

PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO

EM

BIOTECNOLOGIA

ESALQ - USP

CAPES

RELATORIO ANUAL VIII

1993

Piracicaba, 02 de dezembro de 1993

Tutor: Flavio Cesar Almeida Tavares - *Flavio*

Bolsistas:

Elizabeth Bilsland
Jefferson Willians de Gaspari
Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida
Juliana Craveiro de Freitas
Luciana Viriato Saboya
Marcos Merzel
Mario Cesar Sesso
Mauricio Fedele
Paula Marques Meyer
Sandro Alves Lima

RELATÓRIO ANUAL DE ATIVIDADES

(JANEIRO - DEZEMBRO DE 1993)

PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO

PET - BIOTECNOLOGIA

I - Índice:

Ítem	Página
II - Identificação do Programa.....	3
III - Informações sobre os bolsistas.....	3
IV - Desempenho dos bolsistas no PET.....	7
V - Considerações sobre o relacionamento do grupo.....	26
VI - Planejamento das atividades do grupo para o próximo ano.....	27
VII - Anexos.....	28

II - Identificação do Programa

Universidade: Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Implantação do PET: Fevereiro de 1988

Departamento: Departamento de Genética

Relatório número 8: Janeiro a Dezembro de 1993

III - Informações sobre os bolsistas

1 - Relação Nominal

	Ano de Ingresso	
	na graduação	no PET
Elizabeth Bilsland	1991 - Agronomia	1992
Jefferson W. de Gaspari	1991 - Agronomia	1992
Juan L. Argueso G. de Almeida	1991 - Agronomia	1991
Juliana C. Freitas	1989 - Agronomia	1991

Luciana V. Saboya	1990 - Agronomia	1992
Marcos Merzel	1989 - Agronomia	1992
Mario C. Sesso	1990 - Agronomia	1991
Mauricio Fedele	1991 - Agronomia	1993
Paula M. Meyer	1991 - Agronomia	1993
Sandro A. Lima	1990 - Agronomia	1991

2 - Desempenho acadêmico na graduação

2.1 - Média dos alunos

Nome	Média por semestre	
	1º - 1993	2º - 1993
Elizabeth Bilsland	7,90	
Jefferson Willians de Gaspari	7,10	
Juan Lucas Argueso G. de Almeida	6,45	
Juliana Craveiro de Freitas	8,60	
Luciana Viriato Saboya	7,75	
Marcos Merzel	7,00	
Mario Cesar Sesso	7,80	
Mauricio Fedele	7,35	
Paula Marques Meyer	8,00	
Sandro Alves Lima	8,50	

As notas do 2º-semester não foram divulgadas a tempo para inclusão nesse relatório.

* Em anexo encontram-se os atestados das notas.

2.2 - Justificativa para o declínio no rendimento dos bolsistas

Não houve declínio no rendimento de nenhum bolsista em especial, sendo inclusive verificada um aumento nas médias em geral.

2.3 - Apreciação do Professor - Tutor sobre o desempenho do grupo no ano

O desempenho do Grupo neste ano foi marcado pelos ajustes necessários em função do aumento do número de bolsistas. Assim, algumas atividades que poderiam ter sido executadas foram substituídas pelo treinamento dos novos bolsistas. Apesar da ênfase dada a este aspecto, não houveram prejuízos para o desempenho geral e como se observa neste relatório foi intensa a participação dos bolsistas em atividades grupais, cursos, seminários e na organização e execução do II Curso de Atualização em Biotecnologia. Considerando também que houveram desligamentos de bolsistas este ano, o desempenho do Grupo pode ser considerado muito bom.

3 - Desligamentos

3.1 - Nomes dos bolsistas desligados

a) Juliana Craveiro de Freitas

b) Marcos Merzel

c) Sandro Alves Lima

3.2 - Datas dos desligamentos

a) agosto de 1993

b) setembro de 1993

c) dezembro de 1993

3.3 - Tempo de permanência no PET

a) Quatro semestres

b) Dois semestres

c) Quatro semestres

3.4 - Motivo dos desligamentos

a) Afastamento do grupo para a realização do trabalho de residência agrônômica fora da cidade de Piracicaba, sendo portanto incompatível com as atividades do PET - Biotecnologia. A bolsista hoje está ingressando na pós-graduação a nível de mestrado no Curso de Fitopatologia.

b) Motivos pessoais

c) Afastamento do grupo para a realização do trabalho de residência agrônômica fora da cidade de Piracicaba, sendo portanto incompatível com as atividades do PET - Biotecnologia.

3.5 - Parecer do Tutor

Os desligamentos dos bolsistas Juliana Craveiro de Freitas e Marcos Merzel deveram-se à mudança de área de pesquisa e ao programa de residência agrônômica. Juliana está se dedicando à pesquisa em Fitopatologia e Marcos a estágio fora da ESALQ. O desligamento dos mesmos poderá desabonar ou ao grupo PET por se tratar de interesses particulares e de direito.

Recentemente se deu o desligamento do bolsista Sandro Alves Lima, também para a realização de residência agrônômica. Sandro continua atuando na área, trabalhando no setor de produção de sementes e melhoramento genético da ICI - Brasil. A saída desse bolsista representa grande perda para o Grupo devido à grande dedicação e integração com os demais bolsistas e com os ideais do PET.

4 - Seleção de novos bolsistas

Em setembro de 1993 foram selecionados dois novos bolsistas para substituir os que se desligaram. O relatório dessa seleção já foi enviado à CAPES.

IV - Desempenho dos bolsistas no Programa Especial de Treinamento em 1993

1 - Atividades desenvolvidas

1.1 - Reuniões do grupo

- 01/03/93 Pauta: Programação para o primeiro semestre
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 04/03/93 Pauta: Estudo dirigido
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Freitas, J. Argueso, L. Saboya, M. Sesso e S. Lima.
Duração: 1 hora
- 04/03/93 Pauta: Programação de estudo dirigido
 Seleção de temas para o II Curso de Atualização em Biotecnologia
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 1 hora e meia
- 08/03/93 Pauta: Seleção de temas e palestrantes para o II CAB
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 11/03/93 Pauta: Divulgação do PET - CAPES na ESALQ
Participantes: Todos os bolsistas e mais três bolsistas do Grupo PET - Gerenciamento e Administração da Empresa Agrícola, ESALQ/USP.
Duração: 1 hora.

- 15/03/93 Pauta: Definição de temas de seminários para os bolsistas
Divulgação do PET na ESALQ/USP
Participantes: E. Bilsland, J. Freitas, J. Argueso, M. Merzel, M. Sesso e S.
Lima
Duração: 1 hora
- 16/03/93 Pauta: Reunião dos Grupos PET da ESALQ/USP para divulgação do
Programa
Participantes: Todos os bolsistas PET - BIOTECNOLOGIA, três bolsistas
do PET - Ger. e Adm. da Emp. Agrícola e Prof. Dr. Virgilio Vianna (Tutor
PET - ECOLOGIA).
Duração: 1 hora.
- 22/03/93 Pauta: Divisão de tarefas para a divulgação.
Participantes: Todos os bolsistas.
Duração: 30 minutos.
- 25/03/93 Pauta: Estudo dirigido, comentários ao livro "Genetic Diversity and
Biotechnology".
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor.
Duração: 1 hora.
- 29/03/93 Pauta: Viagem a São Paulo durante a semana santa.
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M. Merzel e
M. Sesso.
Duração: 1 hora.
- 30/03/93 Pauta: Programação e contatos para o II CAB
Contato com Pesquisadores na USP - São Paulo.
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso e M. Sesso e Tutor.
Duração: 1 hora
- 12/04/93 Pauta: Discussão sobre a visita à Cidade Universitária da USP em São
Paulo
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, L. Saboya, M. Sesso e S. Lima
Duração: 1 hora

- 15/04/93 Pauta: Discussão de textos
Programação para o II CAB
Participantes: Todos os bolsistas e o Tutor
Duração: 2 horas
- 19/04/93 Pauta: Seleção de Empresas para o II CAB
Participantes: J. Gaspari, J. Argueso, M. Merzel, M. Sesso e S. Lima
Duração: 1 hora
- 22/04/93 Pauta: Discussão de Textos
Participantes: Todos os bolsistas e o Tutor
Duração: 2 horas
- 26/04/93 Pauta: Datas para a apresentação do Seminários
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 30 minutos
- 03/05/93 Pauta: II CAB
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Freitas e M. Merzel
Duração: 1 hora
- 04/05/93 Pauta: Contatos para o II CAB
Participantes: J. Freitas, J. Gaspari, M. Merzel, M. Sesso e Tutor
Duração: 1 hora
- 10/05/93 Pauta: Planejamento para o II CAB
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 17/05/93 Pauta: II CAB
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M. Sesso e S.
Lima
Duração: 1 hora
- 25/05/93 Pauta: Discussão sobre o andamento dos estágios individuais
Participantes: J. Gaspari, J. Freitas, L. Saboya, S. Lima e Tutor

- Duração: 1 hora
- 01/06/93 Pauta: II CAB
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 01/06/93 Pauta: II CAB
Participantes: Todos os bolsistas e o Tutor
Duração: 1 hora e meia
- 08/06/93 Pauta: Substituição de Empresas para o II CAB
Participantes: Todos os bolsistas e o Tutor
Duração: 1 hora
- 15/06/93 Pauta: II CAB e avaliação do desempenho do Grupo no semestre
Participantes: Todos os bolsistas e o Tutor
Duração: 3 horas
- 01/07/93 Pauta: Contatos para o II CAB
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M. Sesso e S. Lima
Duração: 1 hora
- 02/07/93 Pauta: Seleção de novas empresas para o II CAB
Participantes: J. Gaspari, E. Bilsland e L. Saboya
Duração: 1 hora
- 05/08/93 Pauta: Reformulação da Proposta para o II CAB
Programação para o segundo semestre
Seleção de textos para discussão
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 10/08/93 Pauta: Programa para o segundo semestre
Desligamento de J. Freitas
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya e S. Lima

- Duração: 1 hora
- 12/08/93 Pauta: Reformulação do programa de estudo dirigido
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, S. Lima e o Tutor
Duração: 1 hora
- 16/08/93 Pauta: Programação para o segundo semestre
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 24/08/93 Pauta: Discussão de textos
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 22/09/93 Pauta: Definição de data para o II CAB e contatos com palestrantes
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 24/09/93 Pauta: Substituição de bolsistas
Visita do Grupo PET - Agronomia, UEM
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 1 hora
- 29/09/93 Pauta: Seleção dos novos bolsistas
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 2 horas
- 30/09/93 Pauta: Relatório de seleção de novos bolsistas
Participantes: Todos os bolsistas e os selecionados
Duração: 1 hora
- 01/10/93 Pauta: II CAB
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, P. Meyer e S. Lima.
Duração: 1 hora

- 08/10/93 Pauta: Contatos para o II CAB
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 1 hora
- 15/10/93 Pauta: Organização da visita do Grupo PET - AGRONOMIA, UEM
Divulgação do II CAB
Relatório anual
Relatório de seleção
Normas de funcionamento do Grupo
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 2 horas
- 27/10/93 Pauta: Avaliação dos resultados do II CAB
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 29/10/93 Pauta: Discussão da avaliação da CAPES sobre o rendimento do Grupo
PET - BIOTECNOLOGIA em 1992.
Participantes: M. Fedele, S. Lima e Tutor
Duração: 30 minutos
- 03/11/93 Pauta: Programação da visita do Grupo PET - AGRONOMIA, UEM
Discussão da avaliação da CAPES
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 12/11/93 Pauta: Programação para 1993
Relatório anual
Discussão de textos
Programação para as férias
Taxas escolares
Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 17/11/93 Pauta: Relatórios de seleção e anual

Monografias

Participantes: Todos os bolsistas

Duração: 1 hora

- 01/12/93 Pauta: Relatório anual
Encontro Brasileiro de Biotecnologia
Programação para 1994.
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, M. Sesso, M. Fedele, P.
Meyer e S. Lima.
Duração: 1 hora.

1.2 - Seminarios apresentados pelos bolsistas

- 25/05/93 Genes Exógenos em Plantas: Transferência, Estrutura, Expressão e
Aplicação.
Apresentado por: J. Gaspari.
- 01/06/93 Genética Clássica e Molecular do Tomateiro
Apresentado por: J. Argueso.
- 08/06/93 Teoria do Gene a Gene na Interação Patógeno-Hospedeiro.
Apresentado por: J. Freitas.
- 15/06/93 Expressão Gênica Específica em Plantas
Apresentado por: L. Saboya
- 22/06/93 Organização do Genoma de Mamíferos
Apresentado por: Elizabeth Bilsland
- 17/11/93 Biopesticidas - Pesticidas Microbianos
Apresentado por Elizabeth Bilsland

1.3 - Palestras com outros profissionais

- 06/04/93 Prof. Marie Anne von Sluys, Instituto de Biociências, USP
Transformação de Plantas via *Agrobacterium*

Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Freitas, J. Argueso, L. Saboya e M. Sesso.

Prof. Flavio Alterthum, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

Transformação de Microrganismos para Produção de Etanol.

Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Freitas, J. Argueso, L. Saboya e M. Sesso.

Prof. Gilberto Keybowin, Instituto de Biociências, USP.

Problemas da Comercialização de Produtos Obtidos por Cultura de Tecidos.

Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Freitas, J. Argueso, L. Saboya e M. Sesso.

01/12/93 Sr. José Cândido Garcia, 3M .
Técnicas de Apresentação
Participantes: E. Bilsland e Paula M. Meyer.

03/12/93 Dra. Daniela C. Zappi & Dr. Nigel P. Taylor,
Royal Botanic Gardens U.K.
Cactos do Brasil Oriental.
Participante: M. Fedele.

1.4 - Outros Seminários, Conferências e Palestras assistidas pelos bolsistas

07/05/93 Normas e Critérios para Avaliação, Recomendação e Exclusão de Cultivares.

Apresentado por: Sérgio Augusto M. Carbonel

Participante: M. Sesso

14/05/93 Melhoramento de Plantas Visando resistência a Pragas e Doenças

Apresentado por: D. Mariote

Participante: E. Bilsland

21/05/93 Obtenção de cultivares através de plantas haplóides

Apresentado por W.P. Reis

- Participante: J. Gaspari
- 28/05/93 A utilização dos marcadores "RAPD" no melhoramento genético
Apresentados por: A.C. Longo
Participante: J. Argueso e J. Gaspari.
- 04/06/93 Pangênese: uma idéia da Herança Darwiniana
Apresentado por: L.A. Castañeda
Participante: J. Argueso e J. Gaspari.
- 11/06/93 Molecular Markers in Crop Improvement
Apresentado por Dr. Tommas Blake (Montana University)
Local: CENA/USP
Participante: J. Gaspari
- 18/06/93 Uso de Anticorpos Monoclonais na Agricultura
Apresentado por: Keila M. L. Duarte e Luiz H. Gomes.
Participante: J. Argueso.
- Controle da Expressão Gênica da Musculatura Esquelética em Animais
Apresentado por: L.L. Coutinho
Participantes: E. Bilsland e J. Argueso.
- 25/06/93 Transposons em milho
Apresentado por: R. C. Pascon
Participantes: E. Bilsland, J. Argueso e L. Saboya.
- 03/07/93 Aspectos gerais do melhoramento do girassol
Apresentado por: A. L. de Farias Neto
Participante: J. Argueso
- 19/11/93 Hipótese da origem endossimbionte de organelas
Apresentado por: Juliana H. da Silva
Participantes: E. Bilsland e J. Argueso.

1.5 - Participação em congressos

08 - 11/10/93 Congresso Nacional de Genética, Caxambú, MG.

Participantes: J. Gaspari e M. Sesso.

13 - 14/10/93 X Encontro Sobre Temas de Genética e Melhoramento. ESALQ/USP

Participantes: E. Bilsland, J. Argueso, L. Saboya e M. Fedele.

08 - 10/12/93 IV Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias.

ESALQ/USP

Participantes: Todos os bolsistas.

13 - 17/12/93 I Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal. REDEBIO, Brasília, DF.

Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M. Sesso e M. Fedele.

1.6 - Filmes Científicos ou Exposições

16/07/93 DNA Sequencing Programe (USB)

Local: CENA/USP

Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, S. Lima e M. Sesso

1.7 - Monografias

O Grupo PET - BIOTECNOLOGIA está enviando este ano monografias de cada um dos bolsistas. As monografias tratam dos estágios individuais, trazendo relato de atividades, apresentação de resultados e revisão de literatura sobre o tema.

Além disso houveram este ano trabalhos publicados pelos bolsistas em revistas científicas:

ANDO, A; SESSO, M.C.; BORGES, R.; YAMANE, Y.; TULMANN, A.; MENDEZ, B. Micropropagação de Cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) Através de Meristemas. Revista Brasileira de Genética vol. 16 - n. 3 p.383.

FREITAS, J.C · ZARAMELA, G.S.; PASCHOLATI, S.F. Efeitos de agentes bióticos e abióticos no acúmulo de um complexo de pigmentos e fitoalexinas em mesocótilos de sorgo Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia Aracaju/SE 1993.

1.8 - Pesquisa

Cada um dos bolsistas trabalha em projetos de iniciação científica individuais nas diferentes áreas dentro da Biotecnologia. A descrição das atividades de pesquisa de cada um dos bolsistas está no ítem IV - 1.9.

1.9 - Estágios

NOME: Elizabeth Bilsland e Juan Lucas Argueso G. de Almeida

ORIENTADOR: Flavio C. A. Tavares

TÍTULO: Clonagem de genes de resistência a herbicidas em *Sacharomyces cerevisiae*.

OBJETIVOS: Transferência de genes de resistência a herbicidas para plasmídeo com sítios de replicação para *E. coli* e *S. cerevisiae*, com a finalidade de usar esse caráter como marcador genético para futuros trabalhos de engenharia genética.

NOME: Juliana Craveiro de Freitas

ORIENTADOR: Sergio F. Pascholati

OBJETIVOS: Extração e identificação de fitoalexinas em sorgo, visando indução de resistência a doenças como o míldio.

NOME: Jefferson W. de Gaspari

ORIENTADOR: Siu Mui Tsai

TÍTULO: Utilização de marcadores moleculares para análise genética e mapeamento da nodulação e bacteriose em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).

OBJETIVOS: Mapeamento de três QTLs (Quantitative Trait Loci) situados na região da faseolina (principal proteína de reserva da semente de feijão), em populações de feijoeiro com características contrastantes para nodulação e bacteriose provocada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*; e seleção de progênies superiores de feijoeiro para nodulação, com alto grau de resistência para bacteriose.

NOME: Luciana Viriato Saboya

ORIENTADOR: Aline A. Pizzirani-Kleiner

TÍTULO: Fusão de Protoplastos em *Trichoderma pseudokoningii*

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: O objetivo do trabalho é realizar cruzamentos via fusão de protoplastos entre mutantes auxotróficos e morfológicos de *Trichoderma pseudokoningii*, analisar os produtos de fusão, verificar as frequências de recombinação comparando-as com aquelas observadas via anastomose de hifas. Atualmente estão sendo analisadas as colônias recombinantes resultantes da fusão de protoplastos.

NOME: Mário César Sesso

ORIENTADOR: Akihiko Ando

TÍTULO: Cultura de Meristema de caju

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: Melhorar a metodologia de micropropagação clonal de caju através de culturas de meristemas.

NOME: Maurício Fedele

ORIENTADOR: Flavio C. A. Tavares.

TÍTULO: Produção de inóculo para cogumelos do tipo Shiitake.

OBJETIVOS: Conhecer e aperfeiçoar a metodologia de produção de inóculo, desenvolver substratos e técnicas para o cultivo alternativo do cogumelo Shiitake (*Lentinus edodes*) e efetuar o seu melhoramento genético.

NOME: Paula Marques Meyer

ORIENTADOR: Luiz Lehmann Coutinho

TÍTULO: Caracterização de raças bovinas através de DNA fingerprinting

OBJETIVOS: Caracterizar a nível molecular as raças Nelore, Indu-brasil, Charolês e Canchim. Avaliar a direção de seleção dos animais da raça Canchim através de marcadores moleculares. Identificar possíveis padrões de DNA fingerprinting associados à QTL na raça Canchim

NOME: Sandro Alves Lima

ORIENTADOR: Maria Lucia Carneiro Vieira

OBJETIVO: Através do uso da técnica de cultura de tecidos favorecer a ocorrência de variação somaclonal em plantas do gênero *Stylosantes*, visando a produção de plantas regeneradas que sejam tolerantes à salinidade. Trabalho concluído e publicado nos anais da Reunião Anual da SBPC - 1993.

1.10 - Cursos extra-curriculares

01 - 13/03/93 Curso de QUATTRO-PRO, CIAGRI, ESALQ/USP. Piracicaba, SP.
Participante: M. Sesso.

10 - 21/05/93 Curso de WordPerfect, CIAGRI, ESALQ/USP. Piracicaba, SP.
Participante: M. Sesso.

- 05 - 23/07/93 Curso Intersemestral de Tecnologia do DNA Recombinante em Plantas.
ESALQ - CENA/USP
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso e S. Lima.
- 12 - 16/07/93 Curso de Aperfeiçoamento em Fruticultura Tropical - Petrolina, PE.
Participantes: L. Saboya e M. Sesso.
- 27/09 - 08/10/93 Curso de Foxbase, CIAGRI, ESALQ/USP. Piracicaba, SP.
Participante: M. Sesso.
- 08 - 11/10/93 Curso de "Técnicas Modernas em Genética e Biologia Molecular".
Sociedade Brasileira de Genética. Caxambú, MG.
Participantes: M. Sesso e J. Gaspari.
- 12 - 14/10/93 II Curso de Confinamento de Bovinos Leiteiros, ESALQ/USP.
Participante: P. Meyer.
- 19 - 23/10/93 Curso de Harvard Graphics, CIAGRI, ESALQ/USP. Piracicaba, SP.
Participante: M. Sesso.
- 23/10/93 II Curso de Atualização em Biotecnologia. ESALQ/USP, Piracicaba.
Participantes: Todos os bolsistas
- 08 - 11/11/93 I Seminário sobre Cultura Organizacional. ESALQ/USP. Piracicaba, SP
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, M. Sesso, M. Fedele e P. Meyer.
- 03 - 04/12/93 Curso de Mastite Bovina e suas Implicações na Saúde Pública.
UNESP, Botucatu, SP.
Participante: P. Meyer.
- 08 - 10/12/93 Relações humanas no trabalho
SENAC, Piracicaba, SP
Participante: Elizabeth Bilsland
- 13 - 17/12/93 Curso de Inseminação Artificial. PECPLAN - Bradesco, Campinas, SP.
Participante: P. Meyer.

1.11 - Leituras

Agrobacterium-mediated genetic transformation of oilseed *Brassica campestris* -

Mukhopadhyay, A. et al.

Aplicações da Biotecnologia ao melhoramento genético animal.- Mello, A.A.; Peixoto,

M.G.C.& Madalena, F.E.

Biotechnology - John Smith

Biotechnology and Genetic Diversity - Witt, S.C.

Biotechnology, the Science and the Business - Moses, V.; Cape, R.E.

Clonagem de genes: Uso de vetores - Tsai, S.M.

Eletroforese aplicada à agricultura - Lemos, E.G.M. et al.

Genetic Diversity and Biotechnology - CGIAR/FAO

Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers - Welsh, J. & McClelland, M.

Introduction to RFLP mapping and plant breeding applications - Kochert, G.

Molecular Biology of the Cell - Alberts et al.

Organization and strategic change in Human genome project - Rothman, H.

Plant Biotechnology - Fraley, R. & Schell, J.

Princípios e Técnicas de eletroforese - Lemos, E.G. M. & Campanharo, J. C.

Protoplastos de plantas: Isolamento e Regeneração - Fungaro, M.H.P. & Viera, M.L.C.

Recombinant DNA. A short course - Watson, J. S.; Tooze, J. & Kurtz, D.T.

The expresion and performance of cloned genes in yeasts - Hadfield, C.; Raina, K.K.;
Shashi-Menon, K. & Mount, R.C.

The Molecular Genetics of *Saccharomyces cerevisiae* - Castilho-Valavicius, B.A. et al.

Transformation of cotton via particle bombardment - Finer, J.J. & McMullen, M. D.

1.12 - Visitas

05 e 06/04/93 Visita a pesquisadores e institutos de pesquisa localizados na Cidade
Universitaria da USP em São Paulo.

* Instituto de Ciências Biomédicas, assunto: produção de insulina por
microorganismos recombinantes e vacinas contra lepra e diarreia.

* Instituto de Pesquisas Tecnológicas, assunto: projeto para a produção do
plástico biodegradavel; apresentação aos laboratorios do Agrupamento de
biotecnologia.

* Instituto de Biociências, assunto: utilização de *Agrobacterium rizogenes*
em trabalhos de transformação em vegetais. Prof. Dra. M. A. von Sluys

* Instituto de Ciências Biomédicas, assunto: produção de etanol por *E.coli*
genéticamente transformada. Prof. Dr. Flavio Alterthum.

* Instituto de Biociências, assunto: problemas da comercialização de
produtos obtidos por cultura de tecidos. Prof. Dr. Gilberto Keybowm.
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Freitas, J. Argueso, L. Saboya e
M. Sesso.

26/05/93 Visita ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, Campinas, SP)
Participantes: J.Argueso e L. Saboya

16/06/93 Visita à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecniade Pirassununga,
SP
Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal

Participantes: J. Argueso e L. Saboya.

- 17/06/93 Visita à Nestlé, Caçapava, SP.
Participantes: L. Saboya.
- 30/06/93 Visita à Cervejaria Brahma, Jaguariúna, SP.
Participantes: L. Saboya e M. Sesso.
- 22/07/93 Visita ao Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética,
UNICAMP, Campinas, SP.
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso e S. Lima
- 23/07/93 Visita ao setor de Biotecnologia Vegetal da Estação Experimental de
Citricultura do Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis, SP.
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso e S. Lima.
- 27/09/93 Instituto Adventista de São Paulo, Setor de Gado Leiteiro,
Limeira, SP.
Participante: E. Bilsland.
- 08/10/93 Visita à Coopersucar, Piracicaba, SP.
Participante: M. Sesso.
- 20/10/93 Visita à Usina Santa Helena
Participante: M. Sesso
- 29/11/93 Visita à Fazenda Colorado, Produtora de Leite Tipo A, Pirassununga, SP.
Participante: E. Bilsland.

1.13 - Estudo de Língua estrangeira

Bolsista: L. Saboya

Inglês: Instituto de Idiomas Yázigi - Nível Intermediário

Bolsista: M. Fedele

Inglês: aulas particulares.

Italiano: aulas particulares

Bolsita: Paula Meyer

Inglês: Instituto Aliança Cultural - Nível Intermediário

Bolsista: Sandro Alves Lima

Inglês: aulas particulares.

O conhecimento de Língua Inglesa é requisito básico no momento da seleção para o Grupo PET - BIOTECNOLOGIA. Praticamente toda a literatura abordada durante o ano está em inglês, sendo muito difícil acompanhar as atividades do Grupo sem o conhecimento desta Língua. Os bolsistas que não estão matriculados em cursos já possuem uma sólida base e constantemente praticam através das leituras. Mesmo assim, fica programado para 1994 que estes deverão se dedicar a uma terceira língua de livre escolha.

1.14 - Outras atividades

De acordo com a programação feita para 1993, o grupo PET - BIOTECNOLOGIA se empenhou na realização do II Curso de Atualização em Biotecnologia. Devido ao grande sucesso do primeiro curso e da repercussão entre os estudantes da ESALQ, o Grupo planejou em 1993 um curso que trataria das possibilidades de emprego que o setor de Biotecnologia oferece no Brasil. Com esse tipo de tema buscava-se atrair mais a atenção dos alunos para o curso. Para organizar um curso com esse enfoque o Grupo contactou várias empresas ligadas ao setor, que viriam apresentar o seu campo de atuação e qual a sua necessidade em matéria de recursos humanos em Biotecnologia. No entanto, devido ao período de crise econômica que o país atravessa, praticamente todas as empresas se mostraram sem condições de apoiar e comparecer ao evento. O Grupo ainda tentou contactar novas empresas mas encontrou novamente as mesmas dificuldades que, nos levaram a redirecionar os objetivos do II CAB no mês de julho. Nessa ocasião ficou decidido que o curso seria feito nos mesmos moldes do I CAB, atendendo ao compromisso assumido.

Embora tenha consumido grande parte do trabalho do primeiro semestre a experiência foi extremamente positiva no sentido de promover a atividade de grupo. O

contato com as empresas atuantes no setor também foi positivo pois possibilitou aos bolsistas conhecer como a Biotecnologia é tratada fora do meio acadêmico.

O II Curso de Atualização em Biotecnologia foi realizado no dia 23 de outubro teve três palestrantes convidados que trataram de temas específicos dentro da Biotecnologia. Novamente foi atingido o sucesso do ano anterior com ótima participação de estudantes da ESALQ e da UNIMEP, contribuindo para a divulgação da Biotecnologia e aumentando o interesse de outros alunos pelas atividades desenvolvidas pelo PET. O curso já está se tornando um evento esperado pela comunidade do Campus, portanto deve-se repetir em 1994. Em anexo seguem o programa do curso e o resumo das palestras.

Outra atividade que também contribuiu para que se conseguisse melhor desempenho nas atividades de grupo foi uma série de reuniões realizadas durante o ano com os outros Grupos PET da ESALQ. Essas reuniões tiveram por objetivo organizar a divulgação do Programa da CAPES entre os estudantes da ESALQ. Nessas reuniões frequentemente se tratou do funcionamento dos três Grupos possibilitando a troca de experiências.

No mês de novembro recebemos a visita do Grupo PET - Agronomia da Universidade Estadual de Maringá. Esse Grupo nos contactou em outubro e mostrou a intenção de trocar experiência de trabalho com o nosso Grupo, que já completou cinco anos de funcionamento e foi considerado Muito Bom pela CAPES nas duas últimas avaliações. A visita foi feita no dia 5 de novembro teve ótimos resultados para ambos os Grupos.

No final do ano, os três Grupos PET da ESALQ promoveram a IV Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias. Essa reunião é realizada a cada dois anos e os bolsistas do PET são encarregados da composição de mesas e da comissão de apoio.

2 - Apreciação sobre o aproveitamento do grupo

Verificar item III - 2.3

V - CONSIDERAÇÕES SOBRE O RELACIONAMENTO DO GRUPO

1 - Entre si

O Grupo tem se mostrado cada vez mais atuante no que diz respeito às atividades em conjunto. Os bolsistas que ingressaram no início do ano se integraram rapidamente mostrando que aquela seleção teve sucesso. Continua o clima de amizade que sempre existiu dentro do Grupo.

2- Com o tutor

Ótimo, todos demonstram grande espontaneidade ao tratar com o tutor. Este por sua vez procura deixar que o Grupo esteja a vontade para trabalhar de maneira independente, porém, atuando na posição de tutor quando surgem dificuldades no funcionamento do PET, de acordo com o que se espera dele.

3 - Com outros alunos que não pertencem ao PET

O Grupo continua a ganhar crédito entre os alunos de Graduação e Pós-graduação da ESALQ pelas atividades que promove com a comunidade. Nesse ano aumentou o interesse pelo PET devido à maior divulgação do trabalho desenvolvido pelo Grupo.

4 - Com o corpo docente da Instituição

O corpo docente tem grande admiração pelos bolsistas do PET devido ao seu elevado aproveitamento acadêmico. Devido a isso, os integrantes do grupo têm facilidade em tratar com os professores assuntos extra-classe.

VI - PLANEJAMENTO PARA O PRÓXIMO ANO:

Para o ano de 1994 o Grupo PET - Biotecnologia seguirá desenvolvendo o mesmo tipo de atividades, fortalecendo, a exemplo de 1993, os programas de pesquisa desenvolvidos pelos bolsistas.

Demonstrando que o Grupo atingiu maturidade suficiente, estamos pleiteando junto à CAPES, atingir o número máximo de 12 bolsistas. Abaixo estão os principais itens da programação para 1994.

- *Ampliação do grupo para 12 (doze) bolsistas;
- *Estudo dirigido;
- *Estágios individuais;
- *Reuniões semanais;
- *Divulgação do PET e da Biotecnologia;
- *III Curso de Atualização em Biotecnologia (CAB);
- *Formulação de um Regimento Interno específico do Grupo PET - Biotecnologia;
- *Visitas;
- *Apresentação de Seminários;
- *Estudo de língua estrangeira;
- *Participação em cursos e congressos.

VII - ANEXOS

- *Atestado de notas do primeiro semestre de 1993;
- *Programa e resumos do II CAB;
- *Cartaz de divulgação da IV Reunião Paulista de Iniciação em Ciências Agrárias;
- *Monografias, descrições de estágio e publicações dos bolsistas em 1993.



SAG/1096-93

- A T E S T A D O -

ATESTO, a requerimento da interessada e de ordem do Senhor Diretor, que a Srta. **ELIZABETH BILSLAND**, natural de São Paulo - Estado de São Paulo, nascida a 31 de janeiro de 1973, filha de Derek Howard Bilsland e de Karin Bilsland, é aluna regularmente matriculada e está cursando o 6º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRÔNOMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referentes as disciplinas cursadas no semestre anterior:

disciplinas	nota	aula	créd	trab.	res.
LAG-501 Agricultura I.....	7,4	4	-	-	AP
LCT-554 Tecnologia de Alimentos.....	8,2	4	-	-	AP
LCT-558 Tecnologia Sucro-Alcooleira Básica.....	7,2	4	-	-	AP
LER-332 Mecânica e Máquinas Motoras.....	8,1	3	-	-	AP
LES-333 Economia Agrícola.....	8,5	4	-	-	AP
LET-430 Pragas das Plantas Cultivadas.....	8,5	4	-	-	AP
LHO-524 Horticultura.....	8,4	4	-	-	AP
LZO-313 Anatomia e Fisiologia Animal.....	7,2	4	-	-	AP

Piracicaba, 16 de novembro de 1993.

Elisabeth Bilsland
Elisabeth Bilsland
Técnica Adm.

V I S T O:

Elisabeth Bilsland
Elisabeth Bilsland
Chefe da Seção de Eng. Agrônomo




SAG/1097-93

- A T E S T A D O -

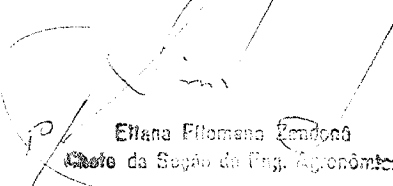
ATESTO, a requerimento do interessado e de ordem do Senhor Diretor, que o Sr. JEFFERSON WILLIANS DE GASPARI, natural de Piracicaba - Estado de São Paulo, nascido a 20 de setembro de 1972, filho de Paulo José De Gaspari e de Isabel Caroni De Gaspari, é aluno regularmente matriculado e está cursando o 6º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRONÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente as disciplinas cursadas no semestre anterior:

disciplinas	nota	aula	créd	trab.	res.
LAG-501 Agricultura I.....	7,8	4	-	-	AP
LCT-554 Tecnologia de Alimentos.....	7,2	4	-	-	AP
LCT-558 Tecnologia Sucro-Alcooleira.....	7,3	4	-	-	AP
LER-332 Mecânica e Máquinas Motoras.....	5,8	3	-	-	AP
LET-430 Pragas das Plantas Cultivadas.....	7,3	4	-	-	AP
LHO-524 Horticultura.....	7,6	4	-	-	AP
LZO-313 Anatomia e Fisiologia Animal.....	6,3	4	-	-	AP
.....					

Piracicaba, 16 de novembro de 1993.


Lucio Assaf Junior
Técico Administrativo

V I S T O:


Eliana Filomena Rendon
Chefe da Seção de Eng. Agrônoma



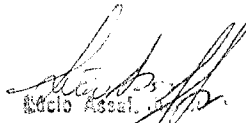
SAG/1098-93

- A T E S T A D O -


ATESTO, a requerimento do interessado e de ordem do Senhor Diretor, que o Sr. **JUAN LUCAS ARGUESO GOMES DE ALMEIDA**, natural de Buenos Aires - ARGENTINA, nascido a 13 de agosto de 1972, filho de Oscar Antonio Argüeso e de Maria Beatriz Gomes de Almeida Argüeso, é aluno regularmente matriculado e está cursando o 6º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRONÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente as disciplinas cursadas no semestre anterior:

disciplinas	nota	aula	créd trab.	res.
LAG-501 Agricultura I.....	6,6	4	-	AP
LCT-558 Tecnologia Sucro-Alcooleira Básica.....	5,5	4	-	AP
LER-332 Mecânica e Máquinas Motoras.....	6,2	3	-	AP
LET-430 Pragas das Plantas Cultivadas.....	6,3	4	-	AP
LGN-477 Princípios Genéticos em Biotecnologia...	8,3	4	-	AP
LHO-524 Horticultura.....	6,5	4	-	AP
LQI-512 Bioquímica Experimental.....	6,2	4	-	AP
LZO-313 Anatomia e Fisiologia Animal.....	6,0	4	-	AP

Piracicaba, 16 de novembro de 1993.


 Diretor Assat.
 Técnico Administrativo

V I S T O:


 Elmano Fátima da Rocha
 Chefe de Seção de Eng. Agrônoma



SAG/1145-93

- A T E S T A D O -

ATESTO, a requerimento da interessada e de ordem do Senhor Diretor, que a Srta. JULIANA CRAVEIRO DE FREITAS, natural de Atibaia - Estado de São Paulo, nascida a 22 de fevereiro de 1972, filha de Wilson Rodrigues de Freitas e de Eliane Craveiro de Freitas, cursou regularmente o 10º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRÔNOMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente às disciplinas cursadas no semestre anterior (1º sem/93):

disciplinas	nota	aula	créd.		res.
			trab.	res.	
LAG-633 Plantas Estimulantes e Plantas Fibrosas.....	9,5	4	-	-	AP
LAG-637 Plantas Extrativas.....	8,0	4	-	-	AP
LHO-670 Controle das Plantas Daninhas.....	8,3	4	1	-	AP
LFT-624 Doenças das Grandes Culturas.....	8,5	4	-	-	AP
LHO-628 Fruticultura II.....	8,8	4	-	-	AP

Piracicaba, 09 de dezembro de 1993.

Lúcio Assaf, Jr.
Diretor Administrativo

V I S T O:

Eliane Filomena Zucchi
Chefe da Seção de Eng. Agrônoma



SAG/1099-93

- A T E S T A D O -

ATESTO, a requerimento da interessada e de ordem do Senhor Diretor, que a Srta. **LUCIANA VIRIATO SABOYA**, natural de Piracicaba - Estado de São Paulo, nascida a 20 de janeiro de 1971, filha de Vicente Carlos Viriato Saboya e de Nadyr Joana Libardi Saboya, é aluna regularmente matriculada e está cursando o 8º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRÔNOMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente as disciplinas cursadas no semestre anterior:

disciplinas	nota	aula	créd. tráb.	res.
LAG-501 Agricultura I.....	6,9	4	-	AP
LCF-581 Silvicultura.....	8,8	4	-	AP
LCT-662 Biotecnologia de Alimentos e Bebidas....	8,8	4	-	AP
LER-471 Hidráulica.....	8,1	4	-	AP
LES-603 Estudo de Problemas Brasileiros I.....	9,0	1	-	AP
LGN-477 Princípios Genéticos em Biotecnologia...	8,0	4	-	AP
LHO-628 Fruticultura II.....	7,1	4	-	AP
LZT-450 Zootecnia II - Criação e Exploração Econômica de Animais.....	6,2	4	-	AP

Piracicaba, 16 de novembro de 1993.

Lucio Azevedo
 Técnico Administrativo

V I S T O:

Eliana Wilma Zaccaria
 Chefe da Seção de Eng. Agrônoma



SAG/1146-93

- A T E S T A D O -

ATESTO, a requerimento do interessado e de ordem do Senhor Diretor, que o Sr. **MARCOS MERZEL**, natural de São Paulo - Estado de São Paulo, nascido a 24 de junho de 1969, filho de José Merzel e de Marly Merzel, cursou regularmente o 10º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRO NÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente às disciplinas cursadas no semestre anterior (1º sem/93):

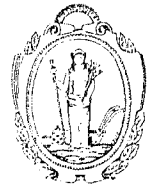
disciplinas	nota	créd.		res.
		aula	trab.	
LAG-633 Plantas Estimulantes e Plantas Fibrosas.....	6,0	4	-	AP
LAG-637 Plantas Extrativas.....	6,1	4	-	AP
LES-669 Iniciação Científica em Economia Agrária....	8,5	-	4	AP
LHO-670 Controle das Plantas Daninhas.....	5,5	4	1	AP
LGN-415 Melhoramento Genético de Aves.....	8,0	4	-	AP
LGN-616 Melhoramento de Hortaliças.....	6,3	4	-	AP
LZT-693 Biotecnologia Animal.....	9,0	4	-	AP

Piracicaba, 09 de dezembro de 1993.

José Abel, Diretor
Escola Administrativa

V I S T O:

Eliana Filomena Zucconi
Chefe da Seção de Eng. Agrônoma



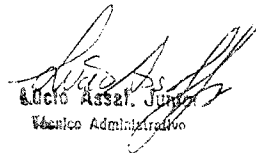
SAG/1100-93

- A T E S T A D O -

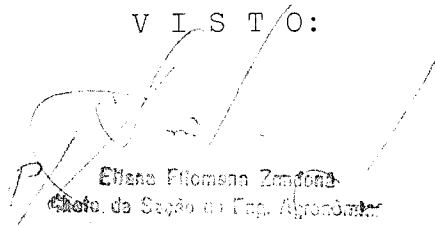
ATESTO, a requerimento do interessado e de ordem do Senhor Diretor, que o Sr. **MARIO CÉSAR SESSO**, natural de Piracicaba - Estado de São Paulo, nascido a 23 de janeiro de 1970, filho de Mario Sesso e de Juventina Granai Sesso, é aluno regularmente matriculado e está cursando o 8º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRONÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente as disciplinas cursadas no semestre anterior:

disciplinas	nota	aula	créd. tráb.	res.
LAG-501 Agricultura I.....	5,9	4	-	AP
LCF-581 Silvicultura.....	9,0	4	-	AP
LCT-696 Pós-Colheita e Armazenamento de Produtos Agropecuários.....	8,3	4	-	AP
LER-418 Construções Rurais.....	8,9	4	1	AP
LES-560 Comercialização Agrícola.....	8,3	4	1	AP
LQI-512 Bioquímica Experimental.....	7,6	4	1	AP
LZT-450 Zootecnia II - Criação e Exploração Econômica de Animais.....	6,2	4	-	AP

Piracicaba, 16 de novembro de 1993.


Aécio Assaf Junior
Vice-Reitor Administrativo

V I S T O:


Eliana Pitomann Zandoná
Diretora de Serviços de Ensino e Aprendizagem



SAG/1101-93

- A T E S T A D O -

ATESTO, a requerimento do interessado e de ordem do Senhor Diretor, que o Sr. MAURICIO FEDELE, natural de São Roque - Estado de São Paulo, nascido a 08 de outubro de 1971, filho de Antonio Fedele e de Marlene Dias Fedele, é alu no regularmente matriculado e está cursando o 6º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRONÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente as disciplinas cursadas no semestre anterior:

disciplinas	nota	aula	créd. tráb.	res.
LAG-501 Agricultura I.....	7,5	4	-	AP
LCT-554 Tecnologia de Alimentos.....	7,6	4	-	AP
LCT-558 Tecnologia Sucro-Alcooleira Básica.....	8,0	4	-	AP
LER-332 Mecânica e Máquinas Motoras.....	5,1	3	-	AP
LES-333 Economia Agrícola.....	(TRANCAMENTO)			
LET-430 Pragas das Plantas Cultivadas.....	7,8	4	-	AP
LHO-524 Horticultura.....	7,2	4	-	AP
LSO-515 Gênese e Classificação de Solos.....	7,6	4	1	AP

Piracicaba, 16 de novembro de 1993.

[Handwritten Signature]
Aécio Assis, Diretor
Básico Administrativo

V I S T O:

[Handwritten Signature]
Eliene Pitomora, Secretária
Chefe da Seção de Eng. Agrônoma



SAG/1102-93

- A T E S T A D O -

ATESTO, a requerimento da interessada e de ordem do Senhor Diretor, que a Srta. **PAULA MARQUES MEYER**, natural de Bauru - Estado de São Paulo, nascida a 18 de janeiro de 1973, filha de José Estevo Meyer e de Maria Aparecida de Araujo Marques Meyer, é aluna regularmente matriculada e está cursando o 6º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRONÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente as disciplinas cursadas no semestre anterior:

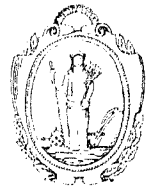
disciplinas	nota	aula	créd	trab.	res.
LAG-501 Agricultura I.....	7,3	4	-	-	AP
LCT-558 Tecnologia Sucro-Alcooleira Básica.....	7,2	4	-	-	AP
LER-332 Mecânica e Máquinas Motoras.....	7,1	3	-	-	AP
LES-333 Economia Agrícola.....	6,5	4	-	-	AP
LES-603 Estudo de Problemas Brasileiros I.....	9,5	4	-	-	AP
LET-430 Pragas das Plantas Cultivadas.....	9,0	4	-	-	AP
LET-633 Insetos Úteis.....	8,1	4	-	-	AP
LHO-524 Horticultura.....	9,0	4	-	-	AP
LZO-313 Anatomia e Fisiologia Animal.....	9,0	4	-	-	AP

Piracicaba, 16 de novembro de 1993.

[Handwritten Signature]
Lucio Assaf, Jun.
Diretor Administrativo

V I S T O:

[Handwritten Signature]
Elena Filomeno de Faria
Chefe da Seção de Eng. Agrônomo



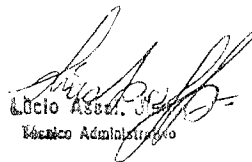
SAG/1103-93

- A T E S T A D O -

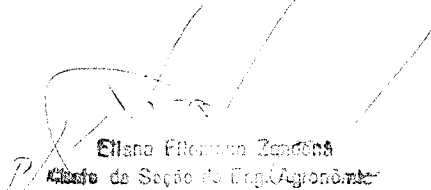
ATESTO, a requerimento do interessado e de ordem do Senhor Diretor, que o Sr. SANDRO ALVES LIMA, natural de Ribeirão Preto - Estado de São Paulo, nascido a 11 de julho de 1972, filho de Osni Alves Lima e de Maria Gomes Lima, é aluno regularmente matriculado e está cursando o 8º semestre do Curso de Graduação em ENGENHARIA AGRONÔMICA da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, tendo obtido os seguintes resultados referente as disciplinas cursadas no semestre anterior:

disciplinas	nota	aula	créd. trab.	res.
LAG-633 Plantas Estimulantes e Plantas Fibrosas.	9,0	4	-	AP
LAG-637 Plantas Extrativas.....	7,7	4	-	AP
LCF-581 Silvicultura.....	8,7	4	-	AP
LCT-685 Tecnologia do Álcool.....	8,6	4	-	AP
LES-603 Estudo de Problemas Brasileiros I.....	9,0	1	-	AP
LHO-670 Controle das Plantas Daninhas.....	8,2	4	1	AP
LSO-515 Gênese e Classificação de Solos.....	8,6	4	1	AP
LZT-450 Zootecnia II - Criação e Exploração Econômica de Animais	8,6	4	-	AP

Piracicaba, 16 de novembro de 1993.


Lucio Assaf, Diretor
Técnico Administrativo

V I S T O:


Eliano Filomeno Zanetti
Chefe de Seção de Eng. Agrônomo

Atualização em biotecnologia

Será realizado na Esalq, hoje, das 8h30 às 12 horas o II Curso de Atualização em Biotecnologia.

Os palestrantes convidados são: João Lúcio de Azevedo, diretor da Esalq; Francisco A. Zapata, do Internacional Rice Research Institute — Filipinas; Wilson R. S. Mattos, Departamento de Zootecnia — ESALQ e Flávio Alterthum, Instituto de Ciências Biomédicas - USP.

Os temas abordados serão: Biotecnologia Vegetal, Somatotropina Recombinante na Pecuária e Utilização de Microorganismos no Aproveitamento de Resíduos.

As inscrições podem ser feitas, ao preço de CR\$ 400,00, no Departamento de Genética da ESALQ, a partir das 8 horas. O evento tem promoção do Grupo Pet - Biotecnologia.

II CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Dia 23 de outubro de 1993
Departamento de Genética - ESALQ/USP

PROGRAMA

- 8:00 - 8:45 Inscrições
- 8:45 - 9:00 Abertura
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Departamento de Genética - ESALQ/USP, Piracicaba
- 9:00 - 9:50 Somatotropina Bovina e suas Implicações nos
Processos de Secreção de Leite
Prof. Dr. Wilson R. S. Mattos
Departamento de Zootecnia - ESALQ/USP, Piracicaba
- 9:50 - 10:10 Intervalo para café
- 10:10 - 11:00 Transformação em Arroz Índica e Japônica Utilizando
Genes Marcadores e de Importância Agronômica
Dr. Francisco J. Zapata-Arias
Prof. Visitante do Departamento de Genética ESALQ/USP
- 11:00 - 11:50 *Escherichia coli* Produtora de Etanol: Fato ou Fantasia?
Prof. Dr. Flavio Alterthum
Departamento de Microbiologia - ICB/USP, São Paulo
- 11:50 - 12:00 Encerramento

PROMOÇÃO PET-BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO
EM
BIOTECNOLOGIA

CAPES

Bolsistas:

Elizabeth Bilsland
Jefferson Willians de Gaspari
Juan Lucas Argueso
Luciana Viriato Saboya
Mario Cesar Sesso
Mauricio Fedele
Paula Marques Meyer
Sandro Alves Lima

Tutor:

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

SOMATOTROPINA BOVINA E SUAS IMPLICAÇÕES NOS PROCESSOS DE SECREÇÃO DE LEITE

Wilson Mattos¹

INTRODUÇÃO

A somatotropina ou hormônio de crescimento é um produto natural secretado pela adenohipófise dos animais superiores. Ela é uma proteína altamente complexa e de alto peso molecular, a exemplo de outros hormônios protéicos produzidos no mesmo órgão, incluindo a insulina, prolactina, hormônio tireotrópico (TSH), hormônio foliculo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH).

Esses hormônios protéicos não são biologicamente ativos quando administrados oralmente, pois sofrem o processo normal de digestão observado em qualquer proteína dietética. É por essa razão que a insulina deve ser fornecida por via parenteral a pacientes diabéticos. Em nível celular esses hormônios precisam unir-se a receptores específicos na membrana celular, para ativação da adenil ciclase e outras enzimas, para que sua ação no metabolismo animal seja concretizada.

Os hormônios do grupo dos esteróis (estrogênios, progesterôgenios, glucocorticóides etc), por outro lado, são compostos de baixo peso molecular; são, portanto, absorvidos intactos e biologicamente ativos quando administrados por via oral. Esses hormônios são absorvidos pelas células, sem a presença de receptores, e transferidos para o seu núcleo onde vão exercer sua ação.

¹ Professor Doutor, Departamento de Zootecnia, Esalq/USP.

Devido a sua alta complexidade, os hormônios protéicos variam tanto na composição em aminoácidos como em sua atividade entre diferentes espécies de animais. Sabe-se, por exemplo, que não se pode reverter o nanismo na raça humana pela administração de hormônio de crescimento de bovinos, pois existem cerca de 65 aminoácidos que ocupam posições diferentes, quando se compara a molécula de somatotropina nessas duas espécies, ou seja, a somatotropina bovina não tem ação biológica na raça humana.

Além de exercer ação nas células somáticas (divisão celular e crescimento ósseo), no metabolismo de carboidratos (decréscimo do transporte de glicose em tecidos - efeito diabotogênico), de proteínas (preservação de proteínas lábeis) e de lipídios (aumento na lipólise e decréscimo na lipogênese), a somatotropina também possui efeito galactopoético, conhecido desde a década de 30. Vários experimentos foram conduzidos com administração de extratos hipofisários purificados em bovinos e caprinos, mostrando a importância da somatotropina na manutenção da lactação. Naturalmente a baixa disponibilidade do hormônio (uma média de 200 hipófises para se obter uma dose diária) impediu a condução de um número maior de experimentos.

Somente no início da década de 80, quando, através da técnica de DNA recombinante, a somatotropina bovina começou a ser obtida em laboratório a partir de culturas de *E. coli*, promovendo a disponibilidade ilimitada do produto, intensificaram-se os estudos sobre a ação galactopoética do hormônio (TYRRELL et alii, 1982; PHELPS et alii, 1983; BAUMAN et alii, 1985). Desde então centenas de trabalhos foram publicados e grande número de estudos ainda são sendo desenvolvidos para se conhecer detalhadamente os mecanismos de ação da somatotropina associados à galactopoiese.

Os níveis de resposta em aumento de produção de leite apresentam valores de 10 a 40%; em condições experimentais as respostas são mais elevadas quando comparadas com estudos realizados em produções particulares, onde o controle experimental é mais difícil; há uma grande variação é devida a uma série de fatores: quantidade, via de administração e fórmula final do produto, qualidade da dieta, manejo, estágio e ordem de lactação, condição corporal etc.

Apesar dessa variação os resultados de pesquisa comprovam definitivamente que a somatotropina bovina, obtida através da técnica de DNA recombinante, aumenta a produção de leite e a eficiência de utilização de alimentos em bovinos.

A somatotropina recombinante é um produto natural e tem efeito "homeorrético" (BAUMAN e CURRIE, 1983) no processo de síntese de leite, isto é, no direcionamento de nutrientes em favor da glândula mamária. Observa-se ainda um aumento na taxa cardíaca e no fluxo sanguíneo na glândula mamária, bem como redução na utilização de

nutrientes em outros tecidos do animal em lactação (TYRRELL et alii, 1982; DAVIS et alii, 1988a,b).

Os animais tratados com somatotropina mostram um aumento na produção de calor, mas esse aumento é devido à produção adicional de leite, e não a um aumento nas exigências de manutenção. Portanto as exigências nutricionais de animais tratados com somatotropina são idênticas às de animais não tratados, com o mesmo nível de produção (TYRRELL et alii, 1982; BAUMAN et alii, 1985; PEEL e BAUMAN, 1987).

Essas evidências sugerem que as práticas de alimentação e manejo de animais tratados com somatotropina devem ser as mesmas adotadas para animais de alto potencial de produção.

MODO DE AÇÃO DA SOMATOTROPINA

Após a descoberta dos efeitos galactopoéticos de extratos hipofisários (AZIMOV, 1937), vários pesquisadores concentraram seus esforços na identificação, caracterização e purificação do composto responsável por essa ação. Em meados da década de 50, foi confirmado por vários pesquisadores que o composto em questão era a somatotropina, composta por 191 aminoácidos. Passaram-se então mais de 30 anos até que no início da década de 80, a somatotropina bovina começou a ser obtida em grandes quantidades pela técnica do DNA recombinante.

Essa técnica permite a obtenção de um produto idêntico e com a mesma atividade daquele produzido pela hipófise e ainda isento de contaminantes e resíduos naturais (HART, 1984).

A concentração plasmática de somatotropina (naturalmente produzida pelo animal) apresenta consideráveis flutuações diárias. Alguns experimentos mostraram valores mais baixos quando há uma alta disponibilidade de nutrientes (VASILATOS e WANGSNESS, 1980), ao passo que outros não mostraram correlação entre concentração plasmática de somatotropina e consumo de alimentos (GLUCKMAN et alii, 1987).

Os níveis plasmáticos de somatotropina durante a lactação são relativamente constantes, embora sejam um pouco mais elevados do início até o pico de produção de leite (4 a 6 semanas pós-parto); acredita-se que essas concentrações mais elevadas no início da lactação sejam um reflexo de picos maiores de secreção do hormônio pela hipófise (VASILATOS e WANGSNESS, 1981).

Existe uma grande variação de secreção e níveis plasmáticos entre animais, embora, no mesmo animal, as variações diárias sejam pequenas (MOLLETT e MALVEN, 1982). Resultados de vários experi-

tos mostraram também que níveis plasmáticos de somatotropina não afetados por stress térmico, estação do ano e fotoperíodo (OLSEN e TRENKLE, 1973; PETERS e TUCKER, 1978; MOHAMMED e JOHNSON, 1975). Os níveis plasmáticos de somatotropina encontrados nos trabalhos publicados variam de 3,0 a 30 ng/ml, com maior frequência entre 3,0 e 7,0 ng/ml.

As evidências existentes até o presente parecem sugerir as variações diárias e durante o período de lactação nos níveis plasmáticos de somatotropina estão associados ao genótipo do animal, isponibilidade a curto prazo de nutrientes e ao status energético longo prazo (McBRIDE et alii, 1988).

Os mecanismos que controlam a secreção de somatotropina a hipófise são bastante complexos e ainda não estão totalmente identificados. Como acontece para a maioria dos hormônios hipofisários, a secreção pela adenohipófise está na dependência do equilíbrio um "fator ou hormônio liberador" (hormônio liberador de somatotropina) e um "fator ou hormônio inibidor" (hormônio inibidor de somatotropina - somatostatina). Ambos são proteínas de baixo peso molecular e secretados pelo hipotálamo.

A ação da somatotropina no metabolismo celular não é direta e sim parece ser realizada através da síntese e secreção de metabólitos intermediários no fígado, conhecidos como "compostos ou fatores de crescimento semelhantes à insulina" (IGF-I e IGF-II) (GREGOR URLEIGH, 1985; BAUMAN e McCUTCHEON, 1986). O IGF-I é denominado atomedina - mediador da ação da somatotropina, cuja ação é estimulada pela capacidade sintética de tecidos (isto é, um agente anabolizante).

Os diferentes tecidos do organismo animal (glândula mamária, tecido adiposo, tecido muscular etc) possuem, aparentemente, número variável de receptores de IGF-I e IGF-II em nível de membrana celular. Esses receptores são necessários para sua transferência para o interior da célula, onde vão promover sua ação anabólica: síntese de DNA e proteínas, aumento da absorção de cálcions, glucose, vitaminas e outros metabólitos etc (BALLARD et alii, 1986).

O processo de síntese e secreção de leite pela glândula mamária é o resultado de uma complexa interação de inúmeros fatores que pode ser resumido, de acordo com BALDWIN et alii (1985) em três componentes básicos: concentração de nutrientes no sangue, fluxo sanguíneo na glândula e capacidade sintética das células. Assim, a ação direta ou indireta da somatotropina como agente galactopoiético pode ser explicada por alterações nesses três "componentes".

Vários trabalhos de pesquisa mostram um aumento no flu-

xo sangüíneo na glândula mamária de animais tratados com somatotropina exógena, na ordem de 18 a 35% (DAVIS et alii, 1983; MEFHAM et alii, 1984). As pequenas alterações observadas na concentração de metabólitos sangüíneos em animais tratados com somatotropina parecem não ser suficientes para explicar os aumentos de produção de leite. Assim, o maior aporte sangüíneo na glândula, o aumento na síntese de várias proteínas associadas com a formação do leite (PEEL et alii, 1983; EPPARD et alii, 1985), provocado pela absorção mais intensa de metabólitos sangüíneos e finalmente pelos efeitos diabetogênicos na somatotropina/IGF-I (aumento de lipólise e decréscimo de lipogênese e utilização de glucose em outros tecidos) parece, explicar, pelo menos parcialmente, os aumentos de produção de leite em animais tratados com somatotropina.

A título de recapitulação, os principais substratos usados na síntese de leite são: glucose, aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta e longa, minerais, vitaminas e água. A glucose disponível na glândula mamária é originária principalmente da gluconeogênese, no fígado e rins, a partir de ácido propiônico e aminoácidos, além de uma certa quantidade de glucose absorvida pelo trato digestivo e de glicerol liberado durante o catabolismo de ácidos graxos de cadeia longa (lipólise).

A lactose é o principal componente osmoticamente ativo do leite, sendo originada exclusivamente a partir de glucose. Assim, para que se observem altas produções de leite é necessário suprimir o elevado e constante de glucose, além de aminoácidos e ácidos graxos de cadeia longa em nível de glândula mamária. Através de sua ação homeorrética a somatotropina direciona o fluxo de nutrientes, seletivamente, para a glândula mamária, promovendo disponibilidade maior de glucose e utilização mais eficiente das reservas de lipídios, glicogênio e aminoácidos, auxiliada também por prováveis alterações em prolactina, insulina, tiroxina e outros metabólitos (COLLIER et alii, 1984).

ESTRATÉGIAS DE APLICAÇÃO DE SOMATOTROPINA RECOMBINANTE

Quando a somatotropina é administrada via parenteral no animal, observa-se elevação nos seus níveis plasmáticos dentro de 2 a 4 horas após a dosagem, retornando a valores prévios dentro de 16 horas (BAUMAN e McCUTCHEON, 1986). A magnitude desse aumento varia com a quantidade da dose fornecida, observando-se aumentos de 4 a 7 vezes quando comparados com as concentrações nos animais controle (PEEL et alii, 1983).

Para que os níveis de somatotropina sejam mantidos elevados por períodos prolongados é preciso entao que a formulação final do produto assegure sua liberação lenta no organismo. Nesse senti-

um grande volume de pesquisa está sendo realizado atualmente em universidades e na indústria privada para o desenvolvimento do sistema ideal de sua administração. Até o presente, existem variações quanto à dosagem, via de aplicação, intervalo entre aplicações e naturalidade na formulação final do produto, que é mantida em segredo pelas empresas, que estão investindo consideráveis recursos nessa tecnologia. Naturalmente o produtor de leite irá exigir um produto de fácil aplicação e com a mínima interferência nas práticas diárias de rebanho.

Paralelamente à pesquisa básica na área, centenas de estudos já foram concluídos e outros ainda estão em andamento para que sejam respondidas importantes questões com relação à resposta do animal ao tratamento com somatotropina: início e interrupção do tratamento, tipo de animal a ser tratado, via de aplicação, intervalo de aplicação, nível de produção de leite, tipo de manejo, nível de alimentação etc.

Além dessas, outras questões ainda despertam o interesse da comunidade científica, de produtores e de consumidores: alterações na composição do leite, efeitos do tratamento a longo prazo na produção, produção, sanidade e longevidade dos animais, distúrbios metabólicos, relação custo-benefício etc. A grande maioria dessas questões já foi extensivamente respondida e as evidências até o presente sugerem não haver qualquer problema, tanto para o animal como para o consumidor que consome o leite de animais tratados com somatotropina recombinante.

No período inicial da lactação o animal de alto potencial consegue ingerir a quantidade de nutrientes necessária para atender à demanda de produção e, conseqüentemente, ele se encontra em um balanço energético negativo. Após o pico de produção o consumo de nutrientes se eleva e o animal volta a apresentar balanço positivo.

A somatotropina direciona os nutrientes para a glândula mamária e, se ela for administrada no início da lactação, o animal poderá apresentar balanço energético mais acentuado e prolongado, permitindo naturalmente seu desempenho reprodutivo pois, para que o animal tenha um intervalo entre partos próximo de 12 meses, o animal deve ser concebido dentro de 100 dias após a parição.

Existem já publicados vários experimentos conduzidos para se verificar a magnitude de resposta à somatotropina em vários estudos da lactação e as possíveis conseqüências em parâmetros de produção e sanidade dos animais.

BAUMAN et alii (1985) iniciaram o tratamento com somatotropina (13,5; 27,0 ou 40,5 mg/dia) 84 dias pós-parto, que se estendeu por 188 dias. A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura aumentou 23, 36 e 41%, respectivamente para os três níveis de so-

matotropina em comparação com os animais controle. Quando foi computado o incremento para toda a lactação, os valores foram 14,4; 22,3 e 25,4%. Os autores não observaram efeito negativo nos parâmetros de reprodução e saúde nos animais. Em outro estudo semelhante, HUTCHINSON et alii (1986) também obtiveram aumentos significativos na produção de leite, sem alterações nos parâmetros reprodutivos.

CHALUPA et alii (1987) iniciaram o tratamento 28 a 35 dias pós-parto, pelo período de 266 dias, e dosagens de 12,5; 25,0 e 50 mg/dia; os autores observaram respostas de 3,3, 4,4 e 5,4 kg leite corrigido para 3,5% de gordura/dia, em relação aos animais controle. Houve menor porcentagem de prenhez mas o número de serviços por concepção não se alterou nos animais que receberam a maior dosagem.

Mais recentemente, vários trabalhos realizados em rebanhos comerciais mostram resultados semelhantes com relação à magnitude de resposta em produção de leite e com algumas diferenças quanto aos parâmetros de reprodução. Estas, no entanto, podem ser explicadas, em grande parte, pelas diferentes práticas de manejo e alimentação adotadas nas diferentes propriedades.

CLEALE et alii (1989) estudaram o efeito da somatotropina em quatro rebanhos particulares (total de 467 animais); os animais foram divididos por ordem de parição (primíparos e múltiparos) e o tratamento (20,6 e 41,2 mg/animal/dia) foi iniciado 98 a 105 dias pós-parto. Os animais primíparos tratados mostraram aumentos em produção de leite de 22 e 30% e os múltiparos de 27 e 27%, em relação aos animais controle, respectivamente para os dois níveis de dosagem. Os dias vazios para todos os animais foram 151, 179 e 203 dias, para os animais controle e nos dois níveis de somatotropina, diferenças estatisticamente significativas. No entanto, o número de serviços por concepção nos três tratamentos não foi diferente (2,93, 4,14 e 3,07).

Em outro experimento semelhante, McDANIEL et alii (1989) usaram dosagens menores (5,15, 10,3 e 16,5 mg/animal/dia) em quatro rebanhos, no total de 204 animais (62 primíparos e 142 múltiparos), iniciando o tratamento 28 dias pós-parto. A produção de leite (kg/animal/dia), corrigida para 3,5% de gordura para os animais controle e nos três níveis de somatotropina, foi, respectivamente, para os primíparos e múltiparos: 27,3; 28,0; 29,5 e 29,2; 28,0; 28,7; 29,3 e 32,4. Essas produções foram significativamente diferentes e dependentes da dosagem. O número de dias vazios foi consideravelmente grande para os quatro tratamentos (152, 157, 161 e 180) e a taxa de concepção foi idêntica. Não houve qualquer tipo de problema relacionado com a saúde e reprodução dos animais.

Em experimento idêntico, HANSEN et alii (1989), trabalharam com 352 animais em seis rebanhos, obtiveram as seguintes produções de leite (kg/animal/dia) corrigidas para 3,5% de gordura, nos animais primíparos e múltiparos, respectivamente: 24,2; 24,8; 25,0 e

; 26,7; 29,5; 30,6 e 32,2. Nos animais primíparos somente a dose mais elevada (16,5 mg/dia) mostrou aumento significativo em relação aos animais controle e os níveis mais baixos de dosagem. Nos animais múltiparos, os três níveis de somatotropina mostraram aumentos significativos em relação aos animais controle. Também neste estudo os autores não observaram diferenças significativas em vários parâmetros de reprodução entre os tratamentos.

Trabalhando com número menor de animais (108), RAJAMAHEN et alii (1989), estudaram detalhadamente vários parâmetros de reprodução em animais tratados com 10,3 e 20,6 mg de somatotropina/dia. Embora as dosagens, os autores observaram aumentos significativos na produção de leite em relação aos animais controle e nenhuma diferença no número de dias até a primeira ovulação, no número de animais com primeiro ciclo estral mais curto, no período do ciclo estral e no período de atividade luteolítico entre tratamentos.

Em dois experimentos semelhantes, em rebanhos participando de dois estudos, envolvendo mais de 600 animais, THOMAS et alii (1989) e ARAM et alii (1989) estudaram o efeito da somatotropina em animais primíparos e múltiparos e também a época de início do tratamento em relação ao parto: 57-100 dias, 101-140 dias e 141-188 dias. Nos dois estudos, o aumento médio de produção nos animais tratados foi de 20% em relação ao controle, e o maior nível de resposta ocorreu quando o tratamento se iniciou 101 dias pós-parto; no primeiro trabalho, o nível de resposta foi semelhante nos animais primíparos independentemente da época de início do tratamento; os autores notaram também a resposta ao tratamento no rebanho que apresentou a menor média de produção (aumento de 7,1 kg/animal/dia).

Outros dois experimentos, em rebanhos particulares envolvendo 255 animais, foram realizados por FRANSON et alii (1989) e COLLE et alii (1989), que também estudaram o efeito da somatotropina (17,8 e 53,5 mg/animal/dia) na produção de leite e parâmetros de saúde e reprodução. Os tratamentos foram iniciados 60 dias pós-parto e prolongaram até o final da lactação. Os aumentos em produção nos tratamentos em comparação com os animais controle foram, respectivamente: 12, 15, 23% (primíparos) e 12, 15, 27% (múltiparos). O consumo de matéria seca aumentou significativamente nos animais tratados: 9, 9, 16% (primíparos) e 7, 7, 12% (múltiparos); também houve aumento significativo na eficiência aparente de utilização da dieta de leite/kg de matéria seca: 4, 4, 6% (primíparos) e 6, 8, 14% (múltiparos). Os autores também não observaram diferenças nos vários parâmetros de reprodução entre os tratamentos; o número de dias até o parto nos animais controle e tratados foi: 122, 122, 118, 143 (primíparos) e 112, 138, 135, 121 (múltiparos).

O aumento de consumo de matéria seca nos animais tratados com somatotropina observado por esses autores é também observado em outros estudos (SODERHOLM et alii, 1986; BAIRD et alii, 1986).

Esse aumento varia de 3 a 15% e normalmente ocorre algumas semanas após o início do tratamento, provavelmente em resposta a maior demanda por nutrientes devido ao aumento de produção de leite. Em geral esse aumento na ingestão de matéria seca não é suficiente para atender a quantidade adicional de leite produzida e, portanto, provavelmente, alguns animais apresentam condição corporal abaixo do desejável à medida que o tratamento com somatotropina se prolonga na lactação. Por essa razão, os animais que estejam recebendo o produto devem ser constantemente observados para se detectar precocemente um decréscimo de condição corporal acentuado. Embora o peso dos animais possa não se alterar devido ao tratamento, a quantidade de gordura corporal tende a ser menor (SODERHOLM et alii, 1986).

Embora alguns experimentos a curto prazo tenham demonstrado que animais tratados com somatotropina em condições de stress têm um nível de resposta menor (MOHAMMED e JOHNSON, 1985; MOLLETT et alii, 1986), trabalhos desenvolvidos em regiões quentes e a longo prazo parecem não mostrar efeito negativo na produção de leite. HUBER et alii (1989), no Arizona, observaram um aumento significativo de 20% na produção de leite em animais tratados com somatotropina, por duas lactações consecutivas; SULLIVAN et alii (1989), também no Arizona, observaram aumentos que variaram de 11 a 18% nos animais tratados, dependendo dos três períodos de tratamentos. MATTOS et alii (1989), também estudando os efeitos da somatotropina em vacas em lactação, no Brasil, durante o verão, encontraram resposta 14% superior em produção de leite corrigido para 3,5% de gordura nos animais tratados; nesse trabalho não foram encontrados quaisquer problemas relacionados com a saúde e reprodução dos animais.

Deve ser salientado mais uma vez que os animais tratados com somatotropina aumentam a produção de calor, mas esse aumento está associado à produção extra de leite decorrente do tratamento e ao maior consumo, e não devido ao aumento em suas exigências de manutenção. Portanto, o animal tratado com somatotropina deve ser alimentado e manejado de modo idêntico àquele de alto potencial de produção, ou seja, dietas com altas concentrações energéticas para que o consumo seja máximo e, naturalmente, corrigir o meio para minimizar a ação adversa dos fatores climáticos.

A composição do leite de animais tratados com somatotropina não difere daquela de animais que nunca receberam o produto. Alguns experimentos mostram pequeno aumento no teor de gordura do leite; para os demais componentes, a grande maioria dos estudos não mostra diferença. Paralelamente, as propriedades organolépticas do leite e seus derivados também não sofrem alterações (EPPARD et alii 1985; HAMMOND, 1988).

Finalmente, uma preocupação geral entre toda a comunidade científica e consumidores potenciais de leite e derivados de animais tratados com somatotropina se refere à segurança do pro-

o, isto é, "faz mal para minha saúde beber leite de uma vaca que bebeu hormônio?".

Não se pode esquecer que a somatotropina recombinante é produto natural, pois ele é produzida por bactérias, em laboratórios, em que foram introduzidos os genes de bovinos responsáveis pela síntese. Assim, a composição da somatotropina recombinante e da natural é idêntica.

A somatotropina é um hormônio protéico e, como tal, deve ser ingerida pelo homem, torna-se inativa, pois sofre o processo normal de digestão no trato digestivo; além disso, a somatotropina bovina, mesmo administrada via parenteral, no homem, não tem ação lógica, devido à especificidade do hormônio entre espécies.

Naturalmente o leite de animais domésticos possui quantidades mensuráveis de hormônios protéicos (prolactina e a própria somatotropina), em concentrações próximas de 0,3 a 0,8 ng/ml. Em experimentos cuja dosagem fornecida aos animais é superior a seis vezes a que será usada comercialmente no futuro, as concentrações encontradas de somatotropina no leite são inferiores a 3 ng/ml (3 ppb). Tanto nas dosagens que serão usadas comercialmente não haverá aumento significativo da somatotropina no leite.

SUMO E CONCLUSÕES

Os inúmeros estudos publicados até o presente não deixam dúvidas de que a somatotropina recombinante tem efeito galactopéico no animal em lactação, resultando em significativos aumentos de produção de leite, que parecem estar associados com a dose do produto.

Os animais que recebem o produto após o pico de lactação apresentam aparentemente melhor resposta, talvez por já estarem próximos de um balanço positivo de energia, o que também os favorece em termos de desempenho reprodutivo.

Embora ainda não se disponha de grande número de dados, parece que novilhas de primeira lactação respondem de maneira semelhante quando comparadas com animais adultos. Poucos resultados de lactações completas mostram conclusivamente não haver problemas de reprodução e comprometimento na saúde de animais tratados a longo prazo.

Os animais tratados com somatotropina recombinante devem ser manejados e alimentados como animais não tratados de alto potencial de produção. O nível de resposta está intimamente associado com

a qualidade da dieta, condição corporal do animal e com as práticas de manejo adotadas na propriedade.

A somatotropina não é uma "pílula mágica" e não pode ser usada como instrumento para corrigir falhas na alimentação e manejo do rebanho.

BIBLIOGRAFIA

- ARAMBEL, M.J., S.O. OELLERMAN e R.C. LAMB, 1989. The effect of Somatropin (recombinant methionyl bovine somatotropin) on milk production response in lactating dairy cows: a field trial. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 451 (abst.).
- AZIMOV, G.J. e N.K. KROUZE, 1937. The lactogenic preparations from the anterior pituitary and the increase of milk in cows. *J. Dairy Sci.*, 20: 289.
- BAIRD, L.S., R.W. HEMKEN, R.J. HARMON e R.G. EGGERT, 1986. Responses of dairy cows to recombinant bovine growth hormone (rbGH). *J. Dairy Sci.*, 69: (Suppl. 1): 118 (abst.).
- BALDWIN, R.L., N.E. FORSBERG e C.Y. HU, 1985. Potential for altering energy partition in the lactating cow. *J. Dairy Sci.*, 68: 3394.
- BALLARD, F.J., L.C. READ, G.L. FRANCIS, C.J. BAGLEY e J.C. WALLACE, 1986. Binding properties and biological potencies of insulin-like growth factors in L6 myoblasts. *Biochem. J.*, 233: 223.
- BAUMAN, D.E. e W.B. CURRIE, 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J. Dairy Sci.*, 63: 1514.
- BAUMAN, D.E., P.J. EPPARD, M.J. DECEETER e G.M. LANZA, 1985a. Responses of high-producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 68: 1352.
- BAUMAN, D.E., S.N. McCUTCHEON, W.D. STEINHOOR, P.J. EPPARD e S.J. SEGHEN, 1985b. Sources of variation and prospects for improvement of productive efficiency in the dairy cow: a review. *J. Dairy Sci.*, 68: 583.
- BAUMAN, D.E. e S.N. McCUTCHEON, 1986. The effects of growth hormones and prolactin on metabolism. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on Ruminant Physiology, ed. L.P. Millian, W.L. Grovum e A. Dobson. Prentice-Hall, N.J.

HALUPA, W., L. BAIRD, C. SODERHOLM, D.L. PALMQUIST, R. HEMKEN, D. OTTERBY, R. ANNEXSTAD, B. VECCHIARELLI, R. HARMON, A. SINHA, J. LINN, W. HANSEN, F. EHLE, P. SCHNEIDER e R. EGGERT, 1987. Responses of dairy cows to somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 69 (Suppl. 1): 151. (abst.).

LEALE, R.M., J.D. REHMAN, E.J. ROBB, A. SINHA, F.R. EHLE, D.K. NELSON, 1989. On-farm lactational and reproductive responses to daily injections of recombinant bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 429 (abst.).

LE, W.J., S.E. FRANSON, R.G. HOFFMAN, V.K. MESEROLE, D.M. SPRICK, K.S. MADSEN, G.F. HARTNELL, D.E. BAUMAN, H.H. HEAD, J.T. HUBER e R.C. LAMB, 1989. Response of cows throughout lactation of somatotribove, recombinant methionyl bovine somatotropin, in a prolonged release system - a dose titration study. Part II. Health and reproduction. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 451 (abst.).

LLIER, R.J., J.P. McNAMARA, G.R. WALLACE e M.H. DEHOFF, 1984. A review of endocrine regulation of metabolism during lactation. *J. Anim. Sci.*, 59: 498.

VIVIS, S.R., R.J. COLLIER, J.P. McNAMARA e H.H. HEAD, 1983. Effect of growth hormone and thyroxine treatment of dairy cows on milk production, cardiac output and mammary blood flow. *Proc. New Zealand Soc. Endocr.*, 26 (Suppl. 2): 31 (abst.).

PARD, P.J., D.E. BAUMAN, J. BITMAN, D.L. WOOD, R.M. AKERS e W.A. HOUSE, 1985. Effect of dose of bovine growth hormone on milk composition: α -lactalbumin, fatty acids and mineral elements. *J. Dairy Sci.*, 68: 3047.

ANSON, S.E., W.J. COLE, R.G. HOFFMAN, V.K. MESEROLE, D.M. SPRICK, K.S. MADSEN, G.F. HARTNELL, D.E. BAUMAN, H.H. HEAD, J.T. HUBER e R.C. LAMB, 1989. Response of cows throughout lactation to somatotribove, recombinant methionyl bovine somatotropin, in a prolonged release system - a dose titration study. Part I. Production response. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 451 (abst.).

LTON, D. e W.A. SAMUELS, 1989. Evaluation of Sometribove, USAN (recombinant Methionyl) bovine somatotropin on milk production and health. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 450 (abst.).

UCKMAN, P.D., B.H. BREIER e S.R. DAVIS, 1987. Physiology of the somatotropic axis with particular reference to the ruminant. Symposium: Growth Hormone and Biotechnology. *J. Dairy Sci.*, 70: 442.

EGOR, O. e B.D. BURLEIGH, 1985. Presence of high affinity somatomedin/insulin-like growth factor receptors in porcine mammary gland. *Endocrin.*, 116 (Suppl. 1): 223 (abst.).

HAMMOND, B.G., 1988. Sometribove and milk wholesomeness. In: *Proceeding the California Animal Nutrition Conference*. Published by Animal Sciences Division, Monsanto Agricultural Co., St. Louis.

HANSEN, W.P., D.E. OTTERBY, J.G. LINN, J.F. ANDERSON e R.G. EGGERT, 1989. Multifarm use of bovine somatotropin (BST) and its effects on lactation, health and reproduction. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 429 (abst.).

HART, I.C., P.M.E. CHADWICK, T.C. BOONE, K.E. LANGLEY, C. RUDMAN e L.M. SOUZA, 1984. A comparison of the growth-promoting lipolytic, diabetogenic and immunological properties of pituitary and recombinant DNA-derived bovine growth hormone (somatotropin). *Biochem. J.*, 224: 93.

HUBER, J.T., S. WILLMAN, J.L. SULLIVAN, R.G. HOFFMAN, S.E. FRANSON e K.S. MADSEN, 1989. Milk response to sometribove, recombinant methionyl bovine somatotropin during two consecutive lactations. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 452 (abst.).

HUTCHISON, C.F., J.E. TOMLINSON e W.H. MCGEE, 1986. The effects of exogenous recombinant or pituitary exytracted bovine growth hormone on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 69 (Suppl. 1): 152 (abst.).

MATTOS, W., A.V. PIRES, V.P. de FARIA, J.A. DUQUE e K.S. MADSEN, 1989. The effect of sometribove (recombinant methionyl bovine somatotropin) on milk yields and milk composition in lactating dairy cows in Brazil. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 451 (abst.).

McBRIDE, B.W., J.L. BURTON e J.H. BURTON, 1988. The influence of bovine growth hormone (somatotropin) on animal and their products. *Res. Develop. Agric.*, 5: 1.

McDANIEL, B.T., D.M. GALLANT, J. FETROW, B. HARRINGTON, W.E. BELL, P. HAYES e J.D. REHMAN, 1989. Lactational, reproductive and health responses to recombinant bovine somatotropin und r field conditions. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 429 (abst.).

MEPHAM, T.B., S.E. LAWRENCE, A.R. PETERS e I.C. HART, 1984. Effects of exogenous growth hormone on mammary function in lactating goats. *Horm. Metabol. Res.*, 16: 248.

MOHAMMED, M.E. e H.C. JOHNSON, 1985. Effect of growth hormone on milk yields and related physiological functions of Holstein cows exposed to heat stress. *J. Dairy Sci.*, 68: 1123.

MOLLETT, T.A. e P.V. MALVEN, 1982. Chronological profiles on prolactin and growth hormone in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 65: 211.

VASILATOS, R. e P.J. WANGSNESS, 1981. Diurnal variations in plasma insulin and growth hormone associated with two stages of lactation in high producing dairy cows. *Endocrin.*, 108: 300.

DULLETT, T.A., M.J. DEGEETER, R.L. BELYEA, R.A. YOUNGQUIST e C.M.LANZA, 1986. Biosynthetic or pituitary extracted bovine growth hormone induced galactopoiesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 69 (Suppl. 1): 118 (abst).

ELSEN, J.D. e A. TRENKLE, 1973. Exposure of cattle to control subzero temperature: growth hormone, glucose and free fatty acid concentrations in plasma. *Am. J. Vet. Res.*, 34: 747.

EEL, C.J., T.J. FRONK, D.E. BAUMAN e R.C. GOREWIT, 1983. Effect of exogenous growth hormone in early and late lactation on lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 66: 776.

EEL, C.J. e D.E. BAUMAN, 1987. Somatotropin and lactation. *J. Dairy Sci.*, 70: 474.

ETERS, R.R. e H.A. TUCKER, 1978. Prolactin and growth hormone responses to photoperiod in heifers. *Endocrin.*, 103: 229.

AJAMAHENDRAN, R., S. DESBOTTES, J.A. SHELFORD, R.G. PETERSON e J.J. KENNELLY, 1989. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on milk production and reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 444 (abst.).

THOMAS, J.W., W.A. SAMUELS e K.S. MADSEN, 1989. Use of Sometribove, USAN (recombinant Methionyl) in a prolonged release system in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 450 (abst.).

RODERHOLM, C.G., D.E. OTTERBY, F.R. EHLE, J.G. LINN, W.P. HANSEN e R. J. ANNEXSTAD, 1986. Effects of different doses of recombinant bovine somatotropin (rbST) on milk production, body composition, and condition score in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 69 (Suppl. 1): 152 (abst.).

BULLIVAN, J.L., J.T. HUBER, S.K. De'ISE, M. TORABI, R.G. HOFFMAN, S. E. FRANSON e K.S. MADSEN, 1989. Factors affecting response of cows to sometribove (recombinant methionyl bovine somatotropin). *J. Dairy Sci.*, 72 (Suppl. 1): 453 (abst.).

TYRRELL, H.F., A.C.G. BROWN, P.J. REYNOLDS, G.L. HAALAND, C.J. PEEL, D.E. BAUMAN e W.D. STEIGNOUR, 1982. Administration of bovine growth hormone to high yielding Holstein cows. I. Influence on in vivo energy metabolism. *J. Dairy Sci.*, 65 (Suppl. 1): 120. (abst.).

VASILATOS, R. e P.J. WANGSNESS, 1980. Changes in concentrations in insulin, growth hormone and metabolites in plasma with spontaneous feeding in lactating dairy cows. *J. Nutrit.*, 110: 1479.

TRANSFORMAÇÃO EM ARROZ ÍNDICA E JAPÔNICA UTILIZANDO GENES MARCADORES E DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA.

F.J. ZAPATA-ARIAS¹

O arroz (*Oryza sativa* L.) é a espécie cultivada de maior importância para a alimentação mundial, com mais de 2 bilhões de pessoas, predominantemente nos países em desenvolvimento, utilizando-o como base de sua alimentação. O melhoramento do arroz através de métodos convencionais tem tido considerável sucesso, no entanto, o desenvolvimento de novas técnicas para a manipulação genética desta espécie, possibilita a rápida produção e melhoramento de genótipos que vêm a atender a demanda gerada pelo, também rápido, crescimento da população mundial. A introdução de genes estranhos nas espécies cultivadas é outra alternativa. Esta técnica promete sobrepujar alguns dos problemas ambientais e agronômicos que ainda não foram solucionados com o uso dos genes disponíveis aos melhoristas, nos atuais bancos de germoplasma.

Várias técnicas tais como a eletroporação, o método mediado por PEG, a biolística, o método do tubo polínico e o sistema de transferência mediado por *Agrobacterium*, têm sido empregadas para a transformação genética do arroz. A respeito da utilização dos diversos métodos, a produção de plantas transgênicas é ainda considerada ineficiente devido a baixa fertilidade e o pequeno número de plantas recuperadas. Estas técnicas, bem como a incorporação do gene de importância agronômica da soja, gene inibidor da tripsina, o qual confere resistência a broca denominada "yellow stem borer", serão objetos de discussão.

¹Professor Visitante, Departamento de Genética ESALQ/USP e CENA.

Escherichia coli Produtora de Etanol: Fato ou Fantasia?

Flávio Alterthum
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo

A transferência de genes de um microrganismo para outro tem sido praticada rotineiramente.

Este trabalho, que serviu de base científica para a patente de número 5.000.000 concedida pelo "Office of Patent and Trade Mark" dos Estados Unidos da América, envolveu a manipulação e transferência de genes de *Zymomonas mobilis* para *Escherichia coli*. O primeiro microrganismo é um excelente produtor de álcool, a partir de glicose ou frutose. Metaboliza estes dois açúcares a ácido pirúvico e este produto, sob a ação de duas enzimas, a piruvato-descarboxilase e a álcool desidrogenase é transformado em etanol e gás carbônico. A *E.coli* também é capaz de metabolizar estes dois açúcares (e muitos outros, como: sacarose, lactose, xilose, manose, arabinose, etc.) a ácido pirúvico. Este composto entretanto, é transformado em CO₂ e água (Ciclo de Krebs) ou ácido láctico, ácido acético e ácido fórmico (fermentação).

Os genes de *Z.mobilis* responsáveis pela expressão da piruvato-descarboxilase e álcool desidrogenase foram introduzidos em *E.coli*, sob a forma de plasmídio, e esta bactéria adquiriu uma nova alternativa metabólica, qual seja, a de produzir etanol e CO₂ a partir de ácido pirúvico.

Selecionamos, inicialmente, oito raças de *E.coli* provenientes da ATCC, American Type Culture Collections, e fizemos uma avaliação sobre a capacidade de crescerem em condições de "stress" fisiológico, como: concentrações elevadas de açúcares, sal, etanol e várias condições de pH e temperatura. A seguir foram feitas construções de plasmídios contendo os dois genes de *Z.mobilis*, mas ligados a outros genes funcionais e de resistência a antibióticos de tal forma a poder escolher a melhor construção genética.

Como todo trabalho envolvendo manipulação genética com vistas a uma aplicação biotecnológica, pelo menos duas condições devem ser alcançadas: o microrganismo que recebe a nova informação genética deve mantê-la ao longo das gerações e esta informação deve ser expressa, em grau elevado.

Ambas questões foram resolvidas satisfatoriamente e neste trabalho mostramos que E.coli foi capaz de produzir caldos fermentados contendo 7,8% de etanol (v/v) a partir de glicose e lactose. Trabalhando-se com xilose, açúcar abundante da hemicelulose, obtivemos 5,2% de etanol (v/v) a partir de 8% desta pentose. Este último resultado é altamente promissor pois inúmeros resíduos agrícolas contém celulose e hemicelulose. Para liberar os açúcares presentes nestes polímeros será necessário fazer-se a hidrólise (físico-química ou enzimática) para então fermentar o hidrolisado.

Os resultados obtidos em este trabalho abriram novas perspectivas para a produção de etanol, empregando-se E.coli recombinante.

IV REUNIÃO PAULISTA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

8 a 10 de
Dezembro de
1993

Local:
Piracicaba, SP

Pavilhão de Engenharia - ESALQ



PROMOÇÃO: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP
Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz" - CALQ
Programa Especial de Treinamento - PET/CAPES
Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz

APOIO: Prefeitura do Campus "Luiz de Queiroz"
Associação dos Ex-Alunos da ESALQ - ADEALQ
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

INFORMAÇÕES: Dep. de Economia e Sociologia Rural - ESALQ
Tel. (0194) 29-4119 / 29-4318
FAX (0194) 34-5186
Cx. Postal 9 - 13418-900 Piracicaba, SP

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

PESTICIDAS MICROBIANOS
(BIOPESTICIDAS)

Elizabeth Bilsland

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAMPUS DE PIRACICABA

PESTICIDAS MICROBIANOS E BIOPESTICIDAS

1- INTRODUÇÃO

O controle de insetos, doenças e plantas daninhas requer anualmente, o dispêndio de milhões de dólares somente com produtos químicos. Além de onerar o custo de produção, os pesticidas químicos representam um dos mais importantes agentes poluidores do ambiente (principalmente dos mananciais de água através da lixiviação e erosão superficial) e da intoxicação de trabalhadores rurais. Apesar da inegável utilidade e necessidade dos produtos químicos na agricultura brasileira, o alto custo, o baixo nível cultural e a falta de conscientização dos agricultores sobre o manuseio adequado e os riscos que os mesmos representam à ecologia, saúde humana e animal, torna urgente a necessidade do desenvolvimento de métodos alternativos mais econômicos e seguros para o controle de insetos, doenças e plantas daninhas.

Logo, para uma agricultura mais rentável, tecnificada e saudável, é fundamental que a produção de alimentos e matérias primas agrícolas seja feita sem agressão ao ambiente e utilizando de forma integrada todos os fatores de produção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Biopesticidas ou pesticidas microbianos envolve a utilização de microorganismos exatamente como seria feita com um agente de controle químico, em tantas aplicações quantas forem necessárias. É a utilização de microorganismos que não persistem no campo, ou menos, não em níveis suficientes para o controle quando o problema reinicia. Exemplos deles são o *Bacillus thuringiensis*, *Penicillium gigantea* e *Agrobacterium radiobacter* (DEACON, 1983).

Quanto ao seu uso, segundo BOSCH et. al. (1985), patógenos tem sido usados no controle de insetos, doenças e plantas daninhas. No controle de pragas, ele é feito de três modos:

- agentes introduzidos nos programas clássicos de controle

Biológico (exemplos: vírus *Brazilian myxomatosis* em coelho europeu na Austrália, *Dryopter baculovirus* (BOV) contra "besouro rinoceronte" no Pacífico Sul),

- como ocorrência natural e incorporadas ao programas de manejo integrado. Exemplos: uso do fungo *Entomophthora* spp. nos afídios da alfafa,

- como parasita ou patogênico natural (microbianos naturais). Exemplos: *Bacillus thuringiensis*.

Segundo CRAGG (1990), as vantagens do uso de biopesticidas, são:

- Especificidade - sendo na maioria mais ou menos específicos não afetam os inimigos naturais das pragas, deixando-os agir livremente no agroecossistema. Por exemplo, o *Baculovirus anticarsus* não afeta os predadores da lagarta da soja,

- Multiplacação e dispersão - possuem capacidade de multiplicação e dispersão no ambiente. Algumas dezenas de esporos são capazes de matar uma cigarrinha, porém cada cigarrinha produz cerca de 10^8 esporos que são disseminados pelos diferentes agentes no ambiente,

- Controle mais duradouro - após estabelecimento do patógeno em uma certa área, a doença pode assumir caráter enzoótico e assim mantém a população de insetos a níveis de danos não econômicos. Exemplo: *N. anisopliae* para controle de cigarrinhas da cana no Nordeste,

- Efeitos secundários - além da mortalidade direta, os patógenos podem afetar as gerações seguintes diminuindo a oviposição, viabilidade dos ovos e aumentando a suscetibilidade de populações a outros agentes de controle. Ex: *B. bassiana* coloniza o bicudo do algodão e diminui o período de oviposição e o número de ovos/fêmea,

- Controle adequado - pode ser aplicado junto com inseticidas seletivos em substituição visando obter ação sinérgica. Ex.: *N. anisopliae* mais trichlorfon para controle de cigarrinhas das pastagens,

- Aplicação - pode ser aplicado com as mesmas máquinas usadas para os defensivos químicos,

- Segurança e toxicidade - não polui o ambiente e nem é tóxico para homens e animais,

- Resistência - dificilmente os insetos poderão se tornar

resistentes aos patógenos.

Por entanto, há alguns pontos que devem ser observados, e referem-se a suas características:

- Disseminação e sobrevivência - as aplicações devem ser planejadas em função do ciclo da praga e do período de incubação do patógeno.

- Condições ambientais - determinados patógenos necessitam de condições favoráveis de temperatura, umidade, luz, etc., para serem eficientes contra as pragas.

- Armazenamento - cuidados no armazenamento são indispensáveis sem os quais é impossível manter a viabilidade e patogenicidade do produto.

- Comercialização - alguns patógenos podem provocar a aderência do inseto morto no produto a ser consumido e isso pode prejudicar a comercialização do produto.

Controle microbiano de insetos

O controle microbiano é a principal meta da Patologia de Insetos e representa um ramo do controle biológico dos insetos. Esse controle trata da utilização racional dos patógenos visando à manutenção da população das pragas a níveis não econômicos (CROCCOMO, 1990).

Metodos de controle dos microorganismos

Os patógenos e seus sub-produtos podem ser empregados, usando-se os seguintes procedimentos (CROCCOMO, 1990).

Colonização é a introdução dos entomopatógenos como agentes naturais de controle. É executada visando à transferência de pequena quantidade de inóculo pela introdução de insetos contaminados, cadáveres ou por pulverizações em populações sadias de pragas. O patógeno, dependendo das suas características, leva um tempo relativamente longo para se estabelecer. Exemplos: disseminação do *Baculovirus* em populações de *Oryctes rhinoceros*; introdução do *N. anisopliae* através da liberação da cigarrinha das folhas, contaminadas, nos canaviais.

Produtos microbianos podem ser aplicados na forma de produto microbiano visando a proteção imediata da cultura. As doses, normalmente, são elevadas e devem ser eficientes independentemente da densidade populacional da praga. Os produtos mais utilizados são a base do *Bacillus thuringiensis* (Dipel, Thuricide), *Beauveria bassiana* (Boverin), *Metarhizium anisopliae* (Biomas), *Hirsutiella thomsonii* (Micar), *Baculovirus heliothis* (Elicor), *Baculovirus antioarsia* (Poliqgen), *Nosema locustae* (Holo), etc.

Isca: alguns patógenos poderão ser formulados como iscas visando ao controle de pragas. Experimentalmente já foram elaboradas iscas de *B. thuringiensis* para o controle de *D. saccharalis* e isca com *Nosema locustae* visando ao controle de gafanhotos.

Metabólitos: as toxinas produzidas pelos patógenos, futuramente poderão ser empregadas no controle de pragas da mesma maneira que os inseticidas químicos.

Manejo de pragas: juntamente com outras medidas de controle podem ser aplicados no agroecossistema visando diminuir ou interromper a evolução da praga.

Padronização de inseticidas microbianos para garantia de qualidade

Segundo HABIB (1986), além da quantidade do patógeno incorporada na formulação, outras informações precisam ser incluídas no rótulo, para fins de expressar a potência do produto. Dessas destacam-se a virulência e a viabilidade do patógeno, principalmente dos facultativos, onde os modos de fermentação e formulação, além da qualidade genética da linhagem, afetam diretamente o potencial inseticida do produto.

Dada a importância de se estabelecerem critérios para técnicas de padronização de produtos microbianos, foi analisado o significado da padronização sob dois pontos de vista, industrial e internacional. O primeiro atinge o fabricante cujo interesse é de manter a virulência do seu produto no nível constante indicado no rótulo, nas diferentes remessas de produção. O segundo ponto de vista, entretanto, discute a dificuldade de comparações entre produtos industrializados

por países diferentes, com processos diferentes de fermentação e formulação e até a equivalência entre produtos à base de variedades diferentes do mesmo patógeno. Desse modo, duas técnicas devem ser usadas para fins de padronização. A primeira expõe métodos rápidos referentes ao patógeno, tais como, contagem direta e quantificação total do patógeno no produto formulado; determinação da quantidade viável do patógeno através da inoculação de meios de cultura e ensaios para toxina e vírus. A segunda, a principal, refere-se aos bioensaios utilizando-se um determinado inseto teste como indicador do potencial inseticida do produto, este em comparação com um padrão da mesma linhagem do patógeno, previamente estabelecido. Vários são os fatores que afetam o grau de precisão, ou seja, a qualidade dos bioensaios. Os mais importantes são as considerações referentes ao patógeno, ao inseto teste e os procedimentos dos bioensaios.

Produção de fungos, bactérias e vírus para controle de insetos

Os inseticidas baseados em entomopatógenos são quase sempre específicos e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade aos vertebrados e insetos benéficos. E ainda, ocorrem naturalmente nos campos cultivados (NORRIS & CAPALBO, 1986).

A produção de microorganismos entomopatogênicos depende do meio em que se desenvolve, ou seja, de meio artificial ou não. Se ele crescer em meio artificial poderá ser produzido em larga escala utilizando-se as modernas técnicas de fermentação. Por outro lado, se o patógeno se reproduzir apenas no vivo, faz-se necessário o hospedeiro vivo, ou um organismo alternativo para sua multiplicação. Tal produção tornar-se-á viável pela utilização de métodos de criação de insetos, livres de doenças, geralmente alimentados com dieta artificial.

A variabilidade, instabilidade e algumas vezes facilidade de manipulação genética são algumas vantagens dos inseticidas baseados em patógenos em comparação com os agentes químicos.

São vários os microorganismos patogênicos a insetos ou que produzem material tóxico a eles. Podem ser divididos em três grupos, com base em sua ecologia. O primeiro grupo, uma vez introduzido numa

população-alvo, será reciclado naturalmente, gerando um grau de controle permanente naquela população. O segundo grupo logo desaparece do ambiente ao qual foi aplicado e deverá ser aplicado repetidamente. O terceiro grupo pode se comportar de ambas as formas, dependendo da combinação da linhagem do patógeno com a espécie de praga visada, e também do ambiente.

Os agentes bacterianos de controle se dividem entre os três grupos. *Bacillus pumilus* e espécies de *B. thuringiensis* são do segundo grupo. O terceiro grupo envolve linhagens de *B. sphaericus*. Essa lista de espécies bacterianas, embora curta, contém os mais promissores agentes de controle microbiano.

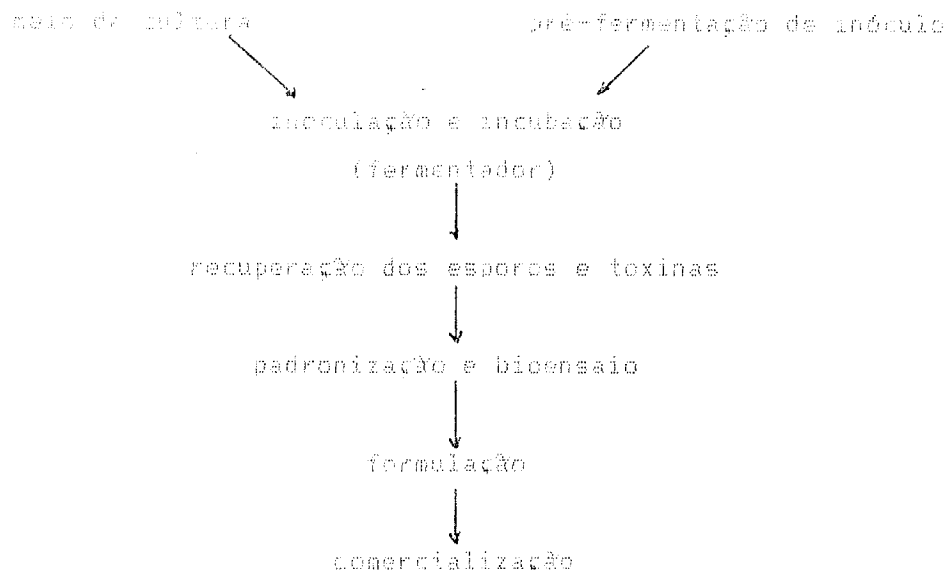
Essas espécies de bactérias possuem vantagens e desvantagens para controle de insetos. As vantagens incluem a produção de esporos, que são bastante resistentes aos fatores adversos do ambiente; podem ser mantidos na forma de pó ou emulsão; são facilmente utilizados em equipamentos projetados para aplicação de inseticidas químicos. e, principalmente, são comprovadamente inócuos ao ser humano, outros animais e à flora e fauna benéficas.

Dentre as desvantagens, está o fato de as bactérias agirem por via oral, não tendo nenhuma ação por contato. Sua ação geralmente se restringe a um estágio de desenvolvimento do inseto, e por consequência a aplicação do produto deve ser mais exata e controlada do que com produtos químicos.

Para a produção comercial de microrganismos ou produtos microbianos, há necessidade de se selecionar uma linhagem bem adaptada ao processo fermentativo e variações são necessárias a fim de maximizar a produção e realizar o crescimento sob condições de fermentação econômicas.

A manutenção de culturas em meio sólido e as repetidas transferências de meio de cultura artificial causam alterações indesejáveis no microrganismo, sendo uma delas o decréscimo na capacidade de esporular, diminuindo sua entocapatogenicidade.

A produção comercial do inseticida pode ser esquematizada como se segue abaixo:



O *Bacillus thuringiensis* possui várias toxinas. Durante a esporulação, torna-se ao lado de cada esporo, um cristal protéico, tóxico à maior parte de insetos da ordem Lepdóptera causando paralisia intestinal e morte do inseto. Além dessas endotoxinas, há a exotoxina termoestável que é produzida pelo *B. thuringiensis* na fase de crescimento vegetativo, e que é tóxica a alguns lepdópteros, dípteros, himenópteros, coleópteros e ortópteros.

As endotoxinas são toxinas ligadas à célula microbiana, enquanto que as exotoxinas são aquelas ecretadas no meio de cultura.

Segundo ALVÉS (1936), os fungos devem estar disponíveis em grande quantidade para serem utilizados no controle microbiano de insetos, pois os insetos necessitam de um elevado potencial de inóculo para serem colonizados por esses patógenos e, além disso, para que sejam eficientes independentemente da densidade populacional dos insetos.

As principais dificuldades da produção de fungos em meios líquidos e semi-sólidos, estão na obtenção de meios de cultura adequados, condições de desenvolvimento, esporulação e prevenção das

contaminações secundárias.

ALVES (1986), cita 4 processos na produção de fungos em meios sólidos:

1- Produção em sacos plásticos: utilizado para produção de um grande número de espécies de deuteromicetos, principalmente *B. bassiana*, *N. anisopliae*, *I. ricinus*.

2- Produção em garrafas de sorot utilizado para produção de espécies de deuteromicetos.

3- Produção de fungos pelo método Bionax: é um método desenvolvido pela Labormax Produtos Químicos Ind. e Com. Ltda., para produção de *N. anisopliae* e *B. bassiana*. É feita em bandejas dentro de salas assépticas, sendo que os cuidados no tocante à contaminação devem ser recobrados em relação aos processos tradicionais.

4- Produção em insetos vivos: há fungos de difícil crescimento em meio de cultura (*Entomophthora*, *Cordyceps*, *Nomuraea*), e nesses casos, produzem-se a partir da inoculação nos insetos hospedeiros. Como exemplo, cita-se *N. rileyi* produzida sobre lagartas de *A. gemmatilis*.

Apesar dos grandes esforços empregados no sentido de obter meios artificiais práticos e econômicos para produção de vírus, não se têm alcançado resultados satisfatórios, sendo que esses patógenos são sendo produzidos exclusivamente sobre insetos hospedeiros (ALVES, 1986).

Normalmente evita-se usar insetos criados em laboratório para que se tenha um melhor controle sanitário do inseto, pois este não deverá ser portador de outro patógeno, o que acarretaria baixa qualidade do inseto-ida.

Insetos provenientes do campo só devem ser utilizados quando for possível a avaliação da sanidade dos mesmos.

A utilização de insetos, criados em laboratório são:

- grande disponibilidade do hospedeiro independentemente da época do ano;

- controle da sanidade da criação;

- controle da qualidade do patógeno.

O inóculo a ser empregado pode ser adquirido em laboratórios especializados ou a partir da coleta em campo em ambos os casos deve-se

Fazer vários testes para se certificar da ausência de microorganismos potencialmente patogênicos para vertebrados como alguns coliformes fecais.

A inoculação pode ser feita através da pulverização da suspensão sobre o alimento utilizando um microatomizador ou incorporando-se à dieta. A incorporação deve ser realizada a temperatura não superior a 50 °C.

Controle microbiano de patógenos de plantas

Foram encontrados na literatura diversos exemplos de controle biológico de doenças de plantas (ex.: controle biológico de *Agrobacterium*, da tristeza de citros, da vassoura de bruxa do cacauzeiro), porém nenhuma delas se enquadrou na definição apresentada como biopesticidas. Contudo, há possibilidades, cada vez mais crescentes, de desenvolvimento de produtos nessa área (MELLO, 1987).

Controle microbiano de daninhas

Patógenos são potencialmente muito úteis no controle biológico de plantas daninhas, podendo ser, na maioria, multiplicados em laboratórios e aplicados da mesma forma que os herbicidas. No mercado americano existem duas marcas registradas de bioherbicidas, o COLLEGO (*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*) para o controle do angiquinho (*Aeschynomene ligulata*) em lavouras de arroz irrigado e de soja e o DEVINE (*Phytophthora palmivora*) para o controle de *Norrenia adonata* em pomares de citros (YOKINOBI, 1987).

CONCLUSÃO

A agricultura atual ainda está muito dependente de produtos químicos para o controle de pragas, porém, como foi mostrado no trabalho, essa situação tende a se reverter.

Isso não quer dizer que os agrotóxicos tendam a desaparecer; o que deve diminuir é o seu uso indiscriminado causando efeito nocivo sobre o ambiente. Eles devem ser substituídos por produtos menos tóxicos e mais específicos. Estes poderão ser usados integralmente com os Biopesticidas e práticas de manejo, de forma a promover um controle mais eficiente e de menor impacto para o meio.

O uso de Biopesticidas tende a aumentar muito, devido à inúmeras vantagens apontadas e devido ao grande potencial microbiano que ainda não foi estudado.

Assim, as perspectivas para o futuro são a utilização cada vez maior de Biopesticidas de forma integrada com agrotóxicos de baixa classe toxicológica.

LITERATURA CITADA

- ALVES, S. B. Controle Microbiano de Insetos. Editora Malte. São Paulo, 1984. 407 p.
- BOSCH, R. V. D.; MESSINGER, F. S. & GUTIERREZ, A. P. An Introduction to Biological Control. Division of Plenum Publishing Corporation. New York, 1985 (2ª ed.), 247p.
- CROCOMO, W. B. Manejo Integrado de Pragas. Editora UNESP. São Paulo, 1990. 358 p.
- DEACON, J. M. Microbial Control of Plant Pests and Diseases. Coleção Aspects of Microbiology 7. Van Nostrand Reinhold Co. Ltd. Hong Kong, 1963. 88p.
- MELO, I. S. de. III Simpósio de Controle Biológico, Anais. CNPDA/EMBRAPA. Jaguariúna - SP, 1992. 312 p.
- YONGMERS, J. T. Controle Biológico de ervas daninhas por microrganismos. Anais da II Reunião sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas. Fundação Cargill, 1987. p. 20-30.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE BIOTÉCNOLÓGIA DE

EQUINOS E BOVINOS

ELIZABETH BYLSTAND

PET- BIOTECNOLOGIA

PIRACICABA 1993

INDICE:

1. OBJETIVOS.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. EQUINOS.....	4
2.1.1. DOENÇAS.....	4
2.1.2. REPRODUÇÃO.....	8
2.1.3. NUTRIÇÃO.....	8
2.2. BOVINOS.....	12
2.2.1. DOENÇAS.....	12
2.2.2. MASTITE, um caso a parte.....	13
2.2.3. REPRODUÇÃO.....	14
2.2.4. HORMÔNIOS.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	20
5. CONCLUSÃO.....	22
6. LITERATURA CITADA.....	23

OBJETIVOS:

A monografia apresentada tem como principal meta a reunião, em uma única obra, dos avanços da biotecnologia em bovinos e eqüinos.

Ela deverá constar de informações sobre novos produtos ou processos desenvolvidos nas áreas de combate à doenças, manipulação e transferência de embriões, utilização de hormônios, microrganismos nocivos ou benéficos, etc...

É importante lembrar que as informações contidas nessa revisão devem se encaixar no verdadeiro conceito de biotecnologia, que envolve a manipulação de organismos a nível celular para o desenvolvimento de novos produtos ou processos.

Assim, a monografia reunirá em uma única obra informações de extrema utilidade para quem pretende se atualizar na área, com a vantagem de ser a única no gênero escrita em português.

REVISÃO DE LITERATURA.

Equinos.

Doenças:

Criar cavalos com maior vitalidade e performance pode ser conseguido a longo prazo, mas, por enquanto, os maiores avanços ligados à área são os que visam recuperar ou manter a saúde através da engenharia genética.

À frente está a tecnologia conhecida como DNA recombinante, usada entre outras coisas para a fabricação de vacinas. Basicamente, a técnica trabalha no princípio de que se o DNA animal pode ser recombinado, então o material genético de vírus e bactérias pode ser alterado também. Segundo William Loegreid, PhD do programa de pesquisa do U.S. Department of Agriculture's Plum Island, existem várias maneiras em que isto pode ser utilizado:

* Pela clonagem apenas da porção imunogênica do DNA viral (a parte ou subunidade que reagirá com os anticorpos do cavalo), o que pode estimular o sistema imunológico do cavalo sem os perigos existentes quando se trabalha com vírus inteiros. Outra vantagem da vacina recombinante, que já vem sendo produzida contra a doença eqüina africana, é

que ela promove uma resposta imunológica diferente daquela apresentada por um animal exposto ao verdadeiro vírus, e que permite aos veterinários e pesquisadores diferenciarem animais infectados de vacinados.

*É possível também retirar a porção imunogênica do genoma de um agente e inseri-la em outro vírus. Esta vacina "com vetor" é então injetada em um animal, onde se multiplica, com a vantagem extra de necessitar menor quantidade de material para produzir uma resposta.

*Um trabalho realizado por Bob Johnston, PhD da University of North Carolina e Jonathan Smith, PhD do U.S. Army Research Institute for Infectious Diseases em Maryland, mostrou que trocando apenas uma base em um gene do vírus responsável pela encefalomielite eqüina da Venezuela (VEE), o agente se torna completamente inofensivo permanecendo, porém, capaz de produzir resposta imunológica no animal (TEIL, 1992).

Vacinas recombinantes foram desenvolvidas por DALE e CORDELL (1987), para a imunização de cavalos contra vírus da gripe eqüina (EIV). Isso foi possível a partir da utilização de sequências de DNA que codificam as glicoproteínas hemaglutina (HA) e neuraminidase (NA), proteínas básicas nas vacinas.

Vírus e bactérias são oportunistas, ou seja, infectam o animal quando seu sistema imunológico está abalado pelo "stress". Mais frequentemente estes atacam o

sistema respiratória causando enfermidades como a doença complexa do sistema respiratória de equinos (ERDC). Agora, a biotecnologia virou a mesa para os microrganismos oportunistas por usar um dos seus para estimular o sistema imunológico dos eqüinos, com a finalidade de aumentar a resistência e acelerar a recuperação dos animais.

EqStimtm, que recebeu a aprovação do departamento de agricultura dos Estados Unidos (USDA) em junho de 1988, é o primeiro estimulante genérico a ser fabricado em larga escala para cavalos. As bactérias envolvidas são *Propionibacterium* *acnes* inativadas, organismos benéficos normalmente presentes na pele. Por meio de um mecanismo ainda não explicado, a injeção desses organismos anaeróbios no sangue do cavalo promove um grande aumento no número de estruturas de defesa do organismo sem causar efeitos colaterais. Estudos em animais tratados com o estimulante imunológico demonstraram aumento nas atividades dos macrófagos, das células "killer" e na produção de interferon e interleucinas. Essa atividade fortifica enormemente a frente do sistema imunológico que destrói vírus e bactérias. Os animais tratados também apresentam aumento na produção de glóbulos brancos e vermelhos na medula.

Assim, o objetivo de todos os imunestimulantes é modificar a "fraqueza" natural do sistema imunológico, acelerando a resposta aos estímulos do patógeno. Aumentando a capacidade do corpo de reagir, há um encurtamento da

"guerra" entre patógeno e hospedeiro, diminuindo a quantidade de tecido ferido e o processo inflamatório resultante, proporcionando uma recuperação mais rápida por haver menos estrago para consertar (MOORE¹, 1992).

Um dos mais novos imunocestimulantes no mercado é conhecido como *Mycobacterial cell wall extract* (MCWE), ou seja, extrato de parede celular bacteriana. Pelo isolamento de partes "úteis" de bactérias mortas e posterior injeção destas, foi demonstrado que o cavalo reagirá como se toda a bactéria estivesse presente. Testes em laboratório mostraram que partes específicas da parede celular de algumas bactérias são eficientes ativadoras dos macrófagos, os ativadores da cadeia imunológica. De fato, vários estudos mostraram que o MCWE estimulam os macrófagos a produzir o sinal de alerta mais cedo do que o normal, o que leva os anticorpos a entrar antes em ação, o que melhora toda a ação do sistema imunológico, que começa a trabalhar antes que danos sejam causados.

A técnica de PCR (polymerase chain reaction) é um método sensível para detecção de DNA de patógenos virais. SHARMA et al (1992) a utilizaram para a detecção do vírus da herpes equina dos tipos 1 e 1 (EHV-1 e EHV-1) a partir de amostras de muco nasofaríngeo de 88 cavalos. Os resultados obtidos foram comparados com os fornecidos pelo método tradicional, o que levou à conclusão que é um método eficiente e rápido no diagnóstico de infecções causadas por

EHV-1 e EHV-4.

Reprodução:

Segundo MOORE² (1992) a meta do projeto liderado por Jay Kirkpatrick, PhD da Universidade Eastern Montana, é uma vacina destinada a tornar fêmeas temporariamente estéreis devido a produção de anticorpos contra um componente chave do seu ciclo reprodutivo, o óvulo.

A vacina é produzida a partir de uma proteína extraída da parede do óvulo de porco. Esta promove a produção de anticorpos contra a proteína do porco assim como a do óvulo da própria égua, tornando-a estéril enquanto o anticorpo estiver presente (normalmente em torno de um ano ou um pouco mais).

A incidência de ovulação dupla em éguas varia de 1 a 11%, sendo a média em torno de 18%. Ovulação tripla ocorre raramente. Os fatores que afetam a taxa de ovulação são: raça, época do ano e predisposição genética. Contudo, experimentos demonstraram que diante de uma imunização com a subunidade- α de hormônio bovino recombinante, o sero das éguas se torna capaz de transformar seus próprios hormônios levando assim a um significativo aumento nas taxas de ovulação.

A gonadotropina coriônica equina possui pequena capacidade de combinação com os receptores das gônadas das

éguas, mas se combina bem com os tecidos gonadais de outras espécies, nos quais suas propriedades semelhantes à de FSH as tornam excelentes drogas superovulatórias. Normalmente, extratos glândula pituitária são o método mais confiável para a indução de ovulação múltipla em éguas e normalmente promovem de uma a quatro ovulações por ciclo. Contudo, esses extratos não são sempre disponíveis e a demanda é grande. Um tratamento de indução de ovulação múltipla em éguas pode ser útil de várias maneiras. Em um programa de transferência de embriões, aumentando o número de embriões coletados por ciclo aumentando a eficiência do método. Mais ainda, um maior número de embriões ficaria disponível para o armazenamento, transporte ou micromanipulação. Outra vantagem é que aumentando a taxa de ovulação, éguas sub-fértis, ou éguas normais cobertas por garanhões sub-fértis teriam maior possibilidade de produzir, devido a um aumento na probabilidade de haver a fertilização. Finalmente, uma vacina como esta permitirá que as fêmeas sejam fertilizadas mais cedo, devido a um adiantamento artificial da época de cio. Isso, naturalmente, necessitará um manejo reprodutivo mais sofisticado, devido ao aumento no número de partos múltiplos, extremamente delicados no caso de equinos (MCKINNON, 1982).

Nutrição

A maioria da alimentação fornecida aos cavalos não parece ser suficiente para suprir as necessidades de seus micróbios, ou seja, as bactérias, protozoários, fungos e leveduras que coabitam seu sistema digestivo auxiliando na digestão de fibras. Devido a isso alguns suplementos nutricionais foram introduzidos em sua dieta. Chamados de "probióticos", "alimentação direta de micróbios" e "culturas de lactobacilos", eles são projetados para auxiliar os pequenos habitantes do trato digestivo dos eqüinos.

Os produtos de algumas espécies de micróbios servem como fonte de energia ou veneno para as outras. As colônias aumentam e competem com as vizinhas até que se estabelece um equilíbrio, no qual entre 30 e 40 espécies predominam.

Os microrganismos benéficos que ocupam o trato digestivo dos cavalos são também uma importante barreira à colonização por patógenos. Não apenas pela monopolização dos nutrientes e do espaço disponível, como também pela produção de compostos químicos onde apenas os altamente adaptados podem sobreviver. Algumas espécies produzem até antibióticos contra outras. Diversas estirpes de *Lactobacillus*, por exemplo, produzem ácido láctico, ácido acético e peróxido de hidrogênio, que inibem o crescimento de *Escherichia coli* e outros coliformes produtores de gases (causadores de doenças quando em número excessivo)

A menos que os invasores apareçam em número muito

superior, a população de micróbios do sistema digestivo de um cavalo adulto saudável torna extremamente difícil a colonização por patógenos.

A ideia que levou à criação de "probióticos" é a de que alimentando os microrganismos benéficos, eles auxiliarão na digestão e no combate aos patógenos.

Alguns produtos são voltados a potros, outros para adultos. Alguns são fornecidos diariamente, junto com a ração, outros em doses espaçadas para repor os micróbios perdidos com a desvermifugação ou com o uso de antibióticos. Normalmente esses produtos possuem uma ou poucas espécies de microrganismos.

Muitos produtos contêm estirpes de *Lactobacillus*, que são antagonistas a muitos patógenos e são capazes de auxiliar na digestão de vários carboidratos diferentes. Outros suplementos contêm culturas vivas de leveduras, que fornecem vitamina B e retiram oxigênio do trato digestivo, favorecendo os microrganismos anaeróbios. *Aspergillus oryzae* é outro "ingrediente" popular que auxilia na digestão da celulose. São também utilizados *Streptococcus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis*.

Existem até suplementos líquidos no mercado para os micróbios do equino, os quais contêm todos os nutrientes necessários para maximizar a atividade microbiana (KRUSCHWITZ, 1991).

Bovinos:

Doenças:

As novas vacinas comerciais e experimentais contra doenças virais e bacterianas de bovinos foram subdivididas por YANCEY (1982) em dois grupos, aquelas usadas para gado de corte e leiteiro ou aquelas usadas exclusivamente para gado leiteiro. No setor corte/leite, as vacinas mais novas são direcionadas a várias vírus (BHV-1, BVDV, BRSV, PI₃, FMD) e bactérias importantes (*Pasteurella* spp., *Haemophilus somnus*). As vacinas virais incluem as constituídas de vírus vivos com genes que conferem patogenicidade deletados (gene-deleted modified live = MLV), fragmentos de vírus ou antígenos peptídicos. As mais novas vacinas contra *Pasteurella* são compostas por MLV ou por antígenos da parede. As pesquisas para vacinação contra *H. somnus* se concentraram apenas em clonar antígenos específicos da parede. As vacinas para gados leiteiro visam principalmente a imunização contra coliformes causadores de mastite (*Streptococcus agalactiae* e *S. uberis*).

A modificação química de *Pasteurella multocida* e *P. haemolytica* foi utilizada por GARREL no preparo de vacinas vivas de bactérias para a imunização tanto de bovinos, quanto de suínos e eqüinos.

BROCK et al (1988) desenvolveram uma metodologia

para o diagnóstico de diarreia bovina através da clonagem do DNA do vírus causador tornando o teste 100 vezes mais eficiente.

GREEN et al (1989) produziram uma vacina contra queratoconjuntivite bovina, e, da mesma forma, HSU et al (1988) o fizeram, produzindo vacinas de vírus recombinantes expressando H.A. ou gene F. para a proteção do gado contra rinderpest.

Foi obtida a expressão do vírus da diarreia bovina em *E. coli* para preparo de diagnósticos (PATENTE: Em/ Reg. Wallonne Chiron, 1986).

WILSON E PADDOCK (1989) desenvolveram uma metodologia para a obtenção do fator de transferência para seu uso na imunização contra doenças associadas a antígenos para os quais o fator de transferência é específico.

LUBING et al (1989) conseguiram a transferência de genes de resistência a neomicina para células embrionárias de bovinos através de retrovírus de rato.

Mastite, um caso à parte:

A terapia por meio de antibióticos só é parcialmente eficiente contra *S. aureus*, um dos patógenos causadores de mastite bovina mais importante. Há períodos de grande incidência de novas infecções intramamárias que precedem o final da lactação, se caracterizando por um encurtamento e

dilatação do canal mamário, proporcionando uma maior entrada de patógenos. Nesse período a injeção de interleucina bovina recombinante-2 reduz drasticamente o diâmetro do canal mamário, tornando a entrada de patógenos extremamente dificultosa (FURDA et al, 1992).

Em outro trabalho visando a prevenção e a terapia da mastite bovina causada por *S. aureus*, COYLE et al (1992) utilizaram interleucina bovina recombinante-1. Esta, quando injetada intramamariamente causou um aumento significativo no número de células somáticas, principalmente neutrófilos que são ativos na indução de formação de superóxido, conferindo proteção contra o patógeno. Além desse efeito, a r-BOLL-19 pode ser combinada com antibióticos aumentando a eficiência terapêutica dos mesmos em até 55%.

WATSON (1907) também desenvolveu uma vacina efetiva na imunização de ruminantes contra mastite causada por *S. aureus*.

TODHUNTER et al (1992) realizaram um trabalho de imunização de gado leiteiro contra *Escherichia coli* (isolada de infecção intramamária) a partir da membrana externa dessa bactéria.

Reprodução:

A transferência de embriões leiteiro começou a ser significativa a partir da década de 70 com a introdução de

técnicas não cirúrgicas de transferência. O número de bezerros holandeses obtidos por transferência de embriões registrados aumentou 100% ao ano de 1977-81 e 8% de 1984-90, alcançando praticamente 20000 bezerros em 1990. Apesar das pesquisas envolvendo gonadotropinas, hormônios ovulatórios e dinâmica de folículos, não houve evolução na eficiência ou produtividade dos processos superovulatórios nos últimos 15 anos. Da mesma forma, nos últimos 10 anos a taxa de sucesso na transferência de embriões frescos permaneceu constante. Embora as técnicas de divisão de embriões já fossem perfeitas em 1980, elas são usadas apenas por pequena parte de indústria de transferência de embriões. Apesar das intensas pesquisas, ainda não existe nenhuma técnica realmente eficiente para a sexagem de embriões comercialmente. Um número modesto de embriões já foi produzido em vários programas comerciais através de técnicas de transferência nuclear. Contudo, experimentos envolvendo transferência de genes em óvulos de gado e outros animais domésticos tiveram pouco sucesso.

Cada leiteiro italiano foi escolhido para um estudo de aumento do potencial genético associado à super ovulação de vacas de elite, à sexagem e divisão de embriões, seguidos de um rigoroso teste de progênie. A divisão, sexagem e transferência dos embriões resultantes em receptoras promove um aumento de 10-15% no ganho genético dos produtos obtidos (BURNSIDE & JANSEN, 1992).

O mapeamento genético através de sondas de DNA e da tecnologia de PCR tem fornecido informações intrigantes a respeito de bezerros e logo será usada para embriões. Essa tecnologia, quando combinada com uma transferência de embriões eficiente, pode fornecer produtos de grande impacto nos próximos anos (HACLER et al, 1991). ELLIS e HARPOLD (1989) também utilizaram sondas de hibridização de ácido nucleico para a sexagem de embriões bovinos no período de transferência de embrião, com virtual 100% de exatidão.

BECZE e MESZAROS (1986) induziram a parição de gêmeos por transferência de embriões em vacas prenhas. O primeiro par de gêmeos idênticos nasceu na Hungria, originado por transferência de embriões divididos em partes iguais (BECZE, 1987).

Segundo HUNTER (1986), em seu trabalho sobre o status atual das novas biotecnologias que afetam a indústria de laticínios, os maiores avanços do setor são: tecnologia de DNA recombinante, manipulação de embriões, produção e utilização de hormônios. Muito importantes também são o uso hormônio de crescimento recombinante, anticorpos monoclonais para aumentar sua atividade somatomédica e fatores de crescimento, tanto para gado leiteiro quanto para gado de corte (HART, 1987).

Grandes avanços foram obtidos com a produção de embriões bovinos por eletrofusão de embriões doadores e fragmentos de oócitos receptores, cultivados em oviduto de

ovelha e transferidos para o gado (PAT:/ CRANADA-GFNFT, 1988). CHURCH (1988) citou a obtenção de animais transgênicos através da manipulação de embriões e transferência de genes, melhorando o resultado da criação. Mais ainda, foi citado no J. FOOD PROT (1986), a micromanipulação de embriões, pré-selecção de progênios e uso de hormônios de crescimento para a indústria de leite.

Hormônios:

Foi produzida prochymisina bovina em *Proteus mirabilis*, engenheirado geneticamente para aumentar a produção de leite em bovinos (KLESSEN et al, 1988).

FRASER e BRUCE desenvolveram um processo para a expressão do gene para o hormônio de crescimento bovino na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

METODOLOGIA:

A metodologia aplicada para a realização do trabalho de revisão, foi a procura minuciosa por artigos referentes a biotecnologia de eqüinos e bovinos.

Esta procura foi feita em periódicos e livros, sendo que estes últimos nunca apresentaram informações atualizadas sobre o tema.

Os periódicos foram divididos em quatro categorias. abstracts, revistas científicas genéricas, revistas sobre biotecnologia e revistas especializadas em bovinos e eqüinos.

Os abstracts utilizados foram. Biotechnology Abstracts, Biotechnology Research Abstracts e Biotechnology Advances (Patent Abstracts). Suas informações são extremamente concisas, servindo apenas como fonte de dados sobre os trabalhos científicos realizados, não fornecendo detalhes a respeito dos processos utilizados ou aplicações.

As revistas científicas genéricas consultadas foram. Current Science (de 1989 a 1992), Nature (de 1990 a 1992), Bioscience (de 1989 a 1992), New Scientist (de 1989 a 1992) e Science (de 1989 a 1992). Suas informações não tiveram utilidade, devido ao fato de tratarem muito pouco de biotecnologia, e, quando isso ocorria, o assunto tratado não era bovinos ou eqüinos.

Os periódicos sobre biotecnologia consultados foram: Biotechnology, Biotechnology and Applied Biochemistry, Biotechnology Progress e Biotechnology Letters. Em nenhum deles foram encontradas informações úteis para a revisão, por tratarem quase exclusivamente sobre homem, animais de laboratório e plantas.

As informações mais úteis para o trabalho foram obtidas nas revistas especializadas em bovinos e eqüinos, das quais se destacaram: Equus, Journal of Dairy Science e Equine Veterinary Journal. Além dessas, dentro da mesma categoria foram consultadas: Journal of Equine Veterinary Science, Equine Sports Medicine News, Horse and Rider e Horseman; estas sem o mesmo êxito.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.

Como foi possível perceber através da revisão de literatura, os trabalhos realizados em biotecnologia de eqüinos não visam o melhoramento genético do próprio animal, isso porque as raças possuem certos padrões que não podem ser modificados, mesmo que a funcionalidades do animal melhore, sob pena do registro do produto. Mesmo a inseminação artificial e transferência de embriões não são aceitas por muitas associações das raças, quanto mais a obtenção de animais transgênicos.

Por esse motivo, os maiores avanços em biotecnologia de eqüinos estão concentrados no combate à doenças, através de vacinas recombinantes ou estímulo do sistema imunológico do próprio animal.

As maiores novidades na área reprodutiva estão ligadas ao controle de natalidade ou aumento da fertilidade, conforme a necessidade local.

Os trabalhos realizados em biotecnologia de bovinos também estão concentrados na área de combate à doenças, com enfoque especial à mastite. A metodologia utilizada nesses casos envolve a tecnologia de DNA recombinante, isolamento de estruturas imunogênicas, entre outras.

Em oposição ao que foi apresentado para eqüinos, avanços vêm sendo obtidos na obtenção de animais

transgênicos, transferência, sexagem e divisão de embriões, visando sempre um aumento da produtividade em decorrência de um aprimoramento do potencial genético dos animais.

Com o mesmo objetivo, estão sendo utilizados hormônios recombinantes para o aumento da produção, tanto de carne quanto de leite.

CONCLUSÃO.

Devido à maior importância econômica, maior é o capital investido em pesquisas envolvendo bovinos, levando a um maior avanço nessa área.

Para o gado, o mais importante não é a conformação, e sim a produtividade. Devido a isso, as pesquisas visam sempre um aumento no rendimento, seja pelo controle de doenças (que representam as perdas) ou pelo aumento na produção de carne ou leite (ganho).

Como eqüinos normalmente não são vistos como produto de subsistência, e sim como diversão, os investimentos em pesquisas nessa área não são tão grandes. O que dificulta ainda mais é o custo de manutenção elevado dos animais, o que torna as pesquisas inviáveis para muitas instituições.

Apesar disso, grandes avanços já foram obtidos na área, principalmente em países ricos, que podem manter grandes tropas com intenso controle sanitário.

LITERATURA CITADA:

- BECZE, J. Magy. Allatorv. Lapja, V.42, No. 2, P. 96, 1987
apud Biotechnology Research Abstracts, 1988.
- BECZE, J. & MECZAROS, J. Magy. Allatorv. Lapja, V.41, No. 1, P. 47-53, jan. 1986 apud Biotechnology Research Abstracts, 1988.
- BROCK, K. V.; BRIAN, D. A.; ROUS, B. T. & POTGIETER, L. N. D. Canadian Journal of Veterinary Research, V.52, No. 1, P. 451-7, 1988 apud Biotechnology Research Abstracts, V. 8, No. 1, 1988.
- BURNSIDE, E. B. & JANCEN, C. B. Feasibility of Embryo Splitting and Sexing to Enhance Genetic Trend in a Dairy Population Under a Modern AI Progeny Proving System. Journal of Dairy Science, V.75 (supl. 1), P. 152, 1992.
- CARREL, J. K. Norden laboratories Inc.
- CHURCH, R. B. Int. J. Anim. Sci., V.1, No. 1, P. 1-6 apud Biotechnology Abstracts, V. 8, No. 14, jul 1989.
- COYLE, P.; FURDA, G.; TAO, W.; DALEY, M. & JOHNSTON, P. n-Ball-W as a Preventative and Therapeutic for *S. aureus* Mastitis. Correlation with its Effects upon Polymerphuclear Neutrophil Function. Journal of Dairy Science, V. 75 (supl. 1), P. 145, 1992.
- DALE, B. & CORDELL, B. Biotechnology Advances, V.5, No. 1, 1987 apud Patent Abstract 4631103.

- ELLIS, S. B. & HARPOLD, M. Biotechnology Advances, V.7, No. 1, 1988 apud Patent Abstracts 175031B.
- FRASER, T. H. & BRUCE, B. J. Upjohn Company.
- FURDA, G. J.; DALEY, M. J.; HAYES, P. & JOHNSTON, P. A. Infusion of Recombinant bovine Interleukin-2 into Infected Mammary Glands at Dry Off Provides Increased Protection Against *S. aureus* Challenge During Early Involution. Journal of Dairy Science, V.75 (supl. 1), P. 145, 1992.
- GREEN, W. C. & POTGEITER, L. N. D. Patent USA 4.818.528 Biotechnology Research Abstracts, 1988.
- HART, I. G. Proc. Nutr. Soc., V.46, No. 3, P. 393-405, 1987 apud Biotechnology Research Abstracts, 1988.
- HASLER, J. F. & TRAN, E. Current Status and Potential of Reproductive Technology. Journal of Dairy Science, V.74 (supl.1), P. 137, 1991.
- HSU, D.; JONES, L.; OWENS, S.; GRUBMAN, M.; MEBUS, C.; YAMANAKA, M. & DALE, B. Science, V.242, No. 4881, P. 1058-61, nov 1988 apud Biotechnology Research Abstracts, 1988.
- HUNTER, A. G. J. Food Prot., V.49, No. 4, P. 844, 1986 apud Biotechnology Research Abstracts, 1988.
- JOURNAL OF FOOD PROT., V. 49, No. 10, 1986.
- KLESSEN, C.; SCHIMDT, K. H.; GUMPERT, J.; GROSSE, H. H. & MALKE, H. Appl. Environ. Microbiol., V.55, No. 1, P. 1009-15, apr. 1989.

- KRUSCHWITZ, K. Managing microbes. Equus, No. 106, P. 98-101, nov 1981.
- LUBING, Z.; WANG, M. T.; JACKSON, K. J.; CHANG, S. M. W. & LAWRENCE, C. B. Somatic Cell Mol. Genet., V. 15, No. 2, P. 137-41, mar 1989.
- MCKINNON, A. G.; BROWN, R. W.; PASHEN, R. L.; GREENWOOD, P. E. & VASEY J. B. Increase ovulation rates in mares after immunisation against recombinant bovine inhibin α -subunit. Equine Veterinary Journal, V.24(2), P. 111-5, 1992.
- MONTAGUE, M. R. Equine Immunity Booster. Equus, No.135, P. 20-2, jan 1989.
- MOORE, J.¹ Enhancing Immunity. Equus, No. 171, P. 62-123, apr 1992.
- MOORE, J.² Science at the seaside. Equus, No. 179, P. 88-91, set 1992.
- PATENTE: Em/ Reg. Wallonie Chiron/ EP-208-672: 88-07-05-US-752801 (14-01-87) 01-07-86 como 070095. 87-009295/ 02.
- PATENTE: / Granada- Genet./ WO 8000-016 05-06-87 US 050001 (15-12-88) como U 81006 88-360630/ 51 apud Biotechnology Abstracts, V. 9, mar 1989.
- SHARMA, P. C.; GULLINANE, A. A.; ONIONS, D. E. & NICOLSON, L. Diagnosis of Equid herpesviruses -1 and -1 by polymerase chain reaction. Equine Veterinary Journal, V. 24, No. 1, P. 20-5, jan 1992.

- TEIL, K. K. Genetic Engineering. Equus, No.173, P. 10-110,
mar 1992.
- TODHUNTER, D. A.; SMITH, K. L. & HOGAN, J. S. Immunization
of dairy cattle with outer membrane proteins isolated
from *Escherichia coli*. Journal of Dairy Science, V.75
(supl. 1), P. 160, 1992.
- WATSON, D. L. Biotechnology Advances, V.5, No. 1, 1987
apud Patent Abstracts 8606639.
- WILSON, C. B. & PADDOCK, C. Biotechnology Advances, V. 7,
No. 3, 1989 apud Patent Abstracts 1816563.
- YANCEY, R. J. Recent Advances in Vaccine Technology.
Journal of Dairy Science, V.75 (supl. 1), P. 218, 1992.

Biotecnologia em Aves Domésticas

Haíssa R. Cardarelli
PET - Biotecnologia (1990 - 92)

MONOGRAFIA:

B I O T E C N O L O G I A
E M
A V E S D O M É S T I C A S

PET- BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

bolsista: Haíssa R. Cardarelli

I. INTRODUÇÃO

Na área da produção animal, a avicultura pode ser considerada como uma das ciências que mais tem evoluído neste século. Fatores relacionados com as áreas de genética, fisiologia, nutrição e imunologia, seriam os responsáveis por este notável progresso que se tem revelado surpreendente com o decorrer das décadas.

Em avicultura, poder-se-ia dizer que o que realmente ocorre é uma interação entre as áreas, cujo resultado positivo seria um desempenho melhor da ave.

Dessa forma, a genética que se iniciou no começo do século, seria o alicerce de toda a interação e o fator preponderante no progresso avícola.

A principal limitação dos processos tradicionais de melhoramento é que a avaliação e manipulação dos genótipos só pode ser feita de maneira indireta, isto é, através do fenótipo. A moderna biotecnologia visa exatamente o desenvolvimento de métodos de avaliação e manipulação direta do fenótipo.

A utilização de tecnologia molecular pode ser aplicada ao mapeamento cromossômico. Uma transferência gênica com sucesso em avicultura promete um aumento na variabilidade genética, através da utilização da tecnologia do DNA recombinante, isolando e clonando uma seqüência gênica.

Assim, a aplicação da engenharia genética no melhoramento de aves seria de valor inestimável, pois poder-se-ia transferir genes desejáveis de aves improdutivas para aves produtivas, evitando o tempo gasto nos cruzamentos e retrocruzamentos, com o objetivo de serem eliminados os genes indesejáveis.

Há grande potencial para o uso da biotecnologia, e esta monografia visa citar alguns dos trabalhos que vêm sendo desenvolvidos para o avanço ainda maior da avicultura a nível mundial com o emprego da biotecnologia.

II. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM AVES

O problema da extensão às aves domésticas dos progressos conseguidos no campo da inseminação artificial dos mamíferos depende de dois fatores basicamente: possibilidade tecnológica e conveniência econômica.

Fatores de caráter zootécnico como o manejo e de caráter sanitário podem ser imperativos para a utilização dessa tecnologia.

Provavelmente, o baixo custo dos machos, a carência de estudos mais específicos sobre a potencialidade da inseminação, a dificuldade de preservação do sêmen "in vitro" etc. constituem fatores que de certa forma limitam a praticabilidade do processo em escala comercial. O seu emprego se torna necessário em circunstâncias como:

- Falha da monta natural, para se manter um nível de fertilidade normal;
- condições em que a monta natural é impossível ou impraticável;
- grande número de pequenos experimentos: reservado especialmente a instituições científicas e organizações de alta escala comercial; e
- interesse na comercialização do sêmen.

A ave zootécnica por excelência é o *Gallus domesticus*, mas não se deve esquecer do peru (*Meleagris gallopavo*) e os gêneros *Numida meleagris*, os faisões (gên. *Phasianus*) e os gêneros *Anser*, *Anas*, *Columba*. Em relação à inseminação artificial suas condutas são diferentes.

No gênero *Meleagris*, as dificuldades do manejo e da reprodução normal superam as que apresentam a inseminação artificial, assim, a difusão do método nos perus é cada vez maior.

Existem espécies avícolas "menores" nas quais a inseminação artificial, dentro da espécie ou em hibridação interespecífica (obter formas vivas economicamente novas e produtivas) tem justificação tanto do ponto de vista tecnológico como do econômico.

No gênero *Meleagris*, tem havido a aplicação maciça da inseminação artificial mediante uma tecnologia específica, derivada tanto dos conhecimentos sobre atividade sexual dos reprodutores como da biologia do esperma, dos métodos de inseminação e do controle dos resultados. Atualmente, é imprescindível a inseminação artificial em perus, não só por motivos tecnológicos ou de manejo, mas também porque as estirpes

de perus de carne parecem não ter nem a agilidade nem o apetite sexual comparável ao das estirpes de peito mais estreito, além do declínio da fertilidade nas fêmeas conforme aumenta a idade.

INSEMINACAO ARTIFICIAL EM Gallus

A inseminação artificial pode melhorar a fecundidade, em especial às espécies que não têm boa capacidade reprodutora. Entretanto, exige-se domínio quanto a manejo do macho e da fêmea, obtenção e manipulação do sêmen, sua diluição e conservação para garantir uma eficiência acima da reprodução natural.

O emprego da inseminação artificial (IA) permite poupar a manutenção de 10% dos galos e a vantagem de estender e uniformizar o emprego de alguns escassos reprodutores masculinos (há entretanto, o perigo de se elevar a homozigose com essa prática).

Há fatores ambientais possivelmente influenciando a produção seminal (total e ritmo diário), como: estação do ano interagindo com temperatura ambiente, iluminação natural (quando não há artificial), idade do reprodutor e seu estado nutricional. Existem, indubitavelmente, influências hereditárias próprias de cada estirpe e outras relacionadas à frequência de coleta do sêmen.

Um fator de relevância é o número de espermatozoides do reprodutor, importante na determinação da diluição e a sobrevivência dos mesmos no oviduto da fêmea (onze dias na galinha) para se determinar a frequência de inseminação. Admite-se que, na galinha, são necessários 62 milhões de espermatozoides para assegurar a fertilidade de uma série de ovos durante dez dias.

A diluição do sêmen de garantir um controle rigoroso biológico e bioquímico (bem como biofísico) do sêmen para assegurar o êxito da IA.

A presença de espermatozoides geneticamente subférteis nesta espécie, e as possibilidades de contaminação do sêmen (com urina, fezes e outros líquidos na cloaca, impõem severa vigilância, incluindo métodos especialmente adaptados à peculiar anatomia das aves como a adoção de antibióticos.

Existem, ainda, fatores ligados a fisiologia da galinha durante e depois da inseminação. Uns se referem à posição do ovo no oviduto no momento da IA, relacionada com a fertilidade. Há fenômenos como a síndrome de infertilidade da galinha, análogo ao da perua que pode ser resultado de uma técnica aplicativa ou de natureza imunológica (anticorpos produzidos pelo espermatozoide) não bem conhecida.

A conservação "in vitro" do sêmen é possível por cerca de uma hora mantido a 10-25°C e, quando se utilizam soluções conservantes, o sêmen tem apresentado boas características por até 24h. a 2-5°C.

IA NO GENERO Meleagris

É uma prática convencional nessa espécie, e apresenta mais vantagens sobre a reprodução natural, aumenta a fecundidade e é mais fácil de ser aplicada, justifica poupar reprodutores

masculinos que são mais caros e custosos em comparação com os galos.

Os fatores ambientais influem da mesma forma que em galos.

Os perus parecem ter sensibilidade maior frente a modificações na dieta alimentar, principalmente no conteúdo de proteínas. Também a presença de alguns ácidos graxos essenciais parece ter importância.

Quanto ao sêmen, é mais viscoso que o de galo, facilitando a contaminação. O peru precisa de um treinamento psicológico para a coleta do sêmen, já que há luta para apanhá-lo para coleta. O sêmen se conserva por poucas horas "in vitro" a 3°C. Pela anatomia particular do peru, utilizam-se tubos de plástico para a IA.

Os demais fatores são bastante semelhantes ao gênero Gallus.

III. UTILIZAÇÃO DA GENÉTICA MOLECULAR EM AVES

A genética molecular é agora uma parte integrante da pesquisa dentro das funções biológicas envolvendo herança, citogenética, nutrição, comportamento, reprodução e saúde animal. Aplicações comerciais já incluem a produção de fármacos, produtos da fermentação e vacinas.

O entusiasmo pela engenharia genética em aves está no potencial para uso da transferência gênica para o desenvolvimento genético.

A genética molecular envolve a manipulação de genes "in vitro" com a tecnologia do DNA recombinante.

O procedimento de substituição do gene por uma sequência gênica de DNA recombinante clonado num DNA cromossômico de uma célula ou organismo pode ser feito de três formas:

- Remoção do DNA cromossômico e substituição por DNA recombinante, ou simplesmente adição no DNA do organismo ou célula sequências que o alterem criando novos genótipos;

- Mutagênese é outro método através do qual uma sequência gênica é alterada "in vitro", então há reintrodução da sequência no organismo ou na célula (criação e inserção de um novo gene);

- Técnica da fusão gênica que compreende a fusão de duas sequências gênicas ou porções de dois genes num gene simples que tenha alterado a capacidade de transcrição.

TRANSFERENCIA GENICA

Vantagens:

1. A galinha começa a produzir a partir de 11/20 semanas de idade, produzindo em média, 300 ovos no período, sendo o indivíduo ideal para a engenharia genética em virtude do tamanho da progênie.

2. Aumento da variação genética, possibilitando alterações (no desempenho).

3. Possibilidade de se superar os problemas relacionados

com a fertilidade.

4. Estudo dos genes responsáveis pela resistência a determinadas doenças; trabalhos iniciais já foram conduzidos por BUMSTEAD(1985), através de identificação genética do complexo histo-compatibilidade maior das galinhas, responsável pela resposta imunitária; este complexo foi descrito inicialmente como o "locus" B do grupo sanguíneo; entretanto, tal "locus" foi identificado como sendo de genes fortemente ligados e localizados em um dos maiores microcromossomas; estes genes afetam a resposta imunitária.

5. Inserção direta de genes em plantéis já selecionados e caracterizados como avós, linhas consanguíneas e linhas puras, evitando-se o trabalho com retrocruzamentos.

6. Os problemas relacionados com "linkage" poderiam ser resolvidos através de alterações na estrutura ou com inserções.

7. Identificação dos genes responsáveis pelos fatores e hormônios do crescimento, que exercem papel bastante importante no controle de crescimento e reprodução. JOHNSON(1989) descreveu a importância do conhecimento da fisiologia do crescimento na aplicação da engenharia genética nas aves, destacando o trabalho de SOUZA et al.(1983,1984), que conseguiram a introdução de cópias múltiplas do gene responsável pelo hormônio de crescimento(HC) nas aves, demonstrando ser possível tal transferência, assim como de outros genes, por exemplo, GRF(fator de liberação do NS) e IGF-1(fator crescimento insulina); entretanto, apesar deste resultado, os efeitos nas aves não são tão claros como os efeitos encontrados em suínos; portanto, antes de qualquer manipulação genética, torna-se necessário compreender profundamente o complicado mecanismo controlado pelos hormônios.

8. Mapa de cromossomas seria completo, através de identificação de "loci" importantes para determinadas características complexas, como crescimento e produção de ovos, além da adição de outros genes.

Desvantagens:

Custo envolvido no processo, além do risco. É importante frisar que a natureza criou um equilíbrio dinâmico, porém, frágil, na estrutura do indivíduo; alterações forçadas pelo homem poderiam alterar facilmente tal equilíbrio, com conseqüências imprevisíveis.

BIORRISCOS POSSIVEIS

A probabilidade de que um frango transformado possa por em risco, mesmo outros organismos ou o investimento é muito baixa, já que os animais são contidos e podem ser prontamente destruídos se necessário.

Linhagens altamente selecionadas modernas de frangos domésticos, perus, patos e gansos têm perdido uma parte de sua adaptabilidade genética a sobreviver em condição "selvagem". Além disso, o gene inserido pode torná-los menos adaptados para sobreviver sem a presença do homem. Talvez o grande perigo possa

ser a perda de germoplasma (eliminação das linhagens menos favoráveis mas possuidoras de características desejáveis não transferidas).

Há normas e diretrizes para a liberação de organismos engenheirados geneticamente que são seguidos rigorosamente e controlam problemas possíveis com linhagens engenheiradas em laboratório.

Quando o genoma do hospedeiro é alterado pela inserção de um gene que atua independentemente do genoma recebido, há uma expressão exógena que pode ser desejável ou não dependendo do seu produto final. Se a inserção replicada se torna fora do controle do genoma hospedeiro, o produto de expressão é considerado como endógeno. A expressão resultante pode ser mesmo favorável ou desfavorável dependendo da natureza do produto codificado pela inserção.

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ANIMAIS TRANSGÊNICOS

A tecnologia para a obtenção de genes clonados (RDNA) resume-se em recombinação de DNA "in vitro" e posterior transferência do RDNA para um hospedeiro correto. Todo processo pode ser dividido em cinco fases ou etapas (FREEMAN, 1987; JOHNSON, 1989):

1. Seleção do gene (identificação da sequência de nucleotídeos).
2. Isolamento; fragmentação e purificação, possibilitando a multiplicação (clone) do gene no vetor.
3. Escolha adequada do vetor.
4. Inserção do gene no vetor, purificação e introdução do gene clonado.
5. Seleção delicada dos genes multiplicados (clone).

1. Métodos moleculares para identificação gênica

Considerando-se que apenas fragmentos de DNA podem ser clonados e manipulados, SHOFFNER (1986) sugere dois métodos para identificação de fragmentos de interesse:

- Encontrar marcadores genéticos que definam regiões cromossômicas que influenciam a produtividade, por exemplo. Métodos moleculares podem adicionar novas dimensões a essa pesquisa. A pesquisa é utilizar a tecnologia do RFLP no DNA genômico a fim de segregar genes marcadores simples (BOTSTEIN et al., 1980). A inserção de qualquer fragmento de DNA numa linha reprodutiva poderia também ser usada para criar RFLPs artificiais. Esses marcadores moleculares poderiam, então, ser usados para caminhar para a região onde os fragmentos de DNA influenciam a produtividade e características poderiam ser localizadas. Dois problemas técnicos são aparentes com essa pesquisa. Um deles é a ocorrência de "linkage" pequena, o que poderia significar que o marcador molecular está muitas quilobases distante do gene potencial de interesse. O outro é que a região em torno do

marcador poderia ser clonada, mas não há caminho óbvio para identificar o fragmento controlador do fenômeno desejável.

- Inserir linhas reprodutivas artificiais. Um fragmento de DNA introduzido com ou próximo a um gene normal pode disrumpcioná-lo e alterar sua expressão, então agir como um "mutagen" insercional (HARBERS et al., 1984). A inserção clonada pode então ser usada como uma sonda para clonar a região contendo o gene normal que foi mutagenizado. Uma vantagem dessa técnica é que a distância entre o marcador e o gene de interesse poderia ser pequena. Entretanto, ainda não está claro como poderia identificar o gene disrumpcionado.

- Mutagênese de inserção poderia também ser uma pesquisa eventual, requerendo muitas tentativas antes de um gene que influencia a produtividade ser identificado.

Enquanto esses métodos teoricamente aparecem, sua utilidade poderá ser posta contra métodos biológicos para identificar fenótipos específicos que influenciam caracteres econômicos.

Genes potencialmente úteis em aves

Num levantamento recente feito pelo "Genbank", já há identificados cerca de 70 genes de aves. Incluem-se genes que codificam proteínas estruturais, proteínas do soro, enzimas e hormônios. A maioria foi selecionada para clonagem, porque, compreendendo-os a nível molecular, podem contribuir para resolver questões biológicas básicas. Entretanto, foram identificados três genes que claramente têm potencial para uso em trabalhos com avicultura, dois relacionados com resistência à doenças, genes codificadores para imunoglobulinas de alto e baixo peso molecular (DAHAN et al., 1983; REYNAUD et al., 1983) e o gene para o hormônio de crescimento (HC) que já foi clonado. Entretanto, estudos preliminares mostraram que um gene do HC inserido somaticamente levou a aumentar a produção do HC, mas teve pequena influência no crescimento (SOUZA et al., 1984).

Há, por último, quatro classes de genes que têm potencial para regular resistência à doenças, os quais têm sido clonados em mamíferos e serão importantes para clonagem e, eventualmente manipulação em frangos. São genes do complexo de histo-compatibilidade maior, genes receptores de células T, genes da imunoglobulina e genes para linfocinas. A importância maior é dada aos genes que codificam para hormônios, seus fatores de liberação e receptores celulares já que atuam no crescimento e reprodução.

Genes clonados de outras espécies e de microrganismos podem ser usados como sondas para identificar seqüências genômicas específicas na ave, mas técnicas de inserção permitirão também inseri-los na linha reprodutiva.

Há e haverá muitos genes valiosos que podem ser colocados em combinações únicas com uma variedade de elementos regulatórios, e o investigador terá que fazer novas escolhas na seleção das melhores combinações de construções para manipulação. Tais estudos

podem responder questões concernentes à regulação gênica e eventualmente aumentar o valor econômico da avicultura.

Segundo HOOD et al.(1984), genes importantes para resistência à doenças, crescimento e reprodução são pertencentes a famílias multigênicas localizadas em regiões específicas dos cromossomos. Estas regiões são tão largas que não podem ser manipuladas como uma unidade simples, e assim, elas não devem ser consideradas candidatas para inserção de genes. Entretanto, dados recentes mostraram que subunidades de gene simples como tais complexos podem ser inseridos na linha reprodutiva de ratos e ser expressadas adequadamente.

2. Clonagem gênica

Há dois caminhos principais para clonagem gênica, mas estratégias específicas variam amplamente(MANAITIS,1982). Os clones representam apenas seqüências de código que são chamadas DNA complementar(cDNA).

O RNA é isolado de um tecido ou tipo celular que mostra um alto nível de expressão fenotípica do gene de interesse. Este RNA é transcrito para DNA pela enzima transcriptase reversa "in vitro". Os fragmentos desse cDNA, homólogos ao RNA originalmente isolado, são inseridos num vetor plasmidial contendo, por exemplo, dois genes para resistência a antibiótico numa posição que inativa a resistência específica a um antibiótico, o que não ocorre na bactéria hospedeira. Este vetor recombinante de DNA é inserido numa bactéria, e se dá a replicação. Um grande número de colônias resistentes a droga são obtidas, cada uma contendo o gene de interesse que pode ser identificado por absorbância de parte da colônia em um filtro de "nylon" ou nitrocelulose colocado na placa que contém as colônias bacterianas e então faz-se a hibridização em uma sonda, resultando o gene de interesse. A sonda pode representar um gene similar clonado de outras espécies ou um fragmento clonado do gene de interesse.

Como alternativa, os fragmentos genômicos podem ser inseridos num plasmídio de um vetor de expressão, então o produto proteico do gene de interesse será produzido por colônias de bactérias individualizadas. Anticorpos para a proteína podem ser usados para identificar as colônias de interesse após transferir para um filtro. As colônias selecionadas são então postas para crescer e as inserções de DNA no vetor são caracterizadas e mapeadas até séries de clones justapostos serem identificados representando a seqüência do código completa do gene de interesse.

4. Inserção

É importante a escolha de uma metodologia simples, capaz de fazer a inserção ou transferência com sucesso, mas há dificuldade em virtude da própria estrutura e formação do ovo nas aves. Diversas técnicas têm sido empregadas mas com relativo sucesso devido às dificuldades encontradas na sua aplicação. As técnicas de transferência empregadas até agora se resumem em:

a) Microinjeção

Consiste em colher os ovos na hora certa, manipulá-los "in vitro", ter as fêmeas preparadas e colocá-los no útero; esta técnica foi utilizada por PALMITER et al. (1982) em camundongos, sendo comum em mamíferos devido à facilidade de trabalho com os ovos. Porém nas aves, é impossível, devido ao tamanho dos oócitos e à multiplicação celular rápida do embrião ainda no oviduto; por outro lado, existe o problema da casca. Assim, a grande dificuldade está em manipular o ovo próximo ao momento de fertilização, no qual os genes são inseridos no embrião sob duas formas: como DNA, usando plasmídios como vetores, ou como RNA, usando retrovírus como vetores. Nenhum resultado satisfatório foi obtido com esta técnica para aves.

b) Irradiação de espermatozoides

É um processo bastante interessante pois o espermatozoide se encarrega de atingir o objetivo; o processo é limitado pois o espermatozoide transporta, além de sua constituição genética, os genes inseridos. Portanto, os resultados podem ser totalmente adversos. BUNSTEAD et al. (1987), trabalhando com aves susceptíveis à doença de Marek mas resistentes à leucose linfóide, produziram aves transgênicas susceptíveis a ambas as doenças. Embora seja um processo de simples aplicação, não existe um controle seguro sobre o DNA a ser inserido, sendo portanto, uma grande desvantagem.

c) Vírus e retrovírus

É uma técnica empregada inicialmente em camundongos; utilizando o vírus da leucemia de Moloney foi possível integrar o DNA nos cromossomos do zigoto do indivíduo. Analogamente, SHUMAN e SHOFFNER (1986) utilizaram esta técnica nas aves através do emprego de vírus da leucose aviária, correspondente ao vírus da leucemia, que é um retrovírus; esses vírus constituem os vetores ideais para a inserção ou transferência de genes nos cromossomos devido à facilidade de penetração nas células do hospedeiro; o ciclo evolutivo do retrovírus contém RNA reverso, que é transcrito em cópia de DNA, que, por sua vez, se integra no cromossoma da célula infectada do hospedeiro, onde é novamente re-transcrito em RNA, através do mecanismo celular normal de transcrição (FREEMAN e BUNSTEAD, 1987; HARTMANN, 1989). Apesar de ser uma técnica simples e eficiente, os retrovírus produzem vírions infecciosos e são frequentemente oncogênicos, podendo causar tumores no hospedeiro, entretanto essa possibilidade é bastante baixa (10^{-7}) segundo BUNSTEAD e FREEMAN (1987); embriões são resistentes a infecções virus e há um limite para o tamanho dos genes inseridos (8 quilobases) (FREEMAN e BUNSTEAD, 1987).

É bastante provável que a adoção de retrovírus como vetores abra novos caminhos para outros tipos de transferência nas aves. Atualmente, as pesquisas estão mais relacionadas com doenças oncogênicas (leucose linfóide e Marek) em virtude da facilidade de manipulação de retrovírus, obtendo-se resultados bastante animadores (BUNSTEAD, 1985; BULFIELD, 1985; CRITENDEN et al., 1989). Assim, a construção de vetores apropriados garantirá

futuramente o sucesso da inserção de genes de interesse no hospedeiro.

EXEMPLOS DA POSSIBILIDADE DE UTILIZACAO DE TRANSFERENCIA GENICA EM AVES

Resistência à doenças e imunização

Uma importante área da engenharia genética que pode beneficiar a indústria avícola envolve a reestruturação de microrganismos para criar novos genomas com capacidade de imunização melhorada. Várias estratégias têm sido usadas, ou propostas, para modificar genomas virais para produção de vacinas ou como vetores para genes que especifiquem antígenos para prevenção de doenças infecciosas. Com um vírus-vacina, transportando uma seqüência gênica estranha com propriedades imunizantes específicas, poderia conceber uma vacina mais eficiente para aquelas doenças avícolas onde outros organismos letais são empregados em benefício da ave.

A resistência à doenças pode empregar os próprios genes dos patógenos. O código genético de patógenos é extremamente simples quando comparado com o das aves domésticas: o código genético do vírus da leucose linfóide compreende três genes em um cromossomo e sete Kb de peso, enquanto o vírus da bronquite infecciosa compreende quatro genes (em um único pedaço de RNA) e 27 Kb de peso. É possível se pensar em estratégias para controle de doenças usando esses códigos simples. De fato, duas estratégias têm sido propostas, uma usando os genes sem modificação e outra usando configuração "anti-sense".

Genes não modificados- Enquanto há muitas propostas para usar imunogenes transferidos para vírus não-patogênicos variados ou bactérias no controle da doença, apenas uma idéia emergiu utilizando frangos transgênicos (relacionada ao controle da leucose linfóide). O vírus infecta as células do hospedeiro através de um receptor específico do subgrupo. Para um subgrupo viral particular, raças suscetíveis de frango expressam os receptores na superfície celular enquanto raças resistentes não o fazem. Deleção dos genes codificando esses receptores não é uma opção prática, mas o bloqueio do receptor poderia produzir um nível apropriado de resistência. Poder-se-ia conduzir por inserção o gene envolvido do vírus no genoma do frango. Quando expressado, seria razoável esperar que a proteína se ligaria ao receptor e deprimiria o vírus invasor desse sítio receptor.

Genes "anti-sense"- A interferência na expressão gênica tem se tornado possível pelo uso de genes complementares ou "anti-sense". A inibição "anti-sense" é dependente da produção de seqüências de ácido nucleico complementar ao RNA mensageiro do gene referido. Essa seqüência complementar é obtida simplesmente por reversão do gene no cromossomo. O código é lido em apenas uma direção, e ao contrário, nenhuma "correção" para o gene revertido é feita. A hibridização do RNA mensageiro "anti-sense" para o RNA mensageiro normal produzido pelo patógeno viral mesmo no citoplasma ou no núcleo inibe sua translação (IZANT e WEINTRAUB,

1985). O processo inibitório é altamente específico mas é influenciado por concentrações parentais do RNA mensageiro normal e sua forma "anti-sense". O valor prático desse método já foi indicado usando antígenos virais (IZANT e WEINTRAUB, 1984) e, a infecção do sarcoma de Rous "in vitro" (STEPHENSON e ZAMECNIK, 1978; ZAMECNIK e STEPHENSON, 1978).

Genomas clonados de vários patógenos aviários importantes bronquite infecciosa, doença de Newcastle, a reticuloendoteliose, doença bursal infecciosa e o vírus associado a Rous já são acessíveis.

Esse processo, futuramente poderá ser utilizado para suprimir a expressão de várias características indesejáveis em aves como a deposição de gordura na produção de frangos, o colesterol nos ovos e broodness em patos.

Alguns exemplos- Foi obtida pela empresa Akzo uma vacina para proteção de aves contra a infecção por *Haemophilus paragallinarum* (Hp) através da produção da membrana proteica externa recombinante de 38 kDa do patógeno. O antissoro e anticorpos podem ser usados para imunização passiva de aves e para diagnose imunológica de aves infectadas com o Hp.

Outro exemplo foi a produção de uma vacina recombinante contra a laringotraqueíte infecciosa por fusão da glicoproteína responsável pela doença com uma proteína heteróloga. Pode ser utilizada na forma de aerosol.

A obtenção de "sondas de DNA" para a detecção de doenças no trabalho executado por pesquisadores da Michigan State University, no qual a partir das sequências de DNA que codificam glicoproteínas do vírus da doença de Marek pode-se conseguir a sonda que detecta o vírus.

Uma outra aplicação pode ser a reconstrução de microrganismos com capacidades biodegradáveis aumentadas, tais como aqueles compostos halogênicos e oleosos degradados, podendo ser útil em lagoas de resíduos avícolas e sistemas de produção de gás metano.

Obtenção do hormônio de crescimento aviário

O hormônio do crescimento aviário (GH) tem sido purificado de glândulas pituitárias de várias espécies de aves domésticas e parcialmente caracterizado (FARMER et al., 1974; HARVEY e SCANES, 1977). O pequeno tamanho e a dificuldade em acessar pituitárias aviárias necessitou um enorme empreendimento para purificar poucos mililitros do GH aviário. Esses níveis não têm sido suficientes para caracterizar totalmente as propriedades bioquímicas e fisiológicas do hormônio.

A produção do GH por *E. coli* pode levar-nos a determinar quais propriedades fisiológicas são atribuídas ao hormônio do crescimento; já que em estudos com o hormônio do crescimento humano foi descoberto que o mesmo é responsável, além do crescimento, por propriedades fisiológicas lipolítica e diabetogênica e com a produção do hormônio por engenharia genética

utilizando *E. coli*, fragmentos da pituitária que permaneciam no processo anterior puderam ser eliminados.

No trabalho realizado por SOUZA et al.(1984), foi feita a clonagem do gene para o GH de ave doméstica, o GH complementar foi caracterizado por análise da sequência do DNA e então engenheirado para expressão em *E. coli*. Um clone com DNA complementar ao GH de ave foi usado para gerar um vetor capaz de produzir GH em *E. coli*. O GH de ave derivado da *E. coli* foi similar ao GH da pituitária em propriedades imunológicas e bioquímicas. O hormônio recombinante derivado foi usado para estabelecer um teste radioimune sensível para determinações de GH feitas a partir do soro da ave. O gene do GH foi também introduzido em um vetor retroviral capaz de estabelecer infecções produtivas em células de ave tanto "in vitro" quanto "in vivo". As infecções resultantes foram acompanhadas por produção de GH detectável pelo teste ELISA. As concentrações do GH no soro de aves Leghorn infectadas com o retrovírus recombinante foram três a dez vezes mais altas do que nos animais-controle.

Em outro trabalho publicado anteriormente do mesmo autor(1983), comparou-se o GH aviário recombinante obtido com o GH de mamíferos, mostrando níveis de homologia de 80%.

Na patente de Am. Cyanamid, conseguiu-se isolar a partir da proteína responsável pelo receptor da somatotropina aviária a sequência de DNA que codifica essa proteína, foi expressada num vetor que então inseriu a sequência nas células hospedeiras, obtendo-se ave transgênica(especialmente frango).

A Merck patenteou um método no qual um vetor contendo o gene do receptor β -adrenergênico mutado e o promotor da actina do músculo insere a alteração no animal e permite que o mesmo reaja à administração de epinefrina, norepinefrina, isoproterenol, assim, aves têm sua composição de carcaça e eficiência alimentar aumentados.

MAPEAMENTO GENICO

Posicao cromossomica

A determinação de cromossomos por métodos convencionais de rearranjo de células somáticas ou rearranjo do cromossomo marcador não tem tido sucesso devido à alta frequência de recombinação.

A tecnologia molecular utilizando sondas com marcadores radioativos, sondas de avidina-biotina e métodos similares agora podem tornar possível identificar uma cópia simples de DNA em cromossomos tratados "in situ" ou para usar RFLP em estudos de mapeamento gênico.

O mapa gênico para frangos e outras aves domésticas é esperado ter expansão rápida com localizações cromossômicas precisas. Inicialmente com características reconhecíveis em géis eletroforéticos e técnicas similares e, a tempo, estas características serão ligadas a grupos de "linkage" morfológicos e possivelmente à maioria dos genes ou blocos de genes que influenciam características quantitativas(SHOFFNER, 1986).

SELECAO DE MARCADORES ASSISTIDOS

Genes simples podem possuir poucos Kb, mas utilizando sequências de RFLP poder-se-ia multiplicar a região reconhecível várias vezes, e então aumentar o número de sondas hibridizadas bem como sítios de reconhecimento receptivo no cromossomo. SOLLER e BECKMAN (1986) propuseram utilizar a tecnologia do RFLP para identificar genes ou regiões no cromossomo a fim de selecionar marcadores assistidos de características quantitativas.

IV. CONCLUSÕES

Em relação aos mamíferos a pesquisa biotecnológica em aves não está sendo tão desenvolvida, entretanto muitos avanços trazendo benefícios para a produtividade e eficiência reprodutiva certamente surgirão num futuro próximo e a biotecnologia será uma ferramenta importante.

V. LITERATURA CITADA

- ARAUJO, P. G. et al. Inseminação artificial em aves In: Cerrado, ano V n.º 21, p. 16-17, Brasília, set. 1973.
- BUMSTEAD, N. e FREEMAN, B.M. Aves transgênicas: teoria e prática In: World's Poultry Science Journal 43(3):180-189, out.1987.
- CAMPOS, E.J. O emprego da biotecnologia no melhoramento genético das aves In: Avicultura, p.77-87.
- CRITTENDEN, L.B. Identificação e clonagem de genes para inserção Simpósio: Pesquisas moleculares para a produção de aves In: Poultry Science 65(8): 1468-1473, ago 1986.
- CUENCA, C.L. de Tecnologia e economia da inseminação artificial das aves domésticas In: Zootechnia 23(1-2):26-34, jan.-fev.1974.
- DERWENT BIOTECHNOLOGY ABSTRACTS , vol.11 1992:
- "DNA sequence encoding avian growth hormone receptor-brid somatotropin receptor preparation by gene cloning and expression in a transgenic fowl for improves growth following administration of somatotropin", Am.Cyanamid.
- "Vaccine for protection of poultry against Haemophylus paragallinarum infection-recombinant 38 kDa outer membrane protein production for use in fowl recombinant vaccine", Akzo.
- "DNA sequence encoding Marek-disease virus glycoprotein gpD, gpI and gpE-useful for production of DNA probe for virus detection, attenuation for use as vaccine and expression vector construction", Michigan State University.
- SHOFFNER, R.N. Perspectivas para a pesquisa em genética molecular e aplicação na avicultura Simpósio: Pesquisas moleculares para a produção de aves In: Poultry Science 65(8):1489-1496, ago 1986.
- SHOFFNER, R.N. e SHUMAN, R.M. Transferência de genes por retrovírus aviário Simpósio: Pesquisas moleculares para a produção de aves In: Poultry Science 65(8):1429-1632, ago 1986.
- SOUZA, L.M. et al. Clonagem e expressão do hormônio do crescimento de aves em E. coli In: Poultry Science 62(7):1505-1506, jul. 1983.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
CAMPUS DE PIRACICABA

Utilização de Marcadores Moleculares para
Análise Genética e Mapeamento da Nodulação e Bacteriose em
Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Jefferson Willians de Gaspari

PET - Biotecnologia

Nome do Projeto: UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA
ANÁLISE GENÉTICA E MapeAMENTO DA NODULAÇÃO E BACTERIOSE EM
FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Orientadora: Dra. Siu Mui Tsai

Bolsista: Jefferson Williams de Gaspari

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA (CENA)

USP

INTRODUÇÃO

O feijoeiro no Brasil tem sido considerado como planta de nodulação pobre e conseqüentemente apresentar níveis baixos de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). A baixa resposta encontrada principalmente em solos tropicais pode ser atribuída a fatores ambientais que limitam a fixação, agravada pela variabilidade genética das estirpes e cultivares utilizados.

O potencial genético para fixação de N_2 presente em algumas fontes de germoplasma de feijoeiro, geralmente inadaptado a áreas específicas, pode ser incorporado a material mais adaptado, usando métodos apropriados de melhoramento e seleção (BLISS, 1984; GRAHAM et al. 1984). Nos programas de obtenção de linhagens com potencial para altos níveis de fixação de N_2 , tem-se observado que cultivares locais se sobressaem dos demais, além de combinar atividade fixadora mais elevada com características agronômicas aceitáveis, que permitem aceitação pelos agricultores. Dessa forma, para um melhoramento efetivo da FBN em feijoeiro comum visando aliviar uma restrição de produção, incapacidade da planta de feijão fixar quantidade suficiente de N_2 para alta produção de grãos, recomenda-se que: 1) Seja feita a integração da seleção tanto da planta quanto do *Rhizobium* em um único programa; 2) Integrar atividades para melhoramento da fixação de N_2 como parte de um programa geral de melhoramento e; 3) Aumentar a eficiência simbiótica usando métodos apropriados de melhoramento, seleção e identificação de progênies superiores.

Com o desenvolvimento de um mapa de ligação do genoma do feijão comum (NODARI et al. 1993) foi possível localizar quatro loci putativos para a característica quantitativa (QTL - Quantitative Trait Loci) de número de nódulos formados pelo *Rhizobium*. Foi demonstrada também a correlação entre nodulação e a susceptibilidade ao *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, idéia que já se tinha anteriormente devido à

semelhança entre susceptibilidade da planta à infecção pelo *Rhizobium* e a patógenos bacterianos.

Foram identificadas quatro regiões onde atuariam os QTLs quanto à susceptibilidade à bacteriose, uma das quais mapeada na mesma região do cromossoma para número de nódulos, que por sua vez também atuaria na expressão da faseolina (principal proteína de reserva da semente do feijoeiro) e de outro QTL, o tamanho da semente. Por esses resultados, haveria necessidade de se determinar a correlação entre baixa nodulação e resistência à bacteriose provocada por *X. campestris* pv. *phaseoli* usando outras populações com históricos de seleção genética.

A faseolina indicou a existência de dois grupos geneticamente distintos em *P. vulgaris*, com divisões em raças (GEPTS et al. 1985). Há indicações da existência de eventos múltiplos de domesticação do feijão na América: na Mesoamérica e nos Andes.

Os dois centros primários de diversidade genética são distintos pelos tamanhos das sementes e hábitos de crescimento, adaptação ao ambiente, resistência a doenças, variantes em isoenzimas tipos de faseolina e afinidade com *Rhizobium* do tipo I (*R. etli*) e do tipo II (*R. tropici*).

Os progressos recentes no melhoramento da fixação biológica de N₂ em feijoeiro têm sido de certa forma animadores pela possibilidade do uso de marcadores genéticos em *Rhizobium* e clonagem de genes codificadores de nodulinas, produtos que atuam no nódulo em diferentes fases de seu funcionamento. A genética quantitativa tem sido aplicada com sucesso no aumento da capacidade de fixação de genótipos seleccionados, apesar de não se conhecer ainda os genes específicos envolvidos no processo. Com a construção do mapa de ligação (NODARI, et al. 1993), identificação de regiões onde atuariam esses genes e conhecimento da contribuição de cada parental usado, haverá possibilidade de identificar os fatores individuais de cada região positivamente correlacionados com o potencial de fixação de N₂. Especialmente com o mapeamento do fator nodulação, essa tarefa terá mais importância pela possibilidade de

busca do hospedeiro superior em bancos de germoplasma anteriormente sem correlação com essa característica. O número de nódulos é de interesse porque está positivamente correlacionada com potencial de fixação de N_2 e porque existem similaridades entre a infecção pelo *Rhizobium* para formação do nódulo e a infecção pelo patógeno bacteriano

Mapa de Ligação em Feijoeiro

Um mapa de RFLP foi construído (NODARI, 1993) a partir da população F2 derivada do cruzamento entre BAT-93 (mesoamericano) e Jalo HBP558 (andino). Os genótipos parentais foram escolhidos por exibirem diferenças na origem evolucionária, alozimas e tipo de faseolina, e diversas características agronômicas. Foram localizadas três características quantitativas: nodulação pelo *Rhizobium*, resistência para a bacteriose causada por *X. campestris* pv. *phaseoli* e peso da semente. Sequências com funções conhecidas compreenderam três grupos: proteínas de semente, genes de resposta a patógenos e genes de resposta a *Rhizobium* (nodulinas).

Bacteriose em Feijoeiro

A bacteriose, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, tem sido uma doença que afeta a cultura tanto em áreas de climas tropicais como temperadas. A bactéria ataca a parte aérea das plantas e causa perdas na produção de até 65%. As sementes de feijão infectadas e restos de cultura são as fontes primárias de inóculo e controle químico não tem sido satisfatório para seu controle. A imunidade à infecção não foi encontrada dentro do germoplasma de feijão comum, mostrando algumas entradas moderada resistência ao patógeno. Porém existe alta resistência genotípica em outras espécies de feijão, especialmente *P. acutifolius*. Através de

cruzamento interespecífico, genes de resistência de *P. acutifolius* e *P. coccineus* têm sido transferidos para o genótipo do feijão comum.

Experimento em Realização

Um experimento foi montado para avaliar a correlação entre peso e cor da semente, número de nódulos (bem como a atividade de redução de acetileno, técnica que avalia a fixação de N₂ pelo nódulo) e afinidade com os dois tipos de *Rhizobium*. Para isto utilizou-se linhagens F9 de um cruzamento entre Midas e G12873. Midas é uma variedade andina cultivada, apresentando sementes grandes e brancas e com alta afinidade com o *Rhizobium* do tipo II. A linhagem G12873 é selvagem mesoamericana, apresentando sementes pequenas e malhadas e com afinidade com o *Rhizobium* do tipo I. Essas duas variedades são as mais distantes evolutivamente dentro da espécie *P. vulgaris*.

As estirpes de *Rhizobium* utilizadas foram a BR10028 (tipo I) e a CNF042 (tipo II). A estirpe CNF042 foi transformada por conjugação (transconjugada) com um gene marcador, o GUS (β - glucuronidase), que tem a propriedade de oxidar uma solução incolor, X-Gluc (5-bromo-4 cloro-3 indolil β -D-glucuronide), tornando o nódulo azul, permitindo a identificação da estirpe. As duas estirpes foram inoculadas concomitantemente (inóculo misto), em concentrações iguais.

O experimento foi conduzido em condições assépticas (vasos Leonard) em casa de vegetação e está atualmente em fase de coleta de dados.

A natureza da variação do controle genético e das relações de ligação entre genes para peso da semente e genes para outras características foram os primeiros QTLs analisados. Diferenças no peso das sementes na progênie F2 eram controladas por diversos fatores com efeitos cumulativos, mas não necessariamente iguais (SAX, 1923). SAX, 1923 detectou uma associação significativa entre tamanho e cor da semente em

cruzamentos envolvendo linhagens de feijão cultivado: sementes pigmentadas eram significativamente maiores que as não pigmentadas (brancas). A presença da cor branca em sementes grandes nas gerações segregantes F3 e F4 sugeriram que as ligações entre tamanho e cor da semente não eram muito estreitas, ou que outros fatores estariam envolvidos na expressão do tamanho da semente. Mais tarde a herança quantitativa foi confirmada por MORTO et al, 1978 num cruzamento entre feijão comum e selvagem.

O grupo de Nodari, estudando as características quantitativas peso da semente, nodulação e bacteriose, conseguiu localizar os loci no mapa do BAT-93 X Jalo EEP558 em diferentes regiões do genoma e distinguir a contribuição dos parentais em cada alelo dos parentais.

Projeções futuras

Serão realizados experimentos para determinação da interação bacteriose X nodulação nos dois grupos distintos de feijão (andino e mesoamericano). Cruzaremos os cultivares mesoamericanos resistentes à bacteriose (IAPAR-14 Aporé e Diamante Negro) com Jalo EEP558 e Midas (andinos), CNF-480, Bico de Ouro e Puebla-152 (mesoamericanos), todos selecionados pela capacidade noduladora e susceptibilidade à bacteriose. Bico de Ouro foi a variedade indicada pelo IAPAR como susceptível à bacteriose; essa variedade foi considerada muito superior quanto a capacidade noduladora. Análise de segregação somente para os loci do grupo de ligação do cromossoma D7 (ver figura em anexo), onde se localizam os QTLs da nodulação, bacteriose e peso da semente, será feita para os 8 cruzamentos nas progênie F2, usando o método RFLP a frio com as sondas GUC1390 e GUC1861 (obtidas por NODARI et al, 1992); o tipo de fascolina será determinado por eletroforese em sementes de F2.

Na determinação da ligação entre nodulação e peso da semente na região da fascolina (grupo de ligação D7, NODARI et al, 1992), 6 populações provenientes de

cruzamento entre os grupos andino X mesoamericano serão testadas para confirmar a ligação entre a fascolina e as duas características (nodulação e bacteriose). Os materiais foram inicialmente cruzados em UC-Davis por S. M. Tsai, e incluem os parentais andinos (doadores) California Red Kidney, ABA-71, Goiano Precoce, Midas, Cargamento e Jalo IIP558, e os parentais mesoamericanos (usados como receptores) BAT-93, Rio Tibagi e Carioca. Serão usadas as sondas genômicas GUC1390 e GUC1861 para hibridização com DNA genômico das progênie F2 de cada cruzamento.

A associação do *Rhizobium* com hospedeiro será estudado com mais detalhe no que determinará a especificidade hospedeira das estirpes UMR-1899 (tipo II) e CIAT-632 (tipo I) com os parentais dos dois grupos de feijoeiro. O experimento será feito em condições assépticas de vasos Leonard, usando inóculo misto. Como UMR-1899 apresenta marcas duplas para resistência a dois antibióticos, será fácil a tipificação dos nódulos e determinação da frequência dos nódulos ocupados respectivamente pelas duas estirpes.

Este projeto tem relevância em dois níveis, básico e aplicado. Os testes de nodulação em materiais superiores de feijoeiro, com histórico (pedigree) para a simbiose e bacteriose, poderão acelerar os programas de melhoramento tanto para fixação de N_2 como para resistência à bacteriose. Ambas as áreas são de interesse considerável pois esses fatores podem contribuir para uma alta produtividade do feijoeiro.

ANEXO

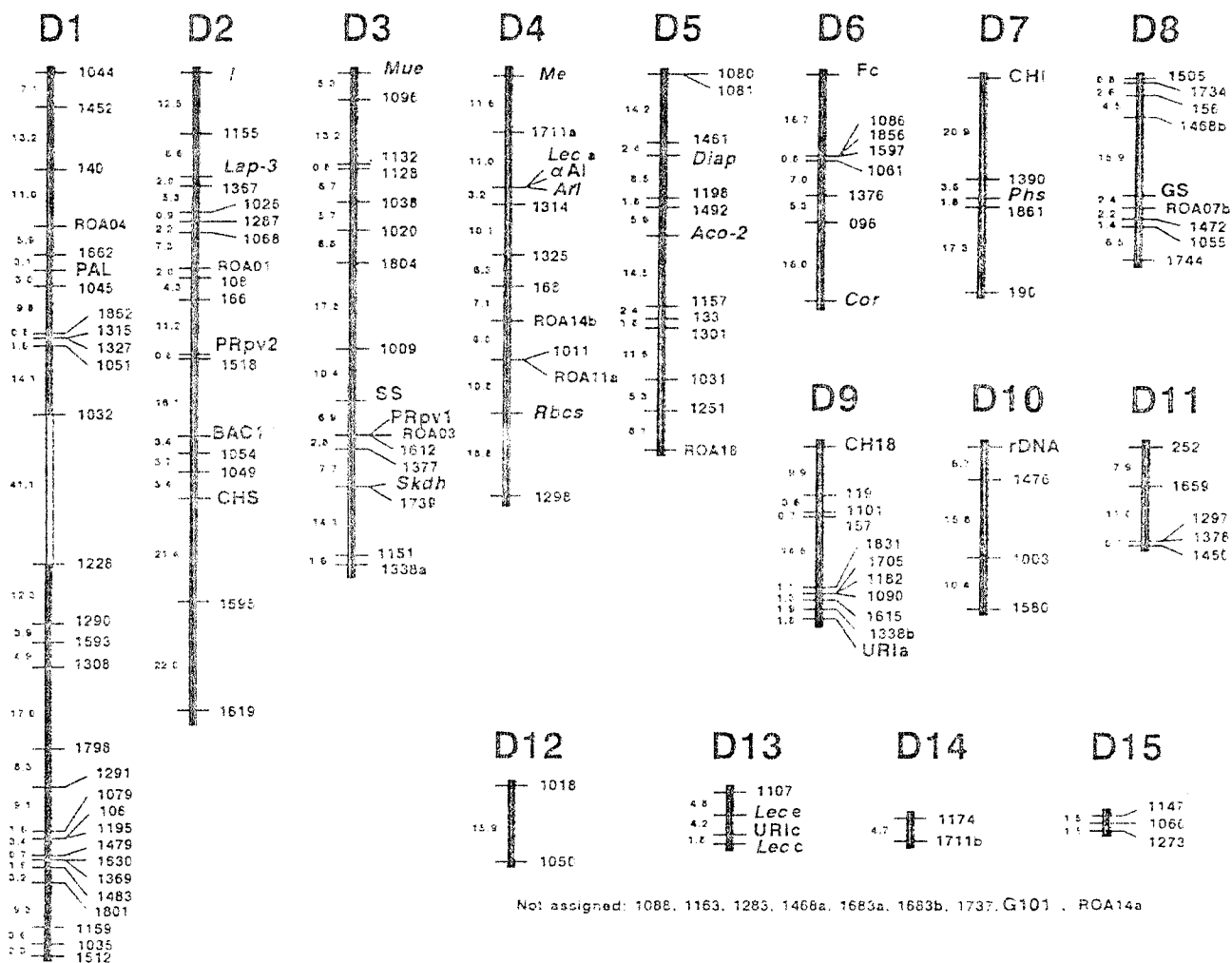


Fig. 1. RFLP-based linkage map of common bean. Linkage group numbers are indicated on top. Kosambi map distance are indicated at the left side of each interval between two markers. Genomic markers are numbered from 001 to 999 (from *EcoRI-BamHI* library) and from 1001 to 1862 (from *PstI* library) (the GUC prefix was removed for the sake of simplicity). *Aco-2*, *Diap*, *Lap-3*, *Me*, *Mue*, *RbcS*, and *Skdh* are isozyme loci. RAPD marker loci are designated by *ROA* followed by a number (see text for explanations). Morpho-agronomic traits are *C*, *Cor*, and *I* (see text for explanations). The following markers represent sequences coding for products of known function: *Ar1*, $\alpha A1$, *BAC10*, *CHI*, *CHS*, *CH18*, *GS*, *Lec*, *PAL*, *Phs*, *PRPv1*, *PRPv2*, *rDNA*, *SS*, and *UR1* (see text for explanations). The open bar in linkage group D1 represents an interval with a LOD score above 3.0 but with a recombination frequency above 30%.

BIBLIOGRAFIA

- BLISS, F.A. Breeding for enhanced dinitrogen fixation potential in common bean *In* Proc. 14th Steenbock Symposium. P.Ludden e J. Burris, Eds. Elsevier, 1984 NY, p.303 - 10.
- GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K.; BLISS, F.A. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Economic Botany*, NY 40 (4) p.451-68 1986.
- GEPTS, P.; BLISS, F.A. F1 hybrid weakness in the common bean; differential geographic origin suggests two gene pools in cultivated common bean germplasm. *Journal of Heredity* 76:447-50 1985.
- GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K.; BLISS, F.A. Electrophoretic analysis of phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean, *Phaseolus vulgaris*: Evidence for multiple center of domestication. *Economic Botany* 40:451-68 1986.
- GRAHAM, P.H. & TEMPLE, S.R. Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merr. and *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* 1984 82: 315 - 27.
- HARDARSON, G.; GORBO, J.; HERNDL-SILMBROD, A.; DANSO, S.K.A.; WILSON, K. The use of the β -glucuronidase (GUS) marker gene to study competitive ability of *Rhizobium* strains. *In* 13th North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference, 1991 Banff-Canada p.5.

TSAL, S.M., NODARI, R.O., PEREIRA, P.A.A., KOINANGI, E., GIBBS, P. RFLP analysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars selected for nitrogen fixation. In 13th North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference. Banff-Canada p79 1991.

UPCHURCH, R.G. Estimation of bacterial nitrogen fixation using acetylene reduction. In BERKMAN, G.H. (ed.) Symbiotic nitrogen fixation technology. Marcel Dekker, Inc NY 345-366 1987.

VALLEJOS C.H., CHASE, C.D. Linkage between isozyme markers and a locus affecting seed size in *Phaseolus vulgaris* L. Theoretical and Applied Genetics 81:413-419 1991.

DESCRIÇÃO DE ATIVIDADE DE ESTÁGIO

Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida

PET - Biotecnologia

Introdução ao uso de leveduras para clonagem e expressão de genes

Quando do início dos trabalhos com a Tecnologia do DNA recombinante o primeiro organismo que teve destaque foi a bactéria *Escherichia coli*. Também dela foram os primeiros vetores de clonagem juntamente com o bacteriófago λ . Desde aquela época a *E. coli* permanece numa posição central nos trabalhos de engenharia genética.

Esta bactéria oferece uma alta expressão das proteínas heterólogas mas as dificuldades começam a surgir no momento da secreção. Esse organismo acumula os produtos dentro da célula, dificultando a recuperação e purificação dos mesmos. Esse foi o principal motivo que levou ao início dos trabalhos de expressão de proteínas heterólogas em leveduras.

A adequação da tecnologia foi mais tardia em leveduras devido a falta de metodologias, vetores e marcas seletivas específicas para esses organismos, mas teve um forte impulso com o estabelecimento dos primeiros protocolos para transformação em *Saccharomyces cerevisiae*, usando vetores recombinantes. A partir daí, surgiram uma série enorme de produtos de genes clonados em leveduras.

A grande aptidão das leveduras para hospedeiros desses genes e a sua expressão vem de uma série de atributos. O de maior importância é certamente o fato delas serem organismos eucariotos e terem a mesma estrutura celular e bioquímica dos outros eucariotos. Isso permite que a célula faça os processos pós-traducionais dos produtos proteicos da mesma maneira que se estivessem no organismo de origem, geralmente um eucarioto. As

leveduras possuem mecanismos de secreção de proteínas ao meio extra-celular facilitando muito a recuperação do produto em relação a aquele obtido por uma *E. coli*, por exemplo. As leveduras são ainda inócuas a saúde humana. São capazes de crescer a altas densidades de células e sob condições muito bem monitoradas de fermentação.

Com o passar dos anos e com o avanço da tecnologia novas espécies de leveduras começaram a ser usadas para esse fim, e tem em alguns aspectos performance superior à própria *S. cerevisiae*.

Os maiores progressos para os produtos de expressão em leveduras tem vindo da industria farmaceutica onde a aceitação do uso de proteínas de origem recombinante tem sido mais rápida. Produtos como hormônios proteicos, proteínas do sangue, vacinas recombinantes já estão tendo uso terapêutico corrente.

A secreção de proteínas recombinantes de qualidade e em grandes quantidades depende de uma série de fatores isolados, que vão em conjunto representar a melhor opção de acordo com o tipo de proteína que se quer obter.

Para obter uma boa expressão em leveduras o gene não deve conter introns uma vez que elas não são capazes de fazer o processamento correto do mRNA. Caso o gene contenha esses introns, o resultado será um polipeptideo com uma sequência de aminoácidos diferente daquela que se deseja.

Outros fatores que influenciam a expressão desses genes estão ligados à quantidade de mRNA produzida, à tradução desse mRNA e aos processos pós-traducionais. Também é importante que a proteína heteróloga não constitua para a célula um fator de estresse.

Uma expressão eficiente também está intimamente ligada a

um promotor específico. Ao se selecionar um promotor da própria levedura deve-se levar em conta que ele está submetido aos processos de regulação gênica daquela espécie. Como o que se deseja é uma expressão contínua e uniforme ao longo de todo o ciclo celular, o melhor seria escolher promotores de genes constitutivos.

A influência dos vetores sobre o nível de expressão está principalmente no fato de que quanto maior seu número de cópias na célula, maior será a produção do mRNA. Ao mesmo tempo em que um vetor ocorre com um alto número de cópias ele pode se tornar instável, perdendo-se a cada geração na multiplicação das células. Pode-se optar por dois tipos de vetores para o uso em leveduras: os integrativos (que se inserem nos cromossomos) propiciando maior estabilidade ou pelos auto-replicativos cuja construção contém sítios de replicação autônoma.

Os vetores usados em leveduras podem ser de quatro tipos. YIp, são os vetores integrativos que carregam consigo sequências de homologia com algum cromossomo e onde por um evento de recombinação se inserem. YE_p e YR_p, auto-replicativos, que contém sequências de replicação autônoma originária no caso dos episossomais do plamideo natural 2 μ m e de cromossomos para os replicativos. Os YAC possuem na sua construção uma região auto-replicante aliada a uma sequência de 6 a 10 Kb de uma região de centrômero, que lhe confere maior estabilidade mesmo sem a integração cromossomal.

HADFIELD, K. K.; SHASHI-MENON, K.; MOUNT, R. C. The Expression of Cloned Genes in Yeasts. *Micology Research*, vol:97, N^o 8, 897-944

Objetivos e andamento do trabalho:

O trabalho que está sendo desenvolvido no Laboratório de Genética de Leveduras da ESALQ tem por objetivo clonar um conjunto de três genes de resistência a herbicidas presentes em linhagens mutantes. Como resultado dessa clonagem será possível identificar quais são os mecanismos que conferem essa resistência às linhagens. Além disso com a incorporação desses genes em plasmídeos do tipo episossomal, pode-se passar a utilizá-los como novas marcas seletivas para o screening de transformantes.

Numa fase inicial, ainda em 1992, foi feito o levantamento dentro da coleção de linhagens do laboratório quais eram essas linhagens e a seleção da linhagem a ser utilizada para a obtenção de cada gene. Foram selecionadas então as seguintes linhagens:

- * MD 3000 (*S. cerevisiae*) resistente a Metholaclor.
- * PRO 1 (*S. cerevisiae*) resistente a Propanil.
- * GLI 1 (*S. cerevisiae*) resistente a Glifosato.

Em seguida passou-se à seleção do vetor que seria usado e escolha foi dos plasmídeos YEp 351 e YEp 352, construídos com parte do plasmídeo pBR 322 (que contém o sítio para replicação em *E. coli* e as marcas Ampicilina e Tetraciclina) e do plasmídeo 2 μ m (ARS para leveduras). Entre as enzimas com único sítio de restrição na região do inserto foi selecionada para o trabalho a Bam HI, por estar disponível no laboratório naquele momento.

Esses plasmídeos foram introduzidos em *E. coli* para a sua multiplicação, depois extraídos e purificados. O DNA genômico das linhagens foi extraído e digerido com Bam HI para gerar os

fragmentos contendo aqueles genes. Da mesma forma os plasmídeos foram digeridos e passou-se à etapa seguinte de ligação entre os fragmentos e os plasmídeos.

O trabalho atualmente se encontra numa fase de adequação da metodologia para que seja possível a obtenção dos plasmídeos contendo os fragmentos em quantidade suficiente para que possa haver a transformação da linhagem receptora AH 22. O fato de a transformação em leveduras ser de baixa eficiência e fornecer um pequeno número de transformantes, exige que o DNA a ser utilizado tenha qualidade e quantidade adequadas.

Para conseguir um DNA com essas características será feita em 1994 a extração e separação de cromossomos por eletroforese de campo pulsado uma vez que um desses genes, MTC 1, já foi mapeado no cromossomo 15. Dessa maneira é possível aumentar a probabilidade de se transformar as células com o plasmídeo desejado.

Descrição de Atividade de Pesquisa

Luciana Viriato Saboya

PET - Biotecnologia

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM *Trichoderma pseudokoningii*

PET - BIOTECNOLOGIA
Bolsista: Luciana V. Saboya

Piracicaba - SP
1993

1. Introdução

A celulose é o composto orgânico mais abundante encontrado na natureza, presente na parede celular das plantas, algas e vários fungos. Nos tecidos vegetais o teor da celulose varia quanto a espécie vegetal e a idade da planta.

As aplicações potenciais da degradação de materiais celulósicos são muitas. Os produtos de hidrólise podem ser utilizados em processos fermentativos para obtenção de combustíveis líquidos, produtos químicos e produtos alimentícios.

O processo de conversão de celuloses em açúcares pode ser realizado por via ácida ou por enzimas, as celulases, produzidas por microrganismos. O processo de hidrólise ácida apresenta desvantagens por formar subprodutos indesejáveis (aldeídos e cetonas) tóxicos aos microrganismos e animais superiores, além de que os ácidos minerais utilizados para a hidrólise, provocam a corrosão dos equipamentos resultando em impurezas no substrato, baixo rendimento e custo elevado. O processo de hidrólise enzimática da celulose tem a vantagem de ter uma conversão eficiente, sem produção de compostos secundários indesejáveis. No entanto, ainda não foi desenvolvido um processo significativo utilizando celulases, devido ao elevado custo da enzima. Isso porque as linhagens utilizadas são baixas produtoras do complexo enzimático e, as enzimas apresentam baixa especificidade para o substrato.

Na tentativa de solucionar esse problema, tem-se procurado desenvolver linhagens microbianas hiperprodutoras de celulase com elevada especificidade na interação enzima-substrato. A obtenção dessas enzimas a partir de alguns fungos, constitui um fator de interesse biotecnológico.

Linhagens do gênero *Trichoderma* vêm sendo bastante estudadas em programas de melhoramento através de seleção-mutação e técnicas de fusão de protoplastos, transformação e clonagem por apresentarem complexo enzimático promissor e balanceado.

Assim, o objetivo desses trabalhos que vêm sendo desenvolvidos, é reduzir os custos da hidrólise enzimática, utilizando linhagens com produção comercial de celulases de baixo custo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Obtenção de protoplastos

Segundo PEBERDY (1979), os protoplastos não são encontrados na natureza, salvo algumas exceções, e são produzidos artificialmente. Normalmente, o isolamento envolve a digestão total ou perfuração localizada da parede celular por enzimas líticas, permitindo que o conteúdo celular envolvido pela membrana celular seja liberado, mantendo-se estável em meio hipertônico.

Os primeiros relatos sobre isolamento de protoplastos em fungos filamentosos foram feitos por EMERSON & EMERSON (1958) e BACHMANM & BONNER (1959) em *Neurospora crassa*. Esses autores relatam sucesso da aplicação do suco digestivo de *Helix pomatia* como complexo lítico. Entranto, a eficiência desse sistema lítico tem sido limitada à algumas espécies tais como: *Aspergillus nidulans* (FERENCZY *et al*, 1975), *Curvularia inaequalis* e *Trichoderma reesei* (LAURILA, *et al*, 1985).

A maioria dos grupos que trabalham com fungos filamentosos, consideram que a produção de complexos enzimáticos a partir de microrganismos é o caminho mais eficaz para obtenção de protoplastos. Um grande número de microrganismos apresenta atividade micolítica, e dentre estes os mais utilizados tem sido as espécies de *Streptomyces* (BILLICH *et al*, 1988), *Trichoderma* (KITAMOTO *et al*, 1988) e de *Penicillium* (SZAJER *et al*, 1989).

A liberação de conteúdo citoplasmático na forma de protoplastos a partir de células de fungos é mais facilmente conduzida usando uma mistura de enzimas líticas degradadoras de parede celular; isto se deve ao fato da parede celular das hifas apresentarem grande complexidade e diversidade (JACKSON & HEALE, 1987). Após vinte anos das primeiras observações feitas, conseguiu-se um avanço considerável na obtenção de protoplastos devido à descoberta de enzimas comerciais, tal como Novozym 234 e Celulase CP, que possuem atividade de quitinase e α e β -1,3-glucanase. Segundo HAMLIN *et al* (1981), esta última enzima aumenta a atividade da primeira (Novozym 234), melhorando sua eficiência, resultando em maior quantidade de protoplastos.

Com a retirada da parede celular, as células ficam osmoticamente sensíveis, sendo necessária a utilização de estabilizadores osmóticos adequados. O tipo de estabilizador e sua concentração são os fatores que influenciam sobre a obtenção e a estabilidade dos protoplastos; esses fatores variam de uma espécie para outra, portanto não

existe um estabilizador osmótico universal adequado para todos os fungos. Em geral, sais inorgânicos são mais adequados para fungos filamentosos, enquanto que açúcares e açúcares-álcoois o são para leveduras (DAVIS, 1985).

Segundo PEBERDY *et all* (1976), a idade da cultura é um fator importante na obtenção de protoplastos, sendo que foram obtidos mais protoplastos na fase exponencial de crescimento em comparação à fase estacionária. A concentração micelial na digestão lítica, assim como pH e temperatura também exercem influência na protoplastização.

2.2. Fusão de Protoplastos

Antes da descoberta da técnica de fusão de protoplastos, a recombinação gênica em microrganismos só podia ser realizada através dos processos sexuais ou paraxessuais, e ambos são consequente de fusão. Mediante a essa nova técnica foi possível a obtenção de heterocários e de híbridos entre linhagens e entre espécies que não podiam ser cruzadas por processos convencionais (PEBERDY, 1985).

Segundo FERENCZY (1981), a fusão de protoplastos foi observada pela primeira vez por MELLON em 1925, em protoplastos bacterianos; porém o fenômeno foi questionado por algum tempo até que SMITH em 1954 e trabalhos posteriores confirmaram esse fato. A descoberta da fusão espontânea de protoplastos em bactérias foi seguida pela mesma descoberta em leveduras, *Saccharomyces* e *Candida* (MULLER, 1970).

A ocorrência de fusão espontânea tinha frequências muito baixas e foi somente após descobertas de KAO & MICHAYLUKE (1974) em protoplastos de plantas que o polietileno glicol (PEG) atuando como agente fusogênico de protoplastos, foi possível o desenvolvimento de técnicas de fusão controladas capazes de aumentar a frequência da mesma.

O interesse de fusão de protoplastos em fungos surgiu de trabalhos similares com células animais e protoplastos de plantas. As primeiras tentativas de fusão controlada tiveram um sucesso limitado (BINDING, 1974; FERENCZY *et all*, 1974). Entretanto, em 1975, um eficiente método de fusão foi descrito por ANNE & PEBERDY, decorrente da aplicação do polietileno glicol como agente fusogênico.

O plano geral desses primeiros experimentos e na maioria deles, desde então, baseou-se no processo clássico de formação de heterocários balanceados (PONTECORVO *et all*, 1953). Os protoplastos usados em experimentos de fusão são obtidos a partir de

linhagens que se complementam nutricionalmente e os produtos de fusão são selecionados em meio mínimo de regeneração (PEBERDY, 1985).

Os parâmetros envolvendo solução fusogênica (PEG), pH e concentração de íons cálcio em protoplastos de *P. chrysogenum* foram estudados por ANNE & PEBERDY (1975) e estabeleceram uma concentração ótima de PEG de 30% (p/v) à um tempo de exposição de 10' a 30 C. ANNE & PEBERDY (1975), através de mutantes auxotróficos obtiveram fusões intraespecíficas em *P. chrysogenum*, *P. patulum*, *P. roquefortii*, *A. nidulans* e *Cephalosporium acremonium* e fusões interespecíficas entre *P. chrysogenum* e *P. notatum*-. Heterocários foram confirmados pelo crescimento de colônias em meio mínimo e os diplóides por prototrofia, coloração de esporos, tamanho de esporos e conteúdo de DNA.

Através desses estudos e, portanto, com o aprimoramento de metodologias de fusão de protoplastos, permitiram que barreiras de incompatibilidade fossem superadas e significativos processos tenham sido obtidos com fusões a níveis intra e interespecíficos e intergenéricos.

Mais recentemente, diferentes autores realizaram trabalhos de fusão de protoplastos intraespecíficos em diversos fungos filamentosos. Assim, TOYAMA *et al* (1984), realizaram a primeira fusão intraespecífica em *Trichoderma reesei*, produtor de celulase, à partir de dois mutantes, um hiperprodutor e outro não produtor, obtendo um recombinante com o dobro da atividade endoglucanase. KIMURA *et al* (1986, 1987), fundiram duas linhagens diferentes de *Aspergillus niger*, produtores de ácido cítrico; SILVEIRA & AZEVEDO (1987) fundiram duas linhagens de *Metarhizium anisopliae*, fungo entomopatogênico utilizado para controle biológico de insetos.

OGAWA *et al* (1989) confirmaram a existência do ciclo parassexual de *T. reesei* e a possibilidade de sua aplicação no melhoramento da produção de enzimas através da fusão de protoplastos.

A fusão intraespecífica de protoplastos também foi observada em outros fungos como *Verticillum lecani* (JACKSON & HEALE, 1987), *T. pseudokoningii* (FURLANETO, 1989).

2.3. Regeneração de protoplastos

Um aspecto importante dos protoplastos é seu potencial de regenerar, dando origem a hifas normais, quando transferidos para um meio nutritivo com estabilizador osmótico apropriado. Entretanto, a frequência de regeneração varia entre as diversas espécies de fungos filamentosos e inclusive dentro de uma mesma espécie (PEBERDY, 1979).

São conhecidos basicamente três tipos de padrão morfológico de regeneração de protoplastos. O primeiro tipo de protoplasto dá origem à uma cadeia de células leveduriformes e normalmente a célula terminal produz a hifa. No segundo padrão de regeneração, os protoplastos produzem uma parede ou concha para onde o citoplasma migra; com o crescimento da cadeia o citoplasma divide-se em duas partes situadas em extremos opostos da cadeia. Um terceiro tipo de regeneração ocorre formação do tubo germinativo diretamente do protoplasto. Este modo de regeneração parece estar relacionado com o meio de cultura utilizado, observando-se geralmente em meio sólido (PEBERDY & GIBSON, 1971).

A incapacidade de alguns protoplastos gerarem hifas normais pode ser devida à ausência de núcleos ou ao sítio de origem dos protoplastos na hifa parental (PEBERDY & GIBSON, 1971). A alta porcentagem de protoplastos anucleados pode ser a causa da baixa frequência de regeneração observada em *F. tricinctum* e *F. oxysporum*, segundo LYNCH *et al* (1985).

2.4. *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai

A espécie *Trichoderma pseudokoningii* var. Rifai apresenta micélio hialino e esparso, composto de hifas ramificadas e septadas, paredes lisas e sem cor. Os conidióforos se agrupam em feixes, tornando-se pulverulentos na maturidade. Os conídios uninucleados são produzidos isoladamente na extremidade de cada fiálide, tendo forma oval e coloração que varia de branco a verde. (RIFAI, 1969).

Segundo BISSETT (1984), as colônias de *T. pseudokoningii* var. Rifai crescem rapidamente atingindo 8 a 9 cm de diâmetro num intervalo de quatro dias, incubados à 20°C.

O *Trichoderma pseudokoningii* é um microrganismo capaz de produzir celulase de uso potencial, em meio às espécies *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. lignorum*, *T. longibrachiatum* e *T. reesei* (COUGHLAN, 1985).

FURLANETTO (1989), obteve mutantes mono e duplo auxotróficos de *T. pseudokoningii* que apresentaram atividade celulolítica superior à linhagem selvagem e ao mutante hipercelulolítico QM 9414 de *T. reesei*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens Utilizadas

Linhagens de *Trichoderma pseudokoningii*, duplos auxotróficos obtidos por FURLANETTO & PIZZIRANI-KLEINER (1990), abaixo dissimulados:

a. g arg₁ rib

b. w leu₁ lis

Símbolos:

g = coloração selvagem verde dos esporos

w = mutante com esporos brancos

arg, rib, leu e lis representam respectivamente deficiências nutricionais para arginina, riboflavina, leucina e lisina.

3.2. Meios de Cultura e Soluções Utilizadas

3.2.1. Meio Mínimo (PONTECORVO *et al*, 1953)

3.2.2. Meio Completo (PONTECORVO *et al*, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

3.2.3. Meio Completo Líquido (PONTECORVO *et al*, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973).

3.2.4. Solução de "Tween-80" (0,1% V/V)

"Tween-80".....	0,1ml
Águadestilada.....	99,9ml

A solução foi distribuída em tubos de ensaio (2.5 ml por tubo), que foram a seguir autoclavado e mantidos no refrigerador.

3.2.5. Solução de Desoxicolato de Sódio (10% P/V)

Desoxicolato de Sódio.....	10.0g
Água destilada.....	100,0ml

A solução foi autoclavada e mantida sob refrigerador.

3.2.6. Tampão Mc Ilvaine's pH 5,8

Solução de ácido cítrico: 21.0 g em 1000.0 ml de água destilada .

Solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 32.0 g em 1000 ml de água destilada

Para obtenção do tampão misturou-se 184.25 ml da solução de ácido cítrico e 315.75 ml da solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

3.2.7. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,2 M

Dissolveu-se 158.4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pequeno volume do tampão Mc Ilvaine's. Ajustou-se o pH para 5.8 com a solução de Na_2HPO_4 e completou-se o volume para 1000,0 ml com o referido tampão. No momento do uso foi adicionada ao meio completo 2 x concentrado na proporção de 1:1 .

3.2.8. Solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M

Diluiu-se na proporção de 1:1 a solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2 M em tampão Mc Ilvaine's pH 5.8 .

3.2.9. Solução de Enzimas para a Produção de Protoplastos (HAMLIN *et al* , 1981) .

Para cada 1.0 ml de tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M pH 5.8 foram adicionados 5,0 mg de complexo lítico, sendo 2,5 mg de "celulase CP" e 2,5 mg de "novozym 234".

3.2.10. Solução de Polietilenoglicol 6000 (PEG)

Solução A

CaCl.....	11.0g
Água destilada	1000ml
Solução B	
Glicina	37,5 g
Água destilada	1000 ml

Adicionou-se 10 ml da solução A em 10 ml da solução B. O pH foi corrigido para 8,0 com NaOH 4% e adicionou-se PEG 6000 na concentração final de 30%. A solução foi autoclavada e mantida em refrigerador a 4°C .

3.3. Isolamento e regeneração de protoplastos

3.3.1. Obtenção de protoplastos (HAMLIN *et al* , 1981)

Fêz-se uma suspensão de conídios em solução de Tween de modo a obter uma concentração de 10^6 conídios por ml .

Um ml desta suspensão foi inoculado em erlenmeyer com 50 ml de meio completo líquido e incubado por 18 horas a 28°C com agitação rotatória (150 rpm). Após esse período, o micélio foi filtrado à vácuo, em papel de filtro e lavado duas vezes com 3,0 ml de solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 M. Determinou-se o peso úmido do micélio e montou-se o sistema lítico (item 3.2.9.).

Incubou-se por três horas a 28°C com agitação rotatória (150 rpm). Após esse período, os protoplastos foram coletados, filtrando-se em seringas com fibra de vidro. O sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm/10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 3,0 ml de tampão $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M. Repetiu-se o procedimento por duas vezes, sendo que após a última lavagem, o precipitado foi ressuspenso em 2,0 ml da solução estabilizadora [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M], e feita a contagem em Câmara de Neubauer. Os protoplastos foram semeados em placas com meio de regeneração [meio completo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6M] e em placas com meio completo, e incubados por 72 horas. Após esse período, a viabilidade dos protoplastos foi estimada.

3.3.2. Fusão de Protoplastos

Protoplastos dos mutantes a serem cruzados, obtidos no item 3.3.1, foram misturados em quantidades iguais (cerca de 10^6 protoplastos / ml) e centrifugados a

4000 rpm/10 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 1 ml de solução de agente fusogênico (PEG), o qual foi mantido a 28°C por 10 minutos. Após esse período, adicionou-se cerca de 10 ml de solução estabilizadora (item 3.2.8) e centrifugou-se a 4000 rpm/10 minutos.

Repetiu-se o procedimento por mais duas vezes, para retirada do PEG, sendo o precipitado finalmente ressuspense em 1 ml de estabilizador. Procederam-se diluições apropriadas e colocou-se 0,5 ml em placas de cultura.

3.3.3. Obtenção dos Produtos de Fusão

Os produtos de fusão foram semeados em meio mínimo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, meios seletivos para as marcas envolvidas no cruzamento (combinação duas a duas das marcas dos parentais) mais $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, meio completo + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e meio completo. Após oito dias de incubação à 28°C, procedeu-se à análise genética.

3.4. Análise Genética

3.4.1. Análise de Recombinantes

As colônias crescidas em meio mínimo e nos meios seletivos foram transferidas para placas mestras de meio completo (26 pontos). Após 5 dias de incubação à 28°C, essas colônias foram analisadas em meio mínimo, meio mínimo mais os requisitos de um e outro parental e meio mínimo mais todos os requisitos nutricionais envolvidos no cruzamento, exceto aquele sob análise. Foi adicionado desoxicolato de sódio em meio mínimo e meio completo para reduzir o diâmetro das colônias, evitando assim, a ocorrência de sintrofismo.

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho teve início testando-se as marcas dos mutantes auxotróficos duplos obtidos com luz ultravioleta por FURLANETTO (1989), as deficiências nutricionais dos respectivos mutantes foram confirmadas, demonstrando estabilidade. O passo seguinte, foi adequar a técnica de fusão de protoplasto aos mutantes a serem cruzados. A técnica utilizada foi a mesma descrita por FURLANETTO (1989), sendo feitas algumas modificações.

Foram realizadas várias fusões. Para a produção de protoplastos, utilizou-se somente 5,0 mg da enzima "novozyn 234" ao invés de utilizar 2,5 mg de "celulase CP" e 2,5

mg de novozym". Com essa modificação, a obtenção de protoplastos mostrou-se mais eficiente.

A solução estabilizadora $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ } 0,6 \text{ M}]$ mostrou-se adequada para sobrevivência de protoplastos.

Produtos de Fusão

Os produtos de fusão de g arg1 rib + w leul lis que foram semeados em Meio Mínimo, apresentaram colônias esverdeadas. A transferência para placas mestras (26 pontos) com Meio Completo fez com que as colônias apresentassem crescimentos vigorosos e colorações verde, branca e ainda verde mesclada de pontos brancos. Estes resultados concordam com os de CARVALHO (1989), onde foram observados heterocários de coloração verde mesclada, à partir de mutantes de *Trichoderma* sp. e com os de CASTRO (1982) o qual obteve heterocários de coloração verde.

Das placas de Meio Completo, as colônias foram transferidas para Meio Mínimo e, estão sendo analisadas quanto aos quatro marcadores em questão.

Algumas colônias sugerem ser heterocários por apresentarem setores diferenciados. Os resultados observados indicam que houve complementação das marcas auxotróficas.

Para confirmação dessas observações será feita coloração de núcleo dos conídios dos produtos de fusão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANNE,J.;PEBERDY,J.F. Condition for induced fusion of fungal protoplasts in polyethylene glycol solutions *Archives of microbiology*, Berlin, **105**:201-5 , 1975.
- AZEVEDO ,J.L.& COSTA ,S.O.P. *Exercícios práticos de génetica* . São Paulo, EDUSP,1973. 288p.
- BISSET,J. A revision of the genus *Trichoderma* , section *longibrachiatum* . *Canadian Journal of Botany*, Ottawa , **62**:924-31, 1984 .
- BACHMANN,B.J.& BONNER,D.M. Protoplasts from *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **78**: 550-6, 1959.
- BILLICH, A.; KELLER, V.; KLEINKAUF, H.; ZOCHER, R. Production of protoplasts from *Fusarium scirpi* by lytic enzymes from *Streptomyces tsusimaensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, **28**: 442-4, 1988.
- BINDING, H. The isolation, regeneration and fusion of *Phycomyces* protoplasts. *Molecular and General Genetics*, Berlin, **135**:273-6, 1974.
- BISSET, T. A revision of the genus *Trichoderma*, section *longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, **62**:924-31, 1984.
- COUGHLAN, M.P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application .In RUSSELL, G.E. ed. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. News upon Tyne, intercept, 1985. p.39-109 .
- CARVALHO, C.M.V. Conidiação, obtenção de mutantes, heterocariose e atividade celulolítica na linhagem selvagem de *Trichoderma* sp. Belo Horizonte, 1989. 141p. (Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais).

- CASTRO, U.G. Aspectos básicos da biologia e genética do *Trichoderma reesei*. Belo Horizonte, 1982. 134p. (Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais).
- DAVIS, B. Factors influencing protoplasts isolation. In: PEBERDY, J.F. & FERENCZY, L., ed. *Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics*. New York, Marcel Dekker, 1985. p.45-72.
- EMERSON, S. & EMERSON, M.R. Production, reproduction and reversion of protoplasts-like structures in the osmotic strain of *Neurospora crassa*. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, 44: 663-71, 1958.
- FERENCZY, L.; KEVEL, F.; SZEGEDI, M. Increased fusion frequency of *Aspergillus nidulans* protoplasts. **Experientia**, Basel, 31:50-2, 1975.
- FERENCZY, L.; KEVEL, F.; ZSOLT, J. Fusion of fungal protoplasts. **Nature**, London, 248:793-4, 1974.
- FURLANETTO, M.C. Recombinação genética e produção de celulases em *Trichoderma pseudokoningii* var. *rifai* Piracicaba, 1989. 152p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz").
- HAMLIN, P.F.; BRADSHAW, R.E.; MELON, F.M.; SANTIAGO, C.M.; WILSON, J.M.; PEBERDY, J.F. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, Guildford, 3:321-5, 1981.
- JACKSON, C.W. & HEALE, J.B. Paraxessual crosses by hyphal anastomosis and protoplasts fusion in the entomopathogen *Verticillium lecanii*. **Journal of General Microbiology**, London, 133:3537-47, 1987.
- KAO, K.N. & MICHAYLUKE, M.R. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. **Planta**, Berlin, 115:355-67, 1974.

- KIRIMURA, K.; NAKAJIMA, I.; LEE, S.P.; KAWABE, S.; USAMI, S. Citric acid production by the diploid strains of *Aspergillus niger* obtained by protoplast fusion. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Baltimore, 27:504-6, 1988.
- LAURILA, H.O.; NEVALAINE, N.; MAKINEN, V. Production of protoplasts from fungi *Curvularia inaequalis* and *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Baltimore, 21:210-2, 1985.
- LYNCH, P.T.; COLLIN, H.A.; ISAAC, S. Isolation and regeneration of protoplasts from *Fusarium tricinctum* and *Fusarium oxysporum*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 85(1):135-40, 1985.
- MELLON, R.E. Studies on microbic heredity. Observations on a primitive form of sexuality (zigospore formation) in the colon typhoid group. **Bacteriology**. 10:481-501, 1925.
- MULLER, R. Contribution to the problem of protoplast fusion. **Acta Facultatis Medicae Universitatis Brunensis**. 37:39-41, 1970.
- OGAWA, K.; OHARA, H.; KOIDE, T.; TOYAMA, N. Intraespecific hybridization of *Trichoderma reesei* by protoplast fusion. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, 67(3):207-9, 1989.
- PEBERDY, J.F. Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. **Annual Review of Microbiology**. California, 33:21-39, 1979.
- PEBERDY, J.F. Fusão de Protoplastos em fungos. In: AZEVEDO, J.L. coord. **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética**. Piracicaba, FEALQ. 1985. cap.7, p.61-5.
- PEBERDY, J.F.; BUCKLEY, C.E.; DALTRY, D.C.; MOORE, F.M. Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 67:23-6, 1976.

RIFAL, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycobiological Papers*, Oxon, 116:1-56, 1969.

TOYAMA, H.; YOKOYAMA, T.; SHINMYO, A.; OKADA, H. interspecific protoplast fusion of *Trichoderma*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, 1:25-35, 1984.

Efeito de Agentes Bióticos e Abióticos no Acúmulo de um Complexo
de Pigmentos e Fitoalexinas em Mesocótilos de Sorgo

Juliana Craveiro de Freitas

PET - Biotecnologia

EFEITO DE AGENTES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NO ACÚMULO DE UM COMPLEXO DE PIGMENTOS E FITOALEXINAS EM MESOCÓTILOS DE SORGO

FREITAS, J.C.; ZARAMELA, G.S.; PASCHOLATI, S.F.

Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

RESUMO

Mesocótilos de sorgo de três cultivares (Brandes, Dk-18 e SC-175-14) foram tratados com diferentes agentes bióticos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bipolaris carbonum* e Thuricide), abióticos químicos ($HgCl_2$, Ethrel e Fosetyl-Al) ou abióticos físicos (luz UV e choque térmico), visando o estudo do acúmulo de um complexo de pigmentos e fitoalexinas nos tecidos. Os resultados mostraram que o $HgCl_2$ e a luz UV foram mais eficazes no acúmulo de pigmentos, enquanto o choque térmico foi supressor da síntese dos pigmentos. HPLC foi utilizada para separar e identificar as fitoalexinas (apigeninidina, luteolinidina e éster do ácido cafeico de arabinosil-5-O-apigeninidina) presentes em mesocótilos de sorgo tratados com os diferentes agentes.

ABSTRACT

EFFECT OF BIOTIC AND ABIOTIC AGENTS ON ACCUMULATION OF A PIGMENT COMPLEX AND PHYTOALEXINS IN SORGHUM MESOCOTYLS.

Etiolated sorghum mesocotyls of three cultivars (Brandes, DK-18 and SC 175-14) were treated with biotic (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bipolaris carbonum* and Thuricide), chemical abiotic ($HgCl_2$, Ethrel and Fosetyl-Al) or physical abiotic (UV light and heat-shock treatment) agents. Results showed that $HgCl_2$ and UV light were more effective on the accumulation of the pigment complex, while heat-shock treatment suppressed pigment formation. HPLC was used to separate and identify the phytoalexins (apigeninidin, luteolinidin and caffeic acid ester of arabinosyl-5-O-apigeninidin) present in sorghum mesocotyls treated with the different agents.

INTRODUÇÃO

Fitoalexinas são compostos que se acumulam em plantas devido a presença de fitopatógenos ou diferentes agentes, denominados elicitores. Os mecanismos pelos quais os inúmeros elicitores induzem este acúmulo de fitoalexinas não são completamente conhecidos (YOSHIKAWA, 1978). O efeito desse acúmulo, porém, está normalmente relacionado à expressão de resistência da planta a patógenos, uma vez que resulta de um incremento na transcrição de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo das fitoalexinas.

Inicialmente foram identificadas duas substâncias do tipo 3-deoxiantocianidina (apigeninidina e luteolinidina), presentes em um complexo de pigmentos (A_{490nm}) extraído de tecidos de sorgo (NICHOLSON *et al.*, 1987). Como a síntese dessas substâncias podia ser estimulada pela inoculação com fungos e, pelo fato delas serem fungitóxicas, os autores sugeriram que as mesmas estariam relacionadas à defesa da planta e que, portanto, poderiam ser consideradas fitoalexinas. Recentemente, uma terceira fitoalexina, o éster de ácido cafeico de arabinosil-5-O-apigeninidina, foi identificada (HIPSKIND *et al.* 1990).

No presente trabalho, procurou-se estudar o acúmulo do complexo de pigmentos e das fitoalexinas em mesocótilos estiolados de três diferentes cultivares de sorgo, em resposta ao tratamento com agentes bióticos, abióticos físicos ou químicos.

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO E TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench), dos cultivares Brandes, DK-18 e SC 175-14, foram embebidas e aeradas em água por 6h a temperatura ambiente, sendo a seguir incubadas entre camadas de papel de filtro umedecidas, no escuro a 28°C, como descrito por HIPSKIND *et al.* (1990).

Depois de 4 dias, as plântulas foram expostas a 4h de luz para a paralisação da alongação dos mesocótilos, sendo posteriormente submetidas aos tratamentos com os agentes **abióticos físicos**: exposição a luz ultravioleta (265nm) por 1h ou a alta temperatura (submersas em água a 52°C por 5 minutos); **abióticos químicos**: aspersão com soluções de HgCl₂ (0,04%), Fosetyl-A1 (0,03%) ou Ethrel (2500ppm); e **bióticos**: aspersão com suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* (5x10⁷ células/ml), *Bipolaris carbonum* (1x10⁵ conídios/ml) ou Thuricide (10mg/ml).

Após os tratamentos, as plântulas foram incubadas a 28°C, com fotoperíodo de 14h luz/10h escuro. No caso dos tratamentos com agentes bióticos, a umidade foi mantida próxima a 100% nas primeiras 24h. Os tratamentos controle foram representados por aspersão com água destilada.

EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO COMPLEXO DE PIGMENTOS

Os pigmentos acumulados, após 60h de incubação, foram extraídos dos mesocótilos colocando-se segmentos destes de 5mm em metanol acidificado com 0,1% HCl. As amostras em triplicata foram representadas por cinco mesocótilos de 5-7cm, repetição.

Após 12h a 4°C, as frações metanólicas das amostras foram obtidas e as respectivas absorbâncias a 490nm determinadas em espectrofotômetro. O acúmulo do complexo de pigmentos foi expresso em unidades de A_{490nm}/grama de peso fresco.

A composição específica das fitoalexinas presentes nas amostras foi determinada através de cromatografia líquida ("HPLC"), de acordo com procedimento descrito por HIPSKIND *et al.* (1990). Aliquotas de 20µl foram injetadas e fracionadas em coluna de fase reversa C18, "Ultrasphere" (4,25x250mm). A fase móvel consistiu dos solventes A: água/ácido acético/metanol (71:10:9; v/v/v) e B: metanol/ácido acético (9:1; v/v). A separação das fitoalexinas foi obtida através de gradiente linear de 0-25% de solvente B, por um período de 13 min. e fluxo de 1ml/min, sendo os picos detectados em comprimento de onda de 480nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ABIÓTICOS FÍSICOS

A exposição à luz UV foi o tratamento mais eficiente na indução de pigmentos e fitoalexinas, resultando, nos três cultivares, em acúmulos superiores aos seus respectivos controles (Figuras 1, 2 e 3; Tabela 1).

Este trabalho concorda com os resultados de outras pesquisas em diferentes espécies vegetais, onde a luz UV de onda curta, além de poder destruir células, e em doses subletais ser mutagênica (BAILEY, 1982), mostrou-se como um elicitador do acúmulo de fitoalexinas em quantidades significativas (BRIDGE & KLARMAN, 1973).

O tratamento térmico, por sua vez, inibiu a síntese de pigmentos nos três cultivares, comportando-se como um supressor (Figuras 1, 2 e 3). O acúmulo de pigmentos mostrou-se, em cada um dos casos, inferior aos respectivos controles. Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos realizados com soja (BHATTACHARYYA & WARD, 1987; CLASSEN & WARD, 1985), demonstrando ser o efeito da temperatura inversamente proporcional ao acúmulo de fitoalexinas e, portanto, à resistência a doenças.

No caso do sorgo, pode-se sugerir que a alta temperatura promove a inativação de enzimas envolvidas no metabolismo dos pigmentos analisados, dentre os quais as fitoalexinas (Tabela 1). Reforçando esta hipótese, WALTER (1989) demonstrou que em plantas de salsa submetidas a tratamento térmico (37° C) enzimas relacionadas ao metabolismo de flavonóides, a PAL e a CHS, não foram induzidas devido a um bloqueio nos primeiros passos da expressão gênica, provavelmente a transcrição.

2. ABIÓTICOS QUÍMICOS

A participação do etileno nos mecanismos de resistência das plantas frente a patógenos tem sido defendida por muitos autores, possivelmente pela participação desse hormônio na síntese de enzimas e nas reações de resistência a doenças. Entretanto, o tratamento de tecidos de sorgo com Ethrel (etileno exógeno) praticamente não diferiu do controle em nenhum dos cultivares estudados quanto ao acúmulo de pigmentos (Figuras 4, 5 e 6). Resultados obtidos por DUBE *et al.* (1993) utilizando o cobalto, um inibidor da síntese do etileno, sugerem que baixas concentrações de etileno são requeridas para a biossíntese de antocianinas em sorgo, sendo que o efeito do ethephon (fonte de etileno exógena) no acúmulo de antocianinas e atividade de PAL foi estudado em internódios de sorgo tratados e não tratados com cobalto.

Em citros, já foi demonstrado que o Fosetyl-Al em altas concentrações é fungistático, mas em baixas doses atua na ativação dos mecanismos de defesa da planta contra patógenos (AFEK & SZTEJNBERG, 1989). Substâncias relacionadas a defesa vegetal como fitoalexinas sesquiterpenóides, lignina, acúmulo de etileno e atividade de PAL foram aumentados mais rapidamente em hastes de tabaco tratados com fosetyl-Al do que em hastes não tratadas (NEMESTOTHY & GUEST, 1990). No entanto, essa ativação parece não ocorrer em sorgo (Figuras 4, 5 e 6), visto que a quantidade de pigmentos estimada foi semelhante ou inferior aos tratamentos controle em cada cultivar.

O HgCl₂ foi o mais eficiente elicitador dentre os agentes abióticos químicos. Em todos os cultivares o acúmulo de pigmentos foi bastante superior aos tratamentos controle. Seu efeito foi previamente estudado em soja, evidenciando um acúmulo de gliceolina devido a forte inibição da degradação da referida fitoalexina, mas com pequeno efeito no estímulo da sua biossíntese (YOSHIKAWA, 1978). Pode-se sugerir então, que o mesmo tenha ocorrido no caso do sorgo (Figuras 4, 5 e 6, Tabela 1).

3. BIÓTICOS

Trabalhos realizados com soja mostram que o modo de ação dos elicitores bióticos difere dos abióticos, pois estimulam a síntese de fitoalexinas (YOSHIKAWA, 1978).

Os resultados obtidos demonstraram que, em sorgo, a resposta elicitora de cada agente biótico variou sensivelmente em função do cultivar em questão. Apenas no cultivar DK-18 pode-se observar um efeito elicitor de todos os tratamentos bióticos (*S. cerevisiae*, *B. carbonum* e Thuricide), enquanto nos demais nem todos os tratamentos foram eficientes (Figuras 7, 8 e 9, Tabela 1).

CONCLUSÕES

O acúmulo do complexo de pigmentos e das fitoalexinas em tecidos de sorgo mostra-se dependente do cultivar utilizado, bem como da interação cultivar X tratamento. E também uma resposta inespecífica à presença de diferentes agentes bióticos ou abióticos, embora os mecanismos de ação desses agentes possam envolver alterações diferenciais na síntese e/ou degradação de pigmentos e fitoalexinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFEK, U.; SZTEJNBERG, A. 1989. Effects of Fosetyl-Al and Phosphorous Acid on Scoparone, a Phytoalexin Associated with Resistance of Citrus to *Phytophthora citrophthora*. **Phytopathology** 79 (7): 736-9.
- BAILEY, J.A.; MANSFIELD, J.W. 1982. *Phytoalexins*. London, Blackie & Son, p. 296.
- BHATTACHARYYA, M.K.; WARD, E.W.B. 1987. Temperature-induced susceptibility of soybeans to *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*: phenylalanine ammonia-lyase and glyceollin in the host; growth and glyceollin I sensitivity of the pathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 31 (3): 407-19.
- BRIDGE, M.A.; KLARMAN, W.L. 1973. Soybean Phytoalexin, Hydroxyphaseollin, induced by Ultraviolet irradiation. **Phytopathology** 63: 606-9.
- CLASSEN, D.; WARD, E.W.B. 1985. Temperature induced susceptibility of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: production and activity of elicitors of glyceollin. **Physiological Plant Pathology** 26 (3): 289-96.
- DUBE, A.; BHARTI, S.; LALORAYA, M.M. 1993. Inhibition of the internode of *Sorghum bicolor* by cobaltous ions. The site of action of cobalt. **Physiologia Plantarum** 87: 441-446.
- HIPSKIND, J.D.; HANAU, R.; LEITE, B. & NICHOLSON, R.L. 1990. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of an apigeninidin acyl ester. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 36: 381-96.
- LOPEZ, A.M.Q.; PASCHOLATI, S.F. 1992. Accumulation of a complex of pigments in sorghum mesocotyls in response to wounding. **Journal of Phytopathology** 135:63-70.
- NEMESTOTHY, G.S.; GUEST, D.I. 1990. Phytoalexin accumulation phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 37 (3): 207-19.
- NICHOLSON, R.L.; KOLLIPARA, S.S.; VINCENT, J.R.; LYONS, P.C. & CADENA-GOMEZ, G. 1987. Phytoalexin synthesis by the sorghum mesocotyl in response to infection by pathogenic and nonpathogenic fungi. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 84: 5520-4.
- TRAYLOR, E.A.; SCOTT, H.S.; RANSOM, R.F. & DUNKLE, L.D. 1987. Pathotoxin Effects in Sorghum are also produced by Mercuric Chloride Treatment. **Plant Physiology** 84: 975-8.
- WALTER, M.H. 1989. The induction of phenylpropanoid biosynthetic enzymes by ultraviolet light or fungal elicitor in cultured parsley cells is overridden by a heat-shock treatment. **Planta** 177 (1): 1-8.
- YOSHIKAWA, M. 1978. Diverse modes of action of biotic and abiotic phytoalexin elicitors. **Nature** 275(12): 546-7.

Table 1.

Composição específica dos pigmentos acumulados em resposta aos diferentes tratamentos, obtida através de análise por HPLC.

AGENTES		CULTIVAR	$\mu\text{g/gpf}$			
			LUT	API	API-éster	
A B I Ó T I C O S	F I S I C O S	LUZ U.V	SC 175-14	-	0.129	-
			Brandes	-	0.064	-
			DK-18	0.406	0.028	0.027
	Tratamento Térmico	SC 175-14	-	-	-	
		Brandes	-	-	-	
		DK-18	-	-	-	
	Q U I M I C O S	HgCl ₂	SC 175-14	-	0.251	-
			Brandes	-	0.072	-
			DK-18	0.458	0.050	-
B I Ó T I C O S	<i>B. carbonum</i>	SC 175-14	-	0.059	+	
		Brandes	-	0.180	-	
		DK-18	0.378	0.011	+	
	<i>S. cerevisiae</i>	DK-18	0.412	0.031	+	
	Thuricide	SC 175-14	-	0.062	+	
		DK-18	0.786	0.0540	+	
CONTROLE (ÁGUA)	SC 175-14	-	-	-		
	Brandes	-	-	-		
	DK-18	-	-	-		

Legenda das Figuras:

- Fig. 1. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar Brandes, em resposta ao tratamento com agentes abióticos físicos.
- Fig. 2. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar DK-18, em resposta ao tratamento com agentes abióticos físicos.
- Fig. 3. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar SC 175-14, em resposta ao tratamento com agentes abióticos físicos.
- Fig. 4. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar Brandes, em resposta ao tratamento com agentes abióticos químicos.
- Fig. 5. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar DK-18, em resposta ao tratamento com agentes abióticos químicos.
- Fig. 6. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar SC 175-14, em resposta ao tratamento com agentes abióticos químicos.
- Fig. 7. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar Brandes, em resposta ao tratamento com agentes bióticos.
- Fig. 8. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar DK-18, em resposta ao tratamento com agentes bióticos.
- Fig. 9. Acúmulo de pigmentos em mesocótilos de sorgo, cultivar SC 175-14, em resposta ao tratamento com diferentes agentes bióticos.

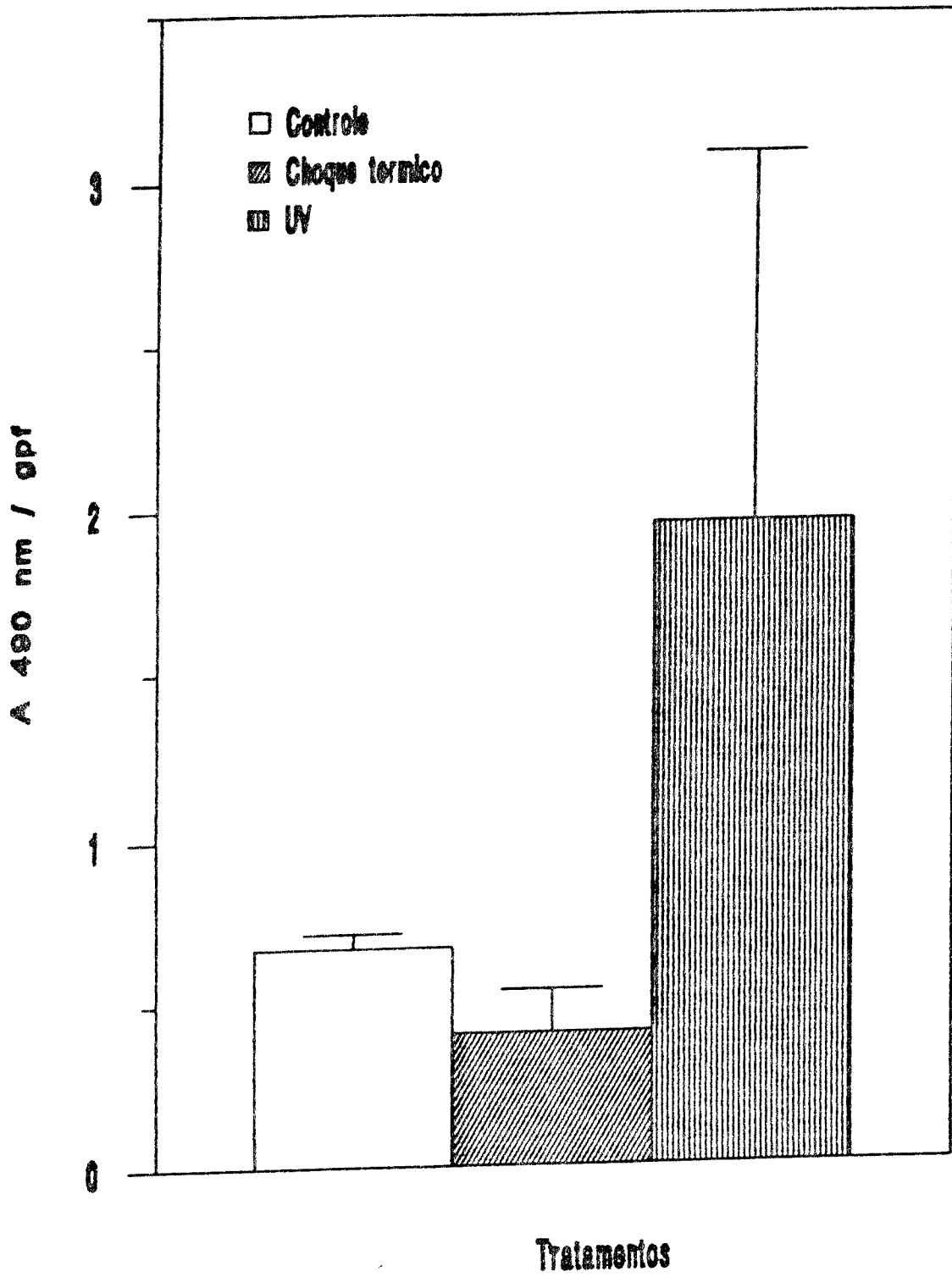


Fig 1

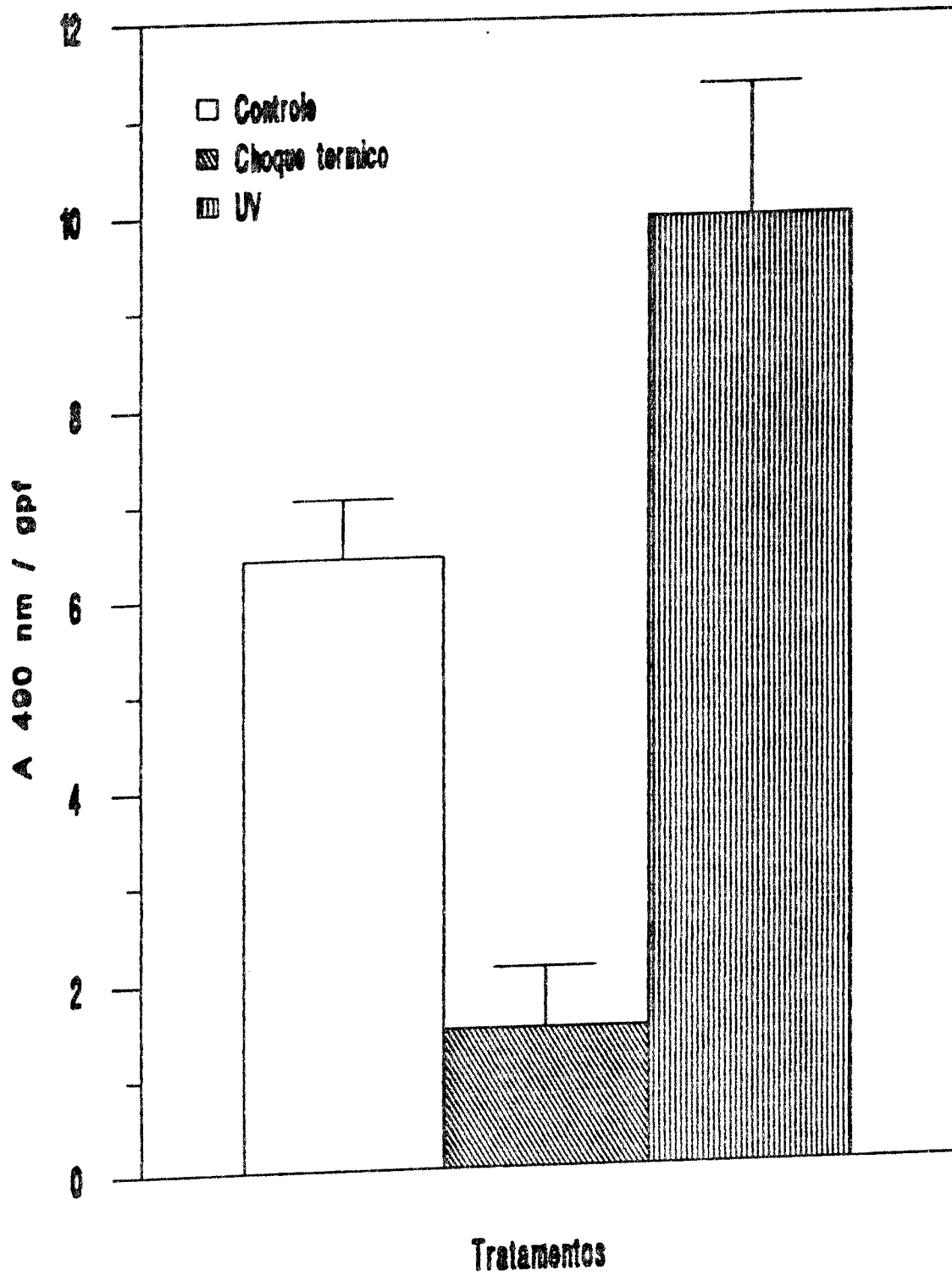


Fig 2

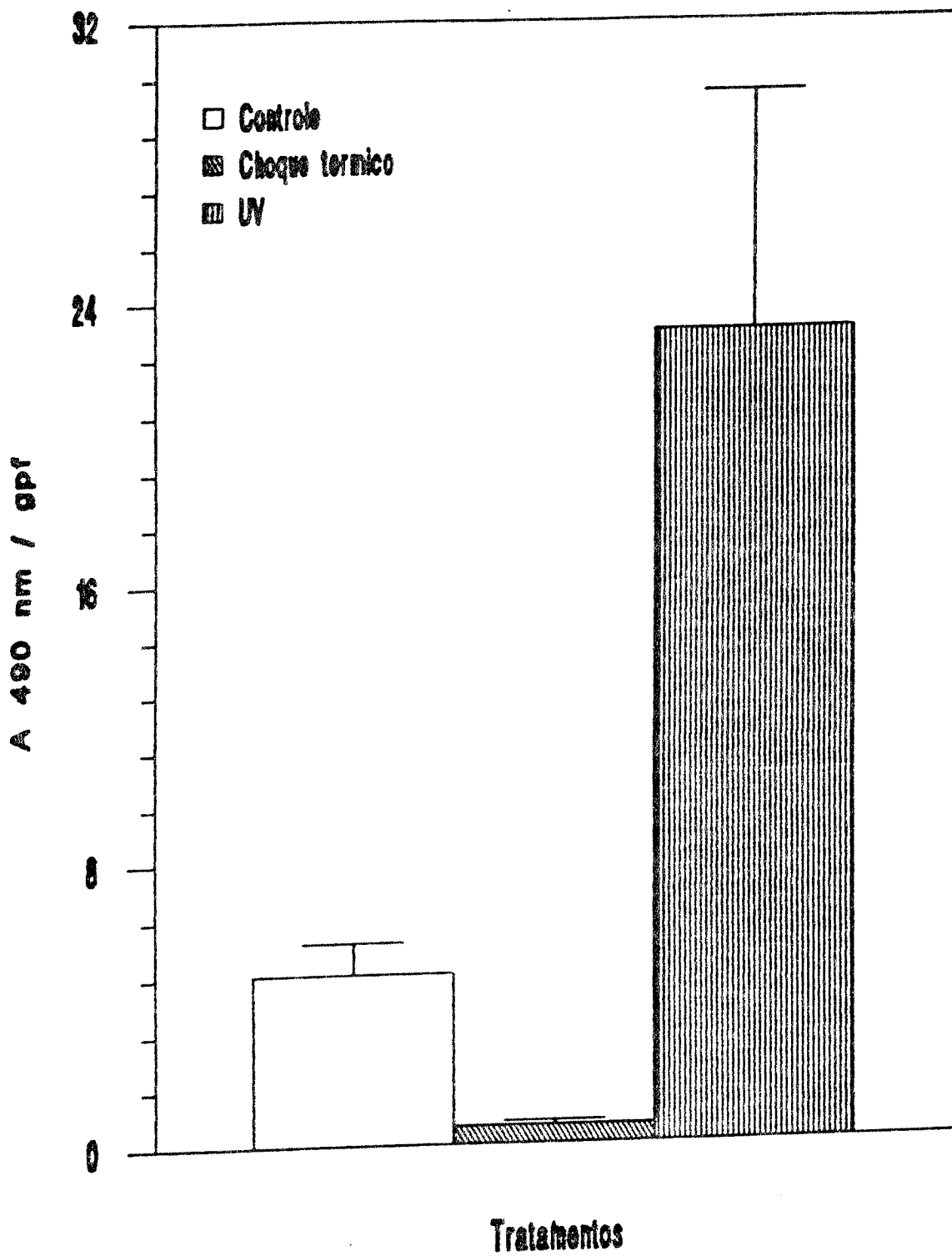


Fig 3

A 490 nm OPI

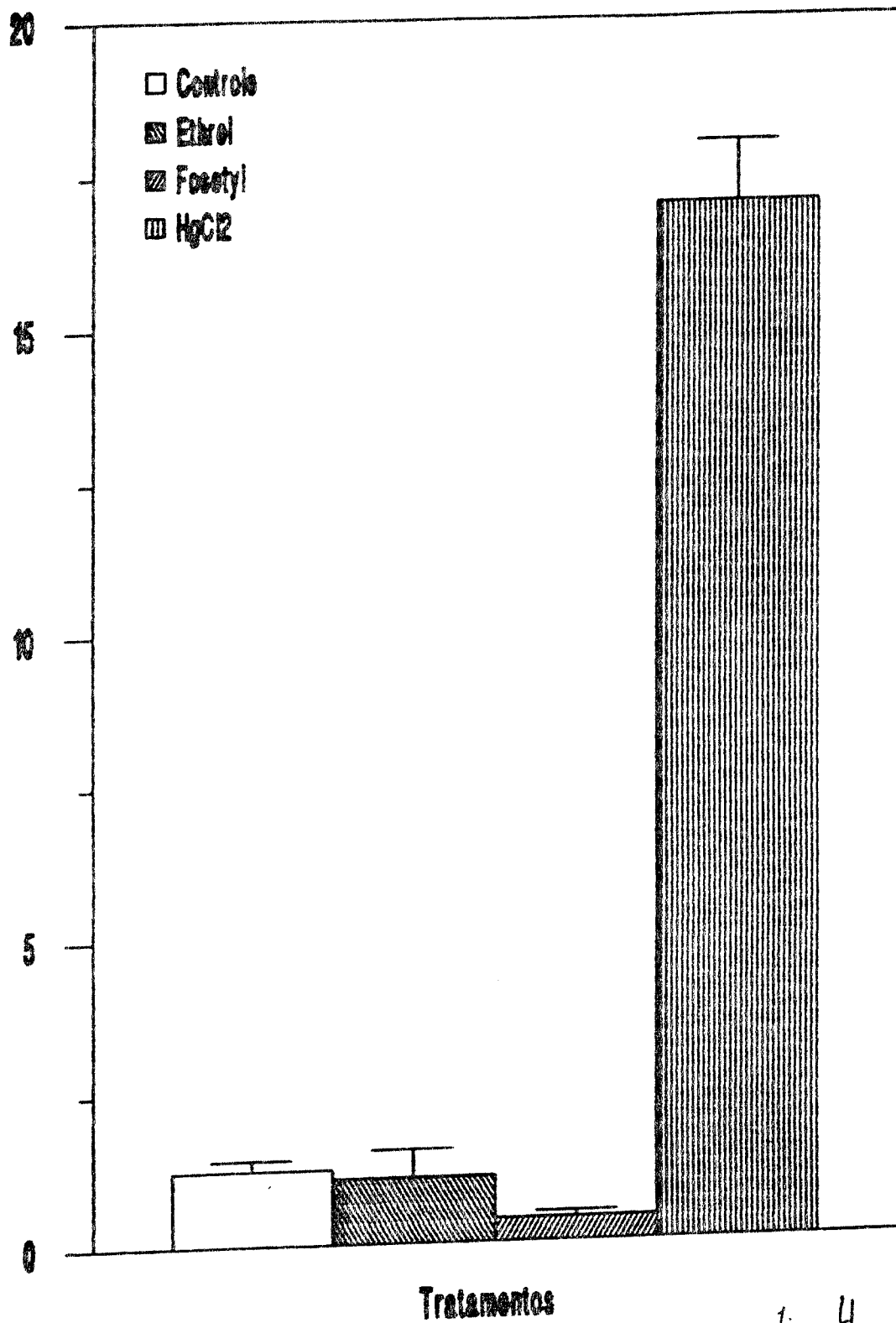


Fig 4

A 490 nm / OPT

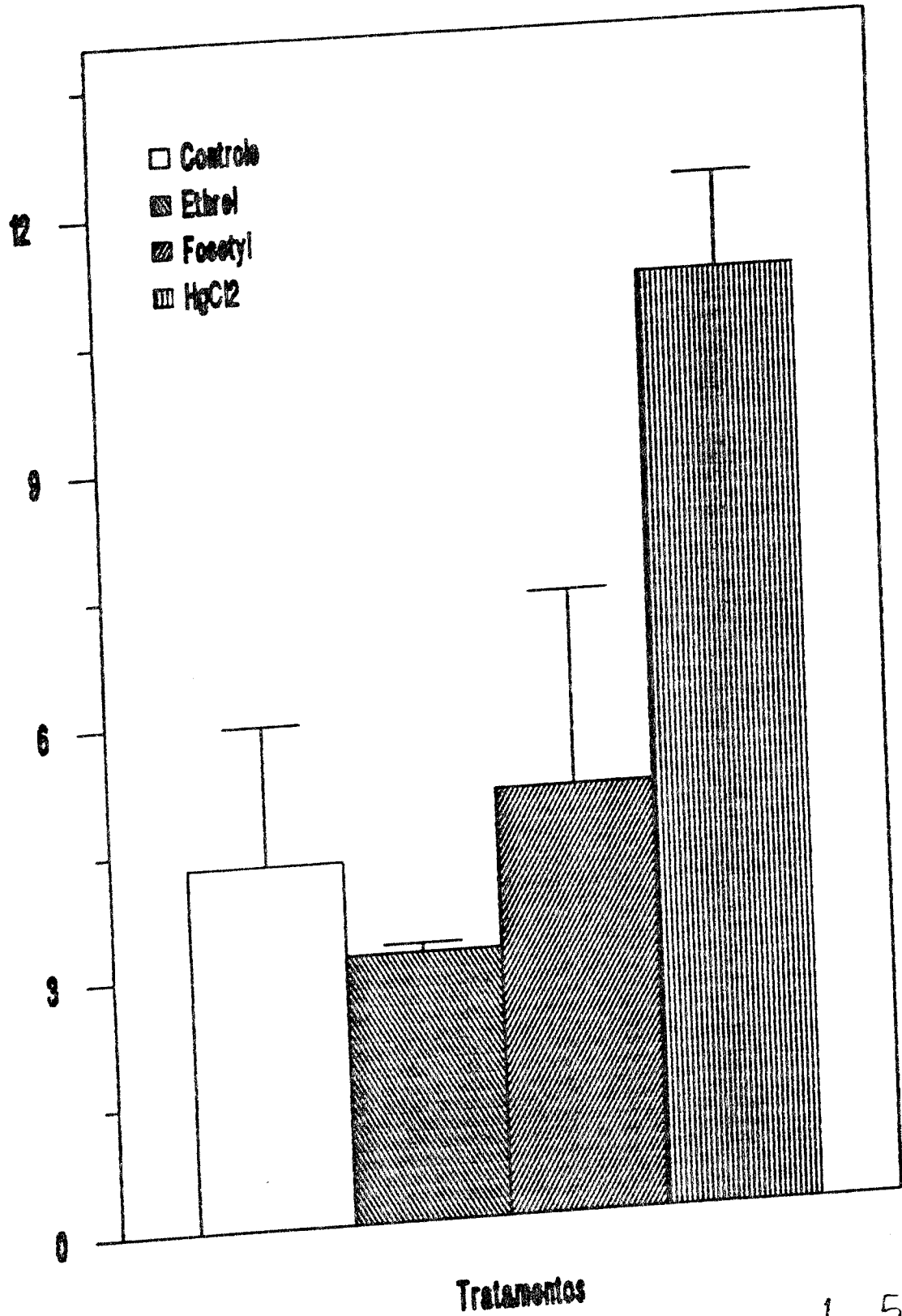
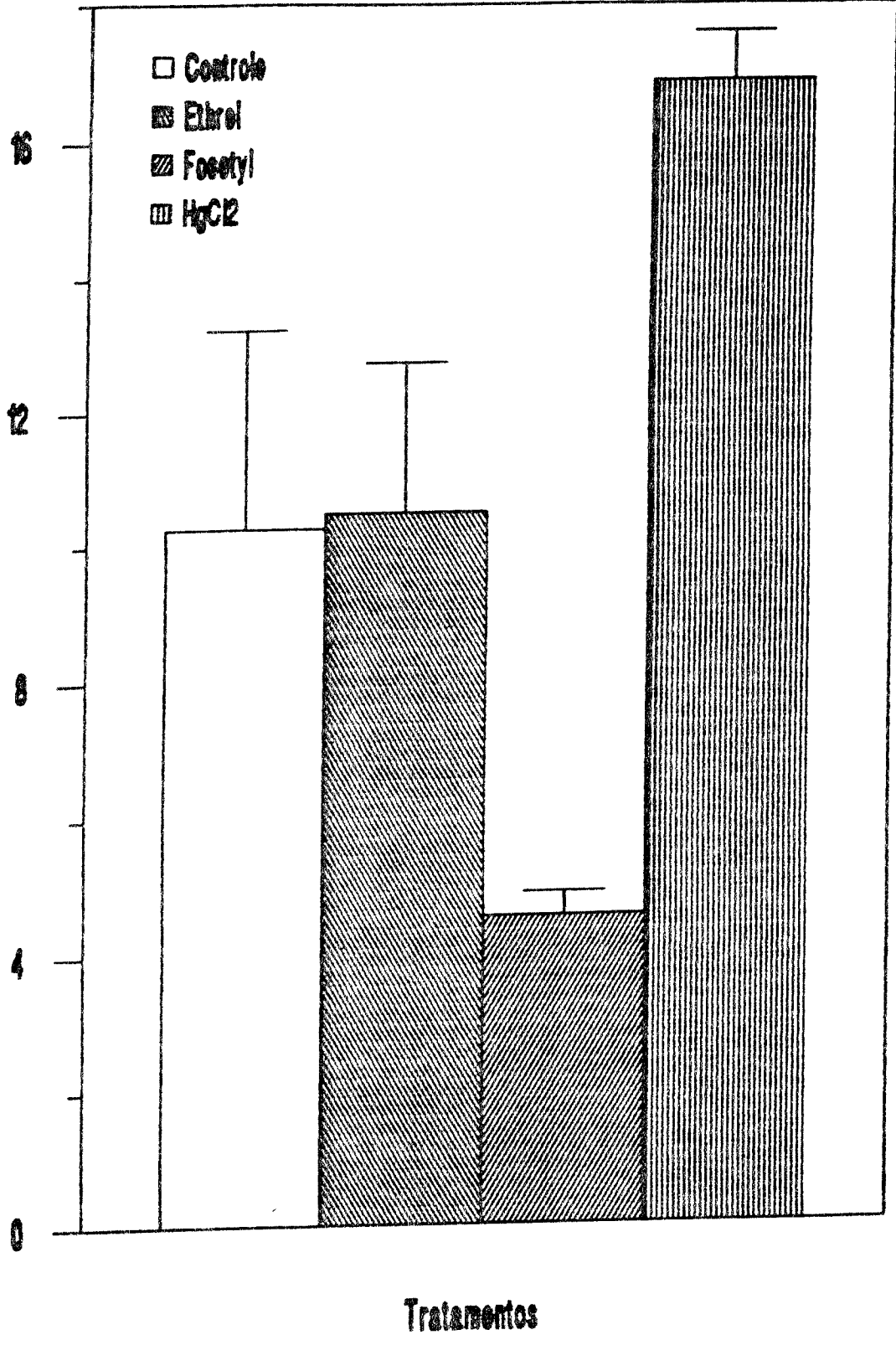
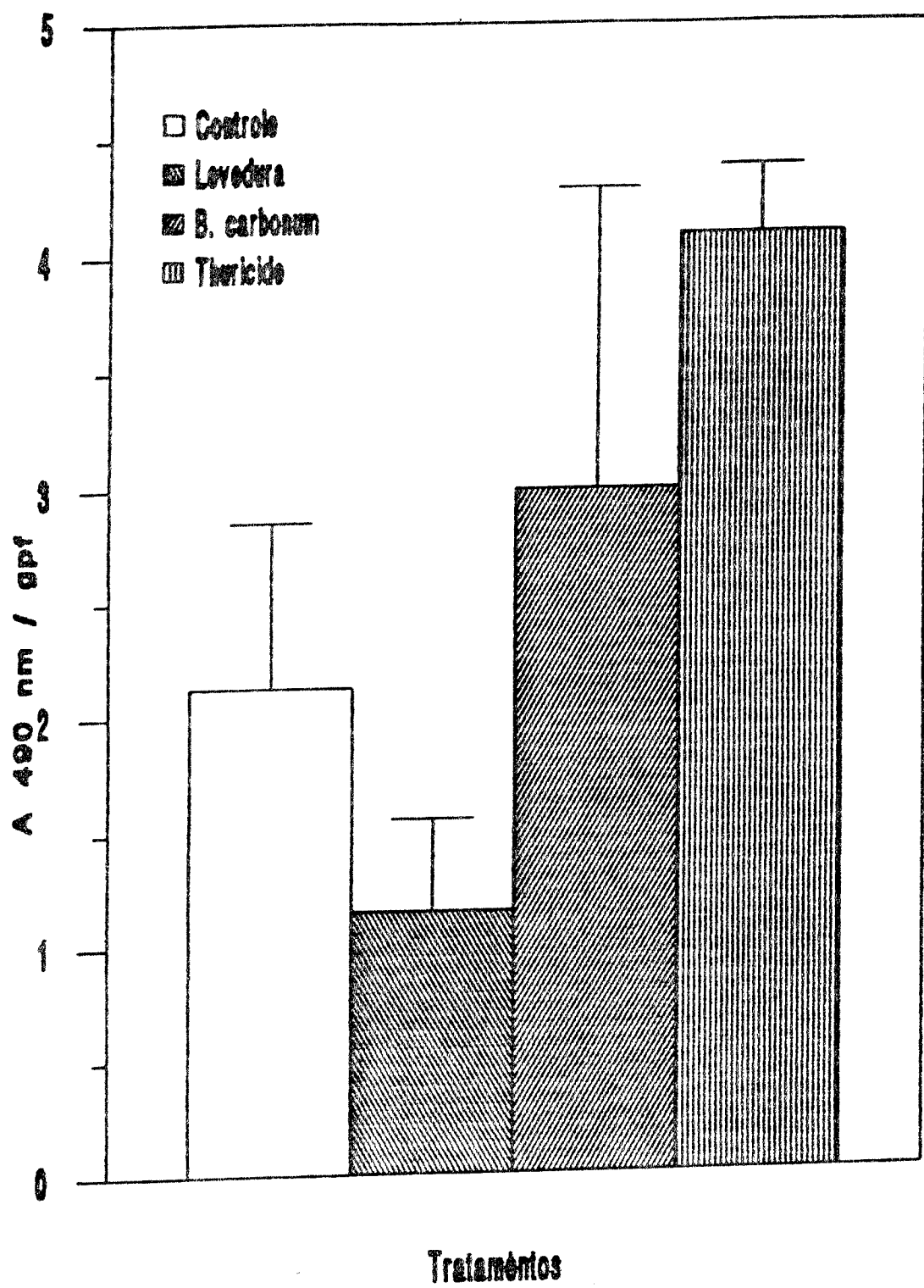


Fig 5

A 490 nm / gpf





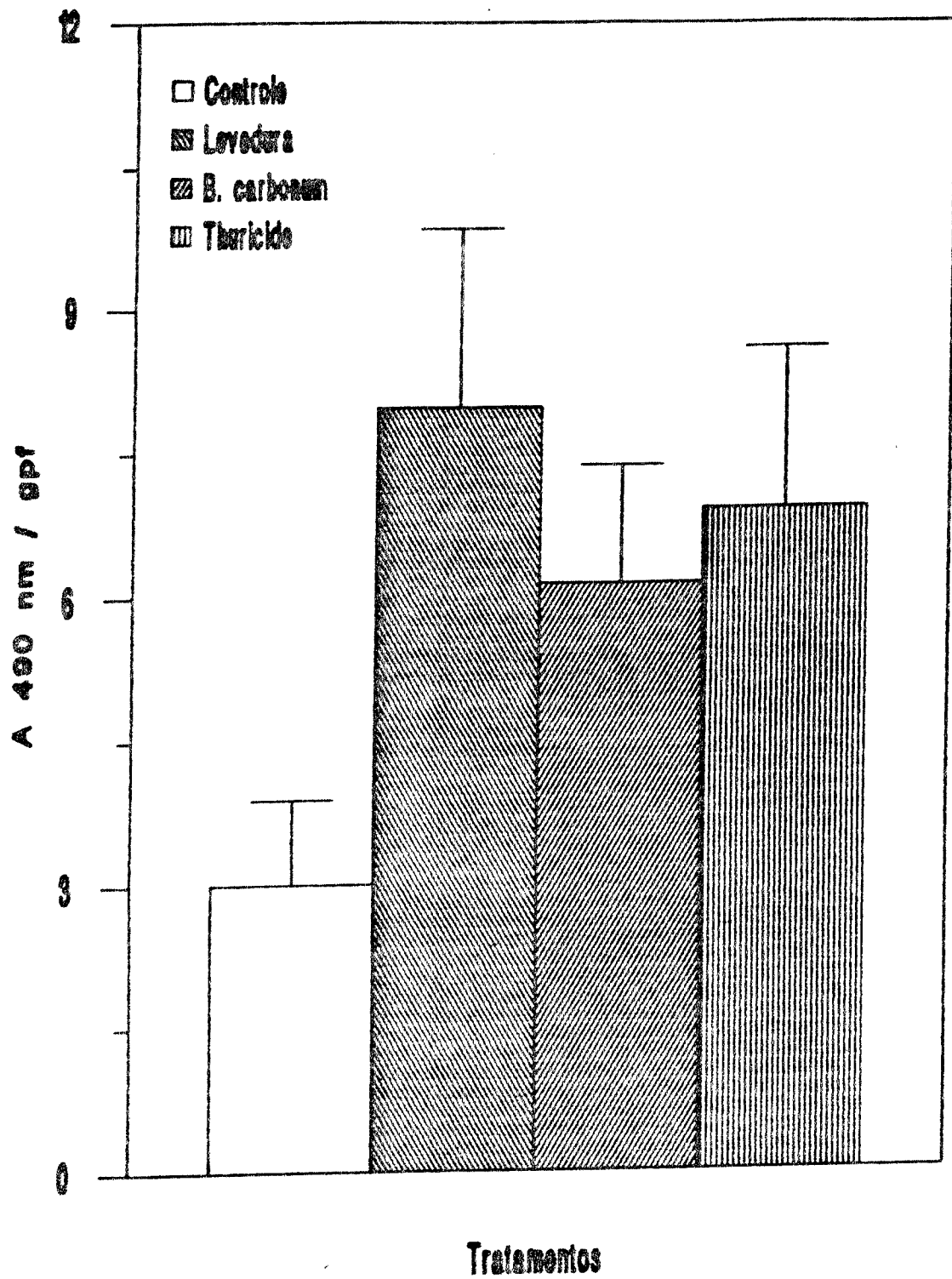
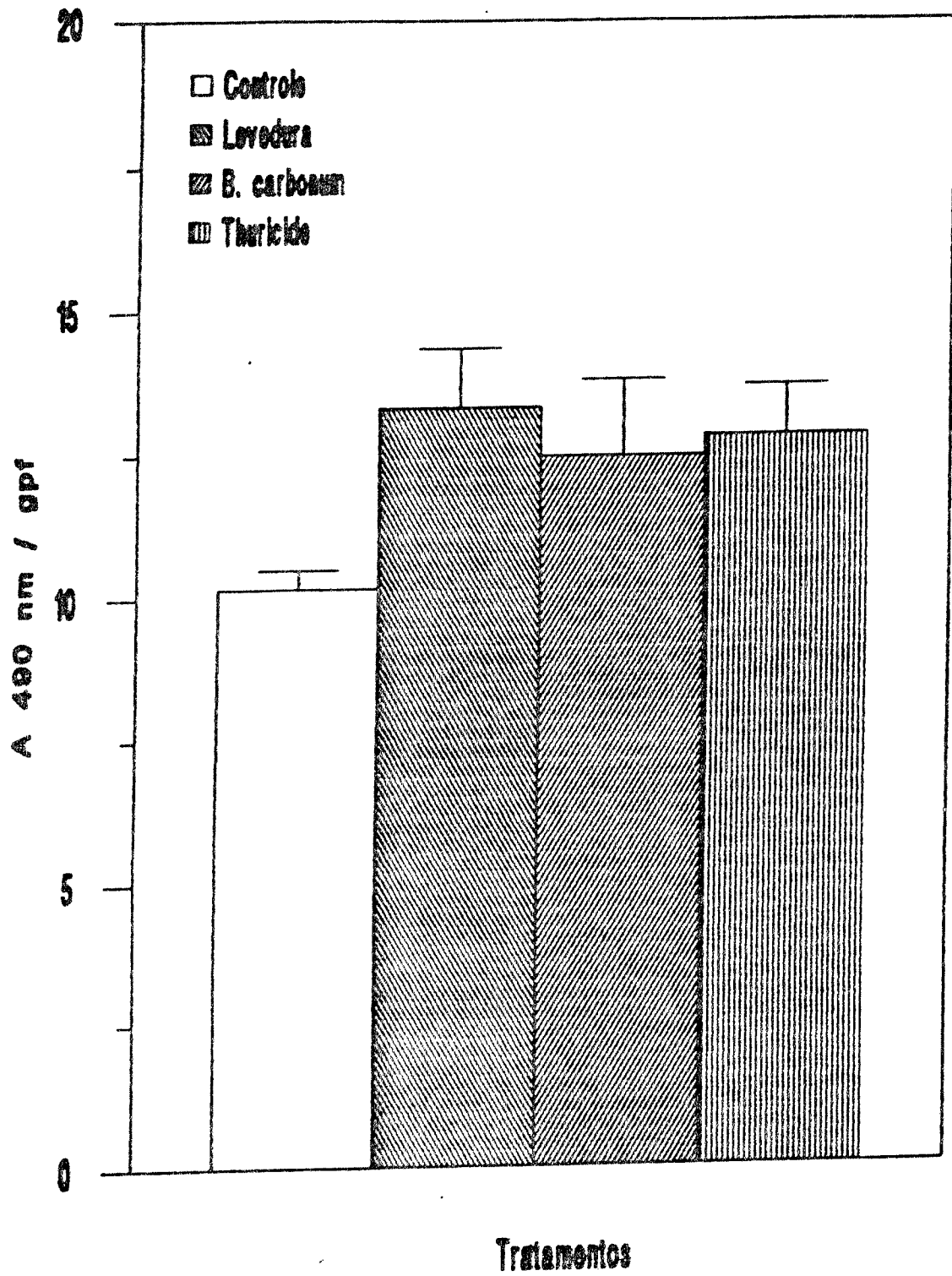


Fig 8



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
CAMPUS DE PIRACICABA

Micropropagação do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)
Através de Cultura de Meristemas

Mario César Sesso
PET - Biotecnologia Agrícola

Departamento de Genética
ESALQ/USP
PIRACICABA - 1993

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Campus de Piracicaba

MICROPROPAGAÇÃO DO CAJUEIRO
(*Anacardium occidentale* L.) ATRAVÉS DE
CULTURA DE MERISTEMAS

Mario César Sesso
PET-Biotecnologia Agrícola

Departamento de Genética
ESALQ/USP
Piracicaba-1993

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
4. MATERIAL E MÉTODO.....	11
5. DADOS E CONCLUSÕES.....	13
6. LITERATURA CITADA.....	16

1. INTRODUÇÃO

O cajueiro é uma das espécies cultivadas que tem maior expressão sócio-econômica, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil.

Segundo LIMA (1988), muito antes do descobrimento do Brasil o caju já era um dos alimentos básicos das populações autóctones conforme atestem os relatos dos primeiros colonizadores.

Apesar de sua provável origem brasileira, a cultura de cajueiro encontra-se difundida em vários países do mundo. Entretanto, a grande parte da produção mundial da castanha de caju, cerca de 96%, concentra-se em 5 países: Índia, Brasil, Moçambique, Tanzânia e Kênia.

O Brasil ocupa a posição de segundo produtor mundial de castanha de caju, o que lhe confere papel de destaque nas exportações de amêndoas. Essa atividade lhe tem representado desperdício de grandes quantidades de pseudofruto. Entretanto vêm se desenvolvendo, nos últimos anos, a instalação de importantes empreendimentos agroindustriais na região Nordeste, objetivando beneficiamento da castanha e a produção de suco de caju, concomitantemente, visando o consumo interno e o mercado exterior.

Devido a boa aceitação da castanha e do suco de caju no mercado consumidor de vários países do mundo, principalmente dos mais desenvolvidos, o interesse para expansão desta cultura nos países produtores é muito grande e crescente. Segundo os últimos dados oficiais do IBGE, a safra de 1986 rendeu 108 milhões de dólares ao Brasil, na exportação de 25000 toneladas de castanha de caju.

Há diversos fatores limitantes para a expansão da cultura de cajueiro, conseqüentemente para o aumento de produção de castanhas de caju no Brasil, dentro dos quais destacam-se: 1) dificuldade na obtenção de mudas uniformes de plantas elites com maior produtividade de castanhas; 2) poucos estudos sobre a cultura de cajueiro, principalmente nas áreas de Genética e Melhoramento. Muitas castanhas de caju são colhidas manualmente de plantas de caju subespontâneas originárias de sementes distribuídas pelos homens e animais.

Segundo ALMEIDA (1988), a propagação de plantas via assexuada é técnica altamente empregada em fruticultura pelo grande número de vantagens que oferece àqueles que a utilizam. No caso da cajucultura destacam-se, entre outras, as seguintes:

- permitir a multiplicação de plantas com patrimônio genético superior, notadamente de maior produção individual;
- resistência a pragas e moléstias e de menor exigência nutricional;
- indução de precocidade, permitindo um retorno mais rápido do capital investido;
- diminuição do porte das plantas, facilitando os tratos culturais e fitossanitários e colheita, ensejando também em povoamentos mais adensados e, logicamente, de maior produção por área;
- evitar o aparecimento de plantas improdutivas ou de elevada incidência de alternância de produção, fato muito comum nos plantios de pés francos, onde, via de regra, cerca de 20% das plantas respondem por 80% da produção;
- melhorar a qualidade da castanha e do pedúnculo adaptando-os para as necessidades do parque industrial, visto que castanhas de tamanho uniforme facilitam a mecanização e reduzem o índice de quebras, e pedúnculos dentro dos padrões determinados (coloração, peso, formato, teores de acidez, tanino, ácido ascórbico, sólidos solúveis, etc.) concorrem para produção de partidas mais homogêneas de sucos e doces, conferindo-lhes mais aceitação comercial.

Para obtenção em escala comercial de mudas através de propagação vegetativa, um dos métodos mais recomendados seria a estaquia. Entretanto, o maior problema deste método, no caso específico de cajueiro, continua sendo difícil enraizamento de estacas. Alguns fitohormônios, como por exemplo IBA (ácido indolbutírico), poderão aumentar a frequência de enraizamento das estacas de cajueiro em condições de casa de vegetação.

PEIXOTO (1960), citado por ALMEIDA (1988), chama a atenção para as dificuldades deste método em razão, principalmente, da falta de conhecimentos técnicos.

Conclui-se que a geração de tecnologias para obtenção vegetativa de mudas, através da cultura de tecidos, poderá desempenhar papel de destaque na cajucultura nacional, uma vez que essa técnica permitirá a propagação rápida e em grande escala de clones com características superiores (EMBRAPA, 1988).

Os experimentos estão sendo realizados na Seção de Radiogenética do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em colaboração com o Departamento de Genética da ESALQ/USP e da Itaqueira Agropecuária S.A. sediada em Fortaleza, a fim de obter grande quantidade de meristemas e sua desinfecção. Recentemente já se obteve plântulas enraizadas "in vitro". Observou-se, também, que plântulas de caju originárias de sementes têm excelente capacidade para produção de gemas laterais após a decapitação da gema apical, o que poderá facilitar a obtenção de meristemas em quantidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais:

- Contribuição ao aumento da produtividade da cultura do cajueiro através da utilização de tecnologia "in vitro".
- Estabelecimento e difusão de inovações tecnológicas no melhoramento de plantas no Brasil.
- Capacitação de pessoal técnico superior e médio em trabalhos de tecnologia "in vitro".

2.2. Objetivos específicos:

- Multiplicação rápida e em grande escala de mudas uniformes e sadias com genótipos superiores de cajueiro através de cultura de meristemas.
- Visa dar continuidade aos trabalhos realizados por ANDO et al. 1989, PASSOS et al. 1989 e ANDO & BORGES, 1990.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Pelo uso de técnicas "in vitro", árvores selecionadas, podem ser propagadas vegetativamente e clonadas com rapidez, onde por métodos convencionais de estaquia, enxertia ou outras práticas silviculturais ou horticulturais poderiam levar anos (BAJAJ, 1986), ou quando não são econômicos ou o número de plantas disponíveis é limitado (NÉMETH, 1986).

A propagação de clones via cultura de meristemas é feita utilizando gemas apicais ou axilares de plantas. Não é tão rápida como a formação de meristemas adventícios (SKOOG & MILLER, 1957), mas é o método mais amplamente usado na indústria de propagação comercial de mudas. Todas as plantas obtidas são geneticamente uniformes, uma vez que se originam diretamente de meristemas pré-existentes ou recentemente formados, sem qualquer interferência do estágio de calo (VASIL & VASIL, 1981).

A cultura de meristemas tem sido extensivamente usada na obtenção e propagação de plantas livres de viroses, onde na realidade se usa o meristema e tecido subjacente formado por alguns primórdios foliares (ABBOTT, 1978). Desde que as células que constituem o meristema são geneticamente estáveis, as plantas regeneradas seriam geneticamente idênticas às plantas doadoras (CHENG, 1978).

Nos meristemas, mecanismos de estrito controle na sequência de síntese de DNA-mitose, junto com as divisões contínuas das células, podem evitar, respectivamente, extra-duplicação de DNA (que produz poliploidia somática) e o aumento de número de células que se submetem a variações espontâneas da estrutura dos cromossomos. Este fato permite a manutenção da estabilidade genética dos tecidos meristemáticos (HANDRO & KERBAUY, 1980).

Segundo NÉMETH (1986), para uma propagação em larga escala bem sucedida, três dificuldades precisam ser superadas: (a) estabelecimento do explante primário em cultura; (b) desenvolvimento de meio de cultura ótimo e condições ambientais para possibilitar altas taxas de multiplicação e (c) indução de raiz e aclimatização dos propágulos depois de transferidos para o solo. Desses estágios, o enraizamento permanece sendo o maior problema em propagação de frutíferas.

Nesta revisão daremos ênfase aos processos de enraizamento e aclimatização, por serem estes, os mais importantes atualmente na pesquisa desenvolvida no CENA, uma vez que as etapas de estabelecimento em cultura e desinfecção já foram superadas.

MURASHIGE (1974) relata que o objetivo do estabelecimento da cultura é simplesmente atingir uma cultura asséptica do tecido da planta em questão. É necessário que a cultura seja livre de infecções, que uma proporção adequada de explantes sobreviva à cultura, e que haja um rápido crescimento dos explantes.

O objetivo máximo da cultura de tecidos, no estágio de multiplicação, é produzir o número máximo de unidades de propágulos úteis em cada incubação de subcultura, sendo a taxa de multiplicação o critério mais importante para o sucesso econômico da propagação da cultura de tecidos (ANDERSON, 1980).

O tamanho do explante utilizado, no caso meristemas, é muito variável, isso ocorre devido a presença de uma maior ou menor parte do tecido do ramo junto ao meristema. Foi observado uma variação de 0,7 mm até 3,0 cm no comprimento do explante utilizado nas culturas de maçã (JONE & HOPGOOD, 1979), *Rubus* sp (JAMES, 1979), entre outras.

Para desinfecção dos explantes, o produto mais utilizado é o hipoclorito de sódio, em várias concentrações, desde 0,5% até 10%, e o tempo de exposição do explante ao produto, desde 10 minutos até 40 minutos.

O hipoclorito de cálcio também tem sido utilizado em *Vitis vinifera*, na concentração de 5%, durante 15 minutos (BARLASS & SKENE, 1980).

O Tween-20 é normalmente usado combinado com outros produtos. Em culturas de maçã, usou-se hipoclorito de sódio 1,3% somado a Tween-20 0,1% durante 10 minutos (LI & EATON, 1984). Em cultura de uva foi usado hipoclorito de cálcio combinado com 0,01% de Tween-20 durante 15 minutos (BARLASS & SKENE, 1980).

Depois de ter sido realizado a desinfecção, os meristemas são lavados em água destilada estéril, normalmente por três vezes, para se eliminar os resíduos dos desinfectantes.

Segundo MURASHIGE (1974), o requerimento de carboidratos tem sido compensado pela incorporação de sacarose na concentração de 2-3%. A glucose tem sido superior à sacarose em alguns casos. As vitaminas incluídas no meio mais comumente usadas são: tiamina, inositol, ácido nicotínico e pirodoxina.

O inositol não é essencial, mas tem sido benéfico (tem ação de "transportar os hormônios exógenos do meio a todo explante) sendo usado na concentração de 80-100 mg/l (MURASHIGE, 1974; HAMMERSCHLAG, 1980; LI & EATON, 1984; BARBOSA et alii, 1986).

ANDERSON (1980) relata que a determinação dos reguladores de crescimento (citocininas e auxinas) e de suas concentrações é de maior importância para desenvolver o meio de cultura apropriado.

No grupo das citocininas incluem: cinetina; N₆-benziladenina (BA); N₆-benzilaminopurina (BAP); N₆-isopenteniladenina (2iP). No grupo das auxinas usa-se: indol-3-ácido acético (IAA); indol-3-ácido butírico (IBA); ácido naftalenoacético (NAA) e 2,4-D ácido diclorofenolacético (2,4-D).

Outra substância usada, que interfere na ação das citocininas e auxinas, é a giberelina. Este hormônio, em presença de luz, inibe a formação de raízes sendo que, na escuridão, em combinação com auxina, estimula o enraizamento.

De acordo com BOUILLENNE (1964), citado por NÉMETH (1986), ortodihidroxiifenóis específicos (cofatores de enraizamento) são produzidos nas folhas sendo translocados para a região de enraizamento, com auxina e polifenoxidasas, dando início a uma estimulação complexa que conduz a uma iniciação e crescimento de primórdios radiculares.

RYUGO e BREEN (1974), citados por NÉMETH (1986), propuseram que a principal função do IBA (a mais efetiva auxina indutora de enraizamento na propagação convencional) é fornecer a conjugação entre os IAA endógenos e aminoácidos que conduzem à síntese de proteínas específicas necessárias para a formação inicial da raiz. Para alongação da raiz, auxinas exógenas não são usualmente requeridas.

Para o enraizamento, relativamente, altas concentrações de cálcio e nitrogênio são essenciais. O cálcio impede o vazamento de auxinas, protetoras do tecido, para o meio nutriente (TRIPANTHI & STONIER, 1971), citados por NÉMETH (1986). Melhores resultados

estão sendo conseguidos com diluições dos macronutrientes em meios de enraizamento (OUOIRIN et al. 1977, SKIRVIN et al. 1980, HAMMERSCHLAG 1982), citados por NÉMETH (1986).

Enraizamento bem sucedido na maioria das frutíferas mostram que as vitaminas do MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) são apropriadas.

O mecanismo de ação do ácido ascórbico, um comum antioxidante e antiescurecedor do meio de cultura ao redor do tecido (SKIRVIN & CHU 1977, ANCORA et al. 1982, citados por NÉMETH, 1986), até o presente momento não é conhecido. Também atua na brotação dos explantes no meio de crescimento (SHARMA & CHANDEL, 1992).

Redução da sacarose para 10-15 g/l foi benéfico para algumas espécies (AYNSLEY 1978, LEPOIVRE 1978, SRISKANDARAHAJ & MULLINS 1981, ZIMMERMANN 1983, citados por NÉMETH, 1986). A maioria dos experimentos são conduzidos com 20-30 g/l de sacarose no meio, para manutenção da fonte de energia e como agente osmótico.

O pH do meio pode variar dependendo da espécie cultivada "in vitro", além de sofrer mudanças com o decorrer do tempo, com as concentrações de nutrientes e com as taxas de crescimento das plantas (LEIFERT et al. 1992).

Estimulação ou inibição da indução de raízes por compostos fenólicos é devido as suas interações com auxinas. Atenção especial tem sido dada ao florizina e ao floroglucinol desde que JONES (1976) reportou a estimulação do broto e formação de raízes em maçãs. O efeito sinérgico entre auxina e floroglucinol é influenciado também por luz, mas não pela temperatura entre 22-29°C (NÉMETH, 1986). O papel principal desses compostos seria auxiliar na manutenção de elevados teores endógenos de IAA, agindo como substrato alternativo para a IAA-oxidase, além de estimular a síntese de IAA (GRATTAPAGLIA & MACHADO 1990).

A concentração de ágar nos experimentos de enraizamento variam de 0 (meio líquido) à 0,9%, usualmente é de 0,6-0,8%. Diminuindo-se a concentração de ágar faz-se a viabilidade dos nutrientes e hormônios melhorar, mas aumenta-se a evaporação da água do meio (NÉMETH 1986, DEBERGH & MACHADO 1991) e os problemas com vitrificação (GASPAR et al. 1982, PÂQUES 1991).

A utilização de carvão ativado no meio de cultura é indicado para absorção de inibidores de crescimento, promoção de

raízes, absorção de fenóis produzidos por tecidos seccionados, absorção do 5-hidroxi metilfurfural produzido pela sacarose autoclavada, de impurezas do ágar, e do etileno da fase gasosa das culturas. Também absorve componentes do meio, tal como, vitaminas, ácido ascórbico, citocininas e auxinas (NÉMETH, 1986).

Trabalho recente concluiu que o carvão ativado estimulou a hidrólise da sacarose durante a autoclavagem. Mais de 95% da sacarose autoclavada com 1% de carvão ativado foi transformada em frutose e glucose. As consequências para o meio de cultura de tecidos foram: diminuição do pH, principalmente devido as reações específicas da frutose: diminuição da rigidez do meio gelatificado e aumento do potencial osmótico, em função da formação de frutose e glucose (DRUART & De WULF, 1993).

A fixação de auxina pelo carvão atua beneficemente no alongamento de raízes que crescem rápido com boa ramificação, mantendo uma cor mais clara do que quando expostas à luz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

Os reguladores de crescimento de plantas, também conhecidos como fitohormônios, são substâncias químicas envolvidas no controle do desenvolvimento de plantas. O uso desses hormônios tem sido questionado ultimamente, pois os componentes reguladores do crescimento não são necessariamente sintetizados nos seus sítios de ação.

Segundo NÉMETH (1986), é comum o uso na micropropagação, da auxina natural IAA e das auxinas sintéticas NAA e IBA para enraizamento. Auxinas sozinhas ou com citocininas, GA³, ABA e fenólicos exercem efeitos principalmente nas fases de indução e iniciação dos primórdios radiculares.

De acordo com LIEVENS et al. (1989), a presença de IBA (2 mg/l) combinado com tratamento no escuro por 10 dias, permitiu a obtenção de uma taxa de enraizamento de cerca de 30% para *Anacrdium occidentale* L.

Já D-SILVA & D-SOUZA (1992), o meio de enraizamento de caju que obteve melhores resultados foi o suplementado com 2,9 micromoles de IAA e 4,9 micromoles de IBA.

O meio básico para micropropagação do cajueiro é o MS ou variantes deste. O meio Schenk & Hildebrandt foi utilizado por LEVA & FALCONE (1990) com bons resultados.

HALDEMAN & MCKAMY (1987), observaram que o componente ativo do benomyl, 2-benzimidazole carbamic acid methyl ester, se degrada quando autoclavado. Testes com explantes de árvores no campo serão conduzidos com fungicida filtrado (Benomyl) em concentrações de 1 a 4 g/l e antibiótico filtrado (Rifampicina) em concentrações de 5 a 15 g/l.

A cultura de tecidos de plantas também requer luz, mas em menor grau, para manter os processos morfoгенéticos. A luz exerce influência através de três parâmetros: fotoperíodo; intensidade e qualidade do espectro. A luz nem sempre é benéfica para a iniciação do enraizamento e desenvolvimento de raízes. Dependendo da espécie, a utilização de luz, ou do escuro na etapa inicial de enraizamento pode ser fundamental para o sucesso desse estágio (ECONOMOU & READ 1987, NEMETH 1986).

Segundo DEBERGH (1991), o mais importante fator controlador do sucesso na transição de plantas ou brotos de condições "in vitro" para "in vivo" são as qualidades intrínsecas da planta.

O processo de aclimatização das plântulas enraizadas de cajueiro, segundo trabalhos anteriores realizados no CENA, apresentou problemas de adaptação dos explantes. A utilização de vermiculita "in vitro", resultou em plântulas necrosadas e mortas. A técnica obteve baixa eficiência.

Trabalhos recentes utilizando a técnica de hidroponia com solução nutritiva de JOHNSON (JOHNSON et al., 1957) estão sendo conduzidos no CENA, com ótimos resultados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

1) Estão sendo utilizadas, neste projeto, sementes de plantas matrizes com boa produtividade, pertencentes ao Centro Nacional de Pesquisa de Caju. (CNPQ), EMBRAPA, em Fortaleza.

2) Os meristemas são excisados a partir de gemas apicais e gemas laterais de plântulas originárias das sementeiras realizadas em caixas de madeira com vermiculita.

3) Para desinfecção dos explantes (meristemas), é adotada tecnologia já estabelecida pelo bolsista, na qual consiste em: a) tratamento rápido com álcool (70%); b) imersão das gemas apicais e laterais, por 5 e 15 minutos respectivamente, em solução de hipoclorito de sódio (2:1) e Tween-20 (0,05%).

4) O meio de crescimento de meristemas é constituído basicamente dos seguintes componentes:

-macro e micronutrientes do meio MURASHIGE & SKOOG;

-vitaminas (mg/l):

meso-inositol	100,0
tiamina	0,2
piridoxina	1,0
ácido nicotínico	1,0

-hormônios (mg/l): experimentos já realizados comprovam melhores resultados com BAP (benzilaminopurina) na concentração de 1,0 mg/l.

-sacarose 30,0 g/l

-agar-agar 7,0 g/l

-carvão ativado 2,5 g/l

O pH inicial do meio é ajustado a 5,7 a 5,9.

SESSO, M.C.

5) O meio de enraizamento é constituído basicamente dos seguintes componentes:

- metade de macro e micronutrientes do meio MS

- vitaminas (mg/l):

meso-inositol	100,0
tiamina	0,2
piridoxina	1,0
ácido nicotínico	1,0

- hormônios:

NAA (ácido naftalenoacético) ou
 IAA (ácido indolacético) ou
 IBA (ácido indolbutírico)
 todos na concentração de 0 a 3 mg/l

- sacarose 10,0 g/l

- agar-agar 7,0 g/l

- carvão ativado 2,5 g/l

O pH inicial do meio é ajustado a 5,7 a 5,9.

6) Os antioxidantes utilizados são:

- ácido ascórbico filtrado nos meios de crescimento e enraizamento na concentração de 100 mg/l.

- cisteína filtrada na repicagem dos explantes na concentração de 100 mg/l.

7) As plântulas enraizadas são removidas para potes plásticos com solução nutritiva de JHONSON diluída a 1/10, com sistema de arejamento.

8) Após crescimento suficiente das raízes, as plântulas são removidas para vasos com terra preparada (6 terra : 3 esterco : 1 areia).

5. DADOS E CONCLUSÕES

5.1. Fontes de explante e contaminação

Ao decorrer do projeto as gemas apicais apresentaram bom desempenho como fonte de explante. Isso, porém, só foi comprovado após vários experimentos, quando houve uma mudança na manipulação das gemas. Alguns folíolos de cerca de 3-4 mm de comprimento foram mantidos recobrando o meristema apical, ao invés de serem todos retirados. Observa-se que esse foi um dos fatores que contribuíram para o bom desenvolvimento inicial dos explantes. Por outro lado, devido a essa maior quantidade de tecido mantida junto ao meristema, notou-se maior taxa de contaminação dos meios de cultura.

Houve também uma dificuldade grande em contornar a contaminação encontrada quando são utilizadas gemas laterais como explantes. Apesar de mostrarem bom potencial, esse não foi aproveitado devido ao insucesso na sua desinfecção. Método recentemente desenvolvido pelo bolsista, já descrito acima, diminuiu a taxa de contaminação de 70-100% para 15-35%.

O problema de contaminação foi acentuado proporcionalmente ao aumento da idade do material coletado em estufa. Testes preliminares realizados com explantes retirados de uma planta adulta, demonstraram a necessidade de se determinar uma metodologia eficaz de desinfecção desse tipo de explante. Como o objetivo do trabalho é a propagação vegetativa "in vitro" de plantas adultas de cajueiro, torna-se latente tal necessidade.

5.2. Oxidação

No início dos trabalhos, a oxidação foi um problema difícil de ser superado. Recentemente começamos a obter bons resultados com o uso do ácido ascórbico filtrado na concentração de 100 mg/l.

A incubação inicial no escuro à baixa temperatura, trocas periódicas do meio de cultura, a cada 15 dias, com limpeza

das partes oxidadas utilizando estilete de vidro, em solução antioxidante de cisteína 200 mg/l, e a presença de carvão ativado, escurecendo o meio evitando a ação oxidativa da luz, demonstraram ser co-fatores na superação da oxidação. Problema esse que parece ser causado pelos altos teores de polifenol tanino na planta do cajueiro.

Convém apontar que, a oxidação somente tem causado a morte do broto nos seus estádios iniciais de desenvolvimento. A partir de um certo momento (duas folhas desenvolvidas), pode limitar o crescimento ou inibir o enraizamento.

4.3. Enraizamento

Como citado no item anterior, observou-se que um dos fatores que contribuiu para o enraizamento foi o carvão ativado, impedindo o acúmulo de compostos oxidados na base das plântulas, evitando a ação oxidativa da luz e absorvendo substâncias tóxicas do meio (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1990).

O hormônio IBA 1.0 mg/l proporcionou um bom enraizamento, porém foi preciso manter a plântula nesse meio de cultura apenas por duas semanas, pois um período causou necroses nas folhas. Interessante notar que, em algumas ocasiões, somente com o desenvolvimento normal do explante, ocorreu enraizamento, sem a necessidade da auxina exógena. Isso comprova o que GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990) relatam. Observaram que as zonas produtoras de auxina não são propriamente os meristemas, e sim os primórdios foliares e as folhas em expansão. Isto poderia explicar a razão pela qual a auxina não é muito necessária quando gemas maiores são utilizadas para cultivo. Justamente o que passou a ser realizado mais recentemente, proporcionando um melhor enraizamento e possibilitando a transferência das plântulas para o solo.

Possaltamos ainda que a porcentagem de enraizamento nos últimos experimentos não é muito expressiva (10-20%), devido as taxas ainda altas de contaminação. Porcentagem essa, que seria maior caso fosse calculada levando-se em conta apenas os explantes, não contaminados, que desenvolvessem no meio.

4.4. Transplante e Aclimatização

Três fatores têm sido detectados como decisivos para o sucesso da aclimatização das plântulas de cajueiro: 1) ótimo desenvolvimento de raízes antes do transplante; 2) umidade relativa do ambiente; 3) substrato de transplante que combine uma boa retenção de umidade, com drenagem e aeração do sistema radicular.

A morte das plântulas transplantadas ao solo, após um período de aclimatização "in vitro", com vermiculita autoclavada, foi causada por um ineficiente controle da umidade ambiental, como também, um solo que não proporcionou uma drenagem e aeração adequadas. Experimentos mais recentes estão sendo conduzidos com a utilização de soluções nutritivas na fase de aclimatização. Bons resultados obtidos mostram que tal metodologia poderá ser empregada em programas de obtenção de mudas micropropagadas de cajueiro.

6. LITERATURA CITADA

- ABBOTT, A.T. 1978. Practice and promise of micropropagation for woody species. Acta Horticulturae. 79: 113-127.
- ALMEIDA, J.I.L. 1988. Multiplicação Vegetativa. In Lima, V.P.M.S.; Ramos, A.D.; França, F.M.C.; Almeida, J.I.L.; Barros, L.M.; Teixeira, L.M.S.; Frota, P.C.E.; Telles, P.R.S.; Melo, Q.M.S.; Cavalcante, R.D. A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. Fortaleza, Banco do Nordeste do Brasil, cap. 6, p. 127-131.
- ANDERSON, W.C. 1980. Mass Propagation by Tissue Culture: Principles and Techniques. Proceedings of the Conference on Nursery Production of Fruit Plants Through Tissue Culture - Applications and Feasibility. Beltsville, 21 a 22 de abril, p. 1-10.
- ANDO, A., BORGES, R.W.M. 1990. Propagação vegetativa de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) através de cultura "in vitro" de meristemas. In: 10º Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Ciências Agrárias. Fortaleza. pg. 100.
- ANDO, A., BORGES, R.W.M., YAMANE, Y, TULMANN NETO, A., MENDAS, B.M.J. 1991. Multiplicação de mudas de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) através de cultura "in vitro" de meristemas. In: Annual Meeting of the Brazilian Genetics Society. 37. Caxambu, 1991. Program and abstracts. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 1991. p.209.
- BAJAJ, Y.P.S. 1986. Biotechnology of tree improvement for rapid propagation and biomass energy production. In: Bajaj Y.P.S. (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry I Trees I. Springer-Verlag, Berlin. 1-23.

- BARLASS, M. & SKENE, K.G.M. 1980. Studies on the Fragmented Shoot Apex of Grapevine. Journal of Experimental Botany, 31 (121), 483-488.
- BARBOSA, W.; DALL, R.T.O., F.A.C.; OJIMA, M.; CAMPOS, S.A.F.; TOMBOLATO, A.F.C. 1986. Micropropagação Vegetativa das madeiras "rainha" e "gala". O Agrônômico, 38 (1), 45-47.
- CHENG, T.Y. 1978. Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques. Proc. Int. Plant Propagator's Soc. 28:139-155.
- DEBERGH, P.C. 1991. Acclimatization Techniques of plants from in vitro. In Plant Biotechnology. Acta Horticulturae 289:291-300.
- DEBERGH, P.C. & BERUTO, M. 1991. Differences in availability to water to in vitro cultures using different brands of agar. In Plant Biotechnology. Acta Horticulturae. 289:331-333.
- DRUART, Ph. & De WULF, D. 1993. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32:97-99.
- D-SILVA, I. & D-SOUZA, L. 1992. In vitro propagation of *Anacardium occidentale* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 29:1-6.
- ECONOMOU, A.S. & READ, P.E. 1987. Light Treatments to Improve Efficiency of in vitro Propagation Systems. HortScience. 22 (5). 751-754.
- GASPAR, T., KEVERS, C. & DEBERGH, P. 1987. Vitrification morphological, physiological and ecological aspects. In Bonga, J.M., Durzan, D.J. (eds), Cell and Tissue Culture in Forestry, vol I. Dordrecht, Holland, Martinus Nijhoff Publishing, 152-166.

- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. 1990. Micropropagação. In: Técnicas e Aplicações de Cultura de Tecidos de Plantas. Torres, A.C. & Caldas, L.S. (eds). ABCTP/SMBRAPA-CNPq. Brasília. 99-169.
- HALDEMAN, J.H., THOMAS, R.L. & MCKAMY, D.L. 1987. Use of Benomyl and Rifampicin for in Vitro Shoot Tip Culture of *Camellia sinensis* and *C. japonica*. HortScience, 22 (2). 306-307.
- HAMMERSCHLAG, F. 1980. Peach Micropropagation. Proceedings of the Conference on Nursery Production Fruit Plants Through Tissue Culture - Applications and Feasibility. 21 a 22 de abril. Beltsville, 48-52.
- HANDRO, W. & KERBAUY, G.B. 1980. Obtenção de plantas modificadas utilizando a cultura de tecidos e células vegetais. Ciência e Cultura. 33: 790-797.
- JAMES, D.J. 1979. The role of auxins and phloroglucinol in adventitious root formation in *Rubus* and *Fragaria* grown in vitro. Journal of Horticultural Science, 54 (4). 273-277.
- JOHNSON, C.M., STOUT, P.R., BROYER, T.C. & CARTON, A.B. 1957. Comparative chlorine requirement of different plant species. Plant and Soil. 8: 337-353.
- JONES, O.P. & HOPGOOD, M.E. 1979. The successful propagation in vitro of two rootstocks of *Prunus*: the plum rootstock Pixy (*P. insititia*) and the cherry rootstock F12/1 (*P. avium*). Journal of Horticultural Science, 54 (1), 63-66.
- JONES, O.P.; PONTIKIS, C.A.; HOPGOOD, M.E. 1979. Propagation in vitro of five apple scion cultivars. Journal of Horticultural Science, 54 (2). 155-158.

- KNEIFEL, W. & LEONHARDT, W. 1992. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 29: 139-144.
- LEIFERT, C., PRYCE, S., LUMSDEN, P.J. & WAITES, W.M. 1992. Effect of medium acidity on growth and rooting of different plant species growing in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 30: 171-179.
- LEVA, A.R. & FALCONE, A.M. 1990. Propagation and organogenesis in vitro of *Anacardium occidentale* L. In: Janick J, Zimmerman R.H. (Eds). In vitro culture of horticultural breeding. Acta Horticulturae. 280: 143-145.
- LI, J. & EATON, G.W. 1984. Growth and Rooting of Grapes Shoot Apices in vitro. HortScience. 19 (1), 64-66.
- LIEVENS, C., PYLSER, M. & BOXUS, Ph. 1989. First results about micropropagation of *Anacardium occidentale* by tissue culture. Fruits. 44: 553-557.
- LIMA, V.P.M.S. 1988. Notas do Organizador. In: LIMA, V.P.M.S.; RAMOS, A.D.; FRANÇA, F.M.C.; ALMEIDA, J.I.L.; BARROS, L.M.; TEIXEIRA, L.M.S.; FROTA, P.C.E.; TELLES, P.R.S.; MELO, O.M.S.; CAVALCANTE, R.D. A Cultura do Cajueiro no Nordeste do Brasil, p. 9-11.
- MARTINELLI, L., SCIENZA, A. & SY, M.D. 1991. In vitro organogenesis and regeneration in cashew (*Anacardium occidentale* L.). In Plant Biotechnology. Acta Horticulturae. 289: 267-268.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.

- NÉMETH, G. 1986. Induction of rooting. In: Bajaj Y.P.S. (Ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry 4 Trees I. Springer-Verlog, Berlin. 49-64.
- PAQUES, M. 1991. Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects. In Plant Biotechnology. Acta Horticulturæ. 289: 283-289.
- PASSOS, R.C.S., TULMANN NETO, A., ANDO, A. & MENDES, B.M.J. Cultura de meristemas de caju (*Anacardium occidentale* L.). In: Reunião Paulista de ICCA, 1. Congresso de Iniciação Científica da ESALQ, 4. Piracicaba, 1989. Resumos. Piracicaba, ESALQ, 1989. p.86.
- PHILIP, V.J. 1984. In vitro organogenesis and plantlets formation in cashew (*Anacardium occidentale* L.). Annals of Botany. 54: 149-152.
- SHARMA, N. & CHANDEL, K.P.S. 1992. Effects of ascorbic acid on axillary shoot induction in *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 29: 109-113.
- SKOOG, F. & MILLER, C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultivated in vitro. In Biological Action of Growth Substances. 11th Symp. Soc. Exp. Bot. 11: 118-131.
- VASIL, I.K. & VASIL, V. 1981. Clonal propagation. International Rev. of Cytology. Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. 145-173.

VARIAÇÃO SOMACLONAL VISANDO
A TOLERÂNCIA A SALINIDADE

Sandro Alves Lima

Departamento de Genética
ESALQ/USP

VARIACAO SOMACLONAL

Muitos cientistas têm sugerido as técnicas de cultura de células como uma possível maneira de aumentar a tolerância ao sal das plantas superiores (DIX, 1980; LARKIN & SCOWCROFT, 1981; NABORS, 1983; DOWNTON, 1984; HANSON, 1984; STAWAREK & RAINS, 1984; RAGAWA RAM & NABORS, 1985).

As vantagens do uso de técnicas de cultura de células sobre os métodos tradicionais de melhoramento são:

1. variação nos genótipos pode ser gerada durante a cultura
2. muitos genótipos podem ser avaliados e selecionados no laboratório usando pouco espaço
3. o tempo entre as gerações pode ser reduzido
4. o ambiente pode ser controlado
5. características celulares podem ser "mascaradas" na planta

Os primeiros relatos publicados descrevendo o sucesso dos métodos de crescimento *in vitro* de tecidos de cenoura e tabaco foram em 1939.

Observou-se que ciclos de cultura de tecido aumentam a variação genética e citogenética durante a exposição de células ao crescimento *in vitro*.

Esta variação tem sido denominada variação somaclonal (LARKIN & SCOWCROFT, 1981).

A natureza, extensão e possível origem da variação somaclonal tem sido muitas vezes relacionada como uma variação ou alteração cromossômica ocorrida durante a cultura.

Desta maneira algumas "verdades" sobre a variação somaclonal *in vitro* e fatores que afetam sua ocorrência foram formuladas:

- algumas variações citológicas podem preexistir nos explantes (especialmente nas espécies polissomáticas);
- o tipo de explante utilizado;
- regime de cultura e componentes do meio (especialmente os reguladores de crescimento);

Processo que envolve o estabelecimento de células diferenciadas ou tecidos em cultura sob condições definidas, proliferando por um número de gerações de células e subsequente regeneração de plantas.

- duração do período de crescimento, *in vitro*;
- correlação entre estabilidade cromossômica e capacidade de regeneração de células;

- crescimento desorganizado de calos e estabilidade de culturas derivadas de meristemas .

Esta variação "gerada" pelo uso de ciclos de cultura de tecidos pode ser estimulada por sete diferentes técnicas:

- a) ciclos de cultura de longo termo (longa duração);
- b) ciclos de cultura de protoplastos;
- c) ciclos de cultura de calo;
- d) uso de explantes de tecidos específicos;
- e) geração ao acaso de variação concomitante com seleção de nutriente específico ou formulação hormonal do meio;
- f) uso de genótipos que tendem naturalmente a gerar maior variação.

As diferentes técnicas que podem "gerar" a variação somacional:

A) Ciclo de Cultura de Longo Termo

Alterações na estrutura cariotípica aumentam sua ocorrência com o aumento do tempo de cultura, mas plantas regeneradas podem, usualmente, não refletir a totalidade de anormalidades relatadas, indicando que alguma seleção anterior para regeneração ocorre normalmente.

B) Ciclo de Cultura de Protoplastos

As primeiras plantas regeneradas de ciclos de cultura de protoplastos apresentavam alterações na morfologia, número de cromossomos e na fertilidade.

C) Ciclo de Cultura de Calos

É a principal via para o surgimento ou "criação" da variação genética via cultura de tecidos.

A replicação do DNA e a divisão celular são estritamente controladas, e células com habilidade de reprodução danificada (defeitos genéticos) são eliminadas pela competição com as células normais.

SIBI (1976) obteve plantas regeneradas de alface que apresentavam alterações na morfologia, e sua progênie mostrou alterações para características da folha, desenvolvimento de gemas axilares e cor da folha.

Acredita-se que plantas derivadas de calos podem apresentar variação preexistente na planta ou uma variação acumulada das células indiferenciadas durante o período de cultura.

D) Cultura de um Tecido Específico

O tipo de explante utilizado pode afetar a quantidade e o tipo de variação produzida.

VAN HARTEN (1981) trabalhando com batata observou que 12,3% de variação no fenótipo de plantas regeneradas de calos de discos foliares e 50,3% de variação quando as plantas regeneradas vieram da raquis e do pecíolo.

E) Variação concomitante com Seleção Celular Bioquímica

Através do uso de sistemas de seleção nos quais alterações podem ser induzidas por mutagenese ou ocorram aleatoriamente.

F) Efeitos do Meio de Crescimento e de Hormônios

BAYLISS (1980) estudou os efeitos do meio e dos hormônios, particularmente do 2.4D

G) Resposta Genotípica

Sob procedimentos para manipulação em cultura e regeneração cuidadosamente controlados, variabilidade entre plantas regeneradas pode ser dependente do genótipo.

"ORIGENS" DA VARIAÇÃO SOMACLONAL

LARKIN & SCOWCROFT (1981) dividiram as possíveis origens para variação em sete categorias

- ⇒ alterações no cariótipo;
- ⇒ reorganizações cromossômicas ocultas;
- ⇒ transposons;
- ⇒ reorganização dos genes somáticos;

- amplificação e depleção gênica;
- crossing-over e mudanças nas cromátides irmãs;
- eliminação virótica oculta;

1) Aberrações cromossômicas em cultura de células e plantas regeneradas

Variações no número e na estrutura de cromossomos têm sido observadas em cultura de células e em plantas regeneradas.

Estudos mostraram que mudanças na estrutura cromossômica têm maior reflexo na frequência e extensão das alterações do cariótipo. Deste modo, eventos que levam a quebra dos cromossomos, e em algumas ocasiões subsequente troca ou reunião de fragmentos, parecem ser de grande importância.

Ânalises da posição e distribuição dos pontos de quebra cromossômica sugerem que os rearranjos podem envolver cromossomas específicos ou regiões do cromossoma, particularmente regiões envolvendo heterocromatina, e principalmente a região entre a heterocromatina e o centrômero.

No caso do milho, observou-se, no cromossoma que contém a região do organizador nucleolar, 51% de translocações.

BRETTELL *et alii* (1986) disse que variação em blocos de heterocromatina tem sido a aberração predominante em plantas regeneradas de triticales.

Possíveis origens dos rearranjos cromossômicos e cultura de tecidos:

* Replicação Tardia da Heterocromatina

Qualquer perturbação que afete o sincronismo entre replicação do cromossomo durante a fase S e divisão da célula pode resultar em aberração cromossômica, e assim as regiões heterocromáticas que replicam mais tardiamente que segmentos eucromáticos são mais vulneráveis as flutuações no ciclo.

Mc COY *et alii* (1982) propôs que a alta frequência de cromossomas telocêntricos em plantas regeneradas de aveia podem ser o resultado de uma tardia ou retardada replicação de heterocromatina pericentromérica, levando a pontes ou rupturas na anáfase.

Contudo as relações entre replicação tardia e sítios de ruptura ainda não são bem conhecidas.

RHODES & DEMPSEY (1973) observaram citologicamente e geneticamente que as rupturas ocorrem entre o "knob" heterocromático e o centrômero em cromossomas B de milho.

* Desbalanço no pool de nucleotídeos

Os conjuntos intracelulares de deoxiribonucleotídeos (dNTP) têm uma importante influência na fidelidade de vários componentes no metabolismo do DNA de eucariotos e procariotos, incluindo precursores de biossíntese, replicação, reparo, recombinação, e possivelmente degradação.

O desbalanço no pool pode ter consequências genéticas sérias que incluem mutações nos cloroplastos e mitocôndrias nucleares, recombinação mitótica, aberrações cromossômicas (estrutural), aneuploidia, troca entre cromátides irmãs, aumento de sensibilidade à mutagênicos e transformação oncogênica.

Células vegetais em meio de cultura podem ser especialmente susceptíveis ao desbalanço porque elas periodicamente são transferidas de um meio exaurido para um meio fresco, no qual há uma aceleração das divisões celulares em função dos elevados níveis dos componentes no meio fresco.

* Recombinação Mitótica

Várias formas de recombinação mitótica, incluindo crossing-over e trocas entre cromátides irmãs, podem produzir diversos tipos de rearranjos cromossômicos observados na cultura de tecidos, especialmente entre assimétricos ou entre cromossomos não homólogos.

O restabelecimento de setores homocigotos de tecidos de progenitores heterocigotos é uma possível consequência de recombinação mitótica.

* Ativação oculta de Elementos Transposons

LARKIN & SCOWCROFT (1981) incluem o envolvimento de elementos transposons como causa de variação.

No caso do milho, EVOLA *et alii* (1985) e PESCHKE *et alii* (1987), observaram que possivelmente a ativação dos elementos tem origem na ruptura e rearranjo dos cromossomos durante o ciclo de cultura.

* Ruptura dos cromossomas

Sua possível origem está relacionada com a existência de estoques de cromossomas com arranjo especial, exposição à radiação e presença de cromossomas B.

* Origem de variantes qualitativas

Uma manifestação comum de variação somaclonal é a ocorrência de variantes de genes simples, segregando entre progênies de plantas regeneradas.

Observações em milho, tomate e arroz indicam que a maioria dos variantes exibem clássica herança recessiva mendeliana.

A ocorrência de alelos instáveis tem sido um dos contrastes associados com atividade de elementos transposons.

LEE & PHILLIPS observaram que variantes génicas simples têm sido as que mais exibiram estabilidade após várias gerações.

As análises de sequências de alelos progenitores, mutantes insercionais e retrocesso de alelos têm demonstrado que a ocorrência de sítios mutantes podem incluir pequenas deleções do DNA hospedeiro adjacente ao sítio de inserção do transposon. A deleção pode ou não acompanhar a excisão dos elementos transposons.

Rearranjamento Cromossômico em Relação a outras formas de Variação Somaclonal

A replicação tardia da região heterocromática leva à formação de pontes e rupturas nos cromossomas, ocorre então o rearranjamento, este promove a ativação dos elementos transposons que podem se inserir ou ser excisados dos sítios, em função disso pode ocorrer a mutação.

MORFOLOGIA DE PLANTAS REGENERADAS

Há uma correlação entre o número e estrutura de cromossomas com a ocorrência de anormalidades morfológicas, fisiológicas e no crescimento de plantas regeneradas, assim a ocorrência de quebras e posterior reunião dos fragmentos podem produzir duplicações, deleções e trocas recíprocas ou não recíprocas.

SALINIDADE

A literatura tem mostrado que o excesso de sal exerce efeitos tóxicos e nutricionais prejudiciais a planta, e também "stress" hídrico.

O aumento da tolerância ao sal de cultura de células raramente tem conduzido ao aumento de tolerância ao sal em plantas regeneradas.

Muitos pesquisadores têm sugerido técnicas de cultura de células como um possível método para aumentar a tolerância ao sal de plantas superiores (DIX, 1980; LARKIN & SOWCROFT, 1981; NABORS, 1983; DOWNTON, 1984).

MECANISMOS DE ADAPTAÇÃO DAS PLANTAS AO EXCESSO DE SAL

Após o curso de um certo número de gerações de células crescendo em meio salino "surgem" células que são capazes de "adaptar-se" ao excesso de NaCl.

Os mecanismos para esta aparente adaptação não são bem conhecidos mas podem ser devidos a :

- * seleção para expressão de genes particulares;
- * seleção de células variantes;
- * ou adaptação fisiológica que persiste enquanto a célula permanece em meio com sal.

Observou-se que a retomada da taxa relativa de crescimento das células, após gerações em cultura, ocorre quando as células são mantidas em cultura com baixas concentrações de NaCl no meio.

Normalmente cultura de células de plantas halofíticas (resistentes ao "stress" hídrico) são mais tolerantes ao sal do que plantas não halofíticas, provavelmente devido a ocorrência de diferenças na fisiologia celular como, por exemplo, compartimentação seletiva de NaCl em vacúolos pelas halofíticas.

Geralmente os níveis necessários de NaCl para inibir a taxa relativa de desenvolvimento para 50% foi similar para a cultura de células e para a planta da mesma espécie.

Em alguns casos a menor tolerância na cultura de células do que na planta pode ser devida a maior pressão osmótica no meio basal do que no solo.

Por outro lado a maior tolerância ao NaCl em cultura de células do que em plantas pode ser devida a abundância de açúcares presentes no meio de cultura (solutos orgânicos) que podem contribuir para a regulação da pressão osmótica interna das células (FLOWERS *et alii*, 1985) e também porque as células em cultura crescem de 2 a 7 vezes mais lentamente do as células na zona de expansão radicular (BAYLISS, 1985) as quais não teriam rapidez suficiente para que seus mecanismos de adaptação atuassem.

RELAÇÕES ÁGUA

Elevadas concentrações de NaCl no meio levam a um aumento da pressão osmótica, assim a célula deve sofrer ajustes para manter o volume e a pressão de turgor (P) positiva a fim dar continuidade ao seu desenvolvimento.

* REGULAÇÃO DO TURGOR

Pode ser um mecanismo para limitar mudanças na concentração interna de solutos enquanto que a taxa de expansão é mantida por propriedades da parede celular.

Os meios utilizados para a regulação da pressão de turgor são a hidrólise de componentes de grande peso molecular como carboidratos (amido) e proteínas e também a redução da respiração.

* CONCENTRAÇÃO INTERNA DE SOLUTOS

A concentração interna de solutos não presentes no meio de cultura pode ser subestimada em cerca de 50% quando o volume de espaços livres não é considerado. Por outro lado concentrações de solutos que ocorrem em altas concentrações no meio como K e glucose podem ser superestimados se as células não forem lavadas. Estes problemas são comuns com dados de cultura de células.

Sabe-se que Na e Cl podem ser compartimentalizados no vacúolo de células de plantas halofíticas, ocorrendo o mesmo com açúcares.

Já K, Ca e açúcares podem ter suas concentrações internas aumentadas quando as células estão na presença de potencial osmótico elevado, visando a manutenção da pressão de turgor.

Porém o mecanismo de desenvolvimento da pressão osmótica em células "adaptadas" ao NaCl ainda é incerta.

A seletividade na absorção de K e Na pode estar envolvida na "adaptação" ao alto NaCl (Hajibagheri et alii, 1987).

Observou-se que também pode ocorrer deslocamento de íons e não a compartimentação, pois na planta o relacionamento existente entre a composição da solução do solo e a solução que banha as folhas pelo fluxo transpiratório é diferenciado entre plantas halofíticas e não halofíticas, enquanto que as células de ambas não apresentam muitas diferenças quando em cultura.

PROBLEMAS DO USO DE AÇÚCARES NO MEIO

O uso de açúcares no meio de cultura pode originar alguns problemas, sendo os principais:

- alterações nas concentrações externas de açúcares podem afetar a concentração interna de açúcares, visto que eles são usados no ajuste da osmoticidade;

- o suprimento de açúcares pode conferir tolerância ao sal às plantas em cultura do que as células na planta;

- o uso dos açúcares pela planta para manter a pressão de turgor poderá se refletir em 30% de queda na taxa de desenvolvimento das células;

- a redução do Na e Cl pode resultar em células mais susceptíveis à deficiência hídrica causada por altas concentrações de íons na parede celular.

Assim a respeito da salinidade pode-se dizer que:

- 1) Respostas da planta ao alto NaCl estão relacionadas com o funcionamento integral da planta

- 2) Tipos selecionados em cultura de células podem ter a expressão relacionada ao meio (nutrientes e hormônios) em que as células crescem individualmente

- 3) Cultura de células crescem mais lentamente do que as células na zona de expansão das raízes

- 4) Cultura de células dispõem de abundante suprimento de açúcares que podem ser usados na "adaptação" ao alto NaCl.

VARIAÇÃO SOMACLONAL VISANDO A TOLERÂNCIA À SALINIDADE

A variação somaclonal é uma alternativa para a incorporação de diversidade genética em culturas que apresentam pequena tolerância ao sal.

O uso da seleção *in vitro* é feita empregando-se o sal (NaCl) como agente seletivo, mas nem sempre a tolerância ao sal a nível celular pode representar o comportamento da planta como um todo.

Assim algumas considerações devem ser feitas quanto a seleção para tolerância ao sal *in vitro* :

- tipo de agente seletivo, usualmente é o sal
- quantificação da tolerância da cultura
- fatores que afetam a seleção
 - . concentração do agente seletivo
 - . fonte de explante
 - . densidade de inóculo
 - . fase de desenvolvimento da cultura
- perda da capacidade de regeneração das células em cultura

REGENERAÇÃO DE PLANTAS E MECANISMOS DE TOLERÂNCIA

O ajuste osmótico ao "stress" d'água imposto pela presença de sal a fim de manter o turgor necessário ao crescimento, é conseguido em plantas halófitas através do deslocamento e/ou compartimentação no vacúolo de ions e através da síntese de solutos orgânicos no citoplasma.

As células da planta tornam-se tolerantes como resultado de uma adaptação fisiológica e não de uma seleção de células variantes.

Por isso células que ficaram na ausência do agente seletivo, após terem passado por subculturas onde ele estava presente, retomam seu crescimento mas perdem sua tolerância.

Porém há relatos de cultura de células que mantiveram a tolerância ao sal nas subculturas onde o sal não estava presente,

Trabalhos mostram que repetidas subculturas de calos ou culturas de suspensões celulares podem levar ao declínio ou perda da capacidade regenerativa

indicando que são estáveis, ou seja, esta tolerância é devida a componentes genéticos e epigenéticos

A literatura tem reportado alguns casos de cultura de células tolerantes ao sal

ESPÉCIE	Nível de tolerância ao sal	REFERENCIA
<i>Capsicum annuum</i>	1%	Dix & Street (1975)
<i>Cicer arietinum</i>	2,5%	Gosal & Bajaj (1984)
<i>Cicer arietinum</i>	100 mM	Pandey & Ganapathy (1984)
<i>Citrus aurantium</i>	10 g/L	Kochba(1982)
<i>Citrus sinensis</i>	0.2 M	Ben-Hayyim & Kochba (1982)
<i>Citrus sinensis</i>	10 g/L	Kochba et alli (1982)
<i>Coffea arabica</i>	1%	Yasuda et alli (1982)
<i>Crepis capillaris</i>	0.7%	Sobko et alli (1981)
<i>Datura innoxia</i>	1%	Tyagi et alli (1981)
<i>Glycine max</i>	64 mM NaNO ₃	Jia-Ping et alli (1981)
<i>Medicago sativa</i>	10 g/L	Croughan et alli (1978)
<i>Nicotiana sylvestris</i>	1%	Zenk (1974)
<i>Nicotiana sylvestris</i>	1%	Dix & Street (1975)
<i>Nicotiana sylvestris</i>	1,5%	Dix & Pearce (1981)
<i>Nicotiana tabacum</i>	5,2 g/L	Nabors et alli(1975)
<i>Nicotiana tabacum</i>	10 g/L	Hasegawa et alli(1980)
<i>Nicotiana tabacum</i>	130 mM	Heyser & Nabors (1981)
<i>Nicotiana tabacum/gossii</i>	200 mM	Watad et alli (1983)
<i>Oryza sativa</i>	15 g/L	Croughan et alli (1981)
<i>Oryza sativa</i>	1.8%	Yasuda et alli(1982)
<i>Pennisetum americanum</i>	1.16%	Rangan & Vasil (1983)
<i>Pennisetum purpureum</i>	2%	Chandler & Vasil (1984)
<i>Saccharum officinarum</i>	1.5%	Liu & Yeh (1982)

A variação epigenética é estável porém não é transmitida pela meiose, ou seja, não é passada à progênie. Ela é promovida por seleção de longo termo na presença do agente seletivo e caracterizada pelo aparecimento rápido de tolerância estável em grande proporção na população de células, sugerindo que ela seja causada provavelmente por amplificação gênica ou mudanças na regulação da expressão de genes.

Ve-se que a seleção de células tolerantes ao sal para diversas espécies tem sido realizada com sucesso através do uso das técnicas de cultura de tecidos. Assim como as plantas regeneradas a partir destas células regeneradas devem mostrar, também, a tolerância e esta deve ser estável de tal forma que seja passada as progênes das plantas.

Através do desenvolvimento de mutantes de espécies de importância agronômica tolerantes ao sal, as técnicas de cultura de tecidos oferecem uma ótima possibilidade de aumentar nosso entendimento sobre os mecanismos e fisiologia da tolerância ao sal a nível celular e possibilita a aplicação de técnicas moleculares que permitam a manipulação genética de células vegetais.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- CHANDLER, S. F. & THORPE, T. A.. Variation from Plant Tissue Cultures: Biotechnological Application to Improving Salinity Tolerance. Biotech. Adv. vol 4 , 117-135. 1986.
- DRACUP, M. Increasing Salt Tolerance of Plants Through Cell Culture Requires Greater Understanding of Tolerance Mechanisms. J. Plant Physiology, 18 (1), 1-15. 1991.
- LARKIN, P.J & SCOWCROFT, W.R.. Somaclonal Variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics 60, 197-214. 1981.
- RAINS, D.W.; CROUGHAN, S.S.; CROUGHAN, T.P.. Isolation and Characterization of Mutant Cell Lines and Plants. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants , vol 3, 537-547.

