pele foi cortada em pequenos fragmentos, que foram cultivados em meio DMEM e repicados semanalmente. Cada repique (R) correspondeu a uma passagem, as avaliações foram feitas em passagens R2, R4, e R8. Para viabilidade, as células foram expostas ao Azul de Tripaná, e contados em câmara de Neubauer. Para a integridade de cromatina as células foram coradas com "Acridine Orange" sendo contadas 200 células. A análise citogenética foi realizada corando as células com Giemsa. A diferença entre as várias passagens com relação a viabilidade, integridade da cromatina e citogenética, para cada um dos animais, foi avaliado pelo teste do  $X^2$ . A percentagem de células viáveis e de células com alterações cromossômicas, foi semelhante ( $P > 0,05$ ) nas diferentes passagens, para todos os animais, variando de 83,3% a 96,4%, e de 2 a 6%, respectivamente. A percentagem de células com cromatina íntegras foi similar ( $P > 0,05$ ) entre diferentes passagens na raça Pantaneira ( $R2 = 77,5\%$ ,  $R4 = 79,0\%$ ,  $R8 = 79,0\%$ ). Entretanto, na Junqueira e na Curraleira a R4 apresentou maior percentagem de células íntegras ( $P < 0,05$ ), sendo  $R2 = 63,0\%$ ,  $R4 = 84,5\%$  e  $R8 = 76,5\%$  e,  $R2 = 78,0\%$ ,  $R4 = 51,5\%$  e  $R8 = 80,5\%$ , respectivamente. Os resultados preliminares sugerem que existe diferença na integridade de cromatina dos fibroblastos nas diferentes passagens, durante o cultivo in vitro. Técnicas complementares devem ser incluídas para identificar o melhor sistema de cultivo para células a serem utilizadas na TN.

Apoio financeiro: EMBRAPA e Prodetab.

---

<sup>1</sup> Méd. Vet., mestrando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Méd. Vet., doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.



## 099 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO* (Evaluation of the cell number of bovine embryos cultures *in vitro*)

Corrêa, G.A.<sup>1</sup>, Rumpf, R.<sup>2</sup>, Dode, M.A.N.<sup>2</sup>.

Os embriões produzidos “*in vitro*” são avaliados morfológicamente antes de serem transferidos para as receptoras. Tendo em vista que as taxas de prenhez obtidas com embriões PIV são relativamente baixas, levantou-se a hipótese de que nem sempre a avaliação morfológica indica a viabilidade embrionária. O presente estudo teve por objetivo avaliar o número de células de embriões que atingiram o estágio de blastocisto após 6 (D6), 7 (D7) e 8 (D8) dias de cultivo. Foram utilizados 52 embriões produzidos “*in vitro*”. Os embriões que encontravam-se no estágio de blastocisto (BL) nos dias de avaliação (D6, D7 e D8) foram retirados do cultivo, fixados e corados com orceína. Foram então levados ao microscópio para avaliação e contagem do número total de células. Os dados foram analisados pelo teste  $\chi^2$ . A média ( $\pm$  desvio padrão) do número de células dos blastocistos em D6, D7 e D8 foi de 120,9 ( $\pm$  40,5), 96,6 ( $\pm$  55,9) e 78,9 ( $\pm$  50,9), respectivamente. Já a porcentagem de embriões com mais de 120 células, foi superior ( $P < 0,05$ ) nos blastocistos de D6 (52,4%) do que nos de D7 (28,6%) e de D8 (11,8%). Os resultados demonstram que os embriões que atingem o estágio de blastocisto em D6 apresentam maior número de células totais. A superioridade biológica de tais embriões só será confirmada após avaliação da relação entre as células do trofoblasto e botão embrionário, e das taxas de prenhez.

---

<sup>1</sup> Bióloga, Técnica Convivada, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 100 - CARACTERIZAÇÃO DE LOCAIS DE INTEGRAÇÃO DE TRANSGENES EM FIBROBLASTOS BOVINOS GENETICAMENTE MODIFICADOS (Characterization of transgene integration sites of genetically modified bovine fibroblasts)

Lisauskas, S.<sup>1</sup>, Oliveira, R.R.<sup>2</sup>, Carvalho, D.M.<sup>1</sup>, Melo, E.O.<sup>3</sup>, Rech, E.L.<sup>4</sup>, Aragão, F.J.L.<sup>4</sup>

A transferência de material genético pela tecnologia do DNA recombinante é um método inovador para produção de animais transgênicos utilizados como biofábricas. Tanto permite a aquisição de características desejadas quanto a produção de proteínas de importância farmacêutica pelos animais com genótipos alterados. Uma alternativa para gerar animais transgênicos é o uso de linhagens de fibroblastos bovinos transfectados, servindo como doadores de núcleos transgênicos para a transferência nuclear em ovócitos enucleados. No presente trabalho foi utilizado lipofectAMINAO® para a transfecção com o vetor plasmidial codificando cópia única de um fragmento denominado Fv, proveniente do anticorpo monoclonal 83D4 (contra câncer de mama), controlado pelo promotor da  $\beta$ -lactoglobulina. As células transfectadas foram selecionadas em meio de cultura acrescido do antibiótico G418 ( $0.4 \text{ mg ml}^{-1}$ ) até a quarta passagem. Devido a integração do transgene no genoma bovino ser aleatória, um pequeno número de eventos irão gerar animais transgênicos expressando a proteína em altos níveis. A fim de aperfeiçoar o método de transfecção, outros autores têm estudado o sítio de integração no genoma. A abordagem é baseada na técnica de resgate de plasmídeo (Wizard® Genomic DNA Kit). Isto nos possibilitará caracterizar vários locais de integração, relacionar a inserção de uma ou múltiplas cópias com o nível de expressão do transgene, bem como se houveram perdas do vetor quando da integração do mesmo. Futuros estudos estarão baseados na integração sítio dirigida de genes previamente flanqueados com seqüências alvo para certa região de recombinação homóloga no genoma bovino, visando maximizar a expressão do transgene nos animais geneticamente modificados.

---

<sup>1</sup> Med. Vet., mestranda, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Med. Vet., mestrando, UnB.

<sup>3</sup> Biólogo, doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Eng. Agr., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 101 - CLONAGEM E RECLONAGEM DE ANIMAIS DE CONSERVAÇÃO A PARTIR DE FIBROBLASTOS ISOLADOS DA PELE DA ORELHA DE BOVINOS ADULTOS (Cloning and recloning from ear fibroblast of adult conservation bovines)

Iguma, L.T.<sup>1</sup>, Sousa, R.V.<sup>2</sup>, Carrijo Jr., O.<sup>3</sup>, Pereira, D.C.<sup>3</sup>, Dode, M.A.N.<sup>4</sup>, Rumpf, R.<sup>4</sup>

A biotécnica conhecida como transferência nuclear (TN) vem sendo amplamente destacada, pois é por meio dela que a clonagem de animais a partir de células somáticas tem sido possível. Várias são as aplicações potenciais da TN, salientando-se a multiplicação de animais em vias de extinção e a produção de animais transgênicos. Este estudo objetivou verificar as taxas de fusão, clivagem, blastocisto e prenhez de embriões reconstruídos a partir de fibroblastos da orelha de bovinos adultos Crioulos (FOBC's). Ovócitos obtidos de abatedouro foram maturados *in vitro* por 20 a 22 h. Os maduros foram enucleados e seguiu-se a reconstrução embrionária utilizando-se FOBC's de 4<sup>a</sup> a 10<sup>a</sup> passagens. Posteriormente, na eletrofusão foram usados 2 pulsos DC de 2,1 kV/cm por 30 ms. De 3 a 5 h pós-eletrofusão realizou-se a ativação em soluções de ionomicina e 6-DMAP. O cultivo *in vitro* aconteceu em meio SOFaaci com 5% de SFB e sobre monocamada de células da granulosa. De 175 ovócitos maduros, 77,14% (n=135) foram enucleados e 69,71% (n=122) de embriões foram reconstruídos. A taxa de fusão foi, em média, de 59,83% (n=73). As taxas de clivagem (D2) e blastocistos (D7) observadas a partir dos fusionados foram de 68,49% (n=50) e 17,8% (n=13), respectivamente. Foram inovuladas 7 receptoras sincronizadas que receberam 1, 2 ou 3 blastocistos. A taxa de prenhez aos 30-35 dias pós-inovulação foi verificada através de ultrassonografia. Observou-se que 5 (71,42%) das receptoras encontravam-se vazias, 1 (14,28%) em reabsorção e 1 (14,28%) prenhe. Esta gestação foi interrompida no 50<sup>o</sup> dia e o feto extirpado. A partir deste feto foram isolados e congeladas várias amostras de fibroblastos; estesses serão utilizados como doadores de núcleos em experimento posterior. O objetivo é avaliar a reclonagem de tais células. Os resultados obtidos sugerem a aplicabilidade do protocolo usado para a produção de embriões clonados por TN de fibroblastos da orelha de bovinos adultos Crioulos. Contudo, persiste a necessidade de maiores estudos com relação à viabilidade fetal de tais embriões, visto que o presente estudo veio corroborar resultados de TN de células somáticas obtidos em experimentos anteriores do laboratório, nos quais as gestações progrediram até o 7<sup>o</sup> mês.

<sup>1</sup> Méd. Vet., doutoranda, UnB, CNPq, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Biologia, graduando, FTB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Méd. Vet., mestrando, UnB, CNPq, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>4</sup> Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 102 - COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE ANORMALIDADES DO ACROSSOMA EM BOVINOS (Comparison among different methods of acrosome abnormalities in bovine)

Melo, N.S.S.<sup>1</sup>, Martins, C.F.<sup>2</sup>, Rumpf, R.<sup>3</sup>, Dode, M.A.N.<sup>3</sup>

A integridade do acrossoma é essencial para que o espermatozóide seja capaz de se ligar a zona pelúcida do ovócito e fecundar. Entretanto, as anormalidades na estrutura do acrossoma são as mais difíceis de serem detectadas na avaliação morfológica dos espermatozóides. Os métodos mais confiáveis para avaliar acrossoma são a microscopia de contraste interferencial e a de fase, porém ambos, requerem microscópio apropriado, nem sempre disponível aos profissionais de campo. Portanto, o presente estudo teve por objetivo comparar o método de contraste de fase (CF), com microscopia de campo claro utilizando dois corantes, rosa-bengala (RB) e Giemsa (G), na detecção de anormalidades acrossomais. Foram utilizadas amostras de sêmen de 20 touros, cada amostra foi avaliada pelos três métodos, sendo contadas 200 células em cada avaliação, perfazendo um total de 12.000 células. As lâminas para avaliação pelos três métodos foram preparadas simultaneamente. Para o CF e RB foi feita preparação úmida. Para o G, foram feitos esfregaços das amostras e esses fixados e corados. A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-quadrado. A porcentagem de anormalidades encontradas no acrossoma foi maior ( $P < 0,05$ ) nas amostras avaliadas no CF (8,1%) do que nas avaliadas com RB (6,7%) e G (2,6%). Quando as anormalidades foram analisadas individualmente, foi observada que para o defeito *knob sperm* o G detectou menor ( $P < 0,05$ ) porcentagem de células (0,07%) do que CF (0,6%) e o RB (0,7%). O CF (6,75%) também foi o método que mais detectou ( $P < 0,05$ ) acrossoma rugoso quando comparado aos demais (RB = 3,17% e G = 1,9%). Entretanto, a maior porcentagem de células apresentando espessamento do acrossoma foi maior no RB (2,8%) do que no CF (0,8%) e no G (0,6%). Os resultados sugerem que apesar dos métodos RB e G serem capazes de detectar anormalidades no acrossoma, o CF mostrou-se o método mais indicado para esta avaliação.

---

<sup>1</sup> Méd. Vet., Técnica convidada, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Méd. Vet., doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 103 - CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PELO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO - ESPERMATOZÓIDES EM PÓ (Spermatozoa conservation by liofilization process - sperm dried)

Martins, C.F.<sup>1</sup>, Dode, M.A.N.<sup>2</sup>, Rumpf, R.<sup>2</sup>

A conservação de espermatozóides oferece relevantes alternativas para agropecuária, biotecnologia e conservação de espécies, por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de sistemas mais eficazes de conservação de gametas. Desta forma, foi concebido um projeto para avaliar a técnica de liofilização de espermatozóides como alternativa para a conservação de germoplasma. Na etapa inicial, foram utilizadas sete amostras frescas de sêmen de touros das raças Curraleira e Pantaneira, os quais tiveram seus espermatozóides diluídos em meio TCM 199 com 10 % de soro fetal bovino, visando a proteção contra a agressão térmica. Durante o processo de liofilização, as amostras foram submetidas a uma temperatura de -43 °C e pressão de  $353 \times 10^3$  Mbar por quatro horas, para a total desidratação. As amostras pré e pós-lioofilizadas foram avaliadas quanto a concentração e morfologia da estrutura espermática, assim como a integridade do acrossoma e da cromatina, com o objetivo de observar possíveis danos aos espermatozóides. Para determinar a viabilidade do material genético, o DNA genômico espermático pós-lioofilização foi extraído e quantificado por eletroforese em gel de agarose 1%, após 47 dias de armazenamento em temperatura ambiente. A avaliação dos resultados demonstrou que o processo de liofilização ainda é agressivo a membrana plasmática e acrossoma dos espermatozóides, uma vez que apenas 5,07% mantiveram a estrutura acrossomal intacta. No entanto, 99,78 % dos espermatozóides apresentaram a cromatina íntegra após o processo de liofilização, indicando que o núcleo espermático, onde a cromatina é estabilizada pelas protaminas e pontes de dissulfeto, resiste ao processo de liofilização. Ainda, a bem sucedida extração e quantificação do DNA genômico descartou a hipótese de desnaturação do material genético por agressão da técnica de liofilização. Assim, a liofilização espermática apresenta importantes perspectivas futuras para a aplicação destes gametas em estudos de caracterização de raças, multiplicação através da microinjeção espermática (ICSI) e transgenia animal.

---

<sup>1</sup> Méd. Vet., doutorando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## **104 - EFEITO DA IDADE UTERINA E DA SUPLEMENTAÇÃO COM PROGESTERONA (P4) NA TAXA DE GESTAÇÃO EM RECEPTORAS MANGALARGA MARCHADOR - DADOS PRELIMINARES (Effect of the uterine age and of the progesteron supplementation on pregnancy rate of Mangalarga Marchador recipients - Preliminary date)**

Silveira, L.L.<sup>1</sup>, Rumpf, R.<sup>2</sup>

A grande demanda por eqüinos, sobretudo para o lazer, têm alavancado enormes investimentos no melhoramento genético dos plantéis de diferentes raças. Os animais da raça Mangalarga Marchador se destacam por suas características associadas ao trabalho e ao lazer. A transferência de embrião (TE) já vem sendo utilizada em eqüinos à pelo menos duas décadas, sempre a partir de ovulação simples. Existem evidências de que a morte embrionária no início da gestação em alguns animais pode ser devida à deficiência de P4 circulante nesta fase. É necessário, portanto, a maximização dos resultados de prenhez para justificar a TE como uma ferramenta eficiente de multiplicação animal. Neste contexto dois aspectos fundamentais estão sendo avaliados no presente estudo: 1) o efeito da idade uterina da receptora no dia da inovulação, considerando dias após a ovulação (D); e 2) a suplementação com Progesterona (P4), para tentar melhorar a condição uterina para a implantação e o desenvolvimento embrionário. Foram utilizados 23 embriões coletados nos estágios de blastocistos (D7) e Blastocistos expandido (D8/9) transferidos para receptoras com idade uterina entre D4 e D8. As gestações ficaram assim distribuídas: D4 - 50% (01/02), D5 - 50% (02/04), D6 - 85.71% (06/07), D7 - 37.5% (03/08) e D8 - 0% (0/02). Pode-se verificar que os melhores resultados estão associados a úteros em estágios mais jovens em relação a ovulação, ou seja, entre D4 e D6. Porém, em função do pequeno número de animais inovulados em D4 e D8 os resultados destes dias devem ser avaliados com cautela. Para o estudo da P4 aplicou-se em 12 animais uma dose diária de 100 mg de P4 por oito dias consecutivos via intramuscular profunda, sendo a primeira dose no dia da inovulação do embrião; e 11 animais foram utilizados como controle sem P4. Até o presente, o percentual de gestações foi similar entre os animais suplementados ou não com P4 ( $\chi^2$ , 1g.l.,  $p=0,54$ ). Mas também não houve nenhum efeito negativo do tratamento no estabelecimento de prenhez. Embora o número de observações ainda é pequeno a P4 pode ser uma ferramenta estratégica para uso na TE de eqüinos quando se deseja melhorar a condição uterina da receptora, principalmente, no início e final da estação de monta.

---

<sup>1</sup> Méd. Vet., mestrando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Méd. Vet., Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

## 105 - USO DE MARCADOR MOLECULAR RAPD NA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO REBANHO DE CONSERVAÇÃO DA OVELHA CRIOLA LANADA (Genetic characterization of the *crioula* wool sheep through RAPD markers)

Carvalho, D.D.<sup>1</sup>, Castro, S.T.R.<sup>2</sup>, Vaz, C.M.S.L.<sup>3</sup>, Egito, A.A.<sup>4</sup>, Moura, R.D.<sup>5</sup>, Klautau-Guimarães, M.N.<sup>6</sup>

Para uma eficiente conservação da ovelha crioula lanada é necessário conhecer a variabilidade genética dentro do rebanho do Banco de Germoplasma localizado na Embrapa Pecuária Sul, Bagé/RS. Este conhecimento possibilitará que se mantenha no rebanho a máxima variabilidade genética possível bem como auxiliará na escolha de animais menos similares para serem doadores de germoplasma (conservação *in situ*). A técnica de RAPD-*Random Amplified Polimorphic DNA* foi escolhida por ser rápida e de baixo custo. Foram utilizados 225 animais, coletados ao acaso, os quais foram subdivididos em sete grupos de acordo com a estruturação familiar do rebanho. O DNA foi obtido de leucócitos e extraído por método inorgânico. O volume para as reações em cadeia da polimerase (PCR) foi de 13 ml contendo 20mM de Tris-HCl (pH 8,4); 50mM de KCl; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200mM de cada dNTP; 8% de BSA a 2,5 mg/ml; 0,4 mM de *primer* arbitrário; 1,5 UI de Taq DNA polimerase (GIBCO/BRL) e 9 hg de DNA genômico. Doze *primers* com 47 bandas polimórficas, entre 57 testados, foram usados. Os padrões das bandas RAPD foram usados para calcular a variância e a distância genética entre as famílias. A ANOVA demonstrou que 22,64% da variância é devido às variações entre as famílias. A distância genética entre as famílias, calculada através do método Pairwise, é altamente significativa. Baseados nos resultados obtidos, sugere-se que uma amostragem dos animais de cada família permaneça no rebanho.

---

<sup>1</sup> Méd. Vet., graduando, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>2</sup> Méd. Vet., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>3</sup> Méd. Vet., M.Sc., Embrapa Pecuária Sul.

<sup>4</sup> Méd. Vet., M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>5</sup> Biólogo, UnB, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

<sup>6</sup> Bióloga, Ph.D., Universidade de Brasília.

## ÍNDICE DOS AUTORES

(A numeração corresponde ao resumo)

|                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| Abiorana, A.F. ....      | 61                         |
| Abreu, L.A. ....         | 1, 4, 5, 6, 59, 62, 64     |
| Almeida, T.N.S. ....     | 39                         |
| Alves, E.R. ....         | 3, 4, 25                   |
| Alves, P.C.M. ....       | 20                         |
| Alves, R.B.N. ....       | 80                         |
| Amaral, A.C. ....        | 47, 48                     |
| Amaral, Z.P.S. ....      | 37, 52                     |
| Aragão, F.J.L. ....      | 16, 29, 100                |
| Araújo, A.C.G. ....      | 21, 22, 49                 |
| Azevedo, V.C.R. ....     | 35, 38                     |
| Barros, E.V.S.A. ....    | 2, 32                      |
| Barros, P.C. ....        | 71, 74, 83                 |
| Batista, A.C. ....       | 71, 74, 75                 |
| Batista, J.A.N. ....     | 7, 12, 14, 19, 26, 85      |
| Batista, M.F. ....       | 92                         |
| Bertioli, D.J. ....      | 11, 18, 21, 30, 31, 42, 53 |
| Bianchetti, L. ....      | 37                         |
| Bispo, A. ....           | 87                         |
| Bloch Jr., C. ....       | 33                         |
| Bonfim, K. ....          | 29                         |
| Buso, G.S.C. ....        | 36, 37, 40                 |
| Buso, J.A. ....          | 40                         |
| Cabral, G.B. ....        | 22                         |
| Caldas Filho, A.E. ....  | 87                         |
| Camargo, W.R. ....       | 81, 82                     |
| Campos, H.C.F. ....      | 96                         |
| Cardoso, L.D. ....       | 4, 5, 59, 62               |
| Carmo, L.S.T. do ....    | 20, 28                     |
| Carneiro, M. ....        | 9                          |
| Carneiro, R.M.D.G. ....  | 42, 45, 54                 |
| Carneiro, V.T.C. ....    | 3, 22                      |
| Carrijo, O.A. ....       | 93                         |
| Carrijo Jr., O.A.C. .... | 98, 101                    |
| Carvalho, D.D. ....      | 105                        |
| Carvalho, D.M. ....      | 100                        |
| Carvalho, R.M.V. ....    | 70                         |
| Castro, F.C. ....        | 7                          |
| Castro, M.E.B. ....      | 10, 17, 27                 |
| Castro, S.T.R. ....      | 105                        |



|                          |   |
|--------------------------|---|
| Chagas, M.J.L. ....      | 73  |
| Ciampi, A.Y. ....        | 35, 38, 39, 47, 48                        |
| Coelho, M.C.F. ....      | 20  |
| Corrêa, G.A. ....        | 99  |
| Correia, J.R. ....       | 81, 82                                    |
| Costa, G.R.T. ....       | 21, 30, 93                                |
| Costa, I.R.S. ....       | 81, 82                                    |
| Coutinho, M.V. ....      | 14  |
| Cruz, A.R.R. ....        | 2   |
| Cruz, D.R.O. ....        | 49  |
| Cunha, A.F. ....         | 8   |
| Cunha, W.G. ....         | 32  |
| Dalmolin, C.C. ....      | 10, 27                                    |
| Dayler, C.D.A. ....      | 33  |
| Del-Sarto, R.P. ....     | 23, 25                                    |
| Dias, D.G.S. ....        | 66, 67, 74, 77                            |
| Dias, J.G.O. ....        | 21, 30, 42                                |
| Dias, O.B.N. ....        | 85  |
| Dias, T. A. B. ....      | 80, 81, 82                                |
| Dode, M.A.N. ....        | 97, 98, 99, 101, 102, 103                 |
| Dusi, D.M.A. ....        | 3, 49                                     |
| Egito, A.A. ....         | 105                                       |
| Eira, M.T.S. ....        | 57, 58, 63                                |
| Evangelista, I.B.R. .... | 19  |
| Faiad, M.G.R. ....       | 55, 56                                    |
| Falcão, R. ....          | 49, 67, 77                                |
| Faria, M.R. de ....      | 72, 73                                    |
| Felix, A.A.A. ....       | 90, 91, 94                                |
| Ferreira, M.E. ....      | 36, 37                                    |
| Fonseca, J.N.L. ....     | 91  |
| Fragoso, R.R. ....       | 12, 85                                    |
| Franco, O.L. ....        | 33  |
| Frazão, H. ....          | 72, 73                                    |
| Gaiotto, F.A. ....       | 39  |
| Godoi, A.G. de ....      | 55  |
| Goes, M.G. ....          | 81, 82                                    |
| Goldenberg, R. ....      | 49  |
| Gomes, A.C.M.M. ....     | 67  |
| Gomes, V.F. ....         | 89  |
| Gonsalves, D. ....       | 28  |
| Goretti, V. ....         | 65  |
| Grattapaglia, D. ....    | 8, 51                                     |
| Grossi-de-Sá, M.F. ....  | 7, 12, 13, 14, 19, 23, 25, 26, 33, 34, 85 |

|                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| Guimarães, C.R.S. ....       | 2                      |
| Guimarães, M.L. ....         | 14                     |
| Guimarães, P.M. ....         | 11, 18, 21, 30, 42, 53 |
| Guth, T.L.F. ....            | 87                     |
| Gutierrez, A.H. ....         | 86, 91                 |
| Hercos, A.P. ....            | 92                     |
| Hiragi, G.O. ....            | 83                     |
| Iguma, L.T. ....             | 101                    |
| José, A.C.V.F. ....          | 53                     |
| Klautau-Guimarães, M.N. .... | 105                    |
| Kraho, A.Y. ....             | 80                     |
| Kraho, J.M. ....             | 80                     |
| Kraho, O.K. ....             | 80                     |
| Kratka, P.C. ....            | 37                     |
| Lacerda, A.L.M. ....         | 22                     |
| Lacorte, C. ....             | 29                     |
| Lago, W.N.M. ....            | 65, 78                 |
| Laumann, R.A.E. ....         | 70                     |
| Leal-Bertioli, S.C.M. ....   | 11, 18, 21, 30, 42, 53 |
| Lima, J.A.G. ....            | 43                     |
| Lima, J.N. ....              | 34                     |
| Lima, L.H.C. ....            | 33, 65, 78             |
| Lima, L.M. ....              | 14                     |
| Lins, T.C.L. ....            | 36, 40                 |
| Lisauskas, S. ....           | 100                    |
| Lisboa, E.D.M. ....          | 26                     |
| Lopes, F.F.R. ....           | 37                     |
| Lourenço, R.T. ....          | 8, 36                  |
| Lucas, L.A. ....             | 96                     |
| Luz, C. ....                 | 75                     |
| Machado, F.R.B. ....         | 35, 38, 39             |
| Magalhães, B.P. ....         | 72, 73                 |
| Magalhães, C.P. ....         | 13                     |
| Magalhães, M.T.Q. ....       | 12                     |
| Marinho, V.L.A. ....         | 92, 95                 |
| Marques, A.S. dos A. ....    | 87, 88                 |
| Martins, C.F. ....           | 98, 102, 103           |
| Martins, E.S. ....           | 66, 67, 77             |
| Martins, N.F. ....           | 85                     |
| Mello, L.V. ....             | 7                      |
| Mello, S.C.M. de ....        | 65, 76                 |
| Melo, D.F. ....              | 72                     |
| Melo, E.O. ....              | 100                    |

|                          |                            |
|--------------------------|----------------------------|
| Melo, L.A.M.P. de .....  | 83                         |
| Melo, N.S.S. ....        | 102                        |
| Mendes, D.N. ....        | 15                         |
| Mendes, M.A.S. ....      | 83, 86, 90, 91, 94         |
| Mendes, P.A. ....        | 33                         |
| Mendes, R.A. ....        | 1, 4, 5, 6, 59, 61, 62, 64 |
| Missiaggia, A.A. ....    | 51                         |
| Monnerat, R. ....        | 12, 66, 67, 71, 74, 75, 77 |
| Monteiro, A.C.S. ....    | 23, 25, 34                 |
| Moreira, R.O. ....       | 79                         |
| Moretzsohn, M.C. ....    | 31, 52                     |
| Moscardi, F. ....        | 68                         |
| Moura, R.D. ....         | 105                        |
| Mundim, I.P. ....        | 60                         |
| Mundim, R.A. ....        | 56                         |
| Mundim, R.C. ....        | 60                         |
| Nascimento, G.A.M. ....  | 84                         |
| Nickel, O. ....          | 28                         |
| Ofugi, K. ....           | 95                         |
| Olegário, R.M.B.N. ....  | 35, 38                     |
| Oliveira, A.S. ....      | 86, 91                     |
| Oliveira, M.R.V. de .... | 78, 94                     |
| Oliveira, M.S. ....      | 9                          |
| Oliveira, R.C. ....      | 50                         |
| Oliveira, R.R. ....      | 98, 100                    |
| Oliveira, S.C. ....      | 29                         |
| Oliveira-Neto, O.B. .... | 12, 19                     |
| Osório, R. ....          | 34                         |
| Paes, N.S. ....          | 34                         |
| Pantaleão, D.C. ....     | 69, 79                     |
| Peñaloza, A.P.S. ....    | 43, 44, 46                 |
| Pereira, D.C. ....       | 97, 101                    |
| Pereira, E.R. ....       | 68                         |
| Pereira, G.A.G. ....     | 8                          |
| Pereira, R.A. ....       | 14                         |
| Piacezzi, A. ....        | 51                         |
| Pires, C. ....           | 69, 70, 79                 |
| Praça, L.B. ....         | 67, 71, 74, 75             |
| Prates, M.V. ....        | 33                         |
| Proite, K. ....          | 11, 42, 47, 48             |
| Queiroz, P.R. ....       | 65, 78                     |
| Ramiro, C.A. ....        | 31, 52                     |
| Rancan, D.C. ....        | 80                         |

|                            |                                    |
|----------------------------|------------------------------------|
| Rech, E.L. ....            | 29, 100                            |
| Reifschneider, F.J.B. .... | 36                                 |
| Reis, R.B. ....            | 57, 58, 63                         |
| Ribeiro, B.M. ....         | 15, 17                             |
| Ribeiro, F.N.S. ....       | 58, 60, 63                         |
| Ribeiro, Z.M.A. ....       | 10, 27                             |
| Rissoli, V.R.V. ....       | 84                                 |
| Rocha, L.M.T. ....         | 55, 56                             |
| Rodrigues, J.C.M. ....     | 22, 24                             |
| Rodrigues, L.S. ....       | 41                                 |
| Rodrigues Jr., A.J.G. .... | 83, 86                             |
| Romano, E. ....            | 16                                 |
| Rumpf, R. ....             | 96, 97, 98, 99, 101, 102, 103, 104 |
| Sá, S. ....                | 11                                 |
| Salomão, A.N. ....         | 60                                 |
| Sampaio, I. ....           | 47, 48                             |
| Santos, A.C.B. ....        | 17, 27                             |
| Santos, C.E.E. ....        | 76                                 |
| Santos, C.E.N. ....        | 83, 90, 94                         |
| Santos, H. de F. ....      | 1, 4, 5, 6, 59, 62, 64             |
| Santos, I.R.I. ....        | 60, 79                             |
| Santos, J.K.P. ....        | 86                                 |
| Santos, J.P. dos ....      | 87, 88                             |
| Santos, M.F. ....          | 90                                 |
| Santos, M.O. ....          | 16                                 |
| Santos, R.F. ....          | 24                                 |
| Santos, S. ....            | 43, 44, 46                         |
| Santos, V.L. ....          | 18                                 |
| Schmidt, F. ....           | 69, 70                             |
| Sihler, W. ....            | 9, 15, 24                          |
| Silva, C.R.B. ....         | 52                                 |
| Silva, F.B. ....           | 23, 25                             |
| Silva, P.R.Q. ....         | 33                                 |
| Silva, R.D.C. ....         | 93                                 |
| Silva, S.F. ....           | 66, 77                             |
| Silva, S.M.B. ....         | 12                                 |
| Silva, V.P. ....           | 35, 38, 39, 47, 48                 |
| Silva Neto, S.P. ....      | 93                                 |
| Silveira, A.R. ....        | 85                                 |
| Silveira, L.L. ....        | 104                                |
| Siqueira, C.B. ....        | 68                                 |
| Soares, C.M.S. ....        | 66, 77                             |
| Soares, D.T. ....          | 61                                 |

|                                  |                            |
|----------------------------------|----------------------------|
| Soares, E.F. ....                | 17                         |
| Soares, F.Q. ....                | 58, 63                     |
| Soto-Araya, M.E. ....            | 46                         |
| Sousa, A.I. de M. ....           | 89                         |
| Sousa, M.A.F. ....               | 57, 58, 63                 |
| Sousa, R.V. ....                 | 101                        |
| Souza, C.C. ....                 | 81, 82                     |
| Souza, C.W. ....                 | 58                         |
| Souza, G.A.B. de ....            | 1, 4, 5, 6, 59, 62, 64     |
| Souza, H.J.M. ....               | 45                         |
| Souza, L.E. ....                 | 81, 82                     |
| Souza, M.L. ....                 | 9, 15, 24, 68              |
| Souza, W.R. ....                 | 95                         |
| Souza Jr., M.T. ....             | 20, 28                     |
| Sujii, E. ....                   | 69, 70, 79                 |
| Tavares, H.M.F. ....             | 36, 40                     |
| Teixeira, A.C.O. ....            | 54                         |
| Teixeira, J.B. ....              | 2                          |
| Tenente, R.C.V. ....             | 21, 84, 89, 93             |
| Tiago, R.T. ....                 | 45                         |
| Tigano, M.S. ....                | 45, 54                     |
| Tinoco, M.L.P. ....              | 16                         |
| Tsukumo, F. ....                 | 8                          |
| Urban, A.F. ....                 | 83, 90, 91, 94             |
| Valle, F.S. ....                 | 7                          |
| Valls, J.F.M. ....               | 30, 41, 42, 43, 44, 46, 50 |
| Vasconcelos, C.M.A. ....         | 87                         |
| Vaz, C.M.S.L. ....               | 105                        |
| Vieira, F.N. ....                | 44                         |
| Vieira, T.M. ....                | 87, 88                     |
| Villela, A.G. ....               | 17                         |
| Vinson, C.C. ....                | 47, 48                     |
| Vivan, A.L. ....                 | 10                         |
| Welzel, A. ....                  | 31                         |
| Werpachowski, J.S. ....          | 49                         |
| Wetzel, M.M.V. da S. ....        | 55, 56                     |
| Willemse, M.T.M.Alves, E.R. .... | 3                          |
| Zarur, S.B.B.C. ....             | 80                         |

## ÍNDICE DOS ORIENTADORES

(A numeração corresponde ao resumo)

|  |                                |
|--|--------------------------------|
| Abi Soares dos Anjos Marques .....       | 87, 88                         |
| Ana Yamagushi Ciampi .....               | 35, 38, 39, 47, 48             |
| Andréa del Pilar de Souza Peñaloza ..... | 43, 44                         |
| Bonifácio Peixoto Magalhães .....        | 72, 73                         |
| Carmen Silvia Soares Pires .....         | 69                             |
| Dário Grattapaglia .....                 | 8, 51                          |
| Diva Maria de Alencar Dusi .....         | 3, 49                          |
| Edison Ryoti Sujii .....                 | 70                             |
| Eduardo Romano .....                     | 16                             |
| Elíbio Rech .....                        | 29                             |
| Érika Valéria Saliba Albuquerque .....   | 2, 32                          |
| Francisco José Lima Aragão .....         | 100                            |
| Gláucia Salles Cortopasssi Buso .....    | 36, 37, 40                     |
| Izulmé Rita Imaculada Santos .....       | 60, 79                         |
| João Aguiar Nogueira Batista .....       | 19                             |
| José Francisco Montenegro Valls .....    | 41, 43, 44, 46, 50             |
| Luciane Vieira de Mello Rigden .....     | 7                              |
| Luzia Helena Corrêa Lima .....           | 65, 78                         |
| Manoel Teixeira Souza Jr. ....           | 20, 28                         |
| Márcio Carvalho Moretzsohn .....         | 31, 52                         |
| Margot Alves Nunes Dode .....            | 98, 99, 102                    |
| Maria de Fátima Batista .....            | 92                             |
| Maria Elita Batista de Castro .....      | 10, 17, 27                     |
| Maria Fátima Grossi-de-Sá .....          | 12, 13, 14, 23, 25, 26, 33, 34 |
| Marlinda Lobo de Souza .....             | 15, 68                         |
| Marta Aguiar Sabo Mendes .....           | 83, 86, 90, 91, 94             |
| Marta Gomes RodriguesFaiad .....         | 55, 56                         |
| Mauro Carneiro .....                     | 9                              |
| Mirian Therezinha Souza de Eira .....    | 57, 58, 63                     |
| Myrian Silvana Tigano .....              | 45, 54                         |
| Natália Florêncio Martins .....          | 85                             |
| Patrícia Messemberg Guimarães .....      | 11, 21, 30                     |
| Renata César Vilardi Tenente .....       | 84, 89, 93                     |
| Rodolfo Rumpf .....                      | 96, 97, 101, 103, 104          |
| Rosa de Belém das Neves Alves .....      | 80                             |
| Rose Gomes Monnerat .....                | 66, 67, 71, 74, 75, 77         |
| Rui Américo Mendes .....                 | 1, 4, 5, 6, 59, 61, 62, 64     |
| Silvia Tereza Ribeiro Castro .....       | 105                            |
| Soraya C. M. Leal-Bertioli .....         | 18, 42, 53                     |
| Sueli Corrêa Marques de Mello .....      | 76                             |

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Terezinha Aparecida Borges Dias ..... | 81, 82 |
| Vera Lúcia de Almeida Marinho .....   | 95     |
| Vera Tavares Campos Carneiro .....    | 22     |
| William Sihler .....                  | 24     |