

8. PROPOSTA E RELATÓRIOS DE RESIDÊNCIA AGRONÔMICA

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Departamento de Fitopatologia

PROPOSTA DE PROGRAMA DE RESIDÊNCIA AGRONÔMICA

Candidato: Mauricio Pires Machado Barbosa

Orientador Responsável: Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

Supervisor Responsável: Herbert Pereira da Silva

Piracicaba, agosto de 1997

PROPOSTA DE PROGRAMA DE RESIDÊNCIA AGRÔNOMICA

01. DISCIPLINA: 011-601 - Residência Agrônômica

02. ALUNO: Mauricio Pires Machado Barbosa

03. CAMPO DE ATUAÇÃO: Pesquisa

04. TÍTULO DO PROGRAMA: Análise genética da resistência de milho a *Puccinia polysora* por meio da análise de médias de gerações e marcadores micro-satélites.

05. DEPARTAMENTO: Fitopatologia

06. ORIENTADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo

07. SUPERVISOR RESPONSÁVEL: Herberte Pereira da Silva

08. EMPRESA: ZENECA BRASIL LTDA. Empresa envolvida em produção de sementes, desenvolvimento e obtenção de linhagens e híbridos de milho e sorgo.

09. LOCAL: Estação Experimental de Cravinhos (SP) & Depto. de Fitopatologia
ESALQ/USP

10. RESUMO DA PROPOSTA:

Introdução

Puccinia polysora é o agente causal da ferrugem de Polysora, doença foliar de alto poder destrutivo na cultura do milho. A doença adquiriu maior impacto econômico no país com a expansão da área cultivada verificada após a adoção do cultivo do milho fora das épocas tradicionais, o chamado milho “safrinha”. Perdas podem ser severas, chegando a acarretar uma redução de 45% na produtividade de híbridos suscetíveis (Rodriguez-Ardon et al., 1980).

A resistência em milho à *P. polysora* pode ser do tipo monogênica (Storey & Howland, 1957; Ullstrup, 1965; Futrell et al., 1975). No entanto, a existência de raças do patógeno capazes de vencer este tipo de resistência em muito limita sua utilização em programas de melhoramento (Bailey et al., 1987). Uma alternativa ao uso de resistência monogênica seria a utilização de formas de resistência que diminuam a taxa de progresso da doença no campo (resistência do tipo “slow-rusting”, ou RSR). Este tipo de resistência já foi descrito em vários patossistemas (Parlevliet, 1979), incluindo o patossistema *P. polysora*-milho (Bailey et al., 1987), onde genótipos resistentes restringem o crescimento do patógeno, reduzindo o número e tamanho de pústulas e retardando o aparecimento de sintomas (Scott & Zummo, 1989). Embora existam cultivares e linhagens de milho com elevado grau de RSR, nada se sabe sobre as formas de herança genética e o número de genes envolvidos nesta característica.

Material e métodos

Avaliação da resistência: As gerações parentais (P1 e P2), F1, F2, (P1 x P2) x P1 e (P1 x P2) x P2, resultantes do cruzamento entre a linhagem resistente Z41 e a suscetível Z93, serão avaliadas para resistência a *P. polysora* sob condições de campo. Serão conduzidos dois ensaios nas dependências da estação experimental de Cravinhos, um com início previsto em dezembro/97 e outro em fevereiro/98. O delineamento experimental de ambos ensaios será o de blocos ao acaso com três repetições, com gerações consistindo em tratamentos. A unidade experimental, para os tratamentos P1, P2 e F1, consistirá em uma fileira de 5 m com 25 plantas. Para as gerações (P1 x P2) x P1 e (P1 x P2) x P2, a unidade experimental consistirá em 4 fileiras de 5 m com 25 plantas cada, ao passo que para a geração F2 consistirá em 6 fileiras de igual comprimento e número de plantas. Os tratos culturais e irrigação seguirão o esquema usualmente adotado pela empresa.

Aos 30 dias após a emergência, serão iniciadas avaliações semanais de severidade da doença, em plantas individuais e até 15 dias após o término do florescimento, por meio de escala diagramática de sintomas. De posse dos dados, será calculado, para cada parcela, a área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC), que, junto com a severidade, será utilizado como parâmetro de resistência. A primeira variável representa uma síntese temporal do comportamento do material frente à doença durante o período de avaliação, ao contrário das estimativas de severidade, que nos dão idéia do comportamento do material em um único ponto no tempo. Desta forma, é razoável supor que a variável AUDPC representa o efeito fenotípico global de todos os genes de resistência, ao passo que estimativas unitemporais de severidade podem refletir o efeito apenas daqueles genes de resistência

que estão sendo expressos no estágio de desenvolvimento da planta em que a avaliação é realizada.

As médias das gerações serão analisadas estatisticamente por meio da análise de média de gerações segundo Mather & Jinks, 1971. Esta análise permite decompor a variância genética em seus componentes aditivos, dominantes e sobredominantes, e estimar o número de genes envolvidos no controle da resistência.

Seleção e genotipagem de indivíduos extremos: Serão selecionados aproximadamente 30 indivíduos F2 pertencentes a cada extremo de resistência (altamente resistente e altamente suscetível) para análise molecular com loci de micro-satélites.

Micro-satélites são seqüências curtas de nucleotídeos (2-5 pb) que se repetem em tandem (Charlesworth et al., 1994). A alta variabilidade entre indivíduos do número de repetições de cada seqüência (em média 100-200 vezes), aliada à distribuição genômica aleatória destas, faz com que SSR sejam passíveis de serem utilizadas como marcadores moleculares em milho. Para tal, existem disponíveis no mercado “primers” (iniciadores) que flanqueiam loci de SSR em milho e que permitem amplificá-las via reação em cadeia por polimerase (PCR). Polimorfismos do comprimento destas seqüências são revelados mediante resolução dos produtos de amplificação em gel de agarose de alta concentração. Fragmentos polimórficos entre dois indivíduos segregam de maneira Mendeliana e co-dominante na progênie.

Neste ensaio, serão selecionados loci marcadores que mapeiam em regiões genômicas do milho aonde já se encontram mapeados genes de resistência a *P. polysora* e a outras doenças e pragas (McMullen & Simcox, 1995). O objetivo é o de verificar se a linhagem Z41 possui gene(s) de resistência que também mapeiam nestas regiões. Para tal, DNA das plantas selecionadas será extraído e analisado para os marcadores candidatos pela técnica de amostras segregantes agrupadas (“bulked

segregant analysis"; Michelmore et al., 1991). De acordo com este procedimento, o DNA das plantas selecionadas é agrupado em dois pools: um pool contendo DNA somente de plantas suscetíveis e outro de plantas resistentes. As amostras agrupadas são então submetidas a genotipagem com os loci marcadores em estudo, via PCR, conforme descrito abaixo. Somente os marcadores que estiverem ligados a genes de resistência a *P. polysora* revelarão polimorfismos entre os dois pools. Isto porque o background genético dos pools é casualizado somente em relação a loci marcadores não ligados aos genes responsáveis pela característica usada para a formação dos pools. A grande vantagem da utilização desta técnica é que o número de reações de PCR, por marcador investigado, é reduzido para essencialmente dois, em comparação ao método tradicional de genotipagem de todos os indivíduos da população, o que reduz custos e tempo de maneira expressiva.

Para a amplificação de loci marcadores, DNA genômico total de cada planta será extraído de folhas maduras de acordo com protocolo de extração do CIMMYT (1995). Após extração, o DNA será quantificado em fluorômetro (Hoefer, EUA) e sua concentração ajustada para 5 ng/μl. O DNA de plantas de cada pool extremo será misturado em quantidades iguais e submetido à reações de PCR.

A reação em cadeia por polimerase (PCR) seguirá protocolo previamente desenvolvido no laboratório de L. Senior (North Carolina State University, EUA) e adaptado por M. Guimarães (Sementes Agroceres, Brasil):

Reagente	conc. estoque	conc. final	quant./amostra
tampão <i>Taq</i> DNA pol	10X	1X	3μl
DNTP	10mM	100μM	0.3μl de cada
primer forward	20μM	0.3μM	0.5μl
primer reverse	20μM	0.3μM	0.5μl
<i>Taq</i> DNA pol.	5U	1U	0.2μl
MgCl ₂	50mM	1.5mM	0.9μl
DNA molde	5ng/μl	20ng	4μl
ddH ₂ O	-	-	20.6μl

O protocolo das condições de amplificação também será o de L. Senior, que sugere o seguinte esquema:

- desnaturação inicial de 94°C por 1 min
- 2 ciclos de 94°C/1 min
65°C/1 min
72°C/2 min
- Igual ao acima, mas diminuindo a temperatura de anelamento para 55°C em decrementos de 1°C a cada 2 ciclos (“touchdown - PCR”)
- 20 ciclos de 94°C/1 min
55°C/1 min
72°C/2 min
- elongação final a 72°C/6 min

Os produtos das reações de amplificações serão resolvidos em gel de agarose (3%) de alta resolução por meio de eletroforese a 70V em tampão 0.5 X TBE. Para comparações de pesos moleculares, será incluído, em cada gel, um padrão de peso molecular apropriado.

Bibliografia Citada

- Bailey BA; Schuh W; Frederiksen RA; Bockholt AJ; Smith JD. 1987. Identification of slow-rusting resistance to *Puccinia polysora* in maize inbreds and single crosses. **Plant Disease** 71:518-521.
- Charlesworth B; Sniegowski P; Stephan W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eucaryotes. **Nature** 371:215-220.
- Futrell MC; Hooker AL; Scott GE. 1975. Resistance in maize to corn rust controlled by a single dominant gene. **Crop Sci.** 15:597-599.
- Mather K. Jinks JL. 1971. Biometrical Genetics. Cornell University. Press Ithaca. New York
- McMullen, M. D.; Simcox, K. D. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 8, n. 6, p.811-15, 1995.

- Michelmore, R.W.; Paran, I. & Kesseli, R.V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.9828-32, 1991.
- Parlevliet JE. 1979. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annu. Rev. Phytopathol.** 17:203-222.
- Rodriguez-Ardon R; Scott GE; King S. 1980. Maize yield losses caused by southern corn rust. **Crop Sci.** 20:812-814.
- Scott GE; Zummo N.1989. Effect of genes with slow-rusting characteristics on southern corn rust in maize. **Plant Disease** 73:114-116.
- Storey HH; Howland A. 1957. Resistance in maize to the tropical American rust fungus *Puccinia polysora* Underw. **Heredity** 2:289-301.
- Ullstrup AJ. 1965. Inheritance and linkage of a gene determining resistance in maize to *Puccinia polysora*. **Phytopathology** 55:425-428.

11. OBJETIVOS:

- Instalar e conduzir dois ensaios de avaliação de resistência de diferentes gerações de milho a *Puccinia polysora* na estação experimental de Cravinhos (SP).
- Perfeccionar análises de médias de gerações com a finalidade de estimar o número e o modo de ação de genes envolvidos no controle da resistência deste germoplasma à enfermidade.
- Selecionar indivíduos pertencentes a extremos de resistência e de suscetibilidade e analisá-los, por meio da técnica de pools segregantes, com loci marcadores do tipo micro-satélite com o objetivo de investigar possíveis ligações entre estes loci e genes de resistência.

12. PROGRAMA DE ATIVIDADES:

As seguintes atividades serão realizadas **pelo residente**:

- A. Revisão bibliográfica sobre os assuntos pertinentes.
- B. Instalação, condução e avaliação de dois ensaios de campo. Espera-se que o residente faça toda a parte de casualização dos tratamentos, alocação de blocos e parcelas experimentais no campo, semeadura, pulverizações, irrigações e avaliações de severidade.
- C. Análise estatística dos dados de severidade. O residente ficará responsável em conduzir digitação de dados, organização de planilhas e análises estatísticas.
- D. Extração de DNA de amostras foliares. Para uma adequada extração de DNA genômico total de folhas de plantas selecionadas, o material deve ser coletado, congelado em ultra-freezer e moído em mini-moedor de café. Durante a moagem, o material vegetal não pode descongelar, razão pela qual faz-se necessário a utilização de nitrogênio líquido. A extração de DNA, propriamente dita, compreende etapas como quebra da parede celular, extração de proteínas com clorofórmio e álcool isoamílico e precipitação de ácidos nucleicos na presença de etanol absoluto. Depois de extraído, o DNA deve ser purificado com fenol e re-precipitado. Segue-se então sua quantificação, que será realizada com auxílio de fluorômetro.
- E. Amplificação, via PCR, de seqüências de micro-satélites. Nesta etapa, as amostras de DNA serão submetidas à reação de polimerase em cadeia para amplificação de loci micro-satélites em um aparelho termociclador existente no laboratório de genética molecular do Depto. de Fitopatologia.
- F. Resolução de seqüências de micro-satélites por meio de eletroforese em gel de agarose. Após o término da reação de PCR, deve-se colocar as amostras em gel de agarose para que, através de corrente elétrica, os fragmentos de micro-satélite

14. ACOMPANHAMENTO:

O trabalho do residente será acompanhado por meio de reuniões quinzenais com o orientador e o supervisor para avaliação do progresso do programa e discussão sobre os problemas encontrados. Espera-se que o residente apresente os resultados de seu projeto em congresso científico de âmbito nacional e participe como co-autor em quaisquer trabalhos científicos que porventura venham a ser publicados.

15. RECURSOS E FONTES ORÇAMENTÁRIAS:

O programa deverá ter custo estimado de R\$ 4.500,00 (Tabela 2). A empresa ZENECA BRASIL arcará com as despesas de estadia, alimentação, transporte e seguro obrigatório de vida e médico-hospitalar do residente. A empresa também arcará com todos os custos de instalação e condução e análise dos experimentos de campo. O Depto. de Fitopatologia, por sua vez, fornecerá reagentes para a realização de trabalhos com marcador molecular.

Tabela 2 - Custo do projeto

Elemento de despesa	Valor Unitário (R\$)	Valor Semestral (R\$)
Estadia diária em Cravinhos	25,00	2.500,00
Transporte Piracicaba-Cravinhos-Piracicaba	15,00	250,00
Alimentação diária em Cravinhos	10,00	400,00
Seguro saúde	-	150,00
Reagentes	-	1.200,00
	Total	4.500,00

16. OBSERVAÇÕES:

O projeto de residência prevê o desenvolvimento de atividades na empresa e na Universidade. Deve ficar claro que trata-se de um sub-projeto que faz parte de um projeto cooperativo ZENECA-Fitopatologia. Outrossim, que por se tratar de experiência pré-profissional, o aluno deverá se sujeitar inteiramente aos regulamentos e preceitos da empresa durante o período necessário ao desenvolvimento de seu projeto. Assim, se a empresa julgar necessário sua participação em outras atividades, o residente deverá cooperar, desde que não haja prejuízos à execução de seu projeto, a critério de seu professor responsável e supervisor.

17. ANEXO: Histórico escolar do candidato.

Mauricio Pires Machado Barbosa
Aluno

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Laboratório de Biologia Molecular de Plantas



Relatório de Residência Agronômica

CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DAS PROTEINASES
DIGESTIVAS (TRIPSINA E QUIMOTRIPSINA) DA BROCA
DA CANA-DE-AÇÚCAR (*Diatraea saccharalis*)

Aluna: Patrícia Pompermayer

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

Piracicaba/S.P.

1997

ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO.....	1
II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
III-MATERIAL E MÉTODOS.....	11
a) Criação das lagartas em laboratório.....	11
b) Preparo do extrato intestinal de <i>Diatraea saccharalis</i>	13
c) Determinação de proteína.....	14
d) Caracterização das enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas.....	15
e) Coluna High S.....	18
f) Uso de inibidores de proteinase contra as enzimas de <i>D. saccharalis</i>	19
VI-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
V) CONCLUSÕES.....	30
VI) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

I - INTRODUÇÃO

O monocultivo da cana-de-açúcar tem favorecido a instalação e desenvolvimento de pragas de importância econômica, dentre as quais situa-se a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*, (Fabr., 1794). A broca-da-cana é a principal praga da cultura na região Centro-Sul, mas também é constatada em todo o território brasileiro, além de países da América do Sul, Central e do Norte. Sua população crescente tem causado perdas significativas na produção, o que torna necessário a aplicação de poderosos inseticidas, além do desenvolvimento de técnicas de controle biológico.

Desse modo, nos últimos anos, uma nova estratégia vem sendo desenvolvida visando a proteção das culturas, que consiste na transformação genética de plantas com genes que codificam inibidores de proteinase.

Inúmeros estudos demonstraram que os inibidores de proteinase, presentes em dietas artificiais ou em plantas transgênicas, são capazes de interferir no crescimento e desenvolvimento de um grande grupo de insetos (Ryan, 1989; Ryan, 1990).

Segundo Terra & Ferreira (1994), para o desenvolvimento de métodos de controle de insetos fitófagos através de plantas transgênicas expressando inibidores de proteinase, é essencial o entendimento das funções do sistema digestivo dos insetos.

Assim, o presente projeto de Residência Agrônoma teve como objetivo a caracterização das principais enzimas digestivas da broca da cana, determinando-se a presença de atividade trípica e quimotríptica. A partir dos

estudos bioquímicos, foram testados alguns inibidores de proteinase disponíveis no laboratório, a fim de identificar aqueles que mostram-se mais efetivos contra as enzimas digestivas de *Diatraea sachareis*.

II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A broca-da-cana, *Diatraea sachareis* (FAB. 1794), Lepidoptera: Pyralidae, é a principal praga da cana-de-açúcar na região Centro-Sul e, sem dúvida, a praga mais conhecida na indústria açucareira. Os prejuízos causados por esta praga são bastante significativos, e sua ampla distribuição nos canaviais brasileiros (Câmara & Oliveira, 1993; Paranhos, 1987), e em diversos países da América do Sul, Central e do Norte a tornam uma praga de grande importância econômica (Copersucar, 1997; Paranhos, 1987).

Dentre os vários fatores que influenciam na composição química da cana-de-açúcar, os efeitos resultantes do complexo “broca-podridões” têm um papel extremamente relevante (Copersucar, 1975). Além dos prejuízos diretos (perda de peso, morte das gemas, abertura de galerias, etc.), é preciso considerar os prejuízos indiretos que são ainda mais significativos. A partir das galerias criadas pela lagarta há a penetração de fungos e bactérias (**FIGURAS 1 e 2**) que causam a podridão vermelha do colmo (*Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*). Como consequência, tem-se a inversão da sacarose, diminuindo a pureza do

caldo e resultando em menor rendimento em açúcar e álcool (Gallo, 1978; Copersucar, 1997).



FIGURA 1: Colmo de cana perfurado e danificado pela broca
(Foto: PLANALSUCAR)



FIGURA 2: Dano da broca-da-cana
(Foto: PARANHOS, 1987)

Nos últimos 20 anos, o aumento da área cultivada foi de 215%, atingindo cerca de 2 milhões de hectares no Estado de São Paulo, na safra de 92/93 (Copersucar, 1997). Este monocultivo da cana favorece o desenvolvimento da praga. Estudos realizados pelo Centro de Tecnologia da Copersucar em Piracicaba, revelaram que, para cada 1% de infestação da broca, a produção de cana é reduzida em 0,77%, a produção de açúcar em 0,25% e a produção de álcool em 0,20% (Copersucar, 1997).

A aplicação dos inseticidas orgânicos nos canaviais não apresenta os mesmos resultados espetaculares obtidos no controle de pragas de outras culturas, principalmente em virtude, de dois fatores. Um desses fatores deve-se à característica da praga passar a maior parte de sua fase larval dentro do colmo, onde o inseticida não a atinge. O outro fator deve-se ao porte da cultura, resultando em aplicações de inseticidas muito onerosas (Gallo, 1978). Ao mesmo

tempo, observa-se riscos ao meio ambiente e aos aplicadores; podendo provocar o desequilíbrio em relação a outras pragas. Normalmente, há a necessidade de duas ou três aplicações por área a cada ano, não havendo um grande número de opções de produtos químicos registrados (Copersucar, 1997). Sabe-se que muitas espécies de insetos da família Lepidoptera desenvolveram resistência a pesticidas convencionais e, portanto, novos métodos de controle tornam-se necessários (Lee & Anstee, 1995).

O melhoramento genético visando a obtenção de variedades resistentes, o uso de controle biológico e a aplicação de biopesticidas têm sido reportados. Entretanto, o desenvolvimento de novas metodologias menos poluentes e onerosas devem ser alcançadas. Durante os últimos anos, uma nova estratégia tem sido desenvolvida para oferecer um caminho ecologicamente aceitável para a proteção das culturas, reduzindo o nível de pesticidas no meio ambiente e atingindo as pragas de forma mais específica. Ela consiste na transferência de genes de resistência a pragas, em plantas de interesse econômico via Engenharia Genética (Belzunces *et al.*, 1994). Dentre os genes em estudo, destacam-se a toxina do *Bacillus thuringiensis* (Vaeck *et al.*, 1987) e genes cujos produtos exercem um efeito antimetabólico, como os inibidores de proteinase (Hilder *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1989).

Com os progressos obtidos a partir da caracterização do processo digestivo dos insetos, notadamente o mecanismo de digestão das proteínas pelas proteinases intestinais (Terra & Ferreira, 1994) foi possível o desenvolvimento de estratégias que interferissem no processo, resultando em plantas tolerantes a pragas.

No sistema biológico, as proteinases são controladas por vários mecanismos (Batista *et al.*, 1996). Eles podem ser inativados por degradação proteolítica (Borges *et al.*, 1986) ou bloqueados por inibidores os quais são atualmente pseudosubstratos manifestando variabilidade nos graus de afinidade com respeito aos sítios catalíticos das enzimas (Laskowski & Kato, 1980). Portanto, os inibidores de proteinase desempenham um papel importante nos sistemas biológicos, especialmente naqueles que dependem de proteólises limitadas para o controle de sua atividade (Travis & Salvessen, 1983).

Os inibidores de proteinase de plantas são polipeptídeos ou proteínas os quais ocorrem em diversas variedades de plantas. O grupo de inibidores de proteinase de planta mais comum e amplamente estudado são aqueles que inibem as proteinases do tipo serina de animais, entre elas as tripsinas e quimotripsinas (Broadway & Duffey, 1986).

Inibidores de proteinase derivados de plantas são de particular interesse pois eles são parte do sistema de defesa natural das plantas contra insetos predadores (Batista, *et al.*, 1996). A maior parte dos insetos da família Lepidoptera possui proteinases do tipo serina, tais como enzimas do tipo tripsina e quimotripsina, as quais atuam na proteólise das proteínas ingeridas (Masoud *et al.*, 1993). As proteinases do tipo serina apresentam uma serina e uma histidina em seu sítio ativo. A presença de serina pôde ser verificada em função da inativação da enzima por compostos específicos (DFP ou PMSF) e a histidina a partir do uso de cetonas (Terra & Ferreira, 1994).

Em plantas de soja, duas classes de inibidores de proteinase são bem caracterizadas: os inibidores do tipo Kunitz e o Bowman-Birk. Os inibidores do

tipo Kunitz apresentam peso molecular da ordem de 20.000 Da, e possuem uma especificidade direcionada contra as tripsinas. O inibidor do tipo Bowman-Birk, apresenta peso molecular de 6.000 a 10.000 Da, e possui uma atividade inibitória contra as tripsinas e quimotripsinas (Liener, 1994).

Plantas de batata e tomate contêm duas pequenas famílias de multigenes para dois poderosos inibidores de proteinase do tipo serina, chamados inibidor I e inibidor II. O inibidor I é um inibidor de quimotripsina enquanto o inibidor II possui dois sítios de inibição, um que inibe a quimotripsina e o outro a tripsina (Plunkett *et al.*, 1982). Constituintes de ambas famílias de genes são expressos nas folhas em resposta ao ataque dos insetos ou outros danos mecânicos (Gustafson & Ryan, 1976). Estes inibidores ajudam na defesa da planta através da redução da digestibilidade e qualidade nutricional das folhas contra os insetos predadores (Ryan, 1978).

Hilder *et al.* (1987) mostraram que plantas de tabaco transformadas com genes do inibidor de proteinase de feijão de corda foram capazes de conferir aumento de resistência contra a predação de lagartas de *Heliothis virescens*.

Num artigo interessante, Duan e colaboradores (1996) transformaram diversas variedades de arroz com o gene *pin2* (inibidor de tripsina e quimotripsina) de batata. Em seguida, os autores observaram que as plantas transgênicas mostraram-se resistentes à principal praga da cultura no Japão, além de constatarem que o transgene foi herdado após sucessivas gerações. Neste trabalho, Duan e colaboradores (1996) sugerem que os estudos relacionados à transformação de plantas com genes que codificam inibidores de proteinase são uma fonte importante de subsídios sobre o papel de inibidores de

proteínase na auto-proteção de plantas, como também demonstram a possibilidade do uso de inibidores de proteínase em culturas importantes por meio da Engenharia Genética. Sendo estes inibidores de proteínase componentes comuns de alimentos derivados de plantas, e por serem facilmente inativados pelo cozimento, a introdução destes genes em novas culturas pode ser considerada como uma estratégia viável para o controle de insetos do ponto de vista da segurança alimentar (Duan *et al.*, 1996).

Recentemente foi proposto que a eficiência dos inibidores de proteínase depende da afinidade ou especificidade de um inibidor para a principal proteínase intestinal do inseto, embora o mecanismo de ação e o efeito dos inibidores de proteínase sejam parcialmente entendidos (Jongsma *et al.*, 1995).

Broadway & Duffey (1986) mostraram que a atividade das proteínases intestinais de *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea* foi similar ou aumentada quando as lagartas foram expostas a níveis elevados de inibidores de proteínase de batata II (PI2) ou inibidor de tripsina da soja em dietas artificiais. O argumento de que as taxas de crescimento foram reduzidas pela redução das taxas de proteólises não foi, entretanto, observado. Os resultados foram interpretados pelos autores como sendo um mecanismo de "feedback" que conduziu a uma hiperprodução de proteínases para compensar a perda de atividade. Este mecanismo levou a uma falta de aminoácidos essenciais na síntese de outras proteínas resultando no retardamento das taxas de crescimento (Broadway, 1995).

Em interessante artigo, Jongsma e colaboradores (1996) mostraram que lagartas de *Spodoptera exigua* quando alimentadas com plantas transgênicas de

fumo expressando o inibidor de proteinase PIN2 de batata, adaptaram-se à presença do inibidor. Este mecanismo deveu-se à síntese de novas proteinases pouco sensíveis à ação do inibidor.

Em recente revisão, Jongsma *et al.* (1996) mostraram que os inibidores de proteinase da soja foram efetivos contra as tripsinas de *Tenebrio molitor* e *Manduca sexta* e contra as elastases de *Teleogryllus commodus*. Estas observações sugerem que estes inibidores quando incorporados em dietas artificiais podem retardar o desenvolvimento larval do inseto quando incorporado em dietas artificiais.

De acordo com Yeh *et al.* (1997), plantas transgênicas resistentes a pragas representam uma oportunidade atrativa para a biotecnologia agrícola. Muitos estudos, entretanto, precisam ser realizados, desde a caracterização das enzimas dos insetos até a identificação, isolamento e introdução de genes codificantes de inibidores específicos em plantas de interesse econômico.

Vários estudos têm sugerido que ensaios *in vitro* podem ser usados na seleção de inibidores específicos à determinadas proteinases digestivas de insetos. Desta forma, são necessários conhecimentos relacionados às propriedades destas enzimas, bem como sua interação com diferentes inibidores.

Muitas enzimas são pouco específicas, agindo sobre um grupo de substratos. Estudando-se as várias enzimas proteolíticas (que fazem hidrólise de proteínas) do tubo digestivo, encontra-se vários tipos de especificidade. As tripsinas são proteinases serínicas que clivam, em seu substrato (as proteínas), preferencialmente as cadeias protéicas nos pontos onde se encontram ésteres

carboxílicos e amidas de lisina e arginina (Raw & Colli, 1965; Terra & Ferreira, 1994).

A tripsina é inibida especificamente por TLCK (*N*- α -Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone), o qual age sobre a histidina (Shaw *et al.*, 1965). Através do uso de ester ou amidos derivados da arginina, tais como o TAME (*p*-tosyl-L-arginine methyl ester) ou BAPA (*N*-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide), a atividade proteolítica da tripsina tem sido relatada na maioria das espécies de insetos estudadas (Applebaum, 1985). Embora a hidrólise dos substratos TAME ou BAPA não seja uma prova definitiva da existência da enzima do tipo tripsina (outras enzimas são capazes de agir sobre estes substratos), evidências mais recentes têm mostrado que as proteinases digestivas dos insetos que hidrolizam estes substratos são do tipo tripsina (Terra & Ferreira, 1994).

Em relação às quimotripsinas, essas moléculas são proteinases serínicas que clivam apenas ésteres carboxílicos e amidas ligadas a um grupo aromático. Assim, esta enzima hidrolisa uma proteína atacando ligações em que estão envolvidos os aminoácidos tirosina e fenilalanina (Raw & Colli, 1965; Terra & Ferreira, 1994). A quimotripsina é especificamente inibida por TPCK (*N*- α -Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), o qual age sobre a histidina. A atividade da quimotripsina é usualmente analisada com grupos éster de amidos derivados da tirosina tais como BTEE (*N*-benzoyl-L-tyrosine etil ester) ou BTPNA (*N*-benzoyl-L-tyrosine *p*-nitroanilide). Embora haja poucos estudos sobre a quimotripsina, quando comparados à tripsina, sua taxa de ocorrência entre os insetos é similar a da tripsina (Applebaum, 1985).

Para a avaliação de uma enzima precisamos escolher a temperatura e o pH em que essa enzima será incubada. A IUB (International Union of Biochemistry) recomenda que os ensaios sejam feitos a 30°C. Essa temperatura é considerada ideal, uma vez que praticamente todas as enzimas permanecem estáveis e pode-se obter uma atividade facilmente mensurável.

A escolha do pH é feita incubando-se igual quantidade da enzima, pelo mesmo tempo, em diferentes pHs e determinando-se o melhor pH, ou seja, o pH no qual a enzima em questão apresenta maior atividade (Terra & Ferreira, 1994). A quantidade de uma enzima é medida em mili unidades (uM). Uma uM é definida como a quantidade da enzima que catalisa a transformação de 1 umol de substrato por minuto, em condições definidas de temperatura e pH. Para que possamos determinar quanto temos de uma enzima em certa preparação, devemos medir o aparecimento de produto em um determinado tempo (Terra & Ferreira, 1994).

Para medir a atividade de uma enzima sempre é possível usar seu substrato natural. Assim pode-se medir amilase usando amido; proteínase usando proteína; aminopeptidase usando um peptídeo, etc. Foram também desenvolvidos vários substratos sintéticos que facilitam muito certos ensaios enzimáticos. Eles possuem estrutura definida e normalmente o produto formado é determinado muito facilmente. Entre os substratos sintéticos, enquadram-se os substratos BAPA, o N(Ala)₂ProPhe pNa), o BTEE e o BAEE utilizados.

No presente trabalho, realizou-se a caracterização preliminar das principais enzimas digestivas da broca-da-cana (*Diatraea saccharis*) (tripsina e quimotripsina) e em seguida foram testados alguns inibidores de proteinases do

tipo serina a fim de se verificar o efeito dos mesmos sobre as enzimas dos insetos na presença de diferentes substratos.

III - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte de um projeto temático recém aprovado pela FAPESP e foi desenvolvido em colaboração com os laboratórios do Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho (Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - Departamento de Genética/ESALQ/USP), Prof. Dr. José Roberto Postalí Parra (Laboratório de Biologia de Insetos - Departamento de Entomologia/ESALQ/USP) e Prof. Dr. Walter R. Terra (Laboratório de Bioquímica de Insetos - Instituto de Química/USP).

a) Criação das lagartas em laboratório

As lagartas de *Diatraea saccharalis* (FAB., 1794), Lepidoptera: Pyralidae, utilizadas nos ensaios bioquímicos, foram cultivadas em dietas artificiais no Laboratório de Biologia de Insetos/ESALQ/USP (Prof. Dr. José Roberto Postalí Parra) e pelo Centro de Tecnologia Copersucar (CTC) localizado em Piracicaba, Estado de São Paulo, Copersucar (**FIGURAS 3, 4 e 5**).

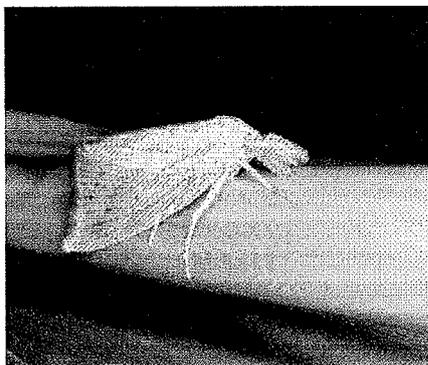


FIGURA 3: Adulto

(Foto: Negri)

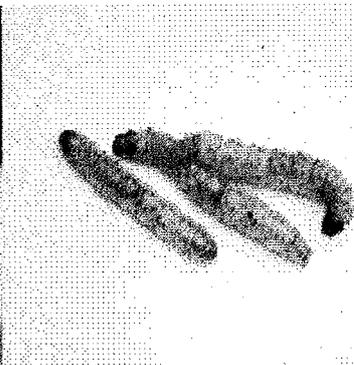


FIGURA 4: Lagartas
6^o ínstar

(Foto: Tolini)



FIGURA 5: Pupa

(Foto: Tolini)

As lagartas foram agrupadas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura), tampados com algodão hidrófugo e alimentadas com dieta artificial (**FIGURA 6**). No caso do Laboratório de Biologia de Insetos, a dieta foi elaborada com os seguintes componentes: Germe de trigo (35 g); Farelo de soja (120 g); Sacarose (120 g); Sais de Wesson (17 g); Nipagen (7 g); Ácido ascórbico (4,2 g); Cloreto de colina (0,9 g); Formol 3,7 % (1,7 ml); Vita gold (0,9 ml); Tetrex (500 mg) ou tetraciclina (1,3 g); Solução vitamínica (25 ml); Ágar (25 g) e Água destilada (2 l). Em relação às lagartas mantidas pelo CTC, a dieta constitui-se principalmente de bagacilho de cana.

A quantidade de dieta colocada foi de aproximadamente 1/3 do comprimento do tubo de vidro.

As lagartas no sexto (último) ínstar foram selecionadas para a utilização nos ensaios bioquímicos.



FIGURA 6: Dieta artificial
(Foto: Tolini)

b) Preparo do extrato intestinal de *Diatraea saccharalis*

Lagartas no último estágio larval (aproximadamente 25 dias após a postura dos ovos) foram imobilizadas em gelo por alguns minutos. Em seguida, com auxílio de microscópio estereoscópico e pinças, os intestinos foram dissecados em uma solução 125 mM de NaCl gelada e a membrana peritrófica, que envolve o conteúdo alimentar dos insetos, foi selecionada da membrana do ventrículo (posicionada externamente a membrana peritrófica) e separadas em lotes de intestino médio total (**FIGURA 7**).

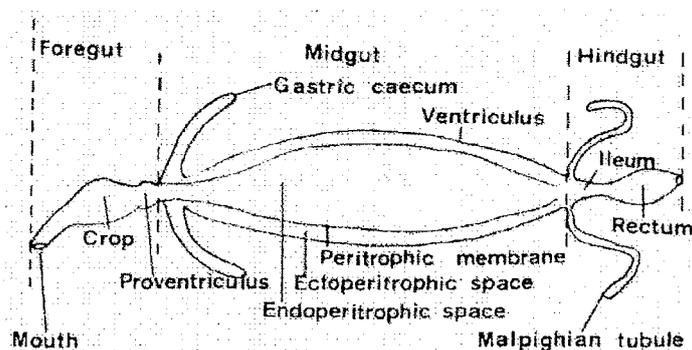


FIGURA 7: Diagrama generalizado do trato digestivo de insetos

Lotes de 25 intestinos por ml (membranas peritróficas juntamente com o conteúdo alimentar) foram homogeneizados em água Milli-Q gelada, utilizando-se um homogeneizador Potter-Elvehjen. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à uma rotação de 15000 rpm, por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado, filtrado em algodão de vidro (para retenção do lipídeos que poderiam afetar a determinação de proteína pelo método de Bradford) e armazenado em freezer -15°C (Ferreira *et al.*, 1994).

O nível de enzima a ser utilizado num ensaio só pode ser descoberto por tentativa e erro. No tempo de incubação, o produto formado deve ser facilmente medido sem exceder a capacidade do(s) método(s) na sua detecção (Terra & Ferreira, 1994). Por essa razão, a diluição de 50 vezes do homogeneizado de *D. saccharalis* (25 intestinos/ml) mostrou-se mais adequada.

c) Determinação de proteína

As proteínas foram determinadas de acordo com método de Bradford (1976) utilizando-se soro de albumina bovina (BSA) como padrão.

d) Caracterização das enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas

Para a determinação da atividade trípica foram utilizados os substratos *N*-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BAPA) e *N*-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE).

A atividade quimotríptica foi determinada usando-se os substratos *N*-benzoyl-L-tyrosine etil ester (BTEE) e *N*-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine *p*-nitroanilide (S(Ala)₂ProPhe-pNa).

O BAPA foi utilizado a uma concentração de 1 mM, enquanto o S(Ala)₂ProPhe-pNa utilizado a uma concentração de 0,1 mM. Cada um deles foi dissolvido em 0,8% (v/v) de dimetilformamida (solvente orgânico) e o volume completado com tampão CAPS (fervente, no caso do BAPA), em pH 9,0, o qual se mostrou ótimo a partir da na curva de pH ótimo, obtida anteriormente. A reação foi interrompida com ácido acético 30%, sendo em seguida feita a determinação da atividade enzimática em nmoles *p*-nitroanilina/min./mg proteína (Souza *et al.*, 1995)

Os substratos BAEE e o BTEE foram preparados a uma concentração final de 1mM, dissolvidos em metanol 10% e o volume completado com tampão CAPS, pH 9,0. Para interromper a reação foram utilizados uma solução 1:1 de hidroxilamina 13,9% (v/v) e NaOH 3,5 M recém feita. Após 25 minutos foi adicionado HCl 3M e Cloreto Férrico (FeCl₃) 10% (v/v). Em seguida, após 15 minutos, foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 540 nm (Houseman & Philogène, 1988).

- *Ensaio de pH ótimo para a tripsina e quimotripsina*

Tampões numa faixa de pH entre 6,0 e 10,0 foram preparados em uma concentração de 0,2 M. Os tampões utilizados foram: Citrato/fosfato (pH 6,9 a 7,0); Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0) e Piperazina (pH 9,0 a 10,0) para o substrato BAPA e Fosfato de Sódio (pH 6,0 a 8,0); Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0) e Glicine (pH 9,0 a 10,5) para o substrato N(Ala)₂ProPhe pNa.

Os substratos foram preparados com o dobro da concentração utilizada nos ensaios (2 mM para o BAPA e 0,2 mM para o N(Ala)₂ProPhe pNa) e dissolvido em Dimetilformamida 0,8% e água Milli-Q (substitui o tampão e também deve estar em fervura para dissolver o BAPA).

Foram preparadas as misturas numa proporção de 1 substrato:1 tampão em diferentes pH. Desta forma a concentração do tampão se diluiu para 0,1 M, a do BAPA para 1mM e a do N(Ala)₂ProPhe pNa 0,1 mM.

O homogeneizado de *D. saccharalis* (25 intestinos/m) foi diluído 50 vezes para o ensaio e pH nos tubos foi medido em ensaio a 30°C. Além do ensaio enzimático foram colocados no banho à 30°C as misturas (substrato e tampão); o padrão de pH e a água destilada para lavagem do eletrodo (para controle do pH a esta temperatura).

Foram feitas curvas de quatro tempos para cada pH (15, 30, 40 e 60 minutos) e a reação foi interrompida com ácido acético 30%.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda igual a 410 nm e determinada a atividade enzimática em nmoles de p-nitroanilina/min./mg de proteína para cada pH.

- Determinação da atividade enzimática

Os substratos BAPA e N(Ala)₂ProPhe pNa) são hidrolizados pela enzima e liberam a p-nitroanilina, que é um composto colorido. Assim pode-se saber se a enzima está muito ativa ou não observando o tubo durante a incubação e através da leitura no espectrofotômetro utilizando-se um comprimento de onda igual a 410 nm. Quanto mais amarelo ou maior a leitura no espectrofotômetro, maior é a atividade enzimática.

Utilizando-se uma curva padrão de p-nitroanilina, onde utiliza-se diferentes concentrações de p-nitroanilina obteve-se um fator (nmoles p-nitroanilina/abs) e a partir do qual pode-se calcular a atividade enzimática em nmoles de p-nitroanilina/min/mg de proteína que é produzida da seguinte maneira:

-*Atividade absoluta* = [Fator (nmoles p-nitroanilina/abs) x Inclinação da curva de 4 tempos (15, 30, 45 e 60 minutos) de cada tubo do ensaio enzimático (abs/min.) x diluição x volume utilizado] / número de intestino = nmoles p-nitroanilina/min.

-*Atividade específica* = Atividade absoluta/mg proteína/intestino (determinada pelo método de Bradford) = nmoles p-nitroanilina/min/mg de proteína.

Já com os substratos BTEE e BAEE é medido o desaparecimento de cor, ou seja, quanto maior a atividade enzimática, menor é a cor visível. Porém a transformação em nmoles de substrato hidrolizado/min./mg de proteína segue o mesmo procedimento acima descrito.

e) Coluna High S

Como primeiro passo para determinação de uma marcha de purificação das tripsinas de *D. saccharalis* foi utilizada uma coluna de cromatografia de troca iônica do tipo High S (um sistema de cromatografia de baixa pressão – Econo System-Bio Rad) no laboratório de Bioquímica de Insetos/Instituto de química/USP (Prof. Dr. Walter Terra), juntamente com a mestrandia Adriana Rios. Esta coluna possui um grupo ($-\text{SO}_3^-$) como grupo funcional ligado a uma matriz constituída de um polímero.

A coluna foi equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 4,5 (tampão A) e eluída com tampão acetato 50 mM, pH 4,5, 1,0 mM NaCl (tampão B). Foram aplicados 600 μl de uma amostra diluída duas vezes no tampão no qual a coluna foi equilibrada.

A metodologia empregada é descrita a seguir: foi: a coluna foi previamente equilibrada em tampão acetato 50 mM, pH 4,5. A coluna foi lavada (a lavagem compreende a intervalo onde será passado apenas o tampão que também foi utilizado para equilibrar a coluna. Esta lavagem irá retirar da coluna as proteínas que não interagiram. A coluna foi lavada com 5 ml do tampão A em um fluxo de 0,5 ml/min. Foi feito um gradiente de 0 a 1,0 M de NaCl passando pela coluna um volume de 20 ml com um fluxo de 0,5 ml/min. Em seguida, aplicados mais 5,0 ml, após o gradiente, de tampão B para a eluição completa das proteínas que interagiram com a coluna.

As frações foram coletadas e foram ensaiadas com o substrato BAPA.

f) Uso de inibidores de proteinase contra as enzimas de *D. saccharalis*

Embora um número importante de compostos tenha a capacidade de se combinar com certas enzimas, não servem como substrato e, portanto, bloqueiam a sua capacidade catalítica. Esses compostos são chamados inibidores (Conn, 1972; Dose, 1982).

A inibição da tripsina foi determinada pela medida da inibição da hidrólise de BAPA (*N*-benzoyl-*L*-arginine *p*-nitroanilide) e BAEE (*N*-benzoyl-*L*-arginine etil ester) pela tripsina; BTEE (*N*-benzoyl-*L*-tyrosine etil ester) e N(Ala)₂ProPhe pNa (*N*-succinyl-ala-ala-pro-phe *p*-nitroanilide) pela quimotripsina.

Foram utilizados os seguintes inibidores: Arrowhead fornecido pelo Dr. Steve Gleddie/Canadá (extraído de uma planta chinesa); Kunitz (Merck) e Kunitz (Sigma) (ambos extraídos de plantas de soja); Aprotinina (Sigma) (extraído de pulmão bovino) e pin2 (presente em extrato foliar de plantas de fumo transgênicas, mas encontrado naturalmente em plantas de batata).

Para o preparo do extrato foliar das plantas de fumo transgênicas foram pesadas as folhas de fumo, envolvidas em papel alumínio, mergulhadas em nitrogênio líquido e maceradas em cadinho juntamente com tampão Tris-HCl pH 7,0 e de ácido ascórbico 0,1%. Em seguida filtrada em gases, centrifugado à 5.800 rpm, 4°C por 15 minutos e ao sobrenadante acrescentado sulfato de amônio 70% sob agitação em gelo. O "pellet" resultante de uma segunda centrifugação à 7.200 rpm, 4°C, por 30 minutos foi ressuscitado em água Milli-Q, passado pela coluna Sephadex e feita a determinação de proteína pelo método de Bradford.

Nos ensaios foram utilizados 50, 100 e 200 ug de proteína do extrato foliar e 2,5, 5,0 e 10,0 ug dos inibidores purificados, quantidades estas obtidas por tentativa e erro.

Para os inibidores do tipo Kunitz das marcas Merck e Sigma foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida 14% a fim de visualizar possíveis diferenças e semelhanças entre ambos.

IV) RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Ensaio de pH ótimo para a tripsina e quimotripsina

A) Curva de pH ótimo para a atividade proteolítica da enzima tripsina de *D. saccharalis* (substrato sintético = BAPA)

FIGURA 8:

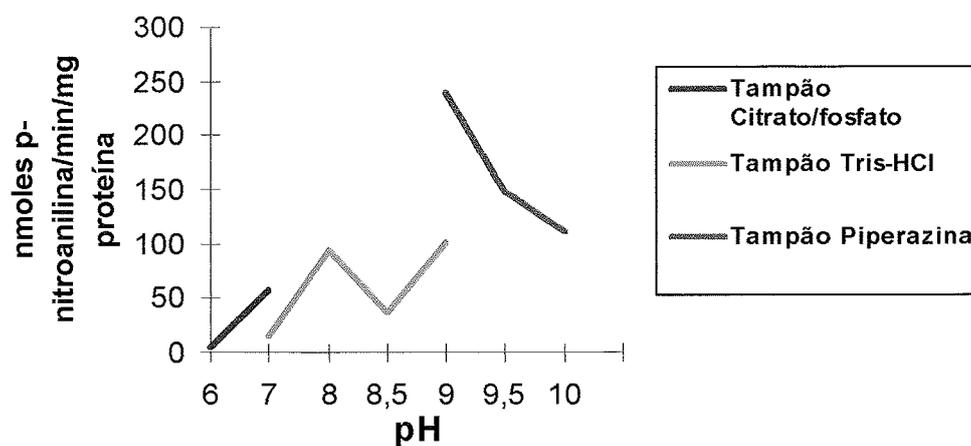
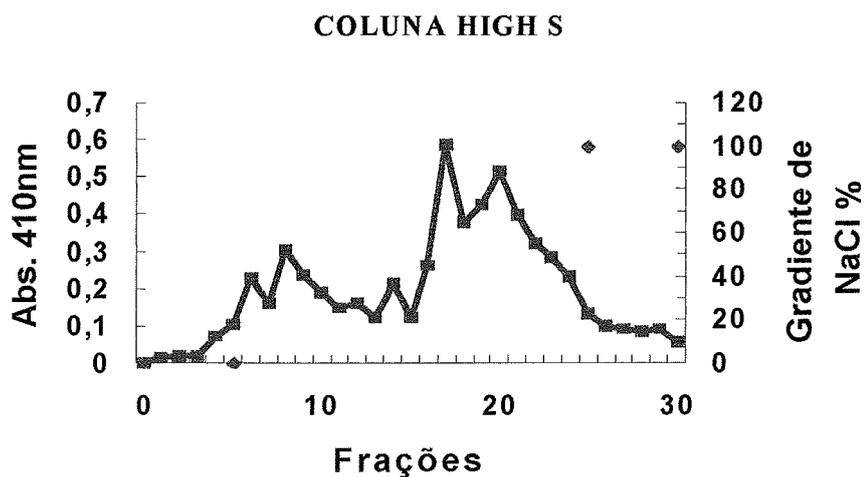


FIGURA 9:

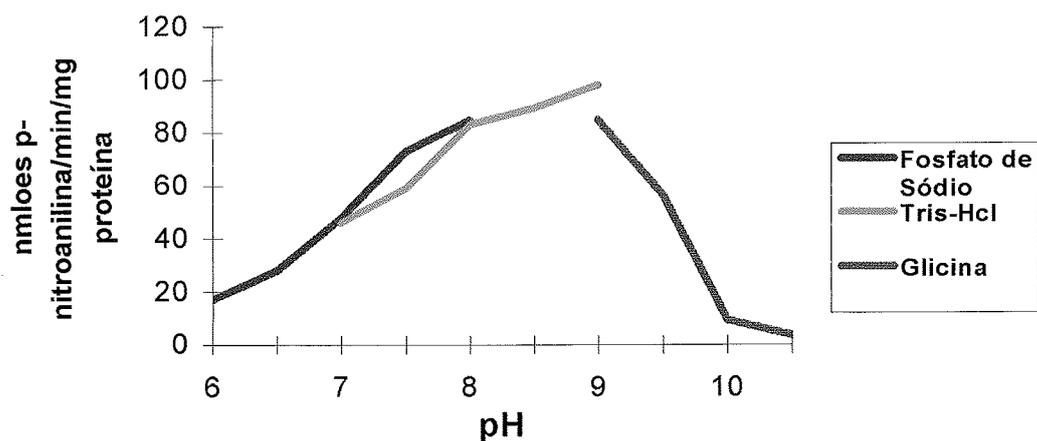


Observando-se os dois gráficos anteriores, ambos realizados no Laboratório de Bioquímica de Insetos/Instituto de Química/USP (Prof. Dr. Walter R. Terra) monitorada pela Adriana R. Lopes (mestranda) no período de duas semanas de treinamento, as tripsinas de *D. saccharalis* parecem ser bastante interessantes, pois nota-se a possível existência de mais de uma enzima do tipo tripsina. Nota-se também a existência de no mínimo dois picos de pH ótimo.

Estudos mais refinados a este respeito estão sendo realizados pela Adriana R. Lopes cujo trabalho refere-se a especificidade de tripsinas de insetos. (*Diatraea saccharalis*, *Musca domestica*, *Tenebrio molitor* e *Periplaneta americana*). A tripsina de *D. saccharalis* está em vias de purificação. Em eletroforese e em focalização isoelétrica aparecem também mais de um pico de atividade, o que é mais uma evidência da presença de mais de uma tripsina, uma minoritária e uma majoritária.

B) Curva de pH ótimo para a atividade proteolítica da enzima quimotripsina de *D. saccharalis* (substrato sintético = S(Ala)₂ProPhe pNa)

FIGURA 10:

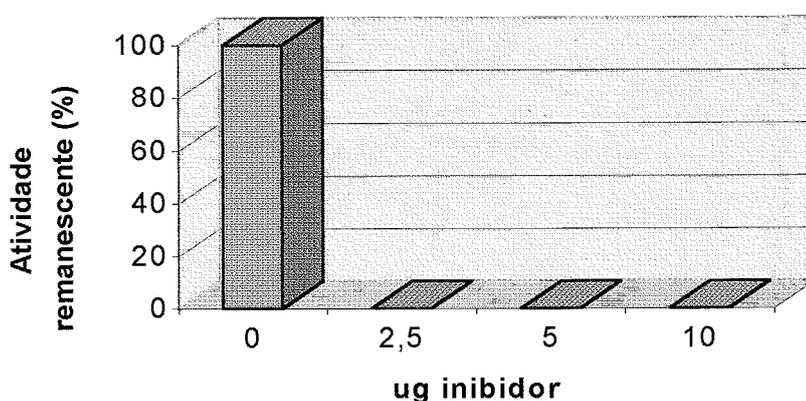


Ao contrário do observado com a tripsina, a quimotripsina apresenta apenas um pico de pH ótimo (9,0) sendo que neste pH ocorre a máxima hidrólise do substrato (maior atividade enzimática).

Em comparação com a tripsina, a quimotripsina apresenta uma atividade menor, ou seja, enquanto a tripsina atinge um valor máximo de aproximadamente 250 nmoles de p-nitroanilina/min./mg de proteína a quimotripsina atinge aproximadamente 100 nmoles de p-nitroanilina/min./mg proteína. Isto pode indicar que a tripsina seja a principal enzima de *D. saccharalis*.

A seguir são apresentados uma série de figuras mostrando o efeito de diferentes inibidores sobre os substratos sintéticos utilizados para as tripsina e quimotripsina.

FIGURA 11: Efeito do inibidor de proteinase do tipo Kunitz (Merck) sobre a tripsina bovina purificada utilizando-se o substrato sintético BAPA



Observa-se na figura acima uma inibição de 100% da atividade da tripsina bovina purificada, nas três concentrações de inibidor utilizadas.

FIGURA 12 : Efeito do inibidor de proteinase do tipo Kunitz (Merck) sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis* utilizando o substrato BAPA

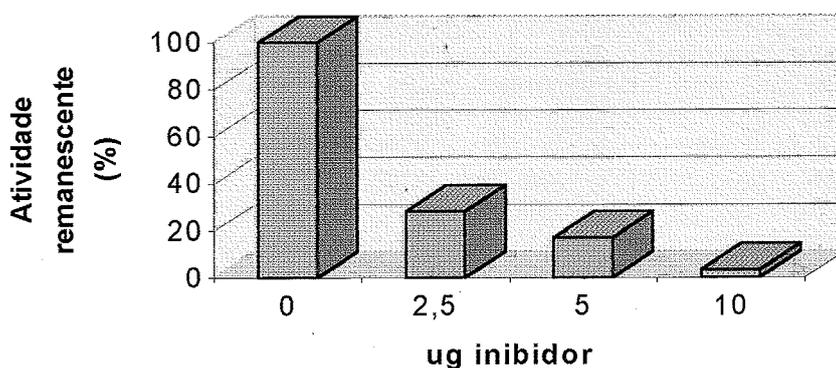


FIGURA 13: Efeito do inibidor de proteinase do tipo Kunitz (Merck) sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis* utilizando o substrato S(Ala)₂ProPhe-pNa

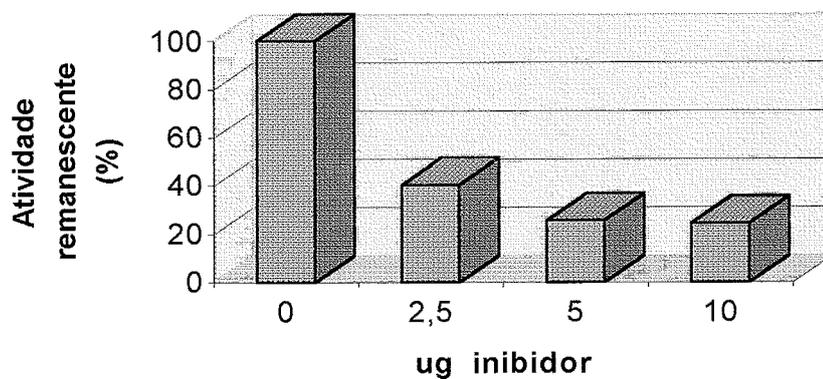


FIGURA 14: Efeito do inibidor de proteinase do tipo Arrowhead sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis* utilizando-se o substrato sintético BAPA

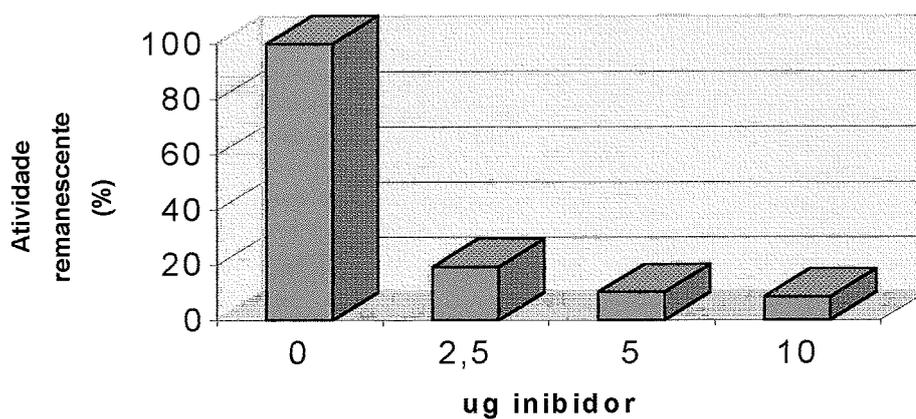


FIGURA 15: Efeito do inibidor de proteinase do tipo Aprotinina sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis* utilizando-se o substrato BAPA

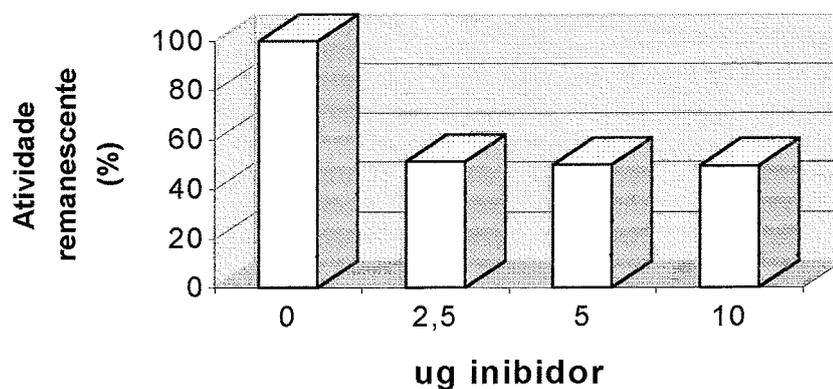


FIGURA 16: Efeito do inibidor de proteinase do tipo Kunitz (Sigma) sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis* utilizando-se o substrato BAPA

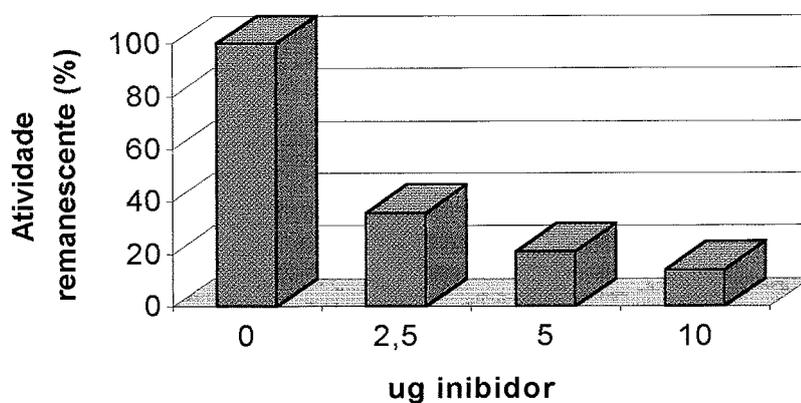


FIGURA 17: Efeito do extrato foliar de plantas selvagens e transgênicas de fumo expressando o inibidor de batata do tipo pin2 sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis* utilizando-se o substrato BAPA

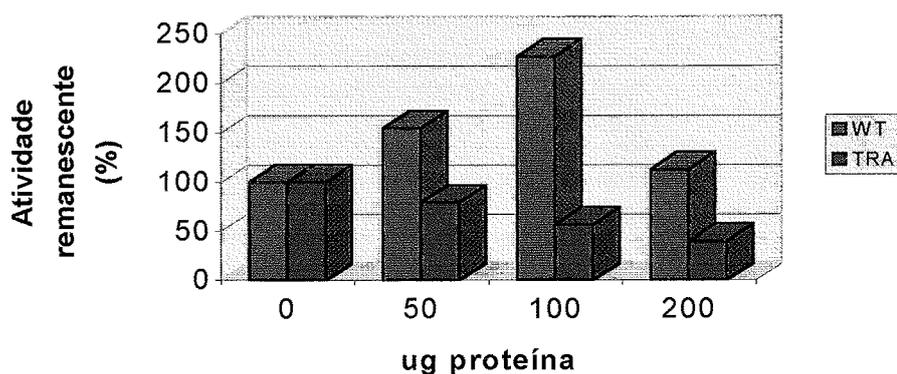


FIGURA 18: Efeito do extrato foliar de plantas selvagens e transgênicas de fumo expressando o inibidor de batata do tipo pin2 sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis* utilizando-se o substrato S(Ala)2PhoPhe pNa

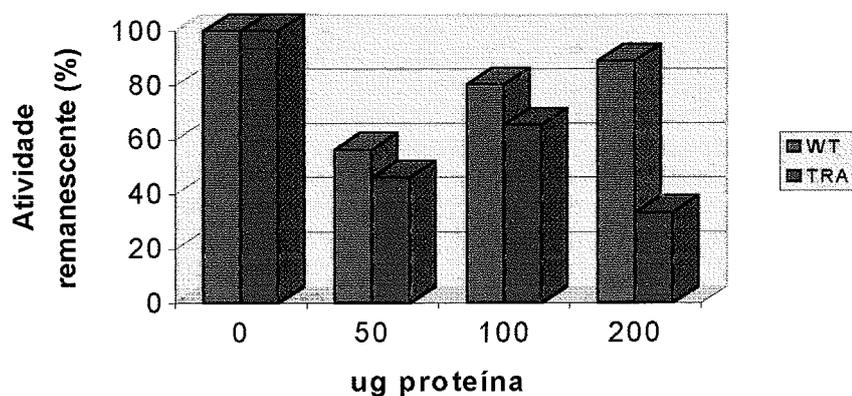


FIGURA 19: Efeito do extrato foliar de plantas selvagens e transgênicas de fumo expressando o inibidor de batata do tipo pin2 sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis*, utilizando-se o substrato BTEE

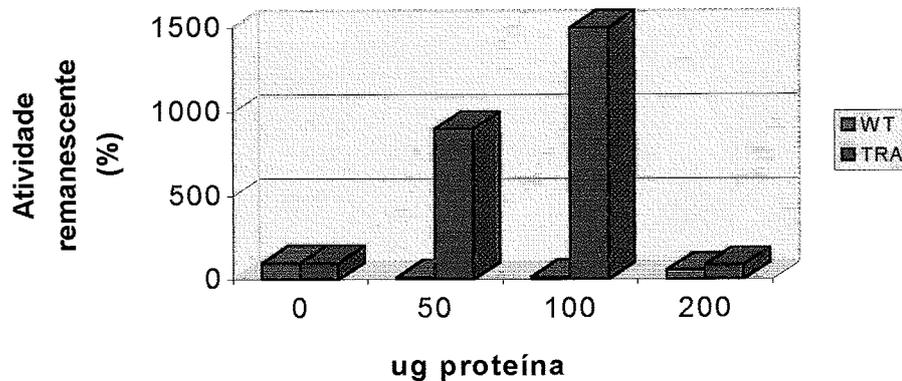
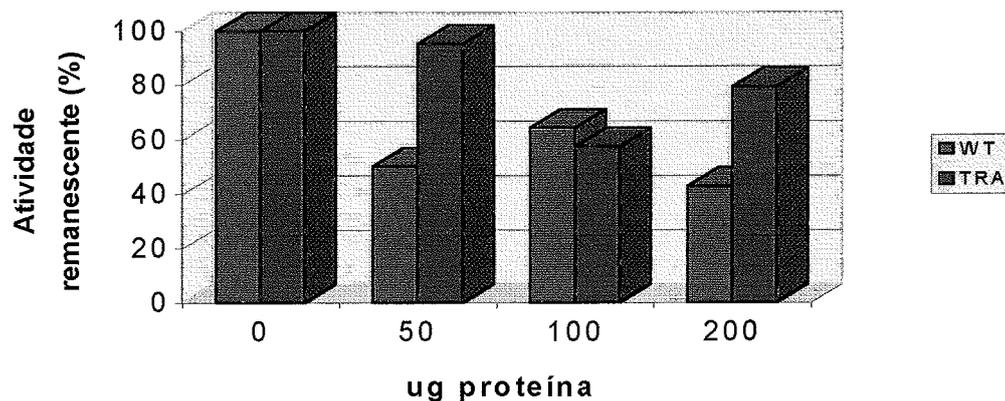


FIGURA 20: Efeito do extrato foliar de plantas selvagem e transgênica de fumo expressando o inibidor de batata do tipo pin2 sobre a atividade proteolítica do extrato intestinal de *D. saccharalis*, utilizando-se o substrato BAEE



Nota-se que cada inibidor age diferentemente sobre as enzimas proteolíticas de *D. sachareis*. Fato também observado por Gleddie e Galgaro (1996)¹ (dados não publicados) com praga mais próxima da Broca-da-cana

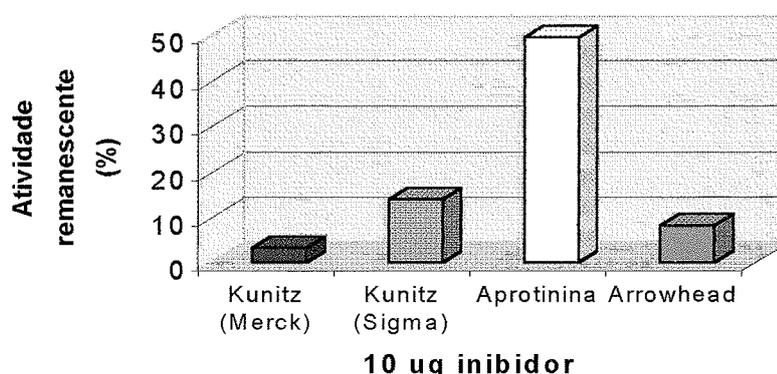
¹ Central Experimental Farm
ECOR – Bldg 21 – Ottawa, Ontário, Canadá
K1A0C6

(*Diatraea saccharalis*) - a corn borer ou broca do milho (*Ostrinia nubilalis*), porém não ocorre no Brasil.

É importante ressaltar que no extrato de plantas de fumo (Figuras 17, 18, 19 e 20) estão presentes outros diversos inibidores que ocorrem naturalmente em plantas de fumo, juntamente com outros compostos. Desta forma há interferência nos ensaios enzimáticos. Também pôde-se observar que houve algumas vezes um estímulo da atividade enzimática, quando se utilizou o extrato de plantas de fumo transgênicas e selvagens (Figuras 17 e 19), fato observado na literatura como uma possível adaptação aos inibidores.

Também são encontrados na literatura os substratos BAEE e BTEE como sendo quebrados por outras enzimas além da tripsina e quimotripsina, respectivamente.

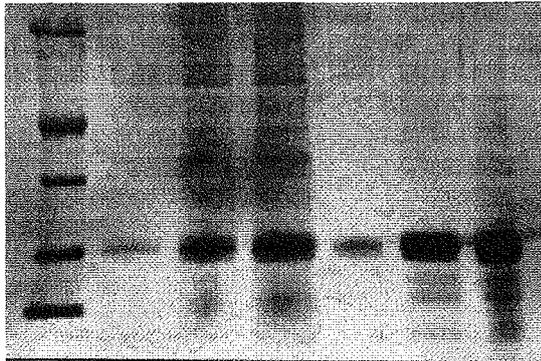
FIGURA 21: Comparação entre os inibidores de tripsina utilizados com o substrato BAPA



Comparando-se os diversos inibidores, conclui-se que o mais efetivo contra as proteinases intestinais foi o Kunitz (Merck). Interessante foram os resultados obtidos pelo mesmo inibidor porém de marcas diferentes (Merck e Sigma).

Abaixo está o gel de poliacrilamina onde foi realizado eletroforese com ambas as marcas:

Kunitz (Merck) **Kunitz (Sigma)**
↓ ↓
Marcador 1ug 5ug 10ug 1ug 5ug 10ug
↓ ↓ ↓



Além do inibidor do tipo Kunitz (bandas mais espessas), observa-se outras bandas no gel que podem ser degradação do inibidor ou contaminação com, por exemplo, o inibidor de soja do tipo Bowman-Birk que apresenta um peso molecular menor e, portanto, uma banda mais abaixo.

Esses resultados representam importantes subsídios para estudos subsequentes:

- ensaios biológicos a partir da incorporação de inibidores em dietas artificiais;
- transformação genética da cana-de-açúcar com o gene que codifica o inibidor.

V) CONCLUSÕES

- Ocorrência de duas (ou mais) enzimas com atividade do tipo tripsina;
- Apenas uma enzima com atividade quimotríptica;
- Inibidores mostraram-se efetivos contra as tripsinas e quimotripsinas de *D. sachareis*, embora significativas variações sejam observadas.
- O inibidor de proteinase do tipo Kunitz (Merck) mostrou-se o inibidor mais eficiente contra as enzimas digestivas do tipo tripsina de *D. saccharalis*;
- Há diferenças entre inibidores do tipo Kunitz de marcas diferentes (Merck e Sigma);
- A tripsina possui maior atividade quando comparada com a quimotripsina.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPLEBAUM, S.W. (1985) Comp. Insect Physiol. **4**: 279-311.
- BATISTA, I.F.C.; OLIVA, M.L.V.; ARAUJO, M.S.; SAMPAIO, M.U., RICHARDSON, H.F. & SAMPAIO, C.A.M. (1996) Phytochem. **41**: 1017-1022.
- BELZUNCES, L.P.; LENFANT, C.; PASQUALE, S.D. & COLIN, M. Comp. Biochem. Physiol. (1994) **109B**: 63-69.
- BORGES, D.R.; SAMPAIO, C.A.; DE LA LLOSA, P. & PRADO, J.L. (1986) Adv. Exp. Med. Biol. **198**: 229.
- BRADFORD, M.M. (1976) Comp. Biochem. Physiol. **93B**: 239-246.
- BROADWAY, R. & DUFFEY, S. (1986) J. Insect Physiol. **32**: 827-833.
- BROADWAY, R. (1995) J. Insect Physiol. **41**: 107-116
- CÂMARA, G.M. de S. & OLIVEIRA, E.A.M. de. Produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: FEALQ, 1993. 242p.
- CONN, E.E. Manual de bioquímica. São Paulo: Ed. da USP, 1972. 420p.
- COPERSUCAR (1997). Divulgação interna
- COPERSUCAR. Influência do ataque do complexo "broca-podridões" na composição da cana-de-açúcar. 1975. 65p.
- DOSE, K. Bioquímica. São Paulo: EPU: Ed. da USP: Springer, 1982. 296p.
- DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q.; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D. & WU, R. (1996) Nature Biotech. **14**: 494-498.
- FERREIRA, C.; CAPELLA, A.N.; SITNIK, R. & TERRA, W. (1994) Comp. Biochem. Physiol. **107A**:631-640.
- GALLO, D. Pragas da cana-de-açúcar. p.35-42. In: Planalsucar, 50 Anos de Estação Experimental de Piracicaba. Piracicaba/ S.P. 1978. 82p.
- GUSTAFSON, G. & RYAN, C. (1976). J. Biol. Chem. **251**: 7004-7010.
- HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E., GARKER, R.F. & BOULTER, D. (1987) Nature **300**: 160-163.
- HOUSEMAN, J.G. and PHILOGÈNE, J.R. (1988) Can. J. Zool. **67**: 864-868.

- JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G. & RYAN, C. (1989) Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. **86**: 9871-9875.
- JONHSTON, K.A.; LEE, M.J. BROUGH, C; HILDER.V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, G.A. (1994) Insect Biochem. Molec. Biol. **25**: 375-383.
- JONGSMA, M.; PETERS, J.; STIEKEMA, W. & BOSCH, D. (1996) Insect Biochem. Molec. Biol. **26**: 185-193.
- JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D. & STIEKEMA, W. J. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **92**: 8041-8045.
- KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. Handbook of Insect Rearing. Amsterdam/Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V., 1985. Vol.II, p.265-270.
- LASKOWSKI, M. Jr. & KATO, I. (1980) Annu. Rev. Biochem. **49**: 593.
- LEE, J.M. & ANSTEE, J.H. (1995) Insect Biochem. Molec. Biol. **25**: 49-61.
- LIENER, I. (1994) Crit. Rev. Food Sci Nut. **34**: 31-67.
- MASOUD, S.A.; JOHNSON, L.B.; WHITE, F.F. & REECK, G.R. (1993) Plant. Mol. Biol. **21**: 655-663.
- PARANHOS, S.B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Fundação Cargil: Campinas/S.P. v2. 1987. 856p.
- PLUNKETT, G., SENEAR, D., ZUROSKE, G. & RYAN, C. (1982) Arch. Biochem. Biophys. **213**: 456-462.
- RAW, I. & COLLI, W. Fundamentos de Bioquímica. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, v1, 1965. 133p.
- RYAN, C. (1987) Trends Biochem. Sci. **7**: 148-150.
- RYAN, C.A. (1989) BioEssays **10**: 20-24.
- RYAN, C.A. (1990) Annu. Rev. Phytopath. **28**: 25-49.
- SHAW,E., MARES-GUIA, M. & COHEN, W. (1965) Biochem. **4**: 2219-2224.
- TERRA, W.T. & FERREIRA, C. (1994) Comp. Biochem. Physiol. **109B**: 1-62.
- TRAVIS, J. & SALVESSEN, G. (1983) Annu. Rev. Biochem. **52**: 655.

VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFLE, H.; JANSEN, S.; de BEUCKLLER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; MONTAGN, M. VAN and LEEMANS, J. (1987) Transgenic plants protected from insect attack. Nature **328**: 33-37.

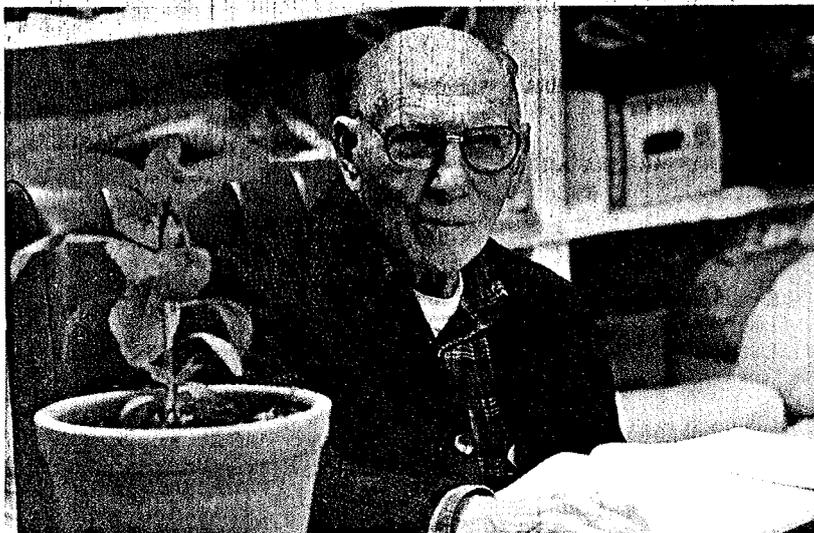
YEH, K.M.; LIN, M.I.; TUAN, S.J. CHEN, C.Y. & KAO, S.S. (1997) Plant Cell Reports **16**: 696-699.

**9. DIVULGAÇÃO DE EVENTOS REALIZADOS PELO GRUPO
ATRAVÉS DO JORNAL DE PIRACICABA**

AGENDA

ESALQ

O 6º Curso de Atualização em Biotecnologia acontece hoje, às 20 horas, no Anfiteatro da Genética, na Escola Superior de Agricultura Lutz de Queiroz. O professor Luiz Lehmann Coutinho, do Departamento de Zootecnia, vai falar sobre "Os últimos dois anos de biotecnologia animal no Brasil". Amanhã, às 20 horas, no mesmo local, haverá a palestra "Resgatando as Memórias da ESALQ", com o professor Zilmar Ziller Marcos, do Departamento de Solos. A promoção é do Programa Especial de Treinamento em Biotecnologia Agrícola.



PRIMEIRO

O pesquisador de plantas medicinais Walter Accorsi abrirá as palestras

Histórias serão relatadas por seus protagonistas

Walter Accorsi abre uma série de palestras sobre a ESALQ

Histórias dos últimos 60 anos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) serão contadas pelas pessoas que as viveram. Quem irá abrir uma série de quatro palestras do projeto "Resgatando as memórias da ESALQ/USP" será o professor Walter Accorsi que está na Escola desde 1934. Aposentado há 17 anos, Accorsi continua desenvolvendo, na ESALQ, suas pesquisas pioneiras sobre plantas medicinais.

As outras palestras a serem agendadas serão com os professores Zil-

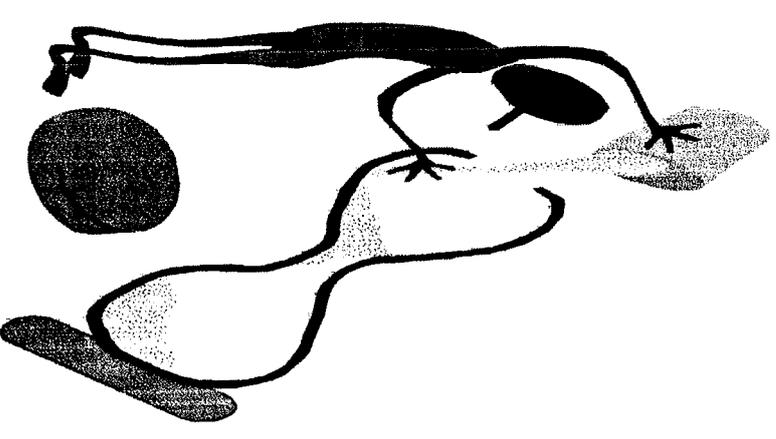
mar Viller Marcos, aposentado do Departamento de Solos; Francisco A.N. Maricone, aposentado do Departamento de Entomologia que escreve periodicamente no Jornal de Piracicaba artigos contando suas histórias da ESALQ e finalmente com o professor do Departamento de Engenharia Rural, Décio Crusciani.

As palestras serão no anfiteatro do Departamento de Genética da ESALQ, às 20 horas, com entrada franca. Organização do grupo Pet Biotecnologia Agrícola.

10- VI Curso de Atualização em Biotecnologia: programação

VI Curso de Atualização em Biotecnologia - CAB

- 21/10/97 **Biotecnologia Animal** - Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho - ESALQ/USP
- UNICAMP
- 05/11/97 **Biotecnologia Aplicada a Insetos** - Dra. Maria Leticia Golgaro - ESALQ/USP
- 28/10/97 **Biotecnologia Aplicada a Microrganismos**
- Prof. Dr. Gonçalo Pereira -
- 12/11/97 **Biotecnologia Vegetal** - MS. Vera Quecini e Adriana Cristina Alves - ESALQ/USP.
- LOCAL: Anfiteatro da Genética
- HORÁRIO: 20:00 horas
- PROMOÇÃO PET-BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

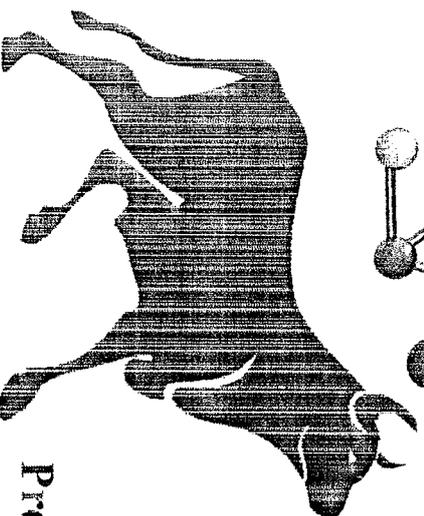
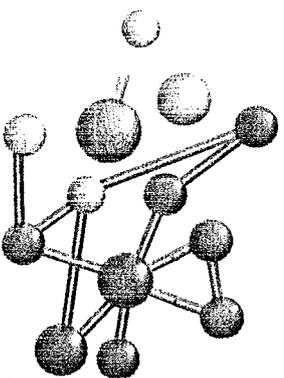
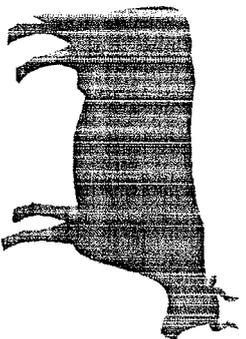


VI CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

21 de outubro (Terça) - Primeira Palestra

ATUALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho



Amfiteatro da GENÉTICA

20:00 horas

Inscrições no Local

19:30 - 20:00 h

Apenas R\$ 5,00

1997

Promoção: PET-BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

11- Relatório de seleção de bolsistas - outubro/97

**PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO
EM
BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

RELATÓRIO DE SELEÇÃO DE BOLSISTAS PET

**CAPES
ESALQ/USP
PIRACICABA
OUTUBRO/1997**

ÍNDICE

1. IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO PET:

- **IES:** Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP. **UF:** SP.
- **GRUPO:** Programa Especial de Treinamento em Biotecnologia Agrícola.
- **IMPLANTAÇÃO DO GRUPO:** Fevereiro de 1988.
- **TUTOR:** Prof. Dr. Flavio César Almeida Tavares.

2. INFORMAÇÕES SOBRE O PROCESSO DE SELEÇÃO:

2.1. Identificação da fase em que se encontra o Grupo

Substituição de bolsistas – preenchimento de vagas por:

1. Conclusão do curso
2. Desistência do bolsista

2.2. Justificativa para a realização do processo de seleção

O processo de seleção é justificado pela desistência de 2 bolsistas e conclusão do curso de graduação de outros 2 bolsistas, visando manter o número de 12 bolsistas participantes do programa.

2.3. Comissão de Seleção:

Cabe a esta comissão avaliar os inscritos para preenchimento das vagas através do histórico escolar, prova escrita sobre conhecimentos gerais, entrevista, e ainda, pelo interesse dos candidatos ao longo do período em que participarão do PET.

2.3.1. Critérios e procedimentos para formação da comissão de seleção; dificuldades encontradas; quaisquer informações consideradas relevantes.

A comissão de seleção foi composta pelo Tutor do Grupo PET – Biotecnologia Agrícola, integrantes do Grupo, professores ligados à área, 2 psicólogas e uma assistente social.

2.3.2. Relação nominal dos integrantes da comissão: nome, titulação, tipo de envolvimento com o Grupo PET.

Nome	Titulação	Envolvimento com o Grupo PET
Flávio C. A. Tavares	Prof. Doutor	Tutor
Luiz L. Coutinho	Prof. Doutor	Co-orientador
Maria Lúcia C. Vieira	Prof. Doutor	Colaborador
João Denir Furlan	Doutor	Psicólogo
Elaine C. Castelhana	Graduação	Bolsista
Fernando M. Sampaio	Graduação	Bolsista
Gildemberg Amorim Leal Jr.	Graduação	Bolsista
Ilana Urbano Bron	Graduação	Bolsista
Irving Joseph Berger	Graduação	Bolsista
Karina Marquesini Hansted	Graduação	Bolsista
Leandra M. Scarpari	Graduação	Bolsista
Marília G. S. Della Vecchia	Graduação	Bolsista
Mauricio P. M. Barbosa	Graduação	Bolsista
Max Francisco Fernandes	Graduação	Bolsista
Patrícia Pompermayer	Graduação	Bolsista
Roberto Hoffmann Palmieri	Graduação	Bolsista

2.4. Critérios e procedimentos adotados pela comissão de seleção.

2.4.1. Divulgação:

A divulgação foi feita durante os vinte e cinco dias antecedentes ao início do processo, através de cartazes espalhados pelos diversos murais da ESALQ: murais dos departamentos, da Seção de Alunos, Biblioteca Central, Central de Xerox do CALQ, e murais centrais. Vinte dias antes da prova escrita foi proferida uma palestra por bolsistas do Grupo explicitando a filosofia, normas e atividades do PET.

Os cartazes informavam as principais atividades desenvolvidas pelo Grupo, sua filosofia, seus atuais integrantes e Tutor, bem como local e datas estabelecidas para a prova escrita, entrevista e dinâmica de Grupo, assim como a documentação necessária para a inscrição.

As inscrições foram realizadas através da Seção de Alunos da Escola.

2.4.2. Seleção de bolsistas: - Descrição pormenorizada dos critérios, procedimentos e instrumentos empregados.

Os alunos foram avaliados através dos seguintes requisitos:

- Histórico Escolar: Com a avaliação do histórico escolar, pode-se avaliar e ter a idéia do desempenho acadêmico dos candidatos, bem como a presença ou ausência de reprovações, além do limite de idade de 22 anos.
- Carta de intenções dirigida ao Tutor do Grupo: Sua importância fundamentou-se no conhecimento, mesmo que de maneira superficial, das intenções de cada candidato, além da observação de sua capacidade de expressão através da linguagem escrita.
- Currículo Resumido: Permitiu, de maneira sucinta, a avaliação do interesse por parte de cada candidato em atividades extracurriculares dentro e fora da Universidade.

- Avaliação Escrita: Avaliou-se o conhecimento geral de cada candidato em línguas estrangeiras (inglês e espanhol), bem como a capacidade de defesa de pontos-de-vista e de redigir.

- Entrevista: A entrevista foi realizada de maneira informal não seguindo nenhum roteiro. Foi realizada no período de 10 minutos por candidato, tempo suficiente para avaliar os motivos pelos quais o candidato se oferece a vaga, sua expressão verbal e para realizar um contato mais próximo entre os candidatos e os integrantes do grupo PET.

- Dinâmica de Grupo: Realizada com acompanhamento de psicólogas, favoreceu o processo de seleção quanto ao perfil psicológico de cada candidato e também quanto a capacidade de trabalhar em grupo, se relacionar com os demais integrantes e de argumentação.

2.5. Data da seleção e número de candidatos:

- 27 de agosto ⇔ palestra de apresentação do Grupo aos candidatos.
- 17 de setembro ⇔ prova escrita.
- 24 de setembro ⇔ entrevista e a dinâmica de grupo.

Concorreram pelas vagas 16 candidatos (12 candidatos do segundo ano e 4 candidatos do primeiro ano).

3. RESULTADOS DA SELEÇÃO

3.1. Alunos aprovado pela comissão de seleção.

Quadro: Resultado da Seleção de Bolsista PET

CLASSIF.	NOME DO ALUNO	DATA DE NASCIMENTO	CURSO DE GRADUAÇÃO		PONTUAÇÃO OBTIDA NA SELEÇÃO*	IDENTIFICAÇÃO DA CONDIÇÃO
			ANO/SEM DE INGRESSO	SEMESTRE ATUAL		
1 ^a	Carolina Bueno de Abreu	07/07/78	4 ^o	4 ^o	4.5	1
4 ^a	Cláudia Santos Gai		2 ^o	2 ^o	4.0	4
3 ^a	Danila Melotto		2 ^o	2 ^o	4.1	3
2 ^o	Fábio H. Bicudo da Silva	20/02/79	2 ^o	2 ^o	4.2	2

Pontuação máxima = 5,0

3.2. Histórico Escolar

Em anexo

4. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE SELEÇÃO

4.1. Apreciação da comissão de seleção e/ou professor tutor a respeito do processo e resultados da seleção efetuada:

Divulgação: Foi realizada de forma satisfatória atingindo todos os estudantes da ESALQ, principalmente os que preenchem as características básicas de um integrante do Grupo PET;

Demanda: Obtivemos uma demanda grande de candidatos em relação ao número de vagas disponíveis;

Crítérios e procedimentos adotados: Os critérios considerados foram justos e não apresentaram rigor algum em relação a conhecimentos em Biotecnologia e línguas. As avaliações foram mais rigorosas no que diz respeito a análise do pensamento crítico e relacionamento em Grupo.

Resultado da Seleção: Os candidatos selecionados preenchem todos os requisitos da CAPES e demonstraram um grande interesse pela vaga.

Formação e funcionamento da Comissão de Seleção: Visando a maior integração entre bolsistas do Grupo e orientadores de Pesquisa individual, o processo de seleção foi desenvolvido com participação de todos os integrantes da comissão, tornando-se uma experiência agradável e passível de repetição em futuras seleções.

4.2. Sugestões para futuras seleções a serem efetuadas pelo grupo.

Estender o tempo de seleção dos novos bolsistas, o que possibilitará uma maior participação dos mesmos com os atuais bolsistas.

5. INFORMAÇÕES SOBRE DESLIGAMENTO DE BOLSISTAS

5.1. Comunicação de desligamento de bolsistas

BOLSISTA DESLIGADO	PERMANÊNCIA NO GRUPO			MOTIVOS DE DESLIGAMENTO
	INGRESSO	DESLIGAMENTO	PERMANÊNCIA	
Fernando de Mesquita Sampaio	03/95	10/97	3 anos	2 (desistência da vaga)
Ilana Urbano Bron	03/96	11/97	2 anos	2 (desistência da vaga)
Irving Joseph Berger	04/94	02/98	4 anos	Conclusão do curso de graduação
Patrícia Pompermayer	04/94	02/98	4 anos	Conclusão do curso de graduação

ANEXO 1

HISTÓRICO ESCOLAR DA ALUNA APROVADA

ANEXO 2

PARECER DOS ALUNOS APROVADOS SOBRE O PROCESSO DE SELEÇÃO

Carolina Bueno de Abreu

O processo de seleção realizado pelo grupo PET Biotecnologia Agrícola mostrou muita eficiência e organização. Apreciei o modo como foi realizado, já que foi possível compreender e avaliar o nível de cada candidato abrangendo vários aspectos.

Primeiramente, o currículo e o histórico puderam mostrar as experiências próprias em geral e desempenho escolar. A carta de intenções anexa a esses documentos teve por finalidade informar as intenções e pretensões do candidato ao Tutor do grupo.

Na entrevista individual pode-se avaliar a habilidade de expressão, de relacionamento e também a personalidade e o perfil psicológico do candidato.

Por fim, a dinâmica de grupo foi ideal para expor a capacidade de relacionamento em grupo.

Dentro desses aspectos pude concluir que o processo de seleção foi eficiente e obteve sucesso.

Fábio Henrique Bicudo da Silva

O processo de seleção de bolsistas para o PET BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA, realizado no final deste ano de 1997, foi a meu ver um processo eficaz e coerente, uma vez que avaliou os candidatos na íntegra, permitindo assim que o grupo observasse as características intelectuais e da personalidade daquele.

A avaliação do *curriculum vitae* e do histórico escolar, permitem uma visão do intelecto do candidato, pois nestes pode-se observar o desempenho escolar e o quanto de experiência que este tem. A aplicação de uma prova escrita à cada candidato propõe um reforço as conclusões sobre a capacidade intelectual e de expressão estes, o que aumenta a eficiência do processo.

A entrevista e a dinâmica em grupo mostram a personalidade e a capacidade de se expressar e agir em grupo, sendo assim importantíssimas na seleção, uma vez que estas são características fundamentais para se fazer parte de um grupo.

Aprovo assim o método de seleção empregado e julgando suas etapas como fundamentais e eficientes.

12- Programação do ciclo de palestras "Resgatando as memórias da ESALQ"

RESGATANDO AS MEMÓRIAS DA ESALQ

Zilmar Z. Marcos

- DIA:22/10/97

Francisco A. M. Mariconi

- DIA:27/10/97

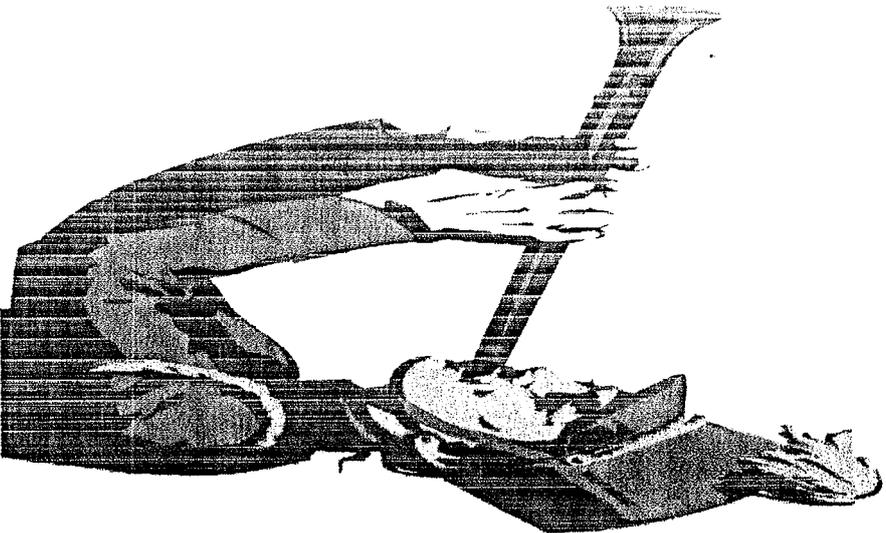
Decio E. Cruciane

- DIA:11/11/97

LOCAL: Genética

HORÁRIO: 20:00 h

PROMOÇÃO: PET BIOTECNOLOGIA
AGRÍCOLA



**RESGATANDO
AS MEMÓRIAS DA ESALQ
CONHEÇA UM POUCCO MAIS DA
HISTÓRIA DA NOSSA
ESCOLA**

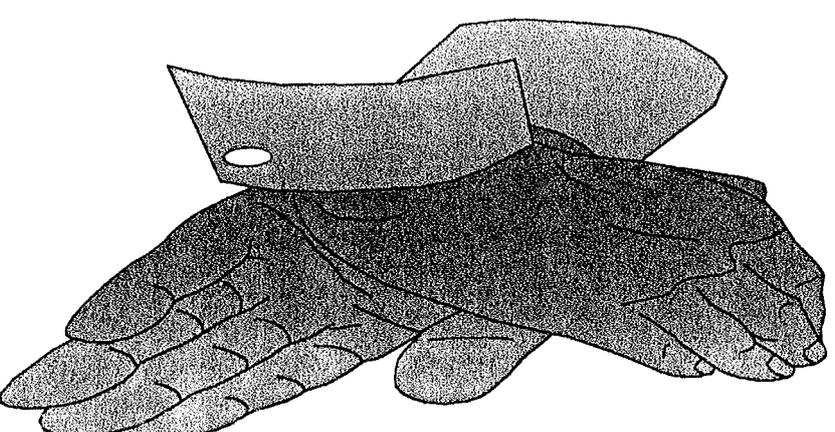
LOCAL: Anfiteatro da Genética

HORÁRIO: 20:00 horas

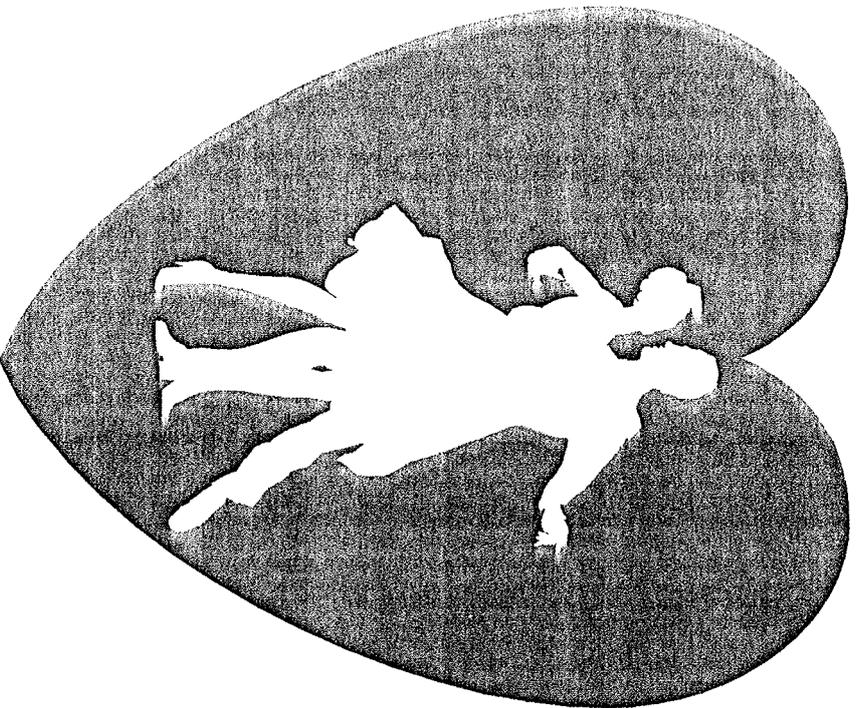
DIA: 02/10 Palestra: Prof. Dr. Walter Acorsi

Próximas : Prof. Zilmar Z. Marcos, Prof. Décio
E. Cruciane, Prof. Francisco A. M. Mariconi

Promoção PET-Biotecnologia Agrícola



O Romantismo e o Casal
Luiz de Queiroz



Palestrante: **Marly Therezinha**
Germano Perecin

- **DIA: 08/10/97**
 - **LOCAL: Genética**
 - **HORÁRIO: 20:00 h**
- Promoção PET Biotecnologia
Agrícola