

PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO

EM

BIOTECNOLOGIA

RELATÓRIO ANUAL IX

CAPES

ESALQ / USP

PIRACICABA 1995

Piracicaba, 28 de julho de 1995

RELATÓRIO ANUAL DE ATIVIDADES

PET - BIOTECNOLOGIA

(Dezembro de 1993 a Julho de 1995)

Tutor: Flávio Cesar Almeida Tavares

Boisistas:

Elizabeth Bilisland

Fernando de Mesquita Sampaio

Irving Joseph Berger

Jefferson Willians de Gaspari

Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida

Luciana Viriato Saboya

Mario Cesar Sesso

Maurício Pires Machado Barbosa

Patricia Pompermayer

Paula Marques Meyer

ÍNDICE

1. Identificação do Grupo PET	4
2. Informações sobre os bolsistas	6
2.1. Desempenho no curso de graduação	6
2.2. Desempenho nas atividades do PET	8
2.3. Desligamentos/inserções de novos bolsistas.....	8
2.4. Período de férias das atividades do PET	9
3. Atividades desenvolvidas pelo Grupo PET.....	9
3.1. Reuniões administrativas com o tutor	9
3.2. Seminários/Conferências/Palestras.....	25
3.3. Filmes científicos/Exposições	32
3.4. Participação em Congresso	33
3.5. Pesquisa	34
3.6. Estágios extra-curriculares	38
3.7. Cursos extra-curriculares	38
3.8. Monografias	41
3.9. Visitas a Institutos, Centros de Pesquisa, Empresas, etc.	42
3.10. Publicações em Boletim, Periódicos, Anais e Congressos, etc.	47
3.11. Estudo de língua estrangeira.....	48
3.12. Leituras extra-curriculares.....	50
3.13. Outras atividades.....	54
4. Avaliação.....	55
4.1. Apreciação qualitativa do Grupo.....	55
4.2. Acompanhamento interno dos Grupos PET-CAPES.....	60

4.3. Sugestões do Grupo para aprimorar a qualidade do desempenho do próprio Grupo e do PET, visando torná-los mais eficazes e eficientes	60
5. Informações sobre os ex-bolsistas	61

1. IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO PET

IES: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- ESALQ/USP - UF: SP

GRUPO: PET - Biotecnologia

IMPLANTAÇÃO DO GRUPO: Fevereiro de 1988

TUTOR: Prof. Dr. Flávio César Almeida Tavares

RELATÓRIO Nº: IX **PERÍODO:** De dez/1993 a jul/95

RESUMO DAS ATIVIDADES REALIZADAS PELO GRUPO:

- a. Participação no I Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal (REDBIO) em Brasília, de 13 a 17/12/1993
- b. Participação na XIX Reunião Anual de Genética de Microrganismos, em Serra Negra, de 6 a 9/3/1994
- c. Participação no VI SEBIAGRI (Seminários em Biotecnologia na Agricultura) do CEBTEC, 20/5/94
- d. Ciclo de seminários internos em biotecnologia, de 28 a 31/5/1994
- e. Entrevista com o Diretor da ESALQ, Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, a respeito do Projeto BIOCEMA (Biologia Celular e Molecular na Agropecuária), em 10/6/94.
- f. Entrevista com o Prof. Dr. Luiz L. Coutinho a respeito do BIOCEMA, em 15/6/94.
- g. Organização do III Curso de Atualização em Biotecnologia, em 16/9/94
- h. Organização da V Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, de 5 a 7/12/94
- i. Organização da VIII Congresso de Iniciação Científica na ESALQ/USP, de 5 a 7/12/94

- j. Organização da I Reunião Pró-Aprendizagem Ativa, em 25/3/95
- k. Visita à Fábrica de Chocolates Nestlé, em Caçapava, 4/4/95
- l. Visita à FIOCRUZ, Instituto Biomanguinhos e Jardim Botânico no Rio de Janeiro, de 4 a 7/5/1995
- m. Organização da Mesa Redonda "Patenteamento de Seres Vivos", em 8/6/95
- n. Ciclo de seminários internos em genética, de 29/5 a 19/6/95
- o. Participação na XX Reunião de Genética de Microrganismos, em 3 a 7/7/95
- p. Organização de Mini-cursos de informática, de 10 a 24/07/95.

ESTRUTURA FÍSICA

- Três salas, sendo uma exclusiva para reuniões (com quadro negro), outra para depósito de materiais e arquivo e uma sala de computação, com dois computadores 486 (ligados na rede do CIAGRI - Centro de Informática na Agricultura e do Dept. de Matemática e Estatística da ESALQ) e duas impressoras (matricial e jato de tinta) em conjunto com o Laboratório de Genética de Leveduras. As três salas são providas de condicionadores de ar.

2. INFORMAÇÕES SOBRE OS BOLSISTAS

2.1 Desempenho no curso de Graduação

a) Quadro de Relação Nominal

Nome do Bolsista	Ingresso no PEI		Semestre Atual da Graduação	Rendimento Escolar: média geral
	Mês/Ano	Semestre/ Graduação		
E. Bilsland	mar/92	3 ^o	Formada	7,98
F. Sampaio	mar/95	5 ^o	6 ^o	7,04
I. Berger	abr/94	3 ^o	6 ^o	8,00
J. Gaspari	nov/92	4 ^o	10 ^o	7,24
J. Argueso	nov/91	2 ^o	10 ^o	6,62
L. Saboya	nov/92	6 ^o	Formada	7,22
M. Sesso	nov/91	4 ^o	Formado	6,96
M. Barbosa	mar/95	3 ^o	4 ^o	6,92
P. Pompermayer	abr/94	3 ^o	6 ^o	7,08
P. Meyer	mar/93	5 ^o	10 ^o	7,32

a) Desempenho Acadêmico na Graduação

Média dos alunos

Nome do Bolsista	Média por semestre				Média Geral
	2 ^o -1993	1 ^o -1994	2 ^o -1994	1 ^o -1995	
E. Bilsland	8,25	8,16	7,55	8,64	7,98
F. Sampaio	-	-	-	6,52	7,04
I. Berger	8,20	7,40	7,89	7,79	8,00
J. Gaspari	7,51	6,77	6,91	8,04	7,24
J. Argueso	6,10	7,04	6,16	*	6,62
L. Saboya	7,22	7,34	7,35	Formada	7,22
M. Sesso	6,87	8,32	7,50	Formado	6,96
M. Barbosa	-	-	-	6,37	6,92
P. Pompermayer	7,00	6,60	6,46	7,36	7,08
P. Meyer	7,83	7,92	7,27	8,23	7,32

* Média ainda não computada devido à viagem de estudos para a Europa.

Os atestados das notas encontram-se em anexo.

b) Justificativa para o declínio no rendimento do grupo c/ou de um bolsista em particular.

Não houve declínio representativo no rendimento dos bolsistas.

2.2 - Desempenho nas atividades do Programa Especial de Treinamento - PET

a) Relato da situação de cada bolsista no período, em termos de participação/produção quantitativa nas atividades desenvolvidas pelo grupo.

Nome do Bolsista	% de participação/produção
E. Bilslund	95
F. Sampaio	90
I. Berger	95
J. Gaspari	95
J. Argueso	97
L. Saboya	90
M. Sesso	90
M. Barbosa	90
P. Pompermayer	95
P. Meyer	90

2.3 - Desligamentos e inserções de novos bolsistas

a) Nomes dos bolsistas desligados e seus respectivos substitutos

Bolsistas desligados	Substitutos
Elizabeth Bilslund	ainda não selecionado
Luciana Viriato Saboya	Fernando Mesquita Sampaio
Mario César Sesso	Maurício Pires Machado Barbosa

b) Parecer do professor tutor sobre os benefícios e prejuízos para o rendimento acadêmico e a dinâmica do grupo.

Encontra-se em anexo.

2.4 - Período de férias das atividades do PET

Início 23/12/94

Término 06/02/95

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS PELO GRUPO PET

3.1 Reuniões Administrativas

- 01/03/94 Pauta: Programação para o ano de 1994
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 02/03/94 Pauta: Relatório do uso das taxas escolares;
Discussão sobre: abertura de conta corrente para o grupo, apresentação de seminários dos trabalhos de pesquisa do grupo;
visitas.
Participantes: Todos os bolsistas.
Duração: 1 hora
- 03/03/94 Pauta: Temas discutidos:
Seleção de novos bolsistas;
Feira de Biotecnologia como atividade de grupo para o programa;
Estruturar o Curso de Atualização em Biotecnologia para o segundo semestre;
Mural sobre Biotecnologia para artigos e notícias;
Artigo científico e artigo de divulgação;
Discutir e relatar estígios, com finalidade de torná-los mais produtivos;
Participantes: Todos os bolsistas e o Tutor
Duração: 2 horas.

- 04/03/94 Pauta: Idéias para " Atividades de Destaque "
Participantes: Todos os bolsistas.
Duração: 1 hora.
- 09/03/94 Pauta: Discussão de artigos de jornal
Participantes: E. Bilslund, M. Sesso, M. Fedele.
Duração: 1 hora.
- 10/03/94 Pauta: Organização da prova de seleção
Participantes: E. Bilslund, J. Gaspari, L. Saboya, M. Fedele, P. Meyer.
Duração: 1 hora
- 22/03/94 Pauta: Preparo do relatório das despesas do grupo
Participantes: E. Bilslund, J. Gaspari.
Duração: 1 hora
- 22/03/94 Pauta: Propostas de palestras para divulgação da biotecnologia;
Textos para discussão em grupo para incentivar o hábito de frequentar a biblioteca.
Participantes: E. Bilslund, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M. Fedele, P. Meyer, e Tutor.
Duração: 1 hora.
- 24/03/94 Pauta: Propostas para "Atividades de Destaque".
Participantes: E. Bilslund J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M. Fedele, P. Meyer.
Duração: 1 hora
- 25/03/94 Pauta: Definição das atividades do grupo para o 1º semestre de 1994

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

Duração: 1 hora

- 07/04/94 Pauta: Seleção de novos bolsistas
Elaboração de artigos de jornal e entrevistas.
Participantes: E. Bilsland , J. Gaspari, L. Saboya, M. Fedele, P. Meyer e Tutor
Duração: 1 hora
- 15/04/94 Pauta: Seleção dos novos bolsistas
Participantes:J. Gaspari, L. Saboya, M. Sesso, M. Fedele, P.Meyer.
Duração: 1 hora
- 18/04/94 Pauta: Avaliação de currículos e preparação da prova de seleção
Participantes: E. Bilsland J. Gaspari, L. Saboya, M. Sesso
Duração: 2 horas.
- 18/04/94 Pauta: Prova de seleção, artigos de jornal, estudo dirigido, definição dos grupos para entrevistas na ESAIQ sobre biotecnologia
Participantes:E. Bilsland J. Gaspari, L. Saboya, M. Sesso e Tutor
Duração: 2 horas
- 19/04/94 Pauta: Entrevista dos novos bolsistas
Participantes:E. Bilsland J. Gaspari, L. Saboya, M. Sesso, P. Meyer e Tutor
Duração: 1 hora e 30 minutos
- 26/04/94 Pauta: Temas para artigos de jornal e relatório de seleção
Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J. Gaspari, L. Saboya, M. Sesso, P. Pompermayer, P.Meyer e Tutor

Duração: 1 hora

- 29/04/94 Pauta: Critérios para o desligamento e dias para a apresentação do estudo dirigido
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 03/05/94 Pauta: Critérios para artigos de jornal
Participantes: E. Bilisland, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 10/05/94 Pauta: Duplas para entrevistas
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 12/05/94 Pauta: Artigos de jornal, data para seminários, discussão sobre o regimento
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 17/05/94 Pauta: Propostas para o regimento do grupo, definição da programação de férias e discussão do regimento da CAPES
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 1 hora
- 24/05/94 Pauta: Roteiro para entrevistas, elaboração de um regimento do grupo
Participantes: I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, P. Pompermayer, P. Meyer e Tutor
Duração: 1 hora

- 26/05/94 Pauta: Propostas para o regimento, discussão dos estígios individuais com o Tutor
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 28/05/94 Pauta: Apresentação de seminários
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 4 horas
- 30/05/94 Pauta: Discussão de textos na biblioteca
Participantes: E. Bilsland, I. Berger, L. Saboya, M. Sesso, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 31/05/94 Pauta: Seminário do J. Gaspari
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 1 hora
- 06/06/94 Pauta: Discussão de textos na biblioteca
Participantes: I. Berger, J. Gaspari, L. Saboya, P. Pompermayer
Duração: 1 hora
- 07/06/94 Pauta: Definição de textos para discussão na biblioteca; artigos de jornal; Cursos de Atualização em biotecnologia; entrevista com Prof. Diretor João Lúcio de Azevedo.
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 09/06/94 Pauta: Formulação das questões para entrevista com o Prof. Diretor João Lúcio de Azevedo

Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J Gaspari, L. Saboya, P. Pompermayer,
P. Meyer

Duração: 1 hora

14/06/94

Pauta: Discussão sobre o III Curso de Atualização em Biotecnologia;
entrevista com o Prof. Luis Coutinho;
discussão sobre RFLP

Participantes: Todos os bolsistas

Duração: 1 hora

21/06/94

Pauta: Discussão sobre o III CAB e visitas

Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J Gaspari, L. Saboya, P. Pompermater, P.
Meyer

Duração: 1 hora

23/06/94

Pauta: Discussão sobre biotecnologia

Participantes: E. Bilsland, J Gaspari,, L. Saboya, M. Sesso, P. Pompermayer,
P. Meyer e Tutor

Duração: 1 hora

28/06/94

Pauta: Programação e contatos para o III Curso de Atualização em
Biotecnologia

Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, P.
Pompermayer, P. Meyer e Tutor

Duração: 1 hora

30/06/94

Pauta: Programação para a semana de práticas de biotecnologia do grupo

Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M.
Sesso, P. Pompermayer

Duração: 1 hora

- 02/08/94 Pauta: Planejamentos para o III CAB
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 04/08/94 Pauta: Programação do III CAB
Participantes: Todos os bolsistas e Tutor
Duração: 1 hora
- 09/08/94 Pauta: Organização do III CAB
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 16/08/94 Pauta: Preparação dos certificados para o III CAB
Participantes: E. Bilslund, J Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 23/08/94 Pauta: Programação e contatos para o III CAB
Participantes: E. Bilslund, I. Berger, J Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 26/08/94 Pauta: Organização do III CAB e requisição dos certificados
Participantes: E. Bilslund, I. Berger, J Gaspari, L. Saboya, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 30/08/94 Pauta: Discussão dos artigos de jornais e organização do III CAB

Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J Gaspari, J. Argueso, M. Sesso, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora

31/08/94 Pauta: Divulgação e contatos para o III CAB
Participantes: E. Bilsland, J Gaspari, J. Argueso, M. Sesso, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora

02/09/94 Pauta: Divulgação, organização e planejamento das inscrição para o IIICAB
Participantes: J. Gaspari, L. Saboya, P. Pompermayer
Duração: 1 hora

06/09/94 Pauta: Contatos e divulgação do III CAB
Participantes: I. Berger, J Gaspari, P. Pompermayer
Duração: 1 hora

08/09/94 Pauta: Contatos e organização do III CAB
Participantes: J Gaspari, L. Saboya, P. Pompermayer
Duração: 1 hora

13/09/94 Pauta: III CAB
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora

15/09/94 Pauta: Planejamento final do III CAB
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora

21/09/94 Pauta: Balanço do III CAB

- Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 23/09/94 Pauta: Programação para o final do ano e avaliação da programação do semestre
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora
- 28/09/94 Pauta: Definição e divulgação da seleção de novos bolsistas;
artigos de jornal, visitas; carta de agradecimento aos palestrantes do III CAB;
palestras planejadas pelo grupo
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M. Sesso, P. Pompermayer, P. Meyer e Tutor
Duração: 1 hora
- 05/10/94 Pauta: Discussão sobre microsatélites, curso para os PET's;
utilização da verba escolar
Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J. Argueso, L. Saboya, M. Sesso, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 18/10/94 Pauta: Elaboração do edital de seleção
Participantes: I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Saboya, M. Sesso, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 25/10/94 Pauta: visita `a Fleischmann
Participantes: Todos os bolsistas
Duração: 1 hora

- 01/11/94 Pauta: Divulgação e elaboração da prova de seleção de novos bolsistas
Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J Gaspari, L. Saboya, M. Sesso, P. Pompermayer, P. Meyer e Tutor
Duração: 1 hora
- 03/11/94 Pauta: Elaboração da prova de seleção
Participantes: E. Bilsland
Duração: 1 hora
- 04/11/94 Pauta: Organização da prova de seleção
Participantes: I. Berger, J Gaspari, L. Saboya, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 07/11/94 Pauta: Organização final da prova de seleção dos novos bolsistas
Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J Gaspari, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora
- 07/11/94 Pauta: Prova de seleção
Participantes: E. Bilsland, I. Berger, J Gaspari, P. Pompermayer, P. Meyer, M. Sesso.
Duração: 3 horas
- 08/11/94 Pauta: Avaliação das provas de seleção
Participantes: E. Bilsland, I. Berger, L. Saboya, P. Pompermayer, P. Meyer, M. Sesso.
Duração: 1 hora
- 21/11/94 Pauta: Divisão das tarefas da V Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Leal, I. Berger, J Gaspari, L. Scarpari, M. Sesso, M. Barbosa, P. Pompermayer,
Duração: 1 hora

22/11/94 Pauta: Apresentação do grupo aos novos bolsistas
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Leal, I. Berger, J Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer, R. Cesarino, M. Sesso.
Duração: 1 hora

29/11/94 Pauta: Elaboração do relatório anual
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Leal, I. Berger, J Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Sesso, M. Barbosa, P. Pompermayer, R. Cesarino
Duração: 1 hora

01/12/94 Pauta: Informações aos novos bolsistas do grupo sobre os regimentos da CAPES
Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, G. Leal, I. Berger, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer,
Duração: 1 hora

08/12/94 Pauta: Organização do relatório final e programação para o ano de 1995
Participantes: E. Castelhana, G. Leal, I. Berger, L. Scarpari, L. Saboya, M. Sesso, P. Pompermayer, P. Meyer, R. Cesarino e Tutor
Duração: 2 horas

12/12/94 Pauta: Elaboração do relatório
Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, G. Leal, I. Berger, J. Gaspari, L. Scarpari, P. Pompermayer, R. Cesarino

Duração: 1 hora

- 07/02/95 Pauta: Discussão do relatório de seleção e relatório anual.
Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, I. Berger, J. Argueso, L. Scarpari, L. Saboya, M. Sesso, M. Barbosa, P. Pompermayer e Tutor
Duração: 2 horas
- 08/02/95 Pauta: Preparo da programação anual de 1.995
Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, I. Berger, J. Argueso, L. Scarpari, L. Saboya, M. Sesso, M. Barbosa, P. Pompermayer
Duração: 1 hora.
- 06/03/95 Pauta: Discussão sobre viagem ao Rio de Janeiro e contatos para a Reunião Pró-Aprendizagem Ativa
Participantes: F. Sampaio, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora.
- 07/03/95 Pauta: Discussão sobre a Reunião Pró-Aprendizagem Ativa
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer e integrantes do PET - Ecologia
Duração: 1 hora.
- 14/03/95 Pauta: Distribuição de tarefas para a organização da Reunião Pró-Aprendizagem Ativa e definição da data da viagem ao Rio de Janeiro.
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer, R. Cesarino e Tutor.
Duração: 1 hora.

- 17/03/95 Pauta: Definição de atividades para 1.995
Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer.
Duração: 1 hora.
- 21/03/95 Pauta: Preparação final para a Reunião Pró-Aprendizagem Ativa e viagem ao Rio de Janeiro.
Participantes: E. Castelhana, E. Bilslund, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora.
- 28/03/95 Pauta: Avaliação da Reunião Pró-Aprendizagem Ativa.
Participantes: E. Castelhana, E. Bilslund, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora.
- 29/03/95 Pauta: Contatos e elaboração do roteiro de visitas ao Rio de Janeiro e programação de atividades semanais fixas
Participantes: E. Castelhana, E. Bilslund, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 2 horas.
- 05/04/95 Pauta: Preparativos para viagem ao Rio de Janeiro.
Participantes: E. Castelhana, E. Bilslund, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, P. Pompermayer.
Duração: 1 hora.
- 18/04/95 Pauta: Organização e orçamento para viagem ao Rio de Janeiro.

Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer

Duração: 1 hora.

19/04/95 Pauta: Programação de temas e datas para a realização de seminários internos.

Participantes: E. Castelhana, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer

Duração: 1 hora.

20/04/95 Pauta: Organização e divisão das duplas para elaboração de artigos de jornal.

Participantes: E. Castelhana, E. Bilslund, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, P. Pompermayer, P. Meyer

Duração: 1 hora.

25/04/95 Pauta: Discussão sobre temas e estrutura dos artigos de jornal.

Participantes: E. Castelhana, E. Bilslund, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer e Tutor.

Duração: 1 hora.

02/05/95 Pauta: Últimos preparativos para viagem ao Rio de Janeiro.

Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer.

Duração: 1 hora.

08/05/95 Pauta: Discussão e reflexão sobre o texto "Declaração sobre os Perigos da Engenharia Genética", enviado pelo PET-Ecologia.

Participantes: E. Castelhana, E. Bilslund, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer

Duração: 1 hora.

- 09/05/95 Pauta: Discussão e elaboração do relatório sobre a viagem ao Rio de Janeiro, realizada no período de 04 a 06/05/1.995.
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora.
- 16/05/95 Pauta: Discussão sobre a divisão do grupo em comissões de organização interna (ver anexo).
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora.
- 19/05/95 Pauta: Discussão sobre as propostas feitas pelas comissões do grupo PET.
Participantes: E. Castelhana, I. Berger, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer.
Duração: 1 hora.
- 23/05/95 Pauta: Critérios para a escolha de temas para o estudo dirigido
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer e Tutor.
Duração: 1 hora.
- 24/05/95 Pauta: Discussão sobre a divisão de tarefas
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer
Duração: 1 hora.

- 06/06/95 Pauta: Organização da mesa redonda sobre “Patenteamento de Seres Vivos”.
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer e Tutor.
Duração: 1 hora.
- 13/06/95 Pauta: Definição da programação do mês de julho.
Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Argueso, L. Scarpari, P. Pompermayer, P. Meyer.
Duração: 1 hora.
- 20/06/95 Pauta: Preparativos iniciais para o IV CAB (Curso de Atualização em Biotecnologia) - Sugestões de temas para a mesa redonda.
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, I. Berger, J. Gaspari, L. Scarpari, M. Barbosa.
Duração: 1 hora.
- 27/06/95 Pauta: Divisão de horários e tarefas para a elaboração do relatório anual.
Participantes: E. Castelhana, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer e Tutor.
Duração: 1 hora.
- 30/06/95 Pauta: Organização do IV CAB e programação de visitas para o 2o. semestre.
Participantes: E. Castelhana, F. Sampaio, J. Gaspari, L. Scarpari, P. Pompermayer.
Duração: 1 hora.

- 04/07/95 Pauta: Discussão sobre o IV CAB.
Participantes: E. Castellhano, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari,
L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer.
Duração: 1 hora.
- 11/07/95 Pauta: Discussão do tema para a mesa redonda para o IV CAB
Participantes: E. Castellhano, F. Sampaio, I. Berger, L. Scarpari, M. Barbosa,
P. Meyer.
Duração: 1 hora
- 18/07/95 Pauta: Questões para a enquete sobre Biotecnologia
Participantes: E. Castellhano, F. Sampaio, I. Berger, J. Gaspari, L. Scarpari,
M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer.
Duração: 1 hora

3.2 Seminários/Conferências/Palestras

a) Apresentados pelos bolsistas

- 17/01/94 Evento: Ciclo de Palestras sobre Tecnologia do DNA Recombinante
Tema: DNA Recombinante e doenças Genéticas
Apresentado por: J. Gaspari
Participantes: Alunos e pesquisadores das Seções de Biologia Molecular e
Microbiologia do Solo
- 19/01/94 Evento: Ciclo de Palestras sobre Tecnologia do DNA Recombinante
Tema: Vírus Causadores de Tumor
Apresentado por: J. Gaspari - CENA/USP - Piracicaba, SP
Participantes: Alunos e pesquisadores das Seções de Biologia Molecular e
Microbiologia do Solo

- 19/01/94 Evento: Ciclo de Palestras sobre Tecnologia do DNA Recombinante
Tema: Vetores Virais
Apresentado por: J. Gaspari - CENA/USP - Piracicaba, SP
Participantes: Alunos e pesquisadores das Seções de Biologia Molecular e Microbiologia do Solo
- 21/01/94 Evento: Ciclo de Palestras sobre Tecnologia do DNA Recombinante
Tema: A Ciência Usada na Indústria de DNA Recombinante
Apresentado por: J. Gaspari - CENA/USP - Piracicaba, SP
Participantes: Alunos e pesquisadores das Seções de Biologia Molecular e Microbiologia do Solo
- 28/05/94 Evento: Ciclo de Palestras do Grupo PET-BIOTECNOLOGIA
Local: Sala de Seminários do Dept. de Genética da ESALQ
Participantes: Todos os bolsistas e tutor
- Tema: O que é Biotecnologia ?
Apresentado por: P. Pompermayer.
- Tema: Química e Biotecnologia
Apresentado por: P. Meyer.
- Tema: Alimentos e Biotecnologia
Apresentado por: M. Sesso

Tema: Ambiente e Biotecnologia

Apresentado por: E. Bilsland

Tema: Materiais e Biotecnologia

Apresentado por: J. Argueso

Tema: Genética e Biotecnologia

Apresentado por: I. Berger

Tema: Energia e Biotecnologia

Apresentado por: L. Saboya

Tema: Agricultura e Biotecnologia

Apresentado por: J. Gaspari

17/06/94

Evento: Seminário Interno

Tema: DNA fingerprinting

Apresentado por: E. Bilsland

Participantes: Todos os bolsistas

03/04/95

Evento: Seminário Interno

Tema: PCR uma visão global.

Apresentado por: E. Bilsland

Participantes: E. Castelhana, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari,
M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer.

29/05/95

Evento: Seminário Interno

Tema: Meiose

Apresentado por: J. Gaspari

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer.

29/05/95 Evento: Seminário Interno

Tema: Formas de Variação

Apresentado por: I. Berger

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer e Tutor.

05/06/95 Evento: Seminário Interno

Tema: Mapeamento Genético

Apresentado por: M. Barbosa

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, P. Pompermayer, P. Meyer.

05/06/95 Evento: Seminário Interno

Tema: Marcadores Genéticos

Apresentado por: E. Castelhana

Participantes: E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer.

12/06/95 Evento: Seminário Interno

Tema: Bioquímica de Enzimas

Apresentado por: F. Sampaio

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari,
J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer.

12/06/95 Evento: Seminário Interno

Tema: Enzimas usadas em técnicas moleculares

Apresentado por: J. Argueso

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger,
J. Gaspari, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer.

b) Assistidos pelos bolsistas

18/01/94 Tema: Mutagênese in vitro

Palestrante: Gabriel Sarries - CENA/USP - Piracicaba, SP

Participante: J. Gaspari

18/01/94 Tema: Introdução de DNA em Leveduras

Palestrante: Gabriel Sarries - CENA/USP - Piracicaba, SP

Participante: J. Gaspari

20/01/94 Tema: Genes Móveis

Palestrante: Alexandre da Silva Conceição - CENA/USP - Piracicaba, SP

Participante: J. Gaspari

20/01/94 Tema: Transferência de Genes para Células de Mamíferos

Palestrante: Alexandre da Silva Conceição - CENA/USP - Piracicaba, SP

Participante: J. Gaspari

- 24/01/94 Tema: Diversidade Genética em Loci de Isoenzimas RFLP em *Brassica campestris* em Relação ao Tipo de Cultura e Origem Geográfica
Palestrante: Gabriel Sarries - CENA/USP - Piracicaba, SP
Participantes: J. Gaspari
- 08/04/94 Tema: Técnicas Imunológicas Aplicadas à Microbiologia
Palestrante: Keila M. R. Duarte - ESALQ - USP
Participante: E. Bilsland
- 03/05/94 Tema: Estrutura, Funcionamento, Diretrizes Prioridades
Palestrante: Diretor Científico da FAPESP
Participante: E. Bilsland
- 12/05/94 Tema: Seminário sobre Selection of Primers for PCR.
Participante: E. Bilsland.
- 13/05/94 Tema: Seminário sobre aspectos moleculares da regulação gênica da síntese de amida em plantas.
Palestrante: Dr. Jack Preiss - Michigan State University, USA.
Participantes: E. Bilsland e P. Meyer.
- 20/05/94 Evento: VI Seminário de Biotecnologia Agrícola (SEDIAGRI VI-CEBTEC/ESALQ/USP)
Participantes: E. Bilsland, I. Argueso, L. Saboya, M. Sesso, P. Pompermayer
- 09/06/94 Evento: I Seminário sobre Elaboração de Projetos
Palestrante: Prof. Dr. Isak Kruglianskas - PACTo - FEA/USP.
Participantes: I. Berger, E. Bilsland, J. Gaspari, P. Pompermayer.

- 19/09/94 Tema: Uso do hormônio de crescimento recombinante na produção de leite.
Palestrante: Paola Augusta Kementes
Participante: E. Bilsland
- 30/09/94 Evento: Seminário de Microsatélites.
Palestrante: Chris Dick
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari.
- 31/10/94 Tema: Sexagem e seleção de embriões
Palestrante: Artur Jordão de M. Rosa
Participante: E. Bilsland.
- 24/03/95 Tema: Biotecnologia Geral
Palestrante: Prof. Dr. Flávio C. A. Tavares (Tutor do grupo)
Participantes: Todos os bolsistas
- 25/03/95 Evento: Reunião "Pró-Aprendizagem Ativa"
Organização: PET-BIOTECNOLOGIA
Palestra 1: Desenvolvimento do trabalho em equipe
Palestrante: José Vicente Vieira - Casa da Agricultura
Palestra 2: Processo de Seleção e Perfil do Profissional Desejado pelas Empresas
Palestrante: Maria Luiza Nascimento - MONSANTO DO BRASIL
Palestra 3: Experiências de um ex-bolsista PET
Palestrante: José Henrique Contí - Dept. de Genética - ESALQ/USP

- 15/05/95 Tema: Sistemas Agroflorestais - uma experiência de êxito.
Palestrante: Ernest Goetsch (Itabuna, BA.)
Debatedores: Prof. Dr. Antonio Luiz Fancelli, Prof. Dr. José L. Demattê,
Prof. Dr. Eurípedes Malavolta, Eng^o Agro^o Manuel Baltazar B. da Costa.
Participantes: Todos os bolsistas
- 31/05/95 Tema: Patenteamento de Seres Vivos
Palestrante: Milton Krieger - Dept. de Genética - ESALQ/USP
Participantes: E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari,
J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer e PET-
Ecologia.
- 08/06/95 Evento: Mesa-Redonda.
Tema: Patenteamento de Seres Vivos.
Integrantes da Mesa: Prof. Dr. Ernesto Paterniani(ESALQ), Prof. Carlos
Rosseto(IAC), Doutorando Milton Krieger(ESALQ), Doutorando Paulo
Velho (UNICAMP), Prof. Dr. Mohamed Dahli (UNICAMP), Prof. Dr.
Paulo Kageyama (ESALQ).
Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger,
J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, P. Pompermayer, P. Meyer e Tutor.

3.3 Filmes Científicos/Exposições.

- 20/03/95 Título: Science and Technology Week (Programa semanal apresentado pela
rede CNN.
Local: Departamento de Genética - ESALQ/USP.

Participantes: E. Castelhana, E. Bilslund, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, P. Pompermayer, P. Meyer.

3.4 Participação em Congressos

- 06-09/03/94 XIX Reunião Anual de Genética de Microrganismos
Serra Negra - SP
Participantes: L. Saboya, J. Argueso
- 02-05/09/94 Congresso de Genética.
Caxambu, SP.
Participantes: E. Bilslund, J. Argueso
- 13-14/10/94 XI Encontro sobre Temas de Genética e Melhoramento -
ESALQ/USP, Piracicaba, SP.
Participantes: I. Berger, P. Pompermayer
- 05-07/12/94 V Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias -
ESALQ/USP, Piracicaba, SP.
Participantes: E. Castelhana, G. Leal, I. Berger, L. Scarpari, M. Sesso, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer, R. Cesarino.
- 03-07/07/95 XX Reunião Anual de Genética de Microrganismos
Local: Pavilhão de Engenharia - ESALQ/USP - Piracicaba, SP.
Participantes (ouvintes): E. Castelhana, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer

3.5 Pesquisa

Cada um dos bolsistas trabalha em projetos de iniciação científica individuais nas diferentes áreas dentro da Biotecnologia.

TÍTULO: Diagnóstico do genótipo de suínos para o gene do halotano através de PCR

OBJETIVO: Desenvolver um método rápido e eficiente de diagnóstico da mutação para orientar cruzamentos

ORIENTADOR: Prof. Luis Lehmann Coutinho, Phd.

BOLSISTA: Elizabeth Bilsland e Paula Marques Meyer

INÍCIO: março 1994

FASE DA PESQUISA: o método já está completamente otimizado, assim, a coleta de dados continua sendo feita com o intuito de correlacionar o genótipo com o desempenho dos animais (conversão alimentar e ganho de peso).

TÍTULO: Síntese de sonda de RNA marcada a frio e hibridização "in situ" em frangos

OBJETIVO: Correlacionar a formação dos fatores miogênicos durante o desenvolvimento embrionário de frangos com sua massa muscular na fase adulta.

ORIENTADOR: Prof. Luiz L. Coutinho, Phd.

BOLSISTA: Elizabeth Bilsland

INÍCIO: janeiro de 1995

FASE DA PESQUISA: A síntese, marcação com digoxigenina, hidrólise alcalina e detecção da sonda em membrana de nylon já estão sendo realizadas com grande êxito. Porém, a hibridização "in situ" de forma específica foi conseguida apenas duas vezes, sendo necessárias portanto algumas modificações na metodologia para obtermos boa repetibilidade.

TÍTULO: a) Cultura de Protoplastos e Regeneração de Plantas de Arroz.

b) Cultura de Meristemas de Caju.

OBJETIVOS: a) Adaptar e melhorar metodologia de indução de calos, isolamento de protoplastos e regeneração de plantas de arroz para cultivares brasileiros, buscando alta

frequência de protoplastos viáveis e plantas regeneradas; oferecer base para trabalho futuro de transformação de protoplastos de arroz, visando produção de mudas melhoradas.

b) Melhorar a metodologia de micropropagação clonal de caju através de cultura de meristemas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Akihiko Ando.

BOLSISTA: Irving Joseph Berger

INÍCIO: Março de 1994 - já concluído.

FASE DA PESQUISA: a) Metodologias de indução de calos e isolamento de protoplastos concluídas.

b) Realização de estudos visando minimizar problema de oxidação de explantes.

TÍTULO: "Seleção e Melhoramento de Linhagens de *Kluyveromyces marxianus* quanto à Atividade Inulinolítica". (Projeto de Residência Agrônômica enviado em março de 1995 e aprovado para ser realizado no segundo semestre do mesmo ano. O projeto encontra-se em anexo).

OBJETIVOS: Selecionar híbridos de *K. marxianus* hiperprodutores de inulinase visando avaliar a hidrólise enzimática como alternativa de obtenção de xarope de frutose, a partir de extrato bruto de *Helianthus tuberosus*.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

BOLSISTA: Jefferson W. de Gaspari

INÍCIO: Julho de 1995

FASE DA PESQUISA: Avaliação das linhagens de *K. marxianus* quanto à atividade inulinolítica e realização de cruzamentos.

TÍTULO: Caracteres Quantitativos Associados a Marcadores Moleculares em *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS: O objetivo da pesquisa é reconhecer marcadores moleculares do tipo RFLP e RAPD associados a caracteres quantitativos como capacidade de produção de etanol, crescimento celular e acúmulo de trealose. O estudo está sendo feito sobre linhagens haploides, segregantes de um híbrido diploide. A partir dos dados obtidos espera-se encontrar

possíveis QTL's que serão usados mais tarde em programas de melhoramento genético de leveduras industriais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flavio C. A. Tavares

BOLSISTA: Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida

INÍCIO: Novembro de 1991.

FASE DA PESQUISA: Coleta de dados

TÍTULO: Fusão de Protoplastos em *Trichoderma pseudokoningii*

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. O trabalho foi apresentado na XIX Reunião Anual de Genética de Microrganismos, em Serra Negra, sob forma de Poster. Durante o primeiro semestre de 1994, foram analisadas as colônias recombinantes resultantes da fusão de protoplastos. Fez-se coloração de núcleos dessas colônias, com a finalidade de encontrar dicários.

ORIENTADOR: Prof^ª. Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner

BOLSISTA: Luciana Viriato Saboya

INÍCIO DA ATIVIDADE: Janeiro de 1992 a junho de 1994.

TÍTULO: Processamento e Caracterização do Requeijão Cremoso

OBJETIVO: Melhor compreender processos de coagulação do leite, obtido por fermentação (produção de ácido láctico por microrganismos lácticos) e por adição de ácido láctico diretamente ao leite, bem como o processamento de requeijão cremoso e sua caracterização. Esse estágio foi um acompanhamento de um trabalho de tese de doutorado, o qual tem como principal obje

vo caracterizar o requeijão cremoso, sob aspectos físico-químicos, já que no Brasil inexist

uma padronização desse produto

ORIENTADOR: Prof^ª. Ariene Gimenes Fernandes Van Dender - ITAL, Campinas, SP

BOLSISTA: Luciana V. Saboya

INÍCIO DA ATIVIDADE: Agosto de 1994 a Dezembro de 1994.

FASE DA PESQUISA/TREINAMENTO: Final

TÍTULO: Cultura de Meristema de caju

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Akihiko Ando

BOLSISTA: Mário César Sesso

INÍCIO: Novembro de 1991.

FASE DA PESQUISA: Pesquisa interrompida em função de conclusão do curso de graduação.

TÍTULO: Micropropagação de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha*)

OBJETIVOS: A partir de 1/4 de folha de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha*) produzir centenas e mesmo milhares de plantas de violetas em um período curto de tempo. Violetas estas sadias/livres de contaminantes.

ORIENTADOR: Luiz Antônio Gallo

BOLSISTA: Patrícia Pompermayer

INÍCIO: Março de 1994

FASE DA PESQUISA: Início

TÍTULO: Indução de gemas em tecido adulto de eucalipto revertido à juvenildade

OBJETIVOS:

ORIENTADOR: Antônio Natal Gonçalves

BOLSISTA: Fernando de Mesquita Sampaio

INÍCIO: Junho de 1995

FASE DA PESQUISA: Início

TÍTULO: Mapeamento do(s) gene(s) de Resistência a Raça 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (FOC2) e Análise de Ligação entre Marcadores Morfológicos e Genes de resistência em *Brassica oleraceae*.

OBJETIVOS: Estudar o modo de Herança e verificar onde se encontra(m) o(s) gene(s) de resistência à FOC2 e a possível Ligação com Marcadores Morfológicos com este(s) gene(s).

ORIENTADOR: Luiz Eduardo Aranha de Camargo.

BOLSISTA: Mauricio P. M. Barbosa

INÍCIO: Agosto de 1994

FASE DA PESQUISA: Avaliação de resistência e susceptibilidade e avanço nas gerações (atualmente em F3) para atingir linhagens isogênicas.

3.6 Estágios extra-curriculares

ESTÁGIO: Controle de Qualidade Microbiológica
Local Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello"
Campinas/SP
Período: 11 a 22 de julho de 1994
Carga Horária: 80h
Orientadora: Dra. Sílvia Eguchi
Participante: L. Saboya

3.7 Cursos extra-curriculares

07-09/03/94 Mini- Curso: "Genética Clássica e Molecular em Fungos", durante a XIX Reunião Anual de Genética de Microrganismos.
Local: Serra Negra-SP
Carga Horária: 3h
Responsável: Profa Dra. Aline A. Pizzirani-Kleiner
Participante: L. Saboya

- 11/06/94 VI Curso de Miniaturização de Plantas
Local: CEBTEC - ESALQ/USP
Carga Horária: 8h
Responsável: João Chaddad
Participante: P. Pompermayer
- 22/08/94 Curso de Conceitos Básicos de Sistema Operacional
Local: CIAGRI - ESALQ/USP
Carga Horária: 20h
Participante: P. Pompermayer
- 02-05/09/94 Mini-Curso: "Como os organismos reagem ao estresse"
Local: Caxambu-MG
Carga Horária: 3h
Responsável: Profa Dra. Maria Boninato (UFPE)
Participante: J. Argueso
- 16/09/94 III Curso de Atualização em Biotecnologia.
Local: Anfiteatro do Depto. de Genética - ESALQ/USP
Carga Horária: 10h
Responsável: Grupo PET-Biotecnologia
Participantes: Todos os bolsistas.
- 02/10/94 Curso DOTI (Desenvolvimento e Organização do Trabalho Intelectual)
Local: ESALQ/USP
Carga Horária: 16h
Participantes: E. Castelhana, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer

- 10-11/10/94 Curso sobre Marcadores Moleculares - Conceito e Utilização no Melhoramento de Plantas
Local: Dept. de Genética - ESALQ/USP
Carga Horária: 24h
Responsável: Dr. Bernard Lejeune - Universidade Paris-Sud
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, J. Argueso e M. Barbosa.
- 05- 19/12/94 Curso de Tecnologia do DNA Recombinante e Expressão Gênica.
Local: Instituto de Ciências Biomédicas/USP - São Paulo/SP
Carga Horária: 96h
Responsável: Prof. Dr. Hernando del Portillo
Participantes: E. Bilsland, J. Argueso.
- 30-31/05/95 Curso de Busca Bibliográfica
Local: ESALQ/USP - Piracicaba, SP.
Carga Horária: 08 horas
Responsáveis: Eliana Maria Garcia Sabino e Kátia Maria de Andrade Ferraz - Bibliotecárias.
Participantes: E. Castellano, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, P. Meyer.
Os relatórios dos bolsistas, de seus estágios individuais, encontram-se em anexo, apresentando atividades, resultados e revisão de literatura sobre o tema.
- 3 e 4/7/95 Aplicações Biotecnológicas de Microrganismos na Agropecuária
Local: Dept. de Genética da ESALQ/USP
Carga horária: 6 horas
Responsáveis: José Odair Pereira (FUAM); Luiz Lehmann Coutinho (ESALQ) e Orlando Petrini (PHARMATON S.A., Suíça)
Participante: J. Gaspari.

3 e 4/7/95 Patentes, Biossegurança e Bioética em Genética.
Local: Dept. de Genética da ESALQ/USP
Carga horária: 6 horas
Responsáveis: Maria Inez F. Faraldo (ESALQ), Edmundo Kanan Marques (UFRGS) e Claudinei A. Monteiro (UNIMEP).

Participante: J. Gaspari.

10/07/95 Mini - Curso de Word for Windows
Local: CIAGRI/ESALQ
Carga horária: 4 horas
Responsável: J. Gaspari - Bolsista PET
Participantes: Todos os Bolsistas

17/07/95 Mini - Curso de Excel for Windows
Local: CIAGRI/ESALQ
Carga horária: 4 horas
Responsável: I. Berger - Bolsista PET
Participantes: Todos os bolsistas

24/07/95 Mini - Curso de Internet
Local: CIAGRI/ESALQ
Carga horária: 4 horas
Responsável: M. Barbosa - Bolsista PET
Participantes: Todos os bolsistas

3.8 Monografias

As monografias dos bolsistas encontram-se em anexo.

3.9 Visitas a Institutos, Centros de Pesquisa, Empresas, etc.

- 13/04/94 Visita à Holambra - Setor de Comercialização de Flores
Objetivos: Tomar conhecimento de como é efetuada a comercialização de flores na Holambra
Local: Holambra
Participante: L. Saboya
- 05/05/94 Visita à Bolsa de Valores do Estado de São Paulo (BOVESPA) - manhã
Objetivos: Conhecer o funcionamento de transações comerciais
Local: São Paulo/SP
Visita ao CEASA - tarde
Local: São Paulo/SP
Objetivos: Conhecer e tomar conhecimento da pós-colheita e comercialização de produtos agrícolas
Participante: L. Saboya
- 11/05/94 Visita à Agroccres
Local: Santa Cruz das Palmeiras/SP
Objetivos: Tomar conhecimento das linhas de pesquisa e desenvolvimento de produtos da Empresa
Participantes: L. Saboya; M. Sesso.
- 12/05/94 Visita ao Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL
Local: Campinas/SP
Objetivos: Saber como é efetuada a conservação de frutas após sua colheita
Participante: L. Saboya
- 09/06/94 Visita à Nestlé.
Local: Caçapava, SP.

Objetivos: Conhecer as instalações e os processos de fabricação dos produtos.

Participante: M. Sesso.

20/06/94

Visita à ASGROW

Local: Paulínia, SP.

Objetivos: Tomar conhecimento a respeito do melhoramento de hortaliças

Participante: L. Saboya.

22/06/94

Visita à FMVZ

Local: Pirassununga, SP.

Objetivos: Conhecer as instalações e linhas de pesquisa desenvolvidas nesta instituição.

Participante: E. Bilsland, J. Gaspari.

21/09/94

Visita à BIOAGRI

Local: Piracicaba, SP

Objetivos: Conhecer a estrutura e funcionamento da empresa.

Participante: I. Berger.

10/08/94

Visita à Indústria de Laticínios "Colina"

Local: Piracicaba, SP

Objetivos: Conhecer os processos de obtenção dos produtos e as instalações da indústria.

Participante: L. Saboya.

24/09/94

Visita ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)

Local: Campinas/SP

Objetivos: Conhecer as linhas de pesquisa de melhoramento vegetal do IAC

Participantes: I. Berger, P. Pompermayer.

- 27/09/94 Visita ao ITAL
Local: Guarujá, SP
Objetivo: Conhecer as técnicas de processamento de pescado e o aproveitamento de resíduos dessa indústria.
Participante: J. Gaspari
- 27/09/94 Visita à COMPESCA
Local: Guarujá, SP
Objetivo: Conhecer as técnicas de processamento de pescado.
Participante: J. Gaspari
- 20/10/94 Visita ao Aviário do Departamento de Genética
Local: Piracicaba, SP.
Objetivos: Ilustrar as aulas de melhoramento genético de aves
Participantes: I. Berger, P. Pompermayer.
- 22/10/94 Visita à Agroceres
Local: Santa Cruz das Palmeiras, SP.
Objetivos: Conhecer as linhas de pesquisa e os processos utilizados no melhoramento vegetal, realizado pela empresa
Participante: P. Pompermayer
- 27/10/94 Visita à Estação Experimental de Piracicaba - Instituto Agronômico de Campinas.
Local: Piracicaba, SP.
Objetivos: Complementar conhecimentos teóricos a respeito do melhoramento genético da cana-de-açúcar
Participantes: F. Sampaio, I. Berger, P. Pompermayer.

- 18/01/95 Visita ao Centro Nacional de Pesquisa do Caju - CNPCa.
Local: EMBRAPA - Pacajus, Ceará.
Objetivos: Conhecer instalações e linhas de pesquisa.
Participante: I. Berger.
- 10/02/95 Visita ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo - CNPMS.
Local: EMBRAPA - Sete Lagoas, Minas Gerais.
Objetivos: Conhecer instalações e linhas de pesquisa.
Participante: I. Berger.
- 18/03/95 Visita a Fazenda Flora
Local: Araraquara, SP.
Objetivos: Conhecer os talhões de diferentes variedades de laranja e seus respectivos tratamentos.
Participante: P. Pompermayer.
- 04/04/95 Visita à Nestlé
Local: Caçapava, SP.
Objetivos: Conhecer as instalações e os processos de fabricação dos produtos.
Participantes: E. Bilsland, J. Gaspari, L. Scarpari, M. Barbosa,
P. Pompermayer, P. Meyer.
- 04/05/95 Visita ao Jardim Botânico.
Local: Rio de Janeiro, RJ
Objetivos: Entrar em contato com as várias espécies de interesse agrônômico, ornamental, medicinal e florestal.

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer e Tutor.

05/05/95 Visita a FIOCRUZ. (Fundação e Instituto Oswaldo Cruz).

Local: Rio de Janeiro, RJ.

Objetivos: Estabelecer contato com pesquisadores, conhecer as linhas de pesquisa e as instalações do Instituto.

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer e Tutor.

05/05/95 Visita ao Instituto Bio Manguinhos.

Local: Rio de Janeiro, RJ.

Objetivos: Conhecer o processo de produção de vacina contra a febre amarela.

Participantes: E. Castelhana, E. Bilsland, F. Sampaio, G. Amorim, I. Berger, J. Gaspari, J. Argueso, L. Scarpari, M. Barbosa, P. Pompermayer, e Tutor.

10/05/95 Visita a Faculdade de Medicina, Veterinária e Zootecnia - USP.

Local: Pirassununga, SP.

Objetivos: Conhecer as instalações e linhas de pesquisa do Departamento de Biotecnologia Animal

Participantes: I. Berger, P. Pompermayer.

17/05/95 Visita ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas - IPT.

Local: São Paulo, SP.

Objetivos: Conhecer as instalações e linhas de pesquisa do Instituto.

Participantes: I. Berger, P. Pompermayer.

24/05/95 Visita ao Centro de Biotecnologia Agrícola - CEBTEC

Local: ESALQ/USP - Piracicaba, SP.

Objetivos: Conhecer as instalações e linhas de pesquisa do Centro.

Participantes: I. Berger, P. Pompermayer.

07/04/95 a 16/04/95 Excursão para Estância Caimã e Parque Estadual do Morro do Diabo

Local: Pantanal Matogrossense e município de Teodoro Sampaio

Objetivos: Manejo de fauna silvestre, análise de habitats e do impacto do homem sobre a fauna e flora local.

Participante: P. Meyer

3.10. Publicações em Boletins, Periódicos, Anais e Congressos

ARGUESO, J. L.; GOMES, L. H.; DUARTE, K. M. R.; TAVARES, F. C. A. - Uso de RAPD para Caracterização de Híbridos e Segregantes de Meioses Completas de *Saccharomyces cerevisiae* In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41, Caxambu-MG, 1995 (no prelo).

BILSLAND, E.; KEMENES, P. A., MEYER, P. M., PEREIRA, F.; COUTINHO, L.L. Detecção da Síndrome do Estresse de Suíno através de AFLP (polimorfismo de fragmentos de restrição amplificados). In: REUNIÃO PAULISTA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, V, Piracicaba-SP, 1994.

COUTINHO, L. L.; LOPES, M. L.; BILSLAND, E. Incorporação de 5-Bromo-2'-
Deoxiuridina no DNA de Embriões de Aves para Medir a Proliferação Celular. In:
CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 41, Caxambu-MG, 1995 (no prelo).

SABOYA, L.V.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Análise de Recombinantes em *Trichoderma
pseudokoningii* via Fusão de Protoplastos. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA
DE MICRORGANISMOS, 19, Serra Negra, 1994. Programa e Resumos. Campinas:
UNICAMP, 1994. p.53.

3.11 Estudo de língua estrangeira

NOME: I. Berger.

CURSO: Inglês - Aliança Cultural.

FASE: Nível Básico

CARGA HORÁRIA: 2h30min semanais.

NOME: E. Castellhano.

CURSO: Inglês - Fisk

FASE: Concluído.

CARGA HORÁRIA: 2h00min semanais.

NOME: P. Pompermayer

CURSO: Inglês

FASE: Avançado

CARGA HORÁRIA: 3h00min semanais.

NOME: L. Scarpari

CURSO: Inglês - CCAA

FASE: Básico.

CARGA HORÁRIA: 3h00min semanais.

NOME: M. Barbosa.

CURSO: Inglês - Up to You.

FASE: Concluído.

CARGA HORÁRIA: 2h30min semanais.

NOME: P. Meyer

CURSO: Inglês - Aliança Cultural

FASE: Avançado

CARGA HORÁRIA: 2h30min semanais

NOME: P. Meyer

CURSO: Alemão - aulas particulares

FASE: Básico

CARGA HORÁRIA: 2 horas semanais

3.12 Leituras extra-curriculares

J. Gaspari

WATSON, J.D.; TOOZE, J. & KURTZ, D.T. Recombinant DNA - A Short Course.
W. H. Freeman and Company - New York, 260p.

E. Castelhana

PRIMROSE, S. B.; Modern Biotechnology - Oxford, Blackwell, 1987, 176p.

E. Castelhana

LEHNINGER, A. L.; Bioquímica, 4ª ed, V4, O DNA e a estrutura do Material Genético,
São Paulo, 1984, 529-621 p.

E. Castelhana

JUNQUEIRA, L. C. U. & CARNEIRO, J. - Biologia Celular e Molecular, 3ª ed, Editora
Guanabara, Rio de Janeiro, 1983.

E. Castelhana

De ROBERTIS, E. D. P; De ROBERTIS, E. M. F. - Bases da Biologia Celular e Molecular,
2ª ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993, 307p.

F. Sampaio

GONÇALVES, A.N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*, S.T.
BLAKE "in vitro". ESALQ, Piracicaba, 1982.

F.Sampaio

VIEIRA, M.L.C. coord. Cultivo "in vitro" e manipulação genética de plantas.
CBAB/ESAIQ, Piracicaba, 1993.

F. Sampaio

WIECHETEK, M. S. S. Micropropagação de *Eucalyptus viminalis* Labill. a partir de material juvenil. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

I. Berger

CALDAS, L.S.; TORRES, A.C. Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas.
Editores Antonio Carlos Torres e Linda Styer Caldas. Brasília ABCTP/
EMBRAPA CNPH, 1990. 433p.

I. Berger

D'SILVA, I. & D'SOUZA, L. In vitro propagation of *Anacardium occidentale* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 1-6, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1992.

I. Berger

LIEVENS, C. et al. First results about micropropagation of *Anacardium occidentale* by tissue culture. Fruits - vol.44, nº10, p.553-557, 1989.

I. Berger

KHUSH, G.S. & TOENNIESSEN, G.H. Biotechnology in Agriculture No. 6: Rice Biotechnology. IRR/CAB International, Oxford, UK, 1991.

I. Berger

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. Rice Tissue Culture Planning Conference, IRRI, Philippines, 1982.

I. Berger

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY. Nuclear Techniques and In Vitro Culture for Plant Improvement, Vienna, 1986.

L. Scarpari

CARRARO, D. M. Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays*, L.), Mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 1990, 121 p.

L. Scarpari

LEHNINGER, A. L. Bioquímica, 4ª ed, V.4, O DNA e a estrutura do material genético, São Paulo, 1984.

L. Scarpari

PRIMROSE, S.B. Modern Biotechnology, Oxford, Blackwell. 1987, 176 p.

P. Pompermayer

MOSES, V.; CAPE, R.E. **Biotechnology. The Science and the Business.** Switzerland: Harwood Academic Publishers GmbH, 1991. 596p.

P. Pompermayer

SASSON, A. **Biotechnologies in developing countries: present and future.** França UNESCO, 1993. 764p.

P. Pompermayer

PRENTIS, S. **Biotechnology: A New Industrial Revolution**. New York:
1984. 192p.

P. Pompermayer

SASSON, A. **Biotechnologies: Challenges and Promises**. Paris:
Universitaires de France, 1984. 315p.

P Meyer

PENA, S.D.J; JEFFREYS, A.J. Breve Introdução às Impressões Digitais de DNA. Revista Brasileira de Genética, 16(3), 857-879. 1993

P. Meyer

MULLIS,K.B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American.
April, 1991.

P. Meyer

MACLENNAN, D.H.; PHILLIPS, M.S. Malignant Hyperthermia. Science,256(8), may
1992

P. Meyer

MITCHELL, G. Porcine Stress Syndromes Advances in Food Research, 28,1991.

P. Meyer

PHILPOTT, M. The Dangers of Disease Transmission by Artificial Insemination and Embryo Transfer. British Veterinary Journal, 149, 1993.

M. Barbosa

BECKMAN, J. S. Plant Genomes: Methods for Genetics and Physical Mapping

M. Barbosa

FERREIRA, M. E., RIMMER, S.R., WILLIAMS, P. H., and OSBORN, T. C., Mapping loci controlling *Brassica napus* resistance to *Leptosphaeria maculans* under different screening conditions. *Phytopathology*, 85:213-217, 1995

M. Barbosa

FERREIRA, M. E., RIMMER, S.R., WILLIAMS, P. H., and OSBORN, T. C., Mapping a locus controlling to *Albugo candida* in *Brassica napus* using Molecular Markers. *Phytopathology*, 85: 218-220, 1995

3.13 Outras Atividades

3.13.1 Organização de eventos:

05-07/12/94 V Reunião Paulista de Iniciação Científica em Ciências Agrárias.

5 a 7/12/94 VIII Congresso de Iniciação Científica na ESALQ/USP.

- 16/09/94 III Curso de Atualização em Biotecnologia.
- 25/3/95 I Reunião Pró-Aprendizagem Ativa.
- 8/6/95 Mesa Redonda "Patenteamento de Seres Vivos".
- 29/5 a 19/6/95 Ciclo de Seminários Internos em Genética.
- 10 a 24/07/95 Mini-cursos de informática.

4. AVALIAÇÃO

4.1 Apreciação qualitativa do grupo sobre:

a) as atividades realizadas no período

Dentre as atividades realizadas no ano de 1994 e até julho de 1995, a organização do III Curso de Atualização em Biotecnologia foi aquela que mais motivou e engrandeceu o grupo. Os esforços em manter contatos com as empresas, pedidos de patrocínios para o evento (vinda do pesquisador Elíbio Rech do CENARGEN-Brasília, papéis, biscoitos, etc.), foram recompensados pela repercussão e sucesso que o curso obteve. Esse foi um modo de divulgar a biotecnologia e o Grupo PET dentro da comunidade do campus e fora dela.

Os seminários realizados pelo Grupo proporcionaram um aprendizado sobre os diversos ramos da atuação da biotecnologia, bem como um treinamento da utilização dessa prática comum no meio científico.

Foram feitas entrevistas com professores da ESALQ diretamente relacionados com a biotecnologia, a fim de se tomar conhecimento das diretrizes dessa área dentro da

Escola. Foi entrevistado o Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, na época o Diretor da ESALQ, que nos expôs os rumos que a Biotecnologia tomou, bem como as perspectivas futuras. Pelas informações adquiridas, fez-se necessária uma entrevista com o Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pela sua liderança no projeto BIOCEMA (Centro de Biologia Celular e Molecular na ESALQ).

O Minicurso de Práticas Laboratoriais em Biologia Molecular realizado no laboratório de Genética de Leveduras no Departamento de Genética da ESALQ foi um evento importante para a desenvoltura dos bolsistas iniciantes dentro de um laboratório. O curso foi ministrado pelos bolsistas mais antigos e experientes. Foram realizadas técnicas como extração de DNA de leveduras, PCR, fusão de protoplastos de fungo, eletroforese de DNA e proteína, etc.

A organização da V Reunião Paulista em Iniciação Científica em Ciências Agrárias realizada no Pavilhão de Engenharia da ESALQ promoveu uma integração entre os três PET's existentes na Escola (Biotecnologia, Ecologia e Gerenciamento e Administração da Empresa Agropecuária). Além de proporcionar um conhecimento de todas as linhas de pesquisa realizadas na ESALQ.

A organização da Reunião Pró-Aprendizagem Ativa realizada no Departamento de Genética/ESALQ promoveu a integração entre os PET's Biotecnologia, Ecologia e Odontologia (UNICAMP) de Piracicaba, assim como com o ex-bolsista PET-Biotecnologia José Henrique Conti, o Eng. Agrônomo José Vicente Vieira (Projeto DRI) e com a responsável pelo Setor de Recursos Humanos da Monsanto do Brasil, Maria Luíza do Nascimento. Além da integração, o evento proporcionou o conhecimento de pré-requisitos no processo de seleção de empresas e a base do trabalho em equipe.

As visitas à FIOCRUZ, Biomanguinhos e Jardim Botânico, realizadas no Rio de Janeiro, permitiram o contato do Grupo com instituições e profissionais das diversas áreas de aplicação da Biotecnologia, proporcionando uma visão mais ampla que a usualmente abordada pelo Grupo, voltado a área Agrícola. Ainda, a viagem realçou as relações de amizade e companheirismo entre os bolsistas.

A mesa redonda “Patenteamento de Seres Vivos” teve como objetivo não apenas informar a comunidade acadêmica da ESALQ e UNIMEP (Universidade Metodista de Piracicaba), mas também de intervir na promulgação da Lei de Patentes através de sugestões enviadas ao Congresso Nacional. Sua organização integrou o PET-Biotecnologia, o PET-Ecologia, o Laboratório de Sementes do Departamento de Ciências Florestais, a Associação de Pós-Graduação da ESALQ e o Centro Acadêmico “Luiz de Queiroz” (CALQ).

A participação na XX Reunião Anual de Genética de Microrganismos contribuiu com a atualização do conhecimento das pesquisas realizadas na área e suas perspectivas futuras, servindo como base para a realização de estudos futuros.

b) articulação das atividades com os objetivos e o planejamento das atividades propostas inicialmente:

De modo geral as atividades foram cumpridas de maneira satisfatória, alguns itens como a ampliação do grupo para 12 bolsistas e a criação de um regimento interno não foram cumpridos. A ampliação não foi realizada devido a ausência de retorno ao pedido encaminhado em fevereiro de 1995. Por sua vez, o regimento interno não foi concretizado apesar das idéias e sugestões surgidas da discussão sobre o tema.

c) possíveis mudanças de direcionamento de objetivos e atividades propostos:

Os objetivos permanecem os mesmos, embora os meios para realizá-los possam ser aperfeiçoados de modo a se tornarem mais eficientes, como por exemplo, a promoção de visitas a empresas e instituições abertas ao corpo discente e docente da ESALQ, visando aumentar o interesse pela área e divulgação do grupo. Outras propostas podem ser citadas, tais como a atualização da publicação “Produtos, Processos e Prestação de Serviços - ESALQ e CENA”, organização de enquetes entre outras.

d) o relacionamento do grupo: entre si, com o tutor, corpo discente e docente da graduação e da IES como um todo:

Do ponto de vista do grupo:

-Entre si :

O grupo manteve um bom relacionamento entre seus integrantes. Mesmo os integrantes ainda não efetivados participam integralmente de todas as atividades demonstrando grande interesse e capacidade de adaptação.

-Com o Tutor:

O relacionamento com o tutor é bom, apesar de em alguns momentos ocorrerem divergências de objetivos e interesses, o que é contornado com muito diálogo discussões sobre o tema em questão.

-Com o corpo discente e docente e da IES como um todo:

Neste período o grupo ganhou maior prestígio entre a comunidade esalqueana através da divulgação de cursos, palestras e visitas. Os alunos estão tomando conhecimento e apresentando maior interesse pela área de Biotecnologia Agrícola e estamos adquirindo cada vez mais apoio dos professores.

- do ponto de vista do tutor:

Neste ano letivo contamos com um grupo de oito bolsistas e, como esperado, maior diversidade de interesses. Procurando atender ao interesse de pesquisa manifestado pelos bolsistas dedicou-se maior tempo às atividades individuais, o que no início contribuiu para diminuir a intensidade das ações coletivas. Esta situação foi corrigida a partir da realização do III Curso de Atualização em Biotecnologia, onde os alunos têm participação intensa no planejamento e execução do mesmo.

Nesta oportunidade verificou-se o grande interesse e o valor das atividades cooperativas, sendo destacado pelos alunos os benefícios colhidos nesta atividade. O relacionamento entre bolsistas com o tutor passou a ser intenso, estimulando as discussões e parcerias.

O relacionamento do Grupo com o corpo discente pode ser considerado normal, desde que as atividades do Grupo estão voltadas à divulgação da Biotecnologia junto

ao corpo docente. O modelo de aproximação utilizado adotado tem como pontos principais o Curso de Atualização em Biotecnologia, inclusive também muito procurado por alunos de cursos de pós-graduação, a divulgação em murais de aspectos relevantes da Biotecnologia e a participação intensa no Congresso de Iniciação Científica anualmente realizado na ESALQ.

Com o corpo docente existe a interação direta através dos estágios de pesquisa.

O Grupo tem interagido com outros Grupos PET como é o caso do PET-Agronomia da Universidade Estadual de Maringá e acredita-se que, com a informatização em andamento na Universidade Federal de Uberlândia estas ações possam ser estimuladas.

- do ponto de vista do grupo:

O relacionamento do Grupo entre si e com o tutor pode ser considerado excelente devido à amizade e companheirismo sempre presentes nos integrantes. O tutor está sempre disposto a aconselhar quanto a vida profissional, além de seu incentivo e dedicação. Os bolsistas ingressantes se integraram com facilidade aos demais. O relacionamento com o corpo docente nos mostra que o PET vem adquirindo popularidade entre os alunos de Graduação e Pós-Graduação da ESALQ, através de atividades promovidas com a comunidade, e com isso aumentando o interesse pelo Grupo. Em relação ao corpo docente o elevado aproveitamento acadêmico proporciona uma admiração por parte dos professores.

Com a realização do III CAB houveram muitas parabenizações por parte dos professores e alunos ao Grupo PET, devido ao sucesso do evento. A amizade do grupo com os funcionários foi realçada, prova disto foi a boa vontade de todos em colaborar com o evento no que diz respeito à sua infraestrutura.

4.2 Acompanhamento Interno dos Grupos PET/CAPES

Parecer do grupo sobre algumas questões importantes para o Programa Especial de Treinamento - PET

A organização e a participação em eventos como cursos e congressos é muito importante para a coesão do grupo, além de contribuir para o desenvolvimento intelectual dos bolsistas e para o contato com pesquisadores e empresas.

As visitas enriquecem o aprendizado e demonstram o campo de trabalho do Engenheiro Agrônomo.

As demais atividades como reuniões semanais, estudo dirigido, entrevistas com professores e pesquisadores da área e seminários apresentados pelos bolsistas são de fundamental importância para a atualização e aprimoramento do grupo na área de Biotecnologia Agrícola, bem como nas demais áreas abrangidas pelo curso.

4.3 Sugestões do Grupo para aprimorar a qualidade do desempenho do próprio grupo e do Programa Especial de Treinamento, visando torná-los mais eficazes e eficientes.

1) De posse da programação, detalhá-la em passos e dividir as tarefas em grupos menores com responsáveis, sem sobreposição, de modo que em um curto espaço de tempo possamos ter o resultado em mãos;

2) Montar a Grade dos integrantes do Grupo, a fim de ser possível encontrar os integrantes a qualquer momento do dia e saber como está o andamento de suas tarefas;

3) No final de cada reunião semanal, faremos a pauta da reunião seguinte, a fim de tornar nossas reuniões mais produtivas;

4) Integrar os bolsistas com seus orientadores de estágios individuais para podermos ter maior amplitude de conhecimento e atividades individuais de cada um;

5) Promover companheirismos sem compromissos acadêmicos visando integrar os novos bolsistas e dar mais intimidade ao grupo como um todo, a fim de melhorar o relacionamento entre os bolsistas;

6) Fazer balanços mensais e ao fim de cada evento, de modo a não cometer os mesmos erros e poder melhorar nossas atividades;

7) Fazer previsões para as taxas acadêmicas com antecedência;

8) Adotar um sistema de avisos em Rede, a fim de tornar nossa comunicação externa e o progresso das nossas atividades mais rápidos;

9) Aumentar a integração com os outros PETs da cidade e possivelmente da região para tornar o intercâmbio de idéias um meio de melhorarmos nosso desenvolvimento;

10) Fundar o "Pró - PET" que consiste em um Grupo de alunos que acompanhem nossas atividades sem ser bolsistas, de modo a torná-los familiarizados com o programa PET e se tornarem grandes candidatos a bolsistas efetivos, nesse grupo entrariam possíveis candidatos a bolsista que fossem selecionados;

11) Fundar também o "I.C. - PET" que consiste num grupo de alunos bolsistas de Iniciação Científica que desenvolveriam atividades com o PET para melhor aproveitamento e sua Graduação;

5. INFORMAÇÕES SOBRE OS EX-BOLSISTAS

1989

Fernando Cesar Boscarol - Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - ESALQ/USP

Goran Kuhar Jezovsek - Mestrado em Genética e Melhoramento - UNESP - Jaboticabal

José Henrique Conti - Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas -
ESALQ/USP

Roberto Pedroso de Oliveira - Mestre, EMBRAPA, Sete Lagoas

1990

Haíssa Roberta Cardarelli - Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial -
ESALQ/USP

Silvana Gomes Regitano - Gerente de Marketing

1991

Claudia M. Iannelli - Mestrado

Keila M. R. Duarte - Mestrado em Microbiologia Agrícola, ESALQ/USP

1992

Juliana C. de Freitas - Mestrado em Fitopatologia - ESALQ/USP

Sandro Alves Lima - Contratado pela ICI

1993

Luciana Viriato Saboya - Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial,
ESALQ/USP

Mario Cesar Sesso - Contratado pela BAGISA SA (Pesquisa e Desenvolvimento)

1995

Elisabeth Bilsland - Recém formada e residindo na Suécia

ACOMPANHAMENTO INTERNO DOS GRUPOS PET/CAPES*

Encontra-se em anexo.

VII- ANEXOS

*Atestado de notas do segundo semestre de 1993, primeiro semestre de 1994, segundo semestre de 1994 e primeiro semestre de 1995.

*Programa e resumos do III CAB.

*Cartaz de divulgação da V Reunião Paulista de Iniciação em Ciências Agrárias.

*Monografias, descrições de estágio e publicações dos bolsistas em 1994.

*Relatório de seleção de novos bolsistas enviado em fevereiro de 1995.

*Resumos de seminários apresentados pelos bolsistas.

*Cartaz de divulgação da Mesa Redonda sobre "Patenteamento de Seres Vivos".

*Artigo do Jornal de Piracicaba divulgando a Mesa Redonda sobre "Patenteamento de Seres Vivos".

*Publicações dos Bolsistas.

*Avaliação e parecer do Tutor com relação ao Grupo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PET-BIOTECNOLOGIA
CICLO DE SEMINÁRIOS INTERNOS

MARCADORES GENÉTICOS

ELAINE CRISTINA CASTELHANO

JUNHO/1995

1-INTRODUÇÃO

Marcadores genéticos são recursos utilizados para caracterizar o material genético dos indivíduos, ou seja, são peculiaridades do material genético úteis no mapeamento genético, caracterização molecular, determinação do grau de parentesco e filogenia, entre outras funções. Podem atuar a nível cromossômico, molecular (DNA, RNA, proteínas), ou ainda a nível de organismos. Aqui serão citados apenas os marcadores atuantes a nível cromossômico e molecular.

2-NÍVEL CROMOSSÔMICO

Os marcadores genéticos que atuam a nível cromossômico geralmente baseiam-se na análise do cariótipo, que são as características do conjunto de cromossomos e variam consideravelmente entre as diferentes espécies. Essas variações no cariótipo podem estar relacionadas com o número, tamanho e formato dos cromossomos.

De acordo com seu formato os cromossomos podem ser classificados em quatro tipos, determinados pela posição do centrômero em:

- telocêntricos - possuem o centrômero localizado em uma extremidade
- acrocêntricos- possuem braço curto bastante pequeno
- submetacêntricos - possuem braços de comprimentos diferentes
- metacêntricos - apresentam braços idênticos ou quase iguais

O camundongo, por exemplo, possui cromossomos acrocêntricos; muitos anfíbios têm somente cromossomos metacêntricos, os humanos possuem um grupamento característico com cromossomos metacêntricos, acrocêntricos e submetacêntricos.

As espécies que possuem elevada quantidade de DNA e cromossomos grandes são mais favoráveis à análise genética do que as outras. Exemplos dessas espécies são as salamandras e gafanhotos.

O cariótipo pode modificar-se levando a alterações genéticas, essas alterações podem envolver modificações no número ou estrutura dos cromossomos e podem ocorrer espontaneamente ou como consequência da ação de radiações ionizantes ou de certas substâncias químicas (agentes mutagênicos que alteram a molécula de DNA)

No caso das alterações numéricas, a alteração no número de cromossomos de um cariótipo pode levar à **euploidia** ou **aneuploidia**. Na euploidia, todo o conjunto de cromossomos está diminuído ou aumentado, já na aneuploidia, há anormalidade do cariótipo, onde um (ou mais) cromossomo específico está presente em muitas ou poucas cópias.

Um ser é denominado poliplóide quando possui mais do que dois conjuntos de cromossomos, a poliploidia geralmente aparece em vegetais em floração, sendo menos frequente em animais, ela pode ser induzida pela colchicina, que inibe a formação do fuso, permitindo o acúmulo de *sets* adicionais de cromossomos.

A aneuploidia pode resultar de uma falha na separação de um par de -- /cromossomos durante a meiose, originando seres *monossômicos*, onde um dos cromossomos foi perdido pois não alcançou o polo e *trissômicos*, onde há ganho de um cromossomo, havendo, assim, três do mesmo tipo.

Essas alterações são comuns em células cultivadas, podendo levar a alterações neoplásticas.

No caso das alterações estruturais do cromossomo, surgem aberrações cromossômicas, que são alterações físicas da estrutura do cromossomo que podem ser observadas através do microscópio, afetam geralmente muitos genes, podendo ser intra ou intercromossômicas, e contrastando com a mutação gênica, onde as alterações ocorrem a nível molecular.

Muitas plantas originaram-se de uma mudança abrupta e rápida na natureza, sendo a aneuploidia e a euploidia as principais fontes de variação.

Nos animais, o número de cromossomos pode ser diminuído através de *fusão cêntrica*, onde dois cromossomos acrocêntricos unem-se para formar um metacêntrico, ou aumentados através de *fissão* ou *dissociação*, onde um cromossomo metacêntrico (geralmente grande) e um pequeno fragmento metacêntrico supranumerário translocam-se, levando à formação de dois cromossomos acrocêntricos ou submetacêntricos.

Através desses marcadores, pôde-se fazer uma correlação entre os 48 cromossomos de alguns primatas (chimpanzé, orangotango e gorila) e os 46 cromossomos humanos, revelando que a diferença entre os dois cariótipos está na fusão de dois cromossomos acrocêntricos dos primatas para formar o cromossomo nº 2 do homem.

Uma técnica que melhora sensivelmente a análise de cariótipos é o **bandeamento cromossômico**, onde os cromossomos são corados em subunidades definidas constituindo as bandas. Existem várias técnicas de coloração baseadas em

princípios diferentes que produzem bandas de distribuição diferente, mas quando se usa uma técnica, o número, posição e dimensão de cada banda são específicas e constantes para cada cromossomo. Essa tecnologia de bandeamento deu origem a um progresso acentuado na análise das mutações e na localização dos genes nos cromossomos do homem e vertebrados superiores.

A coloração diferencial das bandas depende, basicamente, das sequências de nucleotídeos do DNA naquela região do cromossomo. Assim, existem as bandas ricas em AT, as ricas em GC e as que evidenciam regiões heterocromáticas

A cromatina, nos eucariontes, é quimicamente formada por DNA associado a proteínas, dentre as quais se destaca uma classe de proteínas básicas denominadas *histonas*. Essas proteínas se ligam ao DNA graças à interação de seus radicais amínicos com os radicais fosfato do DNA. Nem todos os radicais fosfato são neutralizados pelas histonas, o que dá à cromatina um caráter ácido, isto é, uma grande capacidade para ser corada por corantes básicos (a essa propriedade dá-se o nome de *basofilia*)

3-NÍVEL MOLECULAR

Marcadores moleculares são marcadores genéticos que permitem identificar e caracterizar moléculas (DNA, RNA, proteínas). São baseados nos princípios de complementariedade, denaturação, renaturação, hibridação, enzimas, etc.

Dentre as diversas técnicas utilizadas para agir como marcadores moleculares, algumas serão apresentadas.

3.1-SEQUENCIAMENTO

No sequenciamento, o código genético pode ser decifrado, comparando-se as sequências de aminoácidos de proteínas com as sequências de nucleotídeos dos genes que as codificam. Existem diversos métodos de sequenciamento, todos eles baseados na composição de fragmentos de DNA de diferentes comprimentos, que se iniciam num ponto fixo e terminam em nucleotídeos específicos. Os fragmentos de DNA são separados por tamanho em gels de poliacrilamida e a sequência de nucleotídeos é lida diretamente no gel. Os fragmentos de DNA podem ser produzidos através de clivagem química ou por cópia enzimática do DNA de cadeia única. Através deste

método foi possível determinar sequências completas de nucleotídeos de organismos vivos como o bacteriófago ØX174 (infecta *Echerichia coli*) e o SV40 (vírus que infecta células de macaco podendo causar tumores).

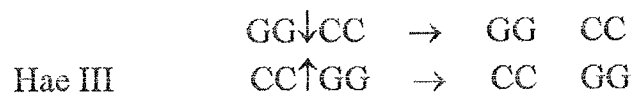
3.2-ENZIMAS DE RESTRIÇÃO

Enzimas de restrição ou endonucleases de restrição são enzimas que reconhecem e seccionam sequências específicas de nucleotídeos no DNA. Estas enzimas atuam como um "bisturi molecular" preciso, sendo muito empregadas no estudo do DNA.

As enzimas de restrição reconhecem, habitualmente, sequências com quatro ou seis nucleotídeos de extensão. Aquelas que reconhecem quatro nucleotídeos produzem fragmentos menores (± 250 bases) do que as que reconhecem seis nucleotídeos (± 4000 bases)

Uma importante característica destas sequências de reconhecimento é o fato de serem assimétricas, ou seja, possuírem um eixo de simetria, a partir do qual os nucleotídeos podem ser lidos de maneira idêntica nas duas cadeias na direção 5' para 3'.

Algumas enzimas cortam a sequência de reconhecimento na metade, produzindo segmentos com extremidades inativas, por exemplo



Muitas outras enzimas realizam cortes nas duas cadeias, separadas por vários nucleotídeos. Isto produz extremidades pegajosas, que são segmentos de uma única cadeia nas extremidades do DNA clivado que podem parear-se entre si, podendo unir-se com quaisquer fragmentos de DNA clivados pela mesma enzima. Ex:



3.3-HIBRIDIZAÇÃO

É uma técnica de grande utilidade em biologia pois permite, entre outras aplicações, determinar quantitativamente por método bioquímico, a homologia existente entre o DNA das várias espécies animais. Nos vertebrados por exemplo, foi detectada a forte hibridização entre o DNA dos artrópodes e do homem (mais do que 90%) e verificou-se que ela decresce à medida que descemos na escala filogenética dos mamíferos aos répteis e peixes. A homologia entre o DNA dos peixes e do homem é de apenas 20%.

Outra utilidade da hibridização realizada *in vitro* é seu emprego para quantitar o número de cópias de uma determinada sequência específica de DNA existente em uma célula, pois a quantidade de material radioativo hibridizado é proporcional ao número de sequências existentes. Foi por esta técnica que foi possível saber que os genes do RNA ribossômico e das histonas estão presentes nas células em cópias múltiplas, ao passo que os genes para colágeno e enzimas digestivas têm apenas uma cópia por célula.

A técnica de hibridização tem também sido muito utilizada para a localização de segmentos específicos de DNA nos cromossomos através do que se chama *hibridização in situ*. Nesta variante, cariótipos cujos cromossomos foram previamente achatados em lâmina são submetidos ao calor com conseqüente fusão do seu DNA. Incuba-se então estes cromossomos com uma solução de DNA específico, radioativo e já fundido, por um tempo determinado em condições nas quais ocorre a hibridização. Após a hibridização, lava-se o preparado, retirando-se o excesso de DNA radioativo e realiza-se, na lâmina, o processo de radioautografia, que nos indicará nos cromossomos qual o local em que está localizado o DNA em questão.

3.4-SONDAS

As sondas são usadas nas técnicas de hibridização descritas no item acima. São sequências puras de DNA de constituição conhecida, tornadas radioativas, e que são utilizadas para localizar e quantitar sequências homólogas em cadeias longas de DNA ou em estruturas celulares como os cromossomos. As sondas são muito utilizadas para a determinação quantitativa e localização de sequências determinantes de DNA ou RNA nas células pelo processo de hibridização.

3.5-PCR (Polymerase Chain Reaction)

É um método de síntese de DNA *in vitro* pelo qual um segmento particular de DNA pode ser especificamente amplificado. Dentro deste método podemos citar também o RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNAs), que é uma modalidade de PCR.

3.6-IMUNOCITOQUÍMICA

Consiste em técnicas que baseiam-se na relação antígeno-anticorpo e que permitem o estudo da localização intracelular de proteínas específicas. Quanto à especificidade, estas técnicas são muito superiores às de identificação de proteínas baseadas na evidênciação de aminoácidos. A imunocitoquímica permite localizar um determinado tipo de molécula proteica, excluindo todas as outras proteínas existentes na célula.

3.6.1-Imunocitoquímica direta: Suponhamos que de um determinado órgão de rato se possa extrair e purificar quimicamente uma proteína, que vamos chamar proteína X. O problema citoquímico consiste em descobrir em que células ou parte da célula está localizada a proteína X, pois ela foi isolada de um órgão inteiro.

Injetando-se a proteína X em um coelho, este formará um anticorpo com propriedade de se combinar exclusivamente com a proteína X, não se combinando com qualquer outra. O anticorpo aparece porque a proteína X pertence a um órgão de rato, sendo portanto estranha para o coelho, no qual foi injetada.

Algum tempo após a injeção da proteína X no coelho, poderemos obter do sangue deste animal um anticorpo específico contra aquela proteína. Esses anticorpos são então combinados com a enzima peroxidase, que serve como marca. A identificação citoquímica da peroxidase identifica também o anticorpo ao qual a enzima está ligada.

Colocando-se sobre um corte do órgão de rato que contém a proteína X uma solução do anticorpo marcado com a peroxidase, haverá uma combinação do antígeno (proteína X) com seu anticorpo (gamaglobulina anti-X) marcado com peroxidase. O complexo antígeno-anticorpo que se forma não é visível ao microscópio óptico nem ao eletrônico, mas torna-se visível se a peroxidase for evidenciada por uma reação citoquímica apropriada.

Esta evidenciação é feita colocando-se sobre o corte uma substância que, sob a ação da peroxidase forme um composto corado e eletrodense.

" Em substituição à peroxidase pode-se usar como marca um corante fluorescente ligado ao anticorpo, neste caso o preparado obtido pela ação do anticorpo sobre o corte que contém o antígeno pode ser imediatamente examinado ao microscópio de fluorescência. Todavia, a peroxidase permite melhor localização, pois o corte pode ser estudado com o microscópio eletrônico e o antígeno localizado ao nível das organelas celulares.

Uma terceira forma de se marcar o antígeno consiste em sua conjugação com *ferritina*. A ferritina, uma proteína que devido ao seu alto teor em ferro é muito eletrodensa, permite o estudo da localização de proteínas (antígenos) ao nível do microscópio eletrônico. Esta marcação não serve para o estudo ao nível do microscópio óptico.

A técnica direta de imunocitoquímica é menos sensível do que a técnica indireta, descrita a seguir, por isso é mais usada.

3.6.2-Imunocitoquímica indireta: Nesta técnica a marcação é colocada em um anticorpo, isto é, uma antigamaglobulina. Por sua maior sensibilidade, permitindo a demonstração de antígeno, a técnica indireta é mais usada na prática.

Supondo que queiramos saber a localização celular da proteína Y, também contida em um órgão de rato, a primeira etapa consiste na colocação, sobre o corte do tecido, de uma solução do antígeno anti Y, obtido pela injeção da proteína Y em um coelho. Haverá combinação de antígeno com seu anticorpo.

Na segunda etapa colocamos sobre o corte uma solução de anticorpo contra gamaglobulina de coelho. Este anticorpo, que é uma antigamaglobulina e, portanto, um anticorpo, pode ser obtido pela injeção de gamaglobulina de coelho em carneiro ou cobra. Ao final, teremos um complexo constituído pela proteína Y, seu anticorpo e uma antigamaglobulina. Esta pode ser evidenciada por conjugação com substâncias fluorescentes, ferritina de peroxidase, conforme foi descrito na técnica direta.

3.7 RADIOAUTOGRAFIA

A radioautografia é aplicada como uma técnica citoquímica *in situ* para a detecção de isótopos radioativos. Baseia-se na sensibilidade das emulsões fotográficas às radiações ionizantes. Como não existem nas células elementos

radioativos, podemos seguir pela radioautografia a incorporação e a migração de compostos radioativos, introduzidos nas células com finalidades experimentais.

Método: 1) Injeta-se timidina H^3 num animal que será sacrificado uma hora depois. As células que estiverem sintetizando DNA incorporarão a timidina radioativa injetada; 2) Os tecidos são fixados, incluídos em parafina ou resina, cortados no micrótomo e presos em lâmina histológica; 3) Na câmara escura a lâmina é coberta com delgada camada de emulsão fotográfica e guardada em caixa à prova de luz por alguns dias ou meses, para que a radioatividade atue na emulsão (exposição); 4) Após este período a câmara é revelada, aparecendo grânulos negros de prata sobre os núcleos radioativos.

A radioautografia é muito usada em citologia para o estudo da síntese de certas moléculas, para isso, como no exemplo do DNA já citado, injetamos em um animal ou colocamos no meio de cultura de células um precursor radioativo da substância que desejamos estudar.

Para estudo do RNA podemos usar uridina e para o estudo da síntese e migração de proteínas usamos aminoácidos. Em geral, as moléculas radioativas usadas nestes experimentos são marcadas com hidrogênio (H^3), carbono (C^{14}) ou enxofre (S^{32})

3.8-EQUIVALÊNCIA DE BASES NO DNA.

Uma das peças mais importantes da evidência bioquímica que apoiou o conceito de que o DNA é portador da informação genética, foi a descoberta de que a composição de bases do DNA está relacionada com as espécies de origem. Antes de os métodos cromatográficos dignos de confiança tornarem-se acessíveis, julgava-se que as quatro principais bases encontradas no DNA -adenina, guanina, citosina e timina- ocorressem em relação equimolecular em todas as moléculas de DNA. Então, no período de 1949 a 1953, E. Chargaff e seus colegas aplicaram métodos cromatográficos quantitativos para separação e análise quantitativa das quatro bases obtidas de hidrolisados de espécimes de DNA isolados de diferentes organismos e as seguintes conclusões foram tiradas:

- A composição de bases do DNA varia de uma espécie para outra;
- Espécimes de DNA isolados de tecidos diferentes da mesma espécie têm a mesma composição de bases;

- A composição de bases do DNA de uma dada espécie não varia com a idade, estado nutricional ou mudanças ambientais;
- Em praticamente todos os DNAs examinados, o número de resíduos da adenina foi sempre igual ao número de resíduos de timina, isto é, $(A=T)$ e o número de resíduos de guanina foi sempre igual ao número de resíduos de citosina $(C=G)$, portanto, é evidente que a soma dos resíduos de purinas iguala-se à soma de resíduos de pirimidinas, ou seja, $A+G = C+T$.
- Os DNAs extraídos de espécies inteiramente relacionadas possuem composição de bases semelhantes, enquanto que os de espécies bastante diferentes terão provavelmente composição de bases muito diferentes. A composição de bases de seus DNAs, na realidade, pode ser usada para classificar organismos.

BIBLIOGRAFIA:

- JUNQUEIRA, I.C.U. & CARNEIRO, J.-Biologia Celular e Molecular, 3ª ed., Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 1983.
- ROBERTIS, E. D. P. De & ROBERTIS, E. M. F. De Jr.-Bases da Biologia Celular e Molecular, 2ª ed., Ed. Guanabara, Rio de Janeiro, 1993.
- LEHNINGER, A. L.-Bioquímica, 4ª ed, V 4, Replicação, transcrição e tradução da informação genética, São Paulo, 1984.

PET - BIOTECNOLOGIA

SEMINÁRIO: BIOQUÍMICA DE ENZIMAS

I - Conceito

Enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas.

II - Classificação

1. Óxido-redutases - atuam em reações de oxirredução

Agindo em $=\text{CH-OH}$

Agindo em $=\text{C=O}$

Agindo em $=\text{C=CH-}$

Agindo em $-\text{CH-NH}_2$

Agindo em $=\text{CH-NH-}$

Agindo em NADH, NADPH

2. Transferases - na transferência de grupos funcionais

Grupos de um carbono

Grupos aldeídicos ou cetônicos

Grupos acila

Grupos glicosila

Grupos fosfato

Grupos contendo S

3. Hidrolases - em reações de hidrólise

Ésteres

Ligações glicosídicas

Ligações peptídicas

Outras ligações C-N

Anidridos ácidos

4. Liases - em adição a duplas ligações

$=\text{C=C=}$

$=\text{C=O}$

$=\text{C=N-}$

5. Isomerases - em reações de isomerização

Racemases

6. Ligases - na formação de ligações com desdobramento do ATP

C-O

C-N

C-S

C-C

III - Cofatores enzimáticos

Componente não proteico necessário para que a enzima se torne cataliticamente ativa. O complexo enzima-cofator é denominado holoenzima enquanto a proteína sem o cofator é denominada apoenzima. Os cofatores podem ser íons metálicos ou coenzimas.

Algumas enzimas que requerem íons metálicos como cofatores

Zn²⁺

Álcool-desidrogenase

Anidrase carbônica

Carboxipeptidase

Mg²⁺

Fosfohidrolases

Fosfotransferases

Mn²⁺

Arginase

Fosfotransferases

Fe²⁺ ou Fe³⁺

Citocromos

Peroxidase

Catalase

Ferredoxina

Cu²⁺ ou Cu⁺

Tirosinase

Citocromo oxidase

K⁺

Piruvato fosfoquinase

Na⁺

ATPase da membrana plasmática

IV - Modo de atuação das enzimas

Os catalisadores aceleram uma reação química pela redução da energia de ativação necessária para desencadear a reação.

Teoria de ação enzimática de Michaelis-Menten:



Equação de velocidade para reações enzimáticas

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

K_m, a constante de Michaelis-Menten, é igual à concentração do substrato na qual a velocidade de reação é a metade da velocidade máxima

V - Efeito do pH

A maioria das enzimas apresenta um pH característico em que sua atividade é máxima. A forma do perfil de atividade enzimática em função do pH varia usualmente com a concentração do substrato uma vez que o K_m se altera com o pH. O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente igual ao pH de seu meio intra-celular, o que sugere que a inter-

relação pH-atividade enzimática pode ser um fator de controle intracelular da atividade da enzima.

VI - Efeito da temperatura

A velocidade de reações catalisadas por enzimas aumenta com a temperatura dentro da faixa de temperatura em que a enzima é estável e mantém atividade integral. Assim, o ótimo aparente de temperatura é resultante de dois processos:

1. O aumento usual de velocidade da reação com a temperatura.
2. A crescente desnaturação térmica da enzima acima de uma temperatura crítica.

VII - Inibição enzimática

1. Inibição competitiva

Um inibidor competitivo reage reversivelmente com a enzima sendo que a molécula do inibidor não é quimicamente alterada.



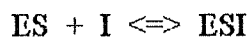
2. Inibição incompetitiva

O inibidor reage com o complexo enzima substrato originando um complexo inativo incapaz de sofrer a etapa subsequente.



3. Inibição não competitiva

O inibidor não competitivo se liga a um sítio na enzima diferente do sítio ativo deformando a enzima e impedindo a formação do complexo ES na velocidade normal e uma vez formado este complexo impede que o mesmo se desdobre na velocidade normal. Surgem duas formas inativas:



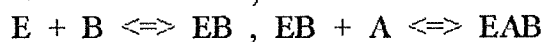
4. Inibição irreversível

A inativação irreversível da enzima é causada por agentes capazes de modificar através de ligação permanente um grupo funcional necessário para a catálise.

VIII - Reações de dois ou mais substratos

1. Reações de simples troca

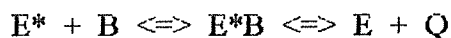
Ao acaso:



Ordenada:

Neste caso há uma seqüência, havendo um substrato principal e um substrato seguinte

2. Reações de dupla troca ou pingue-pongue



IX - Especificidade das enzimas

Algumas enzimas são altamente específicas para um substrato enquanto outras são capazes de agir em substratos diferentes relacionados estruturalmente mas com velocidades de reação diferentes. Os fatores que contribuem para a eficiência catalítica das enzimas são:

1. A enzima se liga ao substrato de modo que a ligação suscetível ou esteja próxima ao grupo catalítico no sítio ativo ou orientada de tal maneira que o estado de transição se forme facilmente.

2. A enzima se liga ao substrato formando um intermediário covalente instável que sofre a reação mais rapidamente para formar os produtos.

3. Ao propiciar grupos funcionais capazes de agir como doadores ou aceptores de prótons, a enzima pode ocasionar uma catálise ácida ou básica geral.

4. A enzima pode induzir uma distorção ou tensão em ligações suscetíveis da molécula do substrato tornando mais fácil o rompimento da ligação.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PET - BIOTECNOLOGIA

FORMAS DE VARIAÇÃO

Irving Joseph Berger

PIRACICABA - ESTADO DE SÃO PAULO
JUNHO DE 1995

1. INTRODUÇÃO

Genética é o estudo de dois fenômenos distintos: a hereditariedade e a variação. A hereditariedade pode ser conceituada como a tendência de iguais para gerar iguais, ou seja, explica o fato pelo qual os descendentes se assemelham aos seus ascendentes. Em contrapartida, a variação pode ser definida como sendo todas as diferenças ambientais ou germinais entre os organismos relacionados pela descendência. Dessa forma, as variações podem ser devidas exclusivamente ao meio - não hereditárias -, como também podem ser produzidas por alterações no genótipo - hereditárias.

Pode-se concluir, portanto, que a hereditariedade e a variação são forças que atuam em sentidos opostos. Isto porque, enquanto a hereditariedade mantém as semelhanças entre os indivíduos, no decorrer das gerações, a variação contribui para a dessemelhança entre eles. Embora antagônicas nesse aspecto, a hereditariedade e a variação são forças que se completam, pois, se por um lado a variação permite que haja diferenças, sobre a qual atua a seleção, havendo o melhoramento, por outro lado, o resultado da seleção só será positivo, ou seja, será mantido, se a variação que ela atuou for herdável.

Ao mesmo passo que a variação é fundamental ao processo de melhoramento genético tradicional, é também essencial ao desenvolvimento da Biotecnologia, especialmente na aplicação de técnicas tais como a fusão de protoplastos e a tecnologia do DNA recombinante.

2. FORMAS DE VARIAÇÃO

São fontes de variabilidade:

- **Mutação;**
- **Recombinação sexual;**
- **Permuta genética;**
- **Recombinação parassexual;**
- **Tecnologia do DNA Recombinante;**
- **Fusão de protoplastos;**
- **Alelismo múltiplo;**
- **Variação somaclonal;**
- **Variação contínua;**
- **Transposição.**

2.1. MUTAÇÃO

2.1.1. MUTAÇÃO GÊNICA

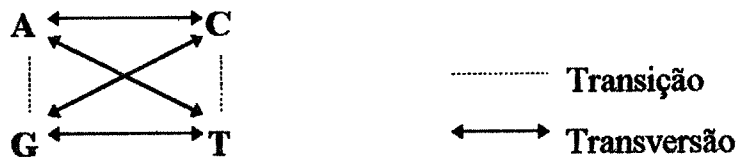
Mutação gênica ou puntiforme é o processo pelo qual são produzidas novas variedades, ou alelos, de um gene, ou seja, são mudanças herdáveis que ocorrem ao nível do gene provocando alterações do mesmo e conseqüentemente produzindo novas formas alternativas - os alelos -, representando as bases genéticas da variação, e portanto, servindo como matéria-prima aos processos de melhoramento genético e evolução.

Existem várias causas que podem provocar uma mutação gênica, porém, apresentam sempre uma característica em comum, todas elas afetam a seqüência de

bases nitrogenadas do DNA. As causas que podem provocar alterações nas seqüências de bases do DNA são:

a) Substituição de bases.

Podem ocorrer vários tipos de trocas, as quais recebem denominações especiais. Assim, a troca de uma purina - adenina ou guanina - por outra, ou de uma pirimidina - citosina ou timina - por outra, é denominada de transição; a substituição de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa, é denominada de transversão. São possíveis quatro diferentes transições e oito diferentes transversões, como pode ser observado no esquema a seguir:



A troca de bases ocorre devido a existência de formas tautoméricas, isto é, formas alternativas das bases nitrogenadas e que freqüentemente apresentam pareamento irregular durante a replicação do DNA. Por exemplo, adenina no seu estado normal amino forma pontes de hidrogênio com a timina, porém na forma tautomérica imino pode se parear com a citosina. Da mesma maneira, timina no estado ceto pareia com adenina, mas na forma tautomérica enólica é capaz de se parear com a guanina.

As formas tautoméricas raramente estão presentes nas células mas podem se tornar comuns graças a ação de agentes mutagênicos naturais ou artificiais.

A substituição de bases causa alteração em um único códon do DNA. O códon mutante pode ou não provocar mudança de um aminoácido ao longo da cadeia polipeptídica, possibilitando três alternativas:

- Mutação silenciosa - a substituição de bases não altera a seqüência de aminoácidos na cadeia polipeptídica graças à degenerescência do código genético.
- Mutação de sentido errado - a substituição de uma base no DNA acarreta alteração em um aminoácido na cadeia polipeptídica.

• **Mutação sem sentido** - de uma troca de bases do DNA surge um dos códons de terminação no mRNA, impedindo a síntese completa da cadeia polipeptídica.

b) **Adição ou deleção de bases.**

A retirada ou inclusão de uma única base já provoca alterações na seqüência de DNA a partir do ponto em que ocorreu a deleção ou adição. Seja, por exemplo, uma molécula de DNA com a seguinte seqüência de bases:

5' ATGCCGACGTATCAGTAA 3'

3' TACGGCTGCATAGTCATT 5' - fita sense

O RNA mensageiro transcrito terá a seguinte seqüência de bases:

5' AUGCCGACGUAUCAGUAA 3'

Esta seqüência de bases, por sua vez, codifica uma cadeia polipeptídica com os seguintes aminoácidos: metionina - prolina - treonina - tirosina - glutamina. Se, por exemplo, for adicionado erradamente durante a replicação do DNA, o par A-T, entre o quinto e sexto pares de bases, a nova molécula do DNA terá a seguinte seqüência:

5' ATGCCAGACGTATCAGTAA 3'

3' TACGGTCTGCATAGTCATT 5'

o mRNA será: 5' AUGCCAGACGUAUCAGUAA 3' e a seqüência de aminoácidos deverá ser: metionina - prolina - ácido aspártico - valina - serina - valina. Como se observa, a adição de apenas uma base modifica completamente a seqüência de aminoácidos na cadeia polipeptídica sintetizada, a partir do ponto em que ocorre a adição da base nitrogenada no DNA. Além disso desapareceu o ponto final, produzindo assim uma cadeia polipeptídica que certamente não será funcional.

Pelo exemplo demonstrado, fica evidenciado que a mutação do tipo adição ou deleção é bem mais drástica do que a substituição de bases. De fato, este tipo de mutação, via de regra, é letal e, portanto, não transmitido através das gerações.

Deve ser enfatizado que, como um gene é constituído por centenas de nucleotídeos, teoricamente o número de alelos para um dado gene é muito grande.

Isto ocorre porque a probabilidade de que uma dada mutação reverta ao estado alélico anterior é muito menor do que a probabilidade de uma mutação adicional para um novo estado alélico. Finalmente, é necessário comentar que, apesar do grande número de nucleotídeos que constitui um gene, a frequência de mutação é muito baixa devido ser o processo de replicação do DNA muito preciso. A frequência de mutação, porém, pode ser incrementada utilizando algumas substâncias químicas ou agentes físicos.

2.1.2. MUTAÇÃO CROMOSSÔMICA

Estas mutações envolvem rearranjos estruturais dos cromossomos, ocasionados por quebras no cromossomo ou em suas subunidades, as cromátides. Existem quatro tipos básicos de mutação cromossômica: deficiências, duplicações, translocações e inversões.

Muitas deficiências (perdas de partes de cromossomos) atuam como recessivos letais; elas obviamente representam uma perda de informação genética e conseqüentemente de algum produto gênico primário ou proteína. As duplicações (ganhos de partes de cromossomos) podem ser muito importantes no fornecimento ao genoma de material genético adicional. Essa quantidade adicional de DNA estaria então “livre” para desenvolver novos genes.

As translocações compreendem a transferência de material genético de um cromossomo para outro. As conseqüências das translocações são grandes, uma vez que elas resultam em grupos de ligação de genes completamente alterados e também em anomalias meióticas.

As inversões são representadas por cromossomos em que uma seqüência do material genético inverteu-se completamente. Se a inversão envolve o centrômero, ela é chamada pericêntrica; se não, é chamada paracêntrica. Neste tipo de evento mutacional as relações de ligação dos genes também são afetadas. Uma das mais

importantes conseqüências das inversões é que em heterozigose elas resultam em dificuldades no pareamento dos cromossomos homólogos. Se ocorrer quiasma na região invertida, os produtos da meiose (gametas) conterão cromossomos anormais. Tanto na inversão paricêntrica como na paracêntrica os produtos do quiasma são anormais e isto deve resultar em duas coisas: primeiro, deverá haver uma redução na viabilidade dos gametas dos indivíduos heterozigotos e, segundo, a recombinação de genes no segmento invertido do cromossomo será efetivamente suprimida. A redução de quiasmas efetivos pode resultar na aglutinação de grupos de genes firmemente ligados que funcionam e se comportam como uma unidade, ou supergene.

Assim como as mutações gênicas, as mutações cromossômicas ocorrem em baixa freqüência e são passíveis de sofrer incremento através de agentes mutagênicos.

2.1.3. AGENTES MUTAGÊNICOS

Como já dito, a freqüência de mutações é baixa, podendo ser incrementada através de substâncias químicas ou agentes físicos. A utilização de tais substâncias químicas ou agentes físicos mutagênicos, de modo geral, é adotada em espécies onde não existe variabilidade ou esta é pequena - arroz, feijão, Penicillium, etc. São mutagênicos utilizados:

- Radiação gama, ultra-violeta, x, alfa, beta, ...

- não ionizante: U.V.

- baixo poder de penetração;

- provocam mutações de alta instabilidade;

- ação por hidratação da citosina (comporta-se como uracila) ou formação de dímeros de pirimidina.

- ionizantes: α , β , γ , x

- alto poder de penetração;

- ação por formação de peróxido, mudando comportamento da base, ou por efeito direto através da quebra de cromossomos.

- Agentes químicos

- alquilantes: adição de radicais alquila, etila ou metila e formação de “cross links” - impedem replicação do DNA.
- intercalantes: substituem bases por terem mesmo tamanho destas.
- análogos de bases: substituem as bases e sofrem tautomerismo.
- desaminantes: deslocam radical amino.

2.2. RECOMBINAÇÃO SEXUAL

O processo de recombinação sexual envolve a meiose e a fusão de gametas, ou seja, a fertilização.

A meiose é, em suma, o processo de formação das células sexuais, e, portanto, um tipo de divisão celular que produz células filhas com o número de cromossomos reduzido à metade e que se diferenciam nos gametas.

Como a meiose consta de duas divisões celulares, tem-se a divisão I, ou meiose I, e a divisão II, ou meiose II. Em cada uma dessas divisões geralmente se observam prófase, metáfase, anáfase e telófase. Antes das divisões a célula passa por um período de preparo, a interfase.

O processo crucial da meiose é o que ocorre durante a divisão I. No decorrer da metáfase I, há um verdadeiro embaralhamento - recombinação - dos genes, de modo que são obtidas inúmeras combinações novas. Tomemos como exemplo um indivíduo que seja portador de dez genes, cada um deles situado em um cromossomo diferente e representado por dois alelos - heterozigoto -, serão observadas 2^9 orientações diferentes na metáfase, que irão proporcionar o aparecimento de 2^{10} gametas com constituição genética diferente. Assim, a meiose permite a

recombinação dos genes - aparecimento de combinações novas não existentes nos progenitores -, o que evidentemente contribui para ampliar a variabilidade na natureza. Esta ampliação da variabilidade é fundamental para a evolução da espécie e é também a principal matéria-prima que os melhoristas de plantas e animais possuem.

2.3. PERMUTA GENÉTICA

A permuta genética (crossing-over), processo que pode ocorrer durante a meiose, resulta da troca de partes entre cromátides não irmãs e portanto ela deve ocorrer quando os cromossomos homólogos estão pareados. Isto se dá durante a prófase I da meiose, quando eles se associam de tal maneira que no paquíteno o pareamento ocorre ao longo de todo o seu comprimento. No diplóteno os centrômeros homólogos começam a se separar uns dos outros, estando os bivalentes unidos só em certos pontos. Estes pontos de união são os quiasmas e representam os pontos de permutações genéticas ocorridas (pontos de recombinação).

Um único quiasma num bivalente resulta na formação de duas cromátides não permutadas e de duas cromátides permutadas, isto é, a frequência de recombinação é a metade da frequência de quiasma. No entanto, são comuns as situações em que não se observa quiasma entre dois genes em todas as células que sofrem meiose. Portanto, se considerarmos como exemplo uma frequência de permuta de 20% entre dois locos quaisquer, teremos a partir de 100 células que sofreram meiose um total de 400 gametas, dentre os quais 80 são recombinantes.

Conclui-se dessa forma que a permuta genética é outro meio de ampliação de variabilidade na natureza.

2.4. RECOMBINAÇÃO PARASSEXUAL

Alguns dos mais importantes organismos usados na corrente Biotecnologia apresentam capacidade de recombinação sexual. Contudo, limitada recombinação pode ser obtida por meio de mecanismos parassexuais. Tais processos compreendem todos os não-meióticos, processos de recombinação genética em células vegetativas.

Processos parassexuais utilizam muitos mecanismos celulares para unir material genético de diferentes fontes. Dentre os mecanismos, os considerados como de maior importância são os que possuem aplicação prática em processos biotecnológicos: conjugação, transdução, transformação e recombinação mitótica.

Conjugação em bactérias é o processo pelo qual informação genética é transferida de uma célula para outra por contato físico entre ambas, podendo também ocorrer em eucariontes quando gametas haplóides fundem-se para formar um zigoto diplóide. Ela é um dos melhores métodos de adaptação de transferência e tem sido muito usada em transferências genéticas intra e interespecíficas. A transferência conjugal é acompanhada de replicação do DNA e pode resultar na integração do DNA transferido com o genoma do receptor.

Transdução envolve a transferência de material genético de uma célula para outra por meio de um vetor viral e sua subsequente incorporação por recombinação. Bacteriófagos lisogênicos podem integrar partes do genoma bacterial com seu próprio genoma, transferindo-o para outra célula hospedeira, oferecendo, assim, condições apropriadas para que esse DNA bacterial possa vir a expressar-se na nova célula.

Transformação, ou transferência unidirecional do material genético, é quando um DNA originado por uma célula é captado e mantido por outra, sendo extremamente usada por bactérias. A principal desvantagem da transformação é que para a maioria das bactérias somente uma pequena proporção de células na população será transformada (aproximadamente 0,1% com E. coli, por exemplo).

Recombinação mitótica é de particular interesse para fungos filamentosos. Com certos fungos onde a fase vegetativa é haplóide, micélios podem fundir-se para formar diplóides. Essa fase diplóide no ciclo assexual do fungo resulta na fusão do núcleo vegetativo, estabelecendo uma condição heterozigótica que logo mais será reduzida de volta à fase haplóide. O processo consiste então nos seguintes estágios: formação de heterocácion entre dois micélios haplóides; fusão nuclear de um pequeno número de núcleos (frequência de 10^{-6}); permuta mitótica; e redução à condição haplóide. Essa forma parassexual de hibridização ocorre em muitos fungos industriais, incluindo Penicillium chryzogenum, Aspergillus oryzae e Cephalosporium acremonium.

2.5. TECNOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE

Com a denominação de Tecnologia do DNA Recombinante está envolvido um conjunto de técnicas cujo objetivo principal é a criação de novas combinações gênicas pela manipulação do DNA. Ela se iniciou por volta de 1972, graças à descoberta de enzimas capazes de cortar o DNA de diferentes origens - enzimas de restrição - e por meio da união dos fragmentos resultantes gerar moléculas novas - DNA recombinante. Esta presença revolucionária mostrou ser exequível a construção do material genético híbrido, através da manipulação de segmentos de DNA de espécies não relacionadas. Isto é, demonstrou ser possível a introdução de um gene de uma espécie em outra não relacionada.

É importante salientar que de nada adianta apenas isolar o DNA ou criar uma nova molécula de DNA, é preciso que o material genético criado “in vitro” seja colocado em uma célula viva e que nela seja mantido. Além do mais é necessário que ele funcione no local e momento certos, produzindo o seu produto final, que é uma cadeia polipeptídica. Para que isso possa ser feito, algumas metodologias têm sido utilizadas, entre elas a restrição por enzimas e a transformação - inserção do segmento de DNA na célula alvo.

A importância da transferência de genes via DNA recombinante está na abertura de perspectivas para que se obtenham clones recombinantes, os quais são potencialmente capazes de produzir grande quantidade de proteína de interesse, codificada pelo gene clonado. Esse tipo de trabalho tem sido realizado especialmente com microorganismos, os quais podem ser transformados em verdadeiras fábricas vivas produzindo muitas proteínas em escala industrial. Exemplos desse tipo de aplicação são comuns na literatura, como é o caso da produção de insulina humana pela E. coli, hormônio de crescimento e vários tipos de interferons humanos.

2.6. FUSÃO DE PROTOPLASTOS

Dá-se o nome de protoplasto à parte viva da célula. Em outras palavras, protoplasto é uma célula que tem sua parede removida. Já em 1910 foi constatado que protoplastos mantidos em soluções com sais de cálcio podiam entrar em contato e eventualmente fundir seus conteúdos. Esse processo é denominado fusão de protoplastos.

Com o desenvolvimento de métodos enzimáticos eficientes para o isolamento de protoplastos na década de 70, grandes quantidades de protoplastos se tornaram disponíveis para estudos de fusão. Essa fusão se inicia pela adesão de membranas de protoplastos adjacentes. Nos pontos de contato entre as membranas ocorre dissolução das mesmas, o que permite a mistura dos dois citoplasmas. Os dois protoplastos originais podem então formar uma única esfera contendo os núcleos das duas células paternas - dicarion (homocariócito se os dois núcleos são idênticos e heterocariócito se os dois núcleos são geneticamente diferentes).

Numerosos compostos químicos ou condições físicas têm sido testados para induzir a fusão de protoplastos, mas o maior avanço ocorreu com a descoberta do composto polietileno glicol - PEG -, o qual tem se mostrado eficiente para todas as espécies vegetais. Uma outra técnica eficiente é a eletrofusão, pela qual a fusão de

protoplastos se dá num campo elétrico desuniforme através de um pequeno pulso de corrente elétrica.

A descoberta de que protoplastos podem se fundir com relativa facilidade propiciou o desenvolvimento de uma metodologia genética que recebeu o nome de hibridação somática. A importância da hibridação somática é que espécies sexualmente incompatíveis podem se recombinar, por meio da fusão de protoplastos, possibilitando assim o surgimento de novas combinações genéticas.

Deve ser salientado que combinações entre genomas não aparentados são regularmente seguidas de eliminação de cromossomos paternos, o que impede muitas vezes a formação de híbridos. Para espécies relacionadas, geralmente a eliminação de cromossomos é parcial, de modo que a introdução de certas características genéticas se torna possível. É necessário enfatizar que a eliminação dos cromossomos é aleatória, o que torna muito difícil o direcionamento do processo visando incorporar somente aqueles cromossomos de maior interesse.

2.7. ALELISMO MÚLTIPLO

Normalmente considera-se, principalmente a nível didático, apenas dois alelos de um dado gene afetando a expressão de um caráter. No entanto, um gene pode possuir, em geral, não apenas dois alelos, mas vários. A esse grupo de alelos dá-se o nome de série alélica e ao fato de um caráter se expressar de várias maneiras alternativas, devido a uma série alélica, denomina-se alelismo múltiplo.

É importante lembrar que estão sendo considerados indivíduos diplóides que podem conter no máximo dois alelos diferentes. Assim, a série alélica ocorre apenas em uma população de indivíduos.

Os alelos múltiplos são representados pela mesma letra, acompanhada de um expoente, para serem diferenciados. Assim, uma série alélica de um gene A pode ser representada por A^1 , A^2 , A^3 , ... A^n .

Os diferentes alelos de uma série surgem devido a ocorrência de mutação, e como já foi comentado anteriormente, é a fonte original que permite ampliar a variabilidade genética de uma população. Essa ampliação se dá de modo mais rápido, graças a reprodução sexuada, que combina os alelos em vários genótipos diferentes. Assim por exemplo, se temos dois alelos, o número de genótipos diferentes na população será três, porém se surgir um terceiro alelo o número de genótipos diferentes passa a ser de seis. Se considerarmos m alelos, o número de genótipos diferentes - NGD - é dado pela expressão:

$$\text{NGD} = m(m + 1)/2$$

Desse total de genótipos, o número de homozigotos é igual ao número de alelos - m - e o número de heterozigotos - NGH - é dado pela expressão:

$$\text{NGH} = m(m - 1)/2$$

Quando se considera mais de uma série alélica, uma de cada gene, o número de genótipos na população aumenta exponencialmente. Generalizando para n genes, cada um com m alelos, espera-se na população $[m(m + 1)/2]^n$ genótipos diferentes.

Exemplo clássico de alelismo múltiplo é a cor da pelagem em coelhos, onde as quatro diferentes cores são explicadas pela presença dos alelos C , c^{ch} , c^h , e c . Sendo a série composta de quatro alelos, nas populações de coelhos são possíveis $m(m + 1)/2$ genótipos, que correspondem a dez. Desse total, ocorrem $m = 4$ genótipos homozigóticos e $m(m - 1)/2 = 6$ genótipos heterozigóticos.

2.8. VARIAÇÃO SOMACLONAL

Entende-se pelo termo variação somaclonal a soma de todas as variações genéticas - mutações - que são incorporadas em uma determinada espécie quando no cultivo “in vitro”, ou seja, será variação somaclonal somente a alteração que atender as duas exigências seguintes: (1) ocorrer “in vitro”; (2) ser herdável, isto é, ser constatada em gerações futuras.

Os fatores responsáveis pela origem dessas mutações no genoma não são totalmente conhecidos. São ligados a estresses fisiológicos, em geral causados por hormônios - especialmente 2,4-D ou combinações de outros. Acredita-se em alterações do metabolismo devido a certas concentrações desses hormônios ou a combinações entre hormônios com outros hormônios e/ou constituintes particulares do meio de cultura.

É importante mencionar que a variação somaclonal embora explorada em espécies de baixa variabilidade genética ou mesmo onde esta não existe, está geralmente ligada a deleções, o que na maioria dos casos implica em alterações desfavoráveis e, portanto, indesejáveis.

2.9. VARIAÇÃO CONTÍNUA

Enquanto geneticistas clássicos têm estado quase sempre interessados nos efeitos fenotípicos de genes maiores ou unidades cromossômicas, os geneticistas quantitativos vêem o processo de adaptação envolvendo os chamados caracteres contínuos, tais como número de ovos, peso corporal ou tolerância à alguma variável ambiental, como a temperatura.

Muitos dos primeiros geneticistas, como Bateson e De Vries, acreditavam que esses caracteres não eram herdados e sim determinados somente por efeitos ambientais. Entretanto, quase no fim do século dezenove, Francis Galton já havia sugerido que tais caracteres eram herdados, reparando por exemplo, que progenitores altos produziam descendentes altos.

Explicando a variação contínua, temos: genes polímeros, genes modificadores e poligenes.

2.9.1. GENES POLÍMEROS

O caráter coloração vermelha dos grãos de trigo, por exemplo, é controlado por 3 genes, R e seus alelos (r), de efeito igual e cumulativo (ação polimérica) e sem dominância. Esses fatores múltiplos e seus alelos, podem dar origem em uma geração F_2 , a 6 fenótipos diferentes, correspondendo cada um a um tom de vermelho além do tipo incolor. Com 4 genes (alguns estudiosos defendem essa hipótese), o número de fenótipos nessa geração F_2 seria de 9.

É importante notar que o efeito de diferentes genes múltiplos pode nem sempre ser igual e aditivo (polimeria). Pode ser, por exemplo, aditivo e desigual (anisomeria), isto é, quando alguns genes são mais e outros menos importantes na expressão do caráter

Embora encontrados em diplóides, os genes polímeros são característicos de poliplóides, resultando em relativamente baixa importância.

2.9.2. GENES MODIFICADORES

A existência de um só sistema de genes múltiplos de efeito relativamente pronunciado, para explicar a variação contínua, não é suficiente porém, para explicar certos aspectos da seleção natural. Se o caráter tem importância adaptativa, as modificações na estrutura genética de uma população, necessárias quando há modificações com respeito ao fenótipo ótimo, podem ser conseguidas mais facilmente se existir um conjunto ou sistema de genes modificadores de efeito pequeno, aditivo, cooperando com os genes principais controladores do caráter.

Esses genes modificadores, existindo na forma de alelos que aumentam (+) ou diminuem (-) o valor do caráter, segregando numa população, constituem uma reserva de variabilidade genética mais eficiente para a adaptação da população, quando as modificações de ambiente não são bruscas, pois possibilitam um “ajuste” mais preciso do fenótipo com a condição ótima.

Genes modificadores foram evidenciados em muitos organismos, como por exemplo a ação do gene D em Drosophila.

2.9.3. POLIGENES

Com base em vários estudos e resultados, pesquisadores chegaram à conclusão geral de que alguns caracteres são governados por um número muito grande de genes, e que estes se distribuem por todos os cromossomos, tendo ação individual primária e não sendo modificadores típicos, mas poligenes, devendo estar organizados no cromossomo de uma forma balanceada como se segue: + - + - + -, em que + e - representam poligenes para aumento e diminuição do caráter - portanto, a existência de grande quantidade de variabilidade genética latente.

A libertação da variação genotípica livre e potencial é conseguida por permuta gênica. A quantidade dessas formas de variação genotípica encontradas em uma população, para um certo caráter, é função das modificações de ambiente ocorridas no passado: se as modificações foram suaves, a tendência é acumular variabilidade potencial, no caso contrário, existirá mais variabilidade genotípica livre.

É a própria seleção natural o fator que define a organização dos poligenes em sistemas balanceados, para atender às exigências de adaptação. Os modificadores por sua vez, não são organizados como os poligenes.

2.10. TRANSPOSIÇÃO

A capacidade de certos segmentos de DNA ,contendo um gene ou mais, moverem-se de um cromossomo para outro ou de uma região para outra de uma molécula de DNA dá-se o nome de transposição. E a esses elementos transponíveis o nome de transposons.

Os transposons foram detectados pela primeira vez em E. coli como mutações polares no operon gal. Para entender essas mutações, fragmentos do DNA contendo tais mutações foram isolados e suas seqüências de nucleotídeos determinadas. Observou-se que cada mutação polar estava associada com um segmento de DNA que tinha sido inserido no gene. Esses segmentos foram chamados de inserção ou elementos IS e mais tarde foram denominados como membros de uma classe de seqüências chamadas transposable elements, ou em bactéria, transposons.

Diversos elementos IS, variando em comprimento a partir de poucas centenas a poucos milhares de pares de nucleotídeos, foram isolados e seqüenciados. Constatou-se que a presença de seqüências invertidas repetidas na estrutura principal do elemento e sua capacidade de mover-se de um sítio para outro são características comuns a todos, sendo a segunda a principal.

Desde a descoberta dos elementos IS numerosos transposons carregando genes que são facilmente identificáveis - em particular a resistência a antibióticos - foram identificados em diversas espécies de bactérias, estando presentes em várias regiões do cromossoma de E. coli, em plasmídios e em alguns fagos.. Esses transposons podem ser usados extensivamente, uma vez que sua presença pode ser detectada meramente pela capacidade do hospedeiro de formar uma colônia em meio de cultura contendo um antibiótico específico.

O objetivo final do processo de transposição é a inserção de um transposon entre dois pares de bases em uma molécula receptora de DNA. Uma característica do processo de inserção é que a inserção de um transposon sempre envolve a duplicação de uma seqüência curta de bases - 3 a 12 pares de bases - na molécula receptora de DNA, chamada seqüência alvo, e o transposon é inserido no meio, entre as bases repetidas. O princípio básico é de que somente uma cópia da seqüência dupla está presente no DNA receptor antes da inserção do transposon e não está presente no próprio transposon.

3. LITERATURA CONSULTADA

- D'AMATO, F. Spontaneous Mutations and Somaclonal Variation. In: Nuclear techniques and in vitro culture for plant improvement. IAEA/FAO, Vienna, p.3-10, 1986.
- KERR, W. E. et all. Melhoramento e Genética. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1969.
- RAMALHO, M., SANTOS, J. B., PINTO, C. B. Genética na Agropecuária. São Paulo: Globo; Lavras, MG : Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 1990.
- RAVIN, A. W. The Evolution of Genetics. New York, New York, USA, Academic Press Inc., 1965.
- SHORROCKS, B. A Origem da Diversidade: as bases genéticas da evolução; tradução de João Morgante e Priscila Guimarães Otto. São Paulo: T. A. Queiroz, Ed. da Universidade de São Paulo, 1980.
- SMITH, J. E. Aspects of Microbiology: Biotechnology Principles. Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd, England, 1985.
- TSAI, S. M. Clonagem de genes: uso de vetores. In: Tecnologia do DNA Recombinante em plantas - Programa do Curso, ESALQ/CENA,, 1993.

**ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
ESALQ/USP**

INDÚSTRIA X BIOTECNOLOGIA

**PROFª ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER
PRINCÍPIOS GENÉTICOS EM BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

ALUNA: PATRÍCIA POMPERMAYER

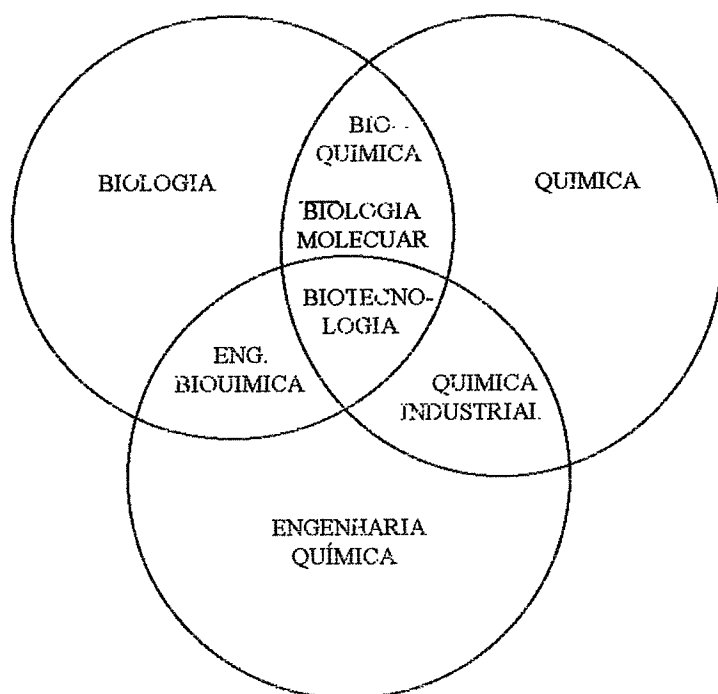
**PIRACICABA
JULHO/1995**

INDÚSTRIA X BIOTECNOLOGIA

Segundo Borzani,1992, a Biotecnologia pode ser entendida como “todo o processo de produção industrial que utiliza seres vivos, ou partes funcionais isoladas de seres vivos”(ABRABI). Em que pese a dificuldade de definir, de maneira precisa, os vários campos de aplicação da Biotecnologia, devem ser citados os seguintes casos:

- Aplicação à agricultura;
- Aplicações à pecuária;
- Aplicações ao campo da saúde;
- Aplicações à preservação do meio ambiente;
- Aplicações industriais (Biotecnologia Industrial).

A figura abaixo (adaptada do artigo publicado por R. Jonas - GBF-Scientific Annual Report,1990, p.35-46) procura representar, esquematicamente e sem pretensões de ser completa, a posição da Biotecnologia Industrial. Em Biotecnologia Industrial realiza-se pesquisa e desenvolvimento em múltiplos aspectos dos processos fermentativos (no mais amplo sentido da expressão, neles incluídos, também, os processos em que atuam células de tecidos e vírus) e dos processos enzimáticos, com vistas à produção, em larga escala, de materiais os mais diversos. A engenharia bioquímica estuda os problemas de engenharia envolvidos nesses processos.



REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA POSIÇÃO DA BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

AS INDÚSTRIAS TRADICIONAIS

A história da primeira tecnologia microbiana nunca poderá ser escrita pois começou muito tempo atrás, antes dos registros escritos. Cerveja era fermentada pelos Babilônios e Sumérios ao redor de 6000 D.C.; queijos eram produzidos do leite nas regiões as quais agora são Iraque em aproximadamente 6000 D.C.; registros de cozedura no Egito datam antes de 4000 D.C.; os Babilônios estavam manufaturando vinagre do suco de palmeira e xarope em 3000 D.C.; tratamento de esgoto em tanques sépticos é conhecido do Paquistão e região de Bagdá por volta de 3000 D.C. e vinagre foi usado como um antibiótico em curativos nos tempos Bíblicos. Para contrastar, isto não ocorria até o século XVII onde Leeuwenhoek primeiro observou microrganismos no microscópio e reconheceu o papel dos microrganismos na fermentação e o desenvolvimento de células em sistema livre tiveram que esperar até o século XIX. A aplicação prática de microrganismos, portanto, pré-datam o começo dos conhecimentos científicos dos processos por diversas centenas de anos e é importante considerar porque fermentação poderia efetuada pelos antepassados com aparente facilidade e sucesso enquanto a produção de penicilina causou muitos problemas anos atrás.

O desenvolvimento da biotecnologia microbiana pode convenientemente ser considerada como tendo ocupado quatro fases, cada uma representando um estágio no desenvolvimento tecnológico. A primeira fase inclui os produtos os quais pré-datam os registros históricos. A tecnologia é grosseira, desenvolvida e executada sem conhecimento dos princípios científicos.

A fase dois (metade do século XIX - 1940), requer aplicações dos rapidamente avançados conhecimentos de bioquímica, microbiologia e genética as quais começaram no século XIX. Há necessidade de uma apreciação do papel específico dos micróbios interessados, uma habilidade de preparar e manter culturas puras, para esterilizar mídia e planta e para excluir organismos competitivos.

Na fase três (1940 -), os processos microbianos são altamente susceptíveis a competição ou conduzindo para produtos farmacêuticos: é requerido um padrão muito alto de esterilidade. Culturas puras. Sofisticados controles de processo e qualidade.

Na fase quatro (após 1970s -), envolve a identificação, isolamento, alteração controlada e geração de produtos de gene específico.

BEBIDA ALCOOLICA

São muitos os tipos de bebidas alcoólicas e são produzidas em todo o mundo, exceto onde está proibido por considerações religiosas. Em termos de valor, elas são os mais importantes produtos da fermentação com um valor no mercado mundial

estimado em \$37 bilhões em 1981, confortavelmente excedendo as estimativas para o queijo (\$22 bilhões) e antibióticos (\$7 bilhões).

As bebidas alcoólicas podem ser classificadas em três classes de acordo com a concentração de etanol. Vinhos e cervejas são produzidos diretamente da fermentação com concentração máxima de etanol de 18%. Alcoois são produzidos pela destilação do vinho ou cerveja: suas concentrações podem ser, portanto, acima de 95%.

As bebidas alcoólicas são produtos de venda. A venda depende, portanto, da reação individual de cada freguês e o fabricante precisa ter atenção para a preferência do consumidor. O apelo de bebida alcoólica é devido somente em parte ao etanol e a agradável intoxicação a qual, abaixo de circunstâncias ideais, segue consumo. Com exceção de poucos alcoois como a wodka, a atração depende da substancial extensão do aroma, sabor e cor do produto. Diversas centenas de traços de componentes têm sido identificado em bebidas alcoólicas.

Testes triviais são amplamente utilizados em bebidas alcoólicas e comidas industriais e métodos detalhados para sua organização têm sido desenvolvidos. One dos parâmetros analíticos mais amplamente utilizados em bebidas alcoólicas industriais é a gravidade específica.

Os efeitos fisiológicos do etanol, incluindo intoxicação, agressividade e comportamento criminal, dependência alcoólica e longo período de prejuízos físicos, são bem conhecidos. Eles causam problemas para a sociedade e para companhias envolvidas na indústria de bebida alcoólica.

A maioria de fermentos usados para as fermentações alcoólicas são classificados também como *Saccharomyces cerevisiae* ou como *S. uvarum*.

Cerveja é uma bebida alcoólica usualmente feita do malte e dado o sabor com lúpulo. Duas variantes principais no processo de produção são: fermentação de topo, o processo original o qual produz cerveja e, fermentação de base, uma variante mais recente a qual tem substituído a fermentação de topo em muitos países e a qual tem dado aumento na maioria..

Após a II guerra mundial diversos governos subsidiaram a produção industrial de etanol de culturas como milho, batata e açúcar de beterraba. Esse subsídio tinha intenção de reduzir a dependência do óleo importado no evento de guerra e para encorajar a indústria e a agricultura própria e reduzir reduzir déficits durante a depressão. Em 1975, o governo brasileiro instigou um programa massivo para encorajar a produção industrial de etanol de culturas, especialmente de cana de açúcar, batata doce e mandioca. Brasil tinha um rápido crescimento da população e outra intenção era fornecer emprego para reduzir desempregados e suportar a indústria de açúcar por um tempo de excesso de açúcar mundial.

Vingre é uma solução de ácido acético usualmente com uma complexa mistura de congenéricos. Parte de seu uso é como condimento e em algumas partes do mundo desempenha uma tarefa importante na preservação de comidas. É

produzido pela fermentação de carboidratos para produzir etanol o qual é depois oxidado por bactéria.

FERMENTO DE PADEIRO

A prática do uso de leveduras no pão por fermento era conhecido pelos egipcios antes mesmo de 4000D.C. e é mencionado na biblia. A principal função do fermento no pão é produzir dióxido de carbono pela fermentação de açúcares: as bolhas de gás expandem e aliviam a estrutura.

QUEIJO

A manufatura de queijo é outro processo com muitas origens de antigas populações: registros existem de produção de queijo em regiões entre os rios Tigre e Eufrates (agora Iraque) no ano 6000 D.C. O processo pode ser simples. Leite é deixado em um local aquecido por poucas horas para estimular o crescimento de bactéria a qual causa coagulação: o resultado das coagulações são prensadas em panos para expelir a umidade. Originalmente praticado em casas e fazendas, a manufatura mudou-se para fábricas a partir de 1850s para frente e a maioria dos queijos é agora feito em escala industrial.

YOGURTE

Yogurte é uma comida acidificada produzida por aquecimento do leite e fermentando com ácido láctico de bactéria. Acredita-se ter originado entre as pessoas nomades no oeste médio onde, devido ao clima subtropical, o leite tornou-se azedo e coagulado dentro de poucas horas de ordenhado. Usando técnicas empíricas é possível prevenir a putrefação e incentivar a ação de bactéria para produzir um produto com um agradável sabor ácido em poucos dias

ALIMENTOS FERMENTADOS COM SAL

Muitos outros alimentos além do leite tem sido tradicionalmente conservado por fermentação microbiana. A fermentação desses alimentos frequentemente envolve representantes de que abaixam o pH pela produção de ácido láctico, frequentemente junto com as leveduras. Sal é adicionado após a fermentação que inibe produção de toxinas como *Clostridium botulinum* e seleciona organismos menos resistentes. Com alimentos á base de soja, o desenvolvimento de fungo é

frequentemente estimulado pela fermentação para produzir amilases e proteases para degradar as reservas de alimento do feijão, para enfraquecer a estrutura e melhorar o sabor.

ÁCIDO CÍTRICO

O ácido cítrico foi originalmente cristalizado de limões em 1784 e permaneceu a busca por um longo tempo, com Itália suplindo a demanda da fruta. em 1923 a Pfizer começou a produzir nos EUA usando *Aspergillus niger* desenvolvendo em meio de cultura. No oeste a produção é dominada por poucas companhias e há um substancial excesso de capacidade. O ácido cítrico é usado principalmente como um agente aromatizante na produção de alimentos, especialmente geléias e doces, e em bebidas leves. É um eficiente quelante de metais e esta propriedade permite que seja usado em grande quantidades de indústrias, farmacêutica e alimentos. É usado par limpeza de metais, para manter metal em solução para placas eletrônicas e na agricultura, para controlar a densidade de suspensão de argila para regular tumefação e como substituto de fosfato em detergentes industriais. Ele age como anticoagulante do sangue e usado como antioxidante em alimentos.

ACETONA E BUTANOL

Acetona e butanol são ambos importantes produtos químicos, com um amplo uso industrial. Acetona é usada como solvente e um ponto iniciante para sínteses químicas. Butanol é usado como um solvente de tinta, em fluídos hidráulicos, e para a extração de antibióticos de caldos de cultura. *Clostridium acetobutylicum* e alguns outros organismos podem fermentar glucose com a produção de acetona e butanol como principais produtos finais.

GLICEROL

O glicerol tem usos variáveis na indústria, mas não é agora produzido por fermentação. Métodos correntes envolvem sínteses químicas a partir do propano ou propanol, ou da saponificação da gordura. Durante a I guerra mundial a indústria alemã de explosivos tinha falta de glicerol porque a marinha britânica bloqueou por breve período a produção por meios microbiológicos.

PRURIFICAÇÃO DE DETRITOS E RESÍDUOS ORGÂNICOS DA AGRICULTURA E INDÚSTRIA

Tem sido divulgado que a saúde pública nas nações mais industrializadas é mais dependente de esforços para purificação da água. Em termos de volume, a purificação de detritos em grandes indústrias envolve a aplicação de microrganismos. A maioria dos detritos são despejados nos rios ou mar onde efeitos adversos podem ser causados pelos quatro tipos de componentes: componente orgânicos prontamente oxidáveis; sólidos em suspensão; materiais tóxicos como amônia, e em caso de efluentes industriais, metais pesados e componente orgânicos tóxicos como fenol; bactérias e vírus patogênicos. Métodos microbianos de tratamento de água podem reduzir a concentração destes quatro componentes (Springham, D.G.,1991).

INDÚSTRIAS QUÍMICAS: FERMENTAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

Versatilidade de performance e facilidade de manuseio favoreceu o uso de microrganismos para a produção de químicas industriais por um longo tempo. A versatilidade é reconhecida notando que os microrganismos sintetizam uma vasta quantidade de componentes químicos incluindo aminoácidos, monossacarídeos, e ácidos gordurosos e alcalóides muito complexos, polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Os sistemas de microrganismos, como resultado de seu largo complemento de enzimas, são participantes de um grande número de reações químicas.

USO DE CÉLULA MICROBIANA

As células microbianas são usadas para a produção industrial por causa da atividade catalítica das enzimas que contêm. São usadas de diversas maneiras: em fermentações com células vivas; desenvolvimento de células imobilizadas; células vivas imobilizadas; células mortas imobilizadas

Entre as vantagens derivadas do uso de células microbianas são: potencial para reduzir custos catalíticos; aumento da estabilidade das enzimas; facilidade para processos multicatalíticos; redução do tempo para produção catalítica. Entre as desvantagens estão: de contaminação por produtos de células; degradação de enzimas celulares; ação das estruturas das células como barreiras de difusão; redução da específica atividade catalítica

QUÍMICAS INDÚSTRIAS POR FERMENTAÇÃO

Fermentação geralmente refere-se a processo no qual os microrganismos desenvolvem-se em um fermentador contendo em média fonte de carbono como a glucose, fonte de nitrogênio, fonte de vitaminas e minerais e outros fatores de crescimento.

PRODUÇÃO DE QUÍMICAS POR IMOBILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Basicamente a imobilização de célula implica em ligar o microrganismo a uma matriz insolúvel que pode ser não celular ou celular, que também pode ser um polímero sintético ou biopolímero ou o próprio microrganismo (Neidleman, S.L.,1991).

ENZIMAS INDUSTRIAIS

A modificação enzimática de matérias-primas tem sido um componente importante no processo industrial por séculos. No entanto, somente na metade do século passado nosso aumento no conhecimento da estrutura molecular e funcionamento nos capacitou a realizar processos nos quais pode-se utilizar a enorme capacidade do sistema catalítico natural das enzimas.

Aproximadamente 80% das enzimas industriais consumidas são de baixa especificidade, altamente hidrolases degradando polímeros naturais de alto peso molecular como as proteínas e carboidratos. Isto é uma reflexão do desenvolvimento histórico da indústria de enzimas e uma indicação dos fatores econômicos favoráveis inerentes em processamento de altos volumes, produtos de baixo custo. Em todos os casos, a enzima é o componente de menor custo do processo. Há um aparente incentivo ao melhoramento das características funcionais das enzimas em muitas das aplicações (exemplo: no detergente industrial).

APLICAÇÃO INDUSTRIAL DAS ENZIMAS

As vantagens do uso das enzimas são: enzimas de alta ou baixa especificidade podem ser selecionadas para determinada função desejada; pequena (ou nenhuma) formação de sub-produto é observado; atividade ótima ocorre bem abaixo das condições amenas de reação. Por outro lado os problemas potenciais são: o custo da

preparação das enzimas é normalmente alto; enzimas são intrinsicamente instáveis; enzimas são facilmente inibidas; substratos ou produtos com baixa solubilidade em solução aquosa podem causar dificuldades.

TENDÊNCIAS FUTURAS

Dois características são nítidas do desenvolvimento da indústria enzimática a partir de duas décadas passadas. Primeira, a revolução predita no processo industrial de enzimas definitivamente não apareceu. Secundo, é bem provável que os passos graduais de expansão de novas enzimas continuem no futuro. O acréscimo nas descobertas de novas enzimas ultrapassa o desenvolvimento de aplicações de novas enzimas.

NOVOS PROCESSOS

Um dos mais novos desenvolvimentos em tecnologia de enzimas foi a descoberta que enzimas podem funcionar sucessivamente em meios não aquosos e solventes de diferentes fases. Esta tecnologia abre um amplo campo de novas possibilidades de reações, particularmente àquelas usando substratos e/ou produtos com baixa solubilidade em meio aquoso (Cowan, 1991).

NOVOS MATERIAIS

TRADICIONAIS BIOMATERIAIS

Muito dos primeiros polímeros e materiais compostos usados pelo homem era de origem biológica. Seda artificial era uma fibra de proteína onde a mecânica e a estética eram valorizadas pela indústria têxtil. Tempo depois as cadeias de amido foram usadas pelos cientistas na criação do nylon. Lã é uma outra fibra de proteína, desta vez composta essencialmente por queratina. Materiais de celulose são sem dúvida os mais significativos de todos. Para biomateriais, para serem de importância tecnológica, é necessário que sejam avaliáveis em grandes quantidades em uma forma de fácil acesso. Além do mais, o produto final precisa ser reproduzível em suas propriedades químicas, um requisito que é difícil de ser satisfeito em alguns materiais derivados de planta.

O desenvolvimento tecnológico de materiais de polímeros derivados de microrganismos é um atrativo e uma meta estimulante. No entanto nossa liberdade precisa ser restrita e nosso entusiasmo analisado pela prática e considerações econômicas. Nós podemos identificar uma série de “necessidades” as quais precisam ser completadas.

PLÁSTICOS MICROBIANOS

A manufatura por meios microbianos de polímeros comerciais é bem estabelecido. Goma xantana, por exemplo, o polissacarídeo extracelular produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*, é uma alternativa de sucesso para polissacarídeos de planta

POLIAMIDA MICROBIANO

Poliâmidas, ou nylons, são uma família de polímeros sintéticos extremamente de sucesso. Consistem essencialmente de correntes curtas de hidrocarbonetos ligados pelo -CONH- amida ou cadeia de peptídeo, eles exibem uma semelhança à proteínas na estrutura química primária e admite algumas comparações de função com as estruturas de proteínas como as sedas, colágenos, queratinas e outras (Brown, D.,1991).

BIOSENSORES

Um biosensor é um instrumento analítico ou um sistema consistindo de material biológico imobilizado em íntimo contato com um apropriado aparelho transdutor que pode converter um sinal bioquímico em um sinal elétrico quantificável.

APLICAÇÕES E USOS DOS BIOSENSORES

Biosensores têm muitas atrações para uso em análises clínicas, monitoramento da saúde geral, aplicações veterinárias e na agricultura, processamento e monitoramento industrial e controle da poluição. Sua vantagens estão: baixo custo, tamanho pequeno, rápido e fácil de manusear e mais sensível e seletivo que os instrumentos correntes (Michael Gronow).

BIOELETRÔNICOS

Um número de idéias foram postas a diante para o potencial uso de moléculas biológicas na construção de biochips. Poucas atingiram o estágio experimental no laboratório. No entanto muitos trabalhadores estão envolvidos em pesquisas dentro da engenharia de proteína (Moses, V., 1991).

CUIDADOS COM A SAÚDE

ANTIBIÓTICOS MONOCLONAIS

Para encontrar o desafio de um brilhante aparato de antígenos, as células B do sistema imunológico tem desenvolvido mecanismos para produzir anticorpos de mais que 10^{12} diferentes combinações genéticas. Biotecnologistas têm explorado seletividade e especificidade dos anticorpos para diagnosticar e tratar uma ampla variedade de doenças.

TRATAMENTO DO CÂNCER

A comunidade bioquímica tem gastado nos últimos 40 anos pesquisando para novos e efetivos tratamentos para o câncer. Durante este tempo, pesquisas científicas fizeram grandes avanços compreendendo a natureza da transformação de células e da reação do corpo frente a isso. A partir disto, novos caminhos para o tratamento do câncer estão emergindo.

ADJUVANTES

Programas de vacinação têm eliminado ou controlado algumas das mais perniciosas doenças do planeta. Ainda a respeito deste sucesso, limitações técnicas têm restringido a um número total de 20 vacinas humanas comercializadas. A biotecnologia. poderá dobrar o número de medidas profiláticas dentro de uma ou duas décadas.

TERAPIA DO GENE HUMANO

Hoje, “terapia do gene humano” significa terapia das células somáticas: substituir genes defeituosos em indivíduos já nascidos com não funcionamento dos sistemas fisiológicos (McCormick, D., 1991).

APLICAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA

Os benefícios das novas tecnologias da engenharia genética na agricultura são amplamente desconhecidas para ser enorme. Cientistas irão desenvolver produtos que irão aumentar a produção de alimentos, reduzir uso de fertilizantes, entre outros. Fundamentalmente as novas tecnologias são provavelmente superiores às tecnologias convencionais porque elas são mais rápidas, mais precisas e elas irão esforçar uma maior flexibilidade na seleção de características genéticas.

A aplicação da tecnologia do DNA recombinante em plantas não é bem desenvolvido como técnicas similares usadas para produzir novos produtos baseados na incorporação de genes selecionados dentro da bactéria e outros organismos unicelulares. Um número de fatores contribuem para isso.

Primeiro, plantas são substancialmente mais complexas que bactéria. Elas são organismos multi-celulares com complexas funções especializadas.

Segundo, plantas são pobremente entendidas por cientistas. Animais e bactérias são assuntos de extensos estudos científicos.

Terceiro, características que influenciam aspectos-chaves da performance da planta são complexos a nível molecular e são controlados por muitos genes.

Quarto, para as plantas modificadas, precisam ser feitas todas as coisas da melhor maneira para que ela exiba as novas características adicionadas pela engenharia genética.

TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS

O mais antigo e melhor entendido sistema de transferência de novo material genético dentro de plantas é plasmídeo intermediário Ti baseado na bactéria, *Agrobacterium tumefaciens*, que ocorre naturalmente nos solos.

AGRICULTURA ENTRA NA INDUSTRIA

Sementes:

A indústria de sementes mundial conta com aproximadamente \$25 bilhões em vendas anuais. O valor comercial da semente usada por fazendeiros globalmente tem estimativa variável entre \$45 e \$60 bilhões. A diferença nesses valores é devido a prática divulgada entre os fazendeiros conhecida como "plant-back".

Químicas para a agricultura:

Os pesticidas industriais emergiram com com uma maior procura pelo fazendeiros após a segunda guerra mundial como um resultado do sucesso da aplicação de químicas orgânicas sintéticas. Como a aplicação da biotecnologia na agricultura emerge, a entrada de novas companhias dentro do mercado de controle de pragas irá apressar-se.

Produtos para a saúde animal:

Em 1985, a venda mundial de produtos químicos para a saúde animal foi em torno de \$6 bilhões anuais de acordo com *Animal Pharm*, uma maior rede de publicação industrial. Os produtos incluídos são terapêuticos animais, vacinas animais e nutritivos. Muitos dos mais significantes esforços no desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos neste setor são prosseguidos em pequenas companhias que têm especial competência nas novas técnicas.

AS REALIZAÇÕES DA BIOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA

Desenvolvimento a curto prazo:

É baseado em produtos anunciados em testes ou desenvolvidos por várias companhias. São exemplos: características de plantas resistentes à herbicidas, à ataque de insetos, à doenças, vacinas animais somatotropina animal.

Desenvolvimento a longo prazo

São exemplos: melhoramento das características e processamento, fixação de nitrogênio, melhoramento genético de animais (Dines A.,1991).

PESTICIDAS: AGENTES BIOLÓGICO E QUÍMICO, FUNGICIDAS E HERBICIDAS

DESTINO DOS RESÍDUOS DE PESTICIDAS NO MEIO AMBIENTE

Os resíduos de pesticidas no solo interagem com constituintes da argila e matéria orgânica. Adsorção do pesticida na superfície da argila e interação com a

matéria orgânica podem resultar em parcial ou até mesmo completa inativação. Solos úmidos associados com um pH alto, pode conduzir a hidrólise dos inseticidas organofosforados. Microrganismos do solo têm uma importante participação na degradação dos resíduos de pesticidas; por outro lado algumas espécies de microrganismos podem ser afetados pela presença de pesticidas. Certamente pesticidas persistentes, tal como DDT, podem permanecer no solo por períodos de tempo consideráveis e acumulam no solo da fauna o qual forma parte da cadeia de alimento dos animais superiores. Os resíduos também estão susceptíveis à ação da fotodecomposição, oxidação e hidrólises como também perdas por volatilização.

MÉTODOS NÃO QUÍMICOS DE CONTROLE DE PESTES

São eles: métodos culturais, melhoramento de plantas e propagação, controle biológico (Garraway J.,1991).

O IMPACTO DA BIOTECNOLOGIA NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

O desenvolvimento durante os últimos 15-20 anos na biociência, e em particular na molecular e biológica., conduziu a uma alta expectativa para a aplicação e simulação de sistemas biológicos em processos comerciais. A força dirigida para a exploração da biotecnologia no setor de alimentos tem tido pressão do consumidor para retirada do alimento processado e aditivos químicos e maior elevação de alimentos com ingredientes “naturais”e processados de maneira similar aos eventos que ocorrem na natureza. O conceito que “somo o que comemos”, tem significado que os ingredientes dos alimentos manufaturados tem necessitado de maior controle nas matérias-primas, um entendimento dos processos bioquímicos naturais e a engenharia capaz de carregá-los fora economicamente (Jeffcoat R.,1991).

INDÚSTRIA DE SABOR E FRAGÂNCIA

O desenvolvimento comercial, incluindo trocas demográficas e trocas da percepção dos consumidores e estilos de vida tal como a tendência de elevar a alimentação saudável, tem uma necessidade por alimentos de sabor natural. Tal

mercado tende a representar desafios para a indústria a qual tem encontrado desenvolvimento de técnicas incluindo o impacto da biotecnologia: entre elas são as enzimas e tecnologias de fermentação e particularmente biotransformação e, a longo prazo, engenharia genética e cultura de tecido e células de plantas (Cheetham, P.J.,1991).

TRATAMENTO DOS RESÍDUOS E ELIMINAÇÃO DA POLUIÇÃO

O desenvolvimento da consciência pública a respeito do meio ambiente nos anos recentes estimulou o interesse em encontrar alternativas significantes na distribuição dos resíduos e novos métodos para descontaminação de resíduos tóxicos. Os métodos convencionais de acordo com a região contaminada com tais materias tem sido escavar solo poluído e removido ele. Portanto, há um exccasso desenvolvimento de locais de distribuição oportunos e um reconhecimento que tal solução tem meramente recolocado o problema adiante que atualmente é removido.

A importância dos microrganismos na decomposição natural dos resíduos orgânicos do solo, sedimentos e sistemas aquáticos tem sido reconhecido. O potencial para aproveitar tal processo natural para o tratamento de resíduos e eliminação da poluição em uma maneira ecológicamente aceitável está atraindo muito a atenção.

Há um vasto número de poluentes e resíduos de materiais distribuídos no meio ambiente anualmente. Há uma ampla literatura a respeito do uso de microrganismos para o tratamento de resíduos industriais como ou sem digestão aeróbica (Bewley, R.J.F. et al.,1991).

BIOMASSA

Biomassa é um termo largamente usado para definir a quantidade total de carbono e nitrogênio incorporado dentro de todo polímero orgânico produzido por processos biológicos. É estimado que o total de biomassa espalhado pelo mundo ultrapassa 10^{12} toneladas. Plantas são a principal fonte de biomassa e suas anuais produção de aproximadamente 10 elevado à 11 tons é resultado da fotossíntese. Há, portanto, um grande perigo quando regiões de florestas são removidas em taxas excessivas porque servem também para remover dióxido de carbono da atmosfera e produzir oxigênio. Dentro deste contexto os materiais disponíveis nos resíduos da agricultura possuem biomassa suficiente para combustível que é um grande negócio nos processos biotecnológicos, evitando a necessidade da remoção massiva das

florestas. Culturas selecionadas podem ser plantadas para produção de biomassa, por exemplo, cana-de-açúcar e beterraba produzindo 7.5 e 4.1 toneladas secas de biomassa por acre respectivamente.

Nos Estados Unidos estima-se que o consumo de combustível da biomassa é de aproximadamente 1.5×10^{15} BTU por ano. Isto comparado com o total da biomassa produzida nos Estados Unidos é de 54×10^{15} BTU por ano. Em 1980, o total de energia consumida pelos Estados Unidos foi estimado em 78×10^{15} BTU por ano; entretanto a quantidade de biomassa disponível era para 2% do total da energia usada. O mais abundante exemplo de biomassa são a celulose, hemicelulose e lignina.

O interesse em biomassa envolve vários fatores, incluindo meio ambiente, político e claro preocupações biotecnológicas. Nos últimos 20 anos o interesse pela biomassa tem aumentado diretamente proporcional ao preço do petróleo. A grande abundância e contínua renovação da biomassa é exemplificado por estimativas de produção de aproximadamente 70 Kg de biomassa por pessoa por dia. Quando calculado sobre uma energia equivalente, a quantidade total de biomassa teria produzido 10.000 barrils de petróleo por segundo. Nos Estados Unidos o principal avanço na agricultura foi na produção e comercialização em escala de plantas para produzir etanol (Batt, C.A.,1991).

PRODUÇÃO E PROCESSAMENTO DO ÓLEO

Preocupação com a Biotecnologia entre os produtores de óleo é geralmente restringido à atualidade para o controle dos problemas de produção: o perigo resultante do sulfato de hidrogênio gerado sob certas condições pela redução do sulfato pela bactéria é provavelmente o mais importante. Em anos recentes, portanto, um número de propostas tem sido feitas para uso de microrganismos atualmente para melhorar a eficiência da produção de óleo do reservatório (Moses, V.,1991).

RECUPERAÇÃO E PROCESSAMENTO DE METAL

Processos biológicos para recuperação de metal, tal como cobre, de minério de baixo grau são um componente tradicional da indústria de extração de metal. Embora a subida de metais da solução por materiais biológicos seja bem conhecida e fenômeno documentado, processos comerciais para renovação de metal tem, somente atualmente, começado a emergir. Tendências atuais em divulgação pública da poluição do meio ambiente acompanhado por legislação tem criado oportunidades novas técnicas biotecnológicas as quais de baixo custo, soluções para poluição de

metal ou extração dos problemas ambientalmente amigável. Esses processos biológicos podem substituir tecnologias convencionais as quais estão se tornando ambientalmente inaceitáveis, ou podem encontrar aplicação das tecnologias tradicionais como tratamentos de polimento designados para encontrar a demanda de novas e justas legislações (Brown, M.J.,1991).

DESULFURAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO CARVÃO

A razão de remover o enxofre do carvão provém da necessidade de diminuir a emissão de dióxido de enxofre na atmosfera. Interesse pela chuva ácida agora tem um perfil público alto e o relacionamento entre consumidor de combustíveis ricos em enxofre e precipitação ácida não é muito questionada. Como resultado, controles mais rigorosos estão sendo introduzidos na maioria dos países industriais dirigido ao controle da liberação de gases sulfurosos.

É conhecido por muitos anos que certas bactérias são capazes de solubilizar a fração inorgânica do carvão. Recente trabalho tem indicado a possibilidade do uso de diferentes organismos para remover também parte do enxofre orgânico. Se ou não sistemas biotecnológicos baseados nestes propósitos irão ter uma participação na redução da emissão de dióxido de enxofre não depende somente das considerações técnicas. Até mesmo se um sistema for desenvolvido e mostrado em provas de campo sob condições reais para remover significantes quantidades de enxofre, haveria outros fatores para influenciar esta adoção na prática: capital e custos operacionais, viabilidade, entre outras. Além do mais, uma boa transação de dinheiro estará envolvida. Temas similares estão na maioria das discussões da biotecnologia industrial (Maloney, S. & Moses, V.,1991).

TECNOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

Segundo WRITMORE, J. H., um velho problema da indústria de aves é como obter carne de tenra sem parecer envelhecida. Embora muitas pesquisas tenham sido feitas nesta área, ainda muito é necessário. Como a indústria de aves continua a mover adiante seus processos, este problema torna-se mais importante. Do mesmo modo, um método é necessário para obter carne de ave sem cozinhar por mais de 3 horas.

Da mesma forma que a indústria de aves desenvolve pássaros grandes, o problema da mortalidade aumenta. Nutrição, fungos podem ser as causas para esta mortalidade, mas para o fato não foram encontradas soluções. Pesquisas adicionais são necessárias para aliviar este problema.

A maioria das aves são desossadas. Consequentemente, produção de carne de peito torna-se muito importante. A indústria necessita de cientistas de algumas universidades para dedicar muitos anos de pesquisa para melhorar a produção de carne de peito.

Pesquisas na área de biotecnologia é muito cara. Entretanto, uma grande parte dos trabalhos irão ser feitos por pesquisadores de indústrias. Portanto, algumas universidades precisam realizar trabalhos nessa área também. Como esta pesquisa provavelmente não será do departamento de ciência de aves, cientistas deverão esforçar-se para participar na pesquisa em centros de biotecnologia.

O autor não tem visão longe o bastante para antecipar o que o desenvolvimento da indústria irá trazer no campo da biotecnologia. A indústria já tem vacinas, aromatizantes, sementes, enzimas, somatotropina bovina e somatotropina suína.

TÉCNICAS DE CULTURA DE TECIDOS EM PLANTAS: **RELACÕES ACADÊMICA-INDUSTRIAL EM** **BIOTECNOLOGIA**

Atualmente, biotecnologia de plantas pode ser visualizada como um sistema de produção de plantas o qual usa técnicas in vitro. É bem conhecida as técnicas de hidroponia, as quais permitem que plantas cresçam em solução aquosa ou em qualquer outro suporte menos o solo, as quais foram introduzidas no século passado, sendo redonhecida somente na segunda parte do atual século. A hidroponia foi essencial para as realizações atuais de biotecnologia de plantas, principalmente quando muitos reguladores de crescimento de plantas foram descobertos e caracterizados (CROCOMO,1989).

Quando os calos produzidos em meio sólido são transferidos para um meio líquido e cresce com constante agitação, na presença de reguladores de crescimento, as células separam-se e dividem-se repetidamente, formando uma suspensão de células. Estas células podem ser filtradas e plaqueadas em um meio sólido com nutrientes e estas células simples podem crescer em colônias dos quais órgãos e planta inteira foram induzidos à formação (Bergmann, 1960; Earle e Torrey, 1965). por outro lado, células de plantas em suspensão, desenvolvendo em bioreatores, podem produzir produtos secundários, como vitaminas, enzimas, fragâncias, aromatizantes, pigmentos, etc, os quais podem ser extraídos e comercializados (Crocomo et al.,1981).

Cultura de células em bioreatores irão certamente guiar a aplicação em embriogênese somática para produção de sementes artificiais, ou em propagação

vegetativa por gemas axilares (micropropagação em meio líquido), e para produzir variantes somaclonais.

Cultura de calos, suspensão de células, cultura de ogãos (raízes, anteras, embrião) junto com cultura de meristemas e cultura de protoplastos, são instrumentos de engenharia de células de plantas a qual, junto com a técnica do DNA recombinante (engenharia genética), formam o conjunto de entradas da biotecnologia as quais podem ser aplicadas para criar inovações tecnológicas na agricultura (Crocomo e Ochoa-Alejo, 1983; Crocomo, 1989).

As técnicas *in vitro* são ferramentas fortes para serem usadas em pesquisas biológicas e molecular as quais conduzem para uma agricultura melhorada. Elas podem ser excelentes auxiliares nos programas de melhoramento de plantas.

A eficiência da produção de produtos derivados de plantas depende de muitos fatores e atualmente do desenvolvimento científico. A parte do melhoramento em técnicas agrícolas, aproximadamente 50% do melhoramento alcançado é trazido pela seleção de novas variedades.

É estimado que existem 10.000 a 80.000 de espécies de plantas comestíveis em nosso planeta. O homem usa pelo menos 3.000 espécies de plantas em sua dieta. Destas somente 150 têm sido cultivadas em larga escala; no presente 29 espécies contam 90% de nosso alimento distribuídos em seis principais grupos. São eles: Cereais, tubérculos, legumes, oleaginosas, produtores de açúcar e árvores frutíferas (Sason, 1988).

A biotecnologia de plantas oferece técnicas para ajudar a encontrar objetivos básicos, tais como: a). aumentar a variabilidade genética sem reprodução sexual, o que poderia também incluir uma diminuição no número e duração dos ciclos necessários para um programa de seleção em melhoramento; b). propagação de genótipos que normalmente são instáveis em reprodução sexual, o que talvez inclua produção de plantas livres de doenças; c). transferência de capacidades genéticas através de embriões híbridos; d). produção de plantas homzigotas diplóides através da cultura de anteras. Estes objetivos poderiam ser alcançados com o uso de dois tipos de técnicas: a). modificação do genótipo, tal como uma cultura de célula, por mutação, variação somaclonal e gametoclinal, hibridação somática (através de protoplastos), ou engenharia genética; b). estabilização ou multiplicação de um genótipo pré-existente, tal como uma cultura de célula, por micropropagação, embriogênese somática, ou haploidização (Crocomo e Gonçalves 1984; Petiard e Deshayes 1987).

Um programa de biotecnologia de plantas deveria também ser incorporada em direção molecular. Biologia molecular pode fornecer uma oportunidade para melhor entender os eventos de bioquímica básica envolvidos em características agrônômicas.

Os conhecimentos adquiridos durante os últimos poucos anos sobre o genoma da planta ajuda no desenvolvimento de técnicas de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e hibridização molecular específica. Estas técnicas nos

capacita a caracterizar uma planta a nível de DNA, e portanto tem consequências importantes.

As vantagens da propagação clonal consiste principalmente nas manciaras na qual multiplicação de plantas podem ser realizadas e o número de plantas que podem ser produzidas em um período de tempo relativamente baixo, economizando tempo. Em alguns programas de melhoramento de plantas, a propagação clonal pode ser usado para aumentar o fornecimento de material de planta limitado e reduziro tempo requerido para introduzir as características genéticas selecionadas. Uma das mais importantes aplicações da técnica de cultura de tecidos tem sido a cultura de meristema apical para eliminar viroses de plantas infectadas. Viroses existem em pequenos em células do meristema e frequentemente não são transmitidos para a planta derivada do meristema em cultura. Cultura de meristemas tem sua maior aplicação em espécies de propagação vegetativa nas quais as plantas parentais são infectadas por vírus, como por exemplo, batata, cana-de-açúcar, morango, batat doce, etc.

Entre outras plantas, o CEBETC tem trabalhado em árvores florestais, ornamentais e espécies hortícolas (pequenas plantas) na maioria das vezes em uma relação fechada acadêmico- companhias privadas.

a) Árvores florestais: Eucaliptos, no Brasil, tem sido usado em larga escala principalmente em madeira industrial e como uma possível fonte de energia no futuro. A maioria das espécies são árveres florestais e têm um sistema de cruzamento preferencial, o qual é reforçado pela auto-incompatibilidade. Um programa de melhoramento de sucesso requer técnicas. A baixa taxa de propagação vegetativa é vencida pelas técnicas de micropropagação. A multiplicação de gemas pode ser alta porque não há problemas de incompatibilidade como acontece com enxerto.

b) Pequenas plantas: morango é um das espécies de plantas que o CEBETC está trabalhando junto a uma companhia privada. Como toda planta propagada vegetativamente, tal como batata, cana-de-açúcar, o morango é frequentemente infectado por vírus e doenças por micoplasma. Estas doenças resultam em significantes perdas no campo. A doenças causadas por vírus causam uma diminuição de 20-80% na produção da fruta, dependendo do cultivar.

c) Outras espécies de plantas: O CEBETC também faz propagação para plantas ornamentais, tais como, orquídeas, violeta africana, bromélias, etc. para frutas como abacaxi, citrus, plantas medicinais.

Variação somaclonal: em poucos anos houve um notável interesse em variação de plantas obtidas através da cultura de tecidos. Cultura de suspensão é o sistema mais frequentemente usado para selecionar células resistentes (Crocomo, 1986). Cultura de calos tem sido utilizado para selecionar células resistentes à diversos componentes químicos. (Whidholm 1974; Crocomo et al. 1986). Em anos recentes cultura de células e tecidos têm sido utilizado como sistemas para testes de fitotoxicidade e estudo de metabolização de herbicidas.

Um extensivo programa ao resgate de embriões híbridos produzidos através de hibridação interespecífica em *Phaseolus* é um progresso no laboratório do CEBETC em colaboração com instituições de pesquisa da região nordeste do Brasil (Recife, Pernambuco) (Crocomo, 1988 e Ochoa-Alejo, 1986).

BIOTECNOLOGIA E ATIVIDADES AGROINDUSTRIAIS

Segundo BAUMGARTNER F. M. & MUNIZ J.N., a questão social e econômica da biotecnologia enfatiza, usualmente, aspectos envolvidos em suas possíveis consequências. Esta temática embora recente, não tem atraído muito a atenção dos estudiosos, sobre tudo da área socio-econômica. Por sua vez a análise das atividades agroindustriais não é recente mas, raramente, tem sido focalizada em termos do seu aparato científico. Somente alguns autores têm recentemente, investigado as implicações da biotecnologia na agroindústria no Brasil, dentre os quais se destacam, por exemplo, SILVEIRA & SALLES FILHO, GOODMAN et alii e WILKINSON. São diferentes preocupações entre os autores quanto a este aspecto. Enquanto SILVEIRA & SALLES FILHO enfatizam a importância da biotecnologia para as mudanças do padrão competitivo das indústrias, os demais preocupam-se com a natureza da industrialização da agricultura que pode advir com a biotecnologia. Neste sentido, há referências à substituição industrial de produtos rurais e às transformações no sistema alimentar em termos de substituição de matéria-prima, geração de produtos intermediários e criação de novos produtos.

Essa tendência é identificada em países desenvolvidos e, por isso mesmo, pode constituir-se em fonte de reflexão sobre o que deverá ocorrer nos países subdesenvolvidos, destacando-se as implicações para a industrialização da agricultura e para a prática das atividades de pesquisa destes países. Neste aspecto, o objetivo de análise deixa de ser a agroindústria propriamente dita, passando-se a enfatizar a natureza do conhecimento científico utilizado para a sua expansão econômica. É a explor+6/

-ação de novas relações decorrentes da expansão agroindustrial associada ao “novo” aparato científico, aqui designado como biotecnológico. Esta análise, entretanto, torna-se possível somente se se pressupõe que o conhecimento científico não é universal, mas particular. Isto é, a criação do conhecimento ou a sua legitimação nos países centrais é um fenômeno particular, no sentido em que o conhecimento é resultado de um conjunto de forças sociais e econômicas, de conflito de personalidades, de pressuposições epistemológicas e ontológicas, além da dependência histórica, da qual o conhecimento é derivado (GOONATHILAKE).

BIOTECNOLOGIA E O TERCEIRO MUNDO

A população de nosso planeta é dividido em muitas maneiras, mas as maiores diferenças são encontradas na saúde e acesso ao tratamento médico. Os habitantes do terceiro mundo morrem jovens, em maior sofrimento e de diferentes doenças que atinge os países. A biotecnologia, como temos visto, poderia fazer muito para elevar o flagelo destas doenças. Se novas vacinas e terapias estão sendo desenvolvidas, um alta prioridade precisa ser dado a essa área. A UNIDO (United Nation Industrial Development Organization) começou a planejar um centro internacional em biotecnologia o qual focará particularmente os problemas de países em desenvolvimento. Na área médica, a primeira necessidade é coordenar a maioria da muitas descobertas que têm sido feitas nos centros de pesquisa e universidades, e o desenvolvimento deles dentro dos processo práticos que poderiam transformar a qualidade e prolongar vida para milhões. Companhias farmacêuticas são vivamente conscientes de suas imagens públicas, uma mudança para ajudar o terceiro mundo, sem qualquer custo extra, poderia provocar atração (Prentis, S.).

EXPECTATIVAS DE DESENVOLVIMENTO

De acordo com experts da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) provávelmente o setor de alimentos não terá um desenvolvimento revolucionário no futuro imediato. Alguns produtos poderiam ser vendidos no período 1990-1995, por exemplo, novos produtos para necessidades específicas de nutrição, ingredientes, alimentícios, entre outros.

Segundo Sasson, 1993, à. médio prazo (1995-2000), outros produtos poderão ser negociados, por exemplo, bactéria geneticamente modificada para sabor ou qualidade, enzimas alimentícias modificadas, novas biocatalises para processos alimentícios, e um aumento no número de biotestes rápidos e biosensores para muitos contaminantes alimentícios.

Mudanças mais drásticas deverão ocorrer no setor de plantas. A primeira batata transgênica, algodão, tomate, tabaco e plantas de soja têm sido testadas em pequena escala, e houve comercialmente valiosas plantas transgênicas destas espécies resistentes à um herbicida específico, viroses, insetos, e também plantas com características melhoradas. Algumas destas foram planejadas para serem negociadas a partir de 1995. No entanto, demoras devido requerimentos de segurança, aprovação pública e a necessidade de executar mais pesquisas e desenvolvimento nos genes significariam que a negociação de espécies de culturas modificadas geneticamente em grande escala deveria ser improvável antes do ano 2000.

No setor de animais, numerosos novos Kits de diagnósticos para detecção de doenças e testes de fertilidade, bem como novas drogas e vacinas (por exemplo contra

doenças parasitas) deverão ser comercializadas. Novos aditivos, incluindo aminoácidos, antibióticos e microrganismos do rúmem, poderão ser comercializados, e os primeiros peixes transgênicos talvez sejam também. Durante o período 1995-2000, o desenvolvimento de porcos e gado com rápido potencial de crescimento, melhorando a qualidade da carcaça e, para gado, aumento na produção de leite, era esperado para ser rápido, devido a administração de hormônios recombinantes de crescimento. Também transfêrencia de genes de valor para animais talvez permita a multiplicação de animais geneticamente superiores, por exemplo culturas resistentes à doenças.

A máxima produção sustentável de peixes foi entre 100 e 120 milhões de toneladas. A aquicultura já tem aumentado sua rede de exportações, e a aplicação da biotecnologia talvez aumente ainda mais. No, entanto há algumas razões para se moderar as altas expectativas: 1) a exportação de organismos aquáticos requer infraestrutura de comercialização sofisticada para manusear os produtos perecíveis; 2) aumento na produtividade da aquicultura talvez traga problemas com super oferta e um conseqüente declínio nos preços de mercados específicos; 3) aumento da procura por peixes e mariscos em países industrializados também estimularia pesquisa e produção nos países industrializados deles mesmos.

Melhoramento nos métodos de controle de sexo está no início da lista de prioridades dos aquaculturalistas. Para muitas espécies cultivadas, a produção de indivíduos de um único sexo foi lucrativo. Duas técnicas foram avaliadas para o controle do sexo: controle do hormônio sexual e controle genético do sexo.

Nos anos 1970s e início de 1980s, pesquisadores isolaram e purificaram hormônio de crescimento das glândulas pituitárias do peixe e outros vertebrados. Apartir de 1990, 13 peixes transgênicos foram relatados. Os métodos de inserção de genes precisam ser melhorados

O setor não alimentício, como o setor de alimentos, foi contrário a qualquer experimento de mudança radical, exceto se houvesse um maior aumento nos preços do óleo, ou se taxas sobre o combustível fóssil fossem introduzidas. Espécies de culturas transgênicas para produção de novos produtos (enzimas, químicas finas, farmacêuticos) poderiam se tornar uma realidade, provavelmete não antes do ano 2000. A muito longo prazo a biotecnologia poderão ter um maior impacto na mudança da produção de combustível e produtos químicos.

CONSTRANGIMENTOS SOBRE OS PROCESSOS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Há um número de constrangimentos científicos e tecnológicos para o desenvolvimento e rápida aplicação da biotecnologia no setor agro-alimentar:

- progresso substancial na fisiologia básica, bioquímica e genética; isolamento de genes de valor e métodos de substituição de genes em plantas;
- extensão para uma larga taxa de espécies de plantas ser geneticamente modificadas, por exemplo, trigo, milho, feijão;
- regeneração de plantas inteiras de tecidos geneticamente modificados;
- identificação do genes de valor de animal, localização desse genes no cromossomo, mecanismos de expressão do gene;
- animais transgênicos ainda pobremente eficientes e o problema básico de criar múltiplas cópias de um animal adulto em particular (clonagem) esperando para ser resolvido.

A viabilidade econômica e ampla disseminação de biotecnologia de “agrofood” foram unidos nos seguintes itens:

- alta incerteza devido a aceitação do consumidor, debate de segurança e proteção intelectual, os quais infringem na decisão industrial;
- prioridade dada à qualidade e não exclusivamente para cortes de custo;
- aumento do envolvimento de diversos atores na cadeia agro-alimentar na incorporação de sucesso de inovações da biotecnologia.

PESQUISAS BIOTECNOLÓGICAS E ESTRATÉGIAS BIO-INDUSTRIAL

A emergência da biotecnologia durante os anos 1970s fez com que a legislação tornasse possível a obtenção de proteção de patente no setor público para materiais de plantas e animais vivos. Isto resultou em uma considerável expansão na pesquisa do setor privado, o investimento em pesquisa em biotecnologia foi provavelmente muito maior do haveria de ser sem a proteção de patentes. Enquanto, historicamente, ganhos na produtividade agrícola dependia pesadamente do investimento público em pesquisas básicas e aplicadas, havia o desenvolvimento de divisão entre pesquisas do setor público e privado. Muito das pesquisas da biotecnologia moderna na agricultura foi guiada pela procura do setor privado. No entanto, o setor público ainda foi importante no desenvolvimento e disseminação de tecnologias.

INTERESSES DOS CONSUMIDORES E BIOSEGURANÇA

Governos e indústria têm percebidos que precisam informar o público melhor a respeito de novos produtos agro-alimentar biotecnológicos. O público frequentemente identifica biotecnologia com engenharia genética. No Japão,

resultados de pesquisas demonstraram que a resistência à biotecnologia não vem da não informação da maioria, mas sim da minoria bem informada (dos quais 90% pesquisadores rejeitados disseram que a realização de organismos geneticamente engenheirados poderiam se ambientalmente seguros).

BIOTECNOLOGIA E PAÍSES EM DESENVOLVIMENTO

Os países em desenvolvimento se encaixam em quatro principais categorias:

- países com interesse mas não diretamente envolvido na moderna biotecnologia ainda;

- países com política nacional em biotecnologia e uma pesquisa programada, principalmente em biotecnologias convencionais, e as quais estavam monitorando desenvolvimentos estrangeiros mas com pouca modernidade;

- países com política nacional em biotecnologia e um programa de pesquisa, principalmente em biotecnologia convencional, as quais tiveram estabelecido coloborações junto a países industrializados para treinamento de cientistas e aquisições de novas tecnologias;

- países com uma política nacional e programa de pesquisa em biotecnologia moderna, complementado por fortes ligações estrangeiras tanto no setor público como no privado.

BIBLIOGRAFIA

- MOSES, V.; CAPE, R.E. **Bitechnology. The Science and the Business.** Switzerland: Harwood Academic Publishers GmbH, 1991. 596p.
- SASSON, A. **Biotechnologies in developing countries: present and future.** França UNESCO, 1993. 764p.
- PRENTIS, S. **Biotechnology: A New Industrial Revolution.** New York: 1984. 192p.
- SASSON, A. **Biotechnologies: Challenges and Promises.** Paris: Universitaires de France, 1984. 315p.
- BAUMGARTNER, F.M.; MUNIZ, J.N. Biotecnologia e atividades agroindustriais: hipótese da diversificação/potenciação. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v.38, n.1, p. 11-16, jul. 1991. **Apud.** World-Agricultural-Economics-&-Rural-Sociology-Abstracts, 1992, V.34, n.6523.
- WHITMORE, J.H. Industry Needs. **Poultry Science.**, v.69, n.12, mar. 1990. **Apud.** Weed Abstracts, 1992, v.41, n.3631.
- CROCOMO, O.J. Plant Tissue Culture Techniques: Academic-Industrial Relations in Biotechnology. In STUDIER, A. **Biotechnologie: Mittel Gegen den Welthunger?** Hamburg: Schiften Des Deutschen Übersee-Instituts Hamburg, 1991. v.8, p. 75- 85.
- BORZANI, W. Biotecnologia Industrial e Engenharia Bioquímica. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.10, p. 7-8, maio/jun. 1992.
- ONIONS, A.H.S. et all. **Smith's Introduction to Industrial Mycology.** Great Britain: 1981. 396p.

ESALQ-USP

MONOGRAFIA

**“Indução de gemas em tecido foliar adulto de diversos clones
de *Eucalyptus* cultivados *in vitro* revertidos à juvenildade”**

Fernando de M. Sampaio

1995

MONOGRAFIA

Indução de gemas em tecido foliar adulto de diversos clones de *Eucalyptus* cultivados “in vitro” revertidos à juvenilidade.

I - Introdução

O eucalipto constitui-se num dos mais importantes gêneros florestais de interesse comercial no mundo. Características como o rápido crescimento, a ampla adaptabilidade a diferentes ambientes e a utilização de seus produtos, associados à sua capacidade regenerativa, tem contribuído para um uso amplamente difundido em plantios comerciais. Atualmente, o gênero *Eucalyptus* vem apresentando importância crescente na produção de madeira e polpa e em programas de reflorestamento no Brasil e no mundo, por suas altas taxas de produtividade e capacidade de rebrota.

A maioria das espécies de eucalipto são propagadas por sementes e o seu melhoramento é um processo relativamente lento devido à extensão de seu período juvenil, antes da floração. Os plantios obtidos por sementes apresentam-se geralmente heterogêneos devido à alta variabilidade genética e má qualidade das sementes. Os eucaliptos, como a maioria das espécies florestais, apresentam rotação relativamente longa, dificuldade no cruzamento para a produção de grande quantidade de híbridos, além da seleção de genótipos para características importantes demandar alguns anos, podendo tornar o seu melhoramento demorado e oneroso. A propagação vegetativa de clones superiores poderia transpor estes problemas, à medida em que os mesmos possam ser rapidamente propagados para uso em plantios comerciais, permitindo que indivíduos superiores de uma população originem novos povoamentos. Assim, a propagação vegetativa pode oferecer diversas vantagens, por possibilitar a perpetuação de características desejáveis e a rápida multiplicação de materiais genéticos para bancos clonais, pomares de sementes e plantios comerciais.

Os métodos clássicos de propagação vegetativa utilizados para *Eucalyptus* como estaquia, enxertia e alporquia, têm apresentado limitações como a incompatibilidade na enxertia, baixas taxas de multiplicação e restrição ao uso de material juvenil no enraizamento de estacas, pois o material adulto na maioria das espécies de *Eucalyptus* é recalcitrante ao enraizamento. A enxertia e a alporquia são muitas vezes inadequadas em virtude dos altos custos e intensidade de uso de mão-de-obra.

A micropropagação pode desta forma, oferecer um método alternativo de propagação vegetativa de *Eucalyptus*. A cultura de órgãos, células e tecidos apresenta um potencial econômico considerável para se propagar genótipos selecionados de forma rápida e econômica. A micropropagação oferece como vantagens a alta taxa de multiplicação, uma menor necessidade de espaço físico, e o fato de não apresentar incompatibilidade e de não se restringir ao uso de material juvenil, além da economia de tempo.

O uso de material adulto na micropropagação é justificado como uma forma de se conhecer o potencial genotípico dos clones produzidos embora os problemas com a contaminação da cultura por organismos patogênicos e com as dificuldades do explante vir a se diferenciar em plântulas, principalmente quanto à fase de enraizamento sejam maiores. No entanto, o uso de material adulto revertido à juvenilidade substitui com êxito o material adulto na micropropagação, produzindo clones com genótipo conhecido. O principal objetivo da reversão à juvenilidade é resgatar a totipotência das células adultas, ou seja, a capacidade de regeneração do organismo vegetal como um todo, característica essa comum a todas as células dos organismos vivos.

O objetivo do presente trabalho é induzir a formação de gemas em tecido foliar adulto revertido à juvenilidade de *Eucalyptus* para diversos clones, testando para isso diversos métodos e tratamentos de rejuvenescimento.

II - Revisão de Literatura

1- A cultura "in vitro" e suas vantagens

As técnicas "in vitro" podem ser amplamente categorizadas como: cultura de órgãos, cultura de calos, cultura de suspensão de células, isolamento e cultura de antera e grão de pólen. (WILKINS et alii 1985). Estes autores fazem referência sobre a utilização de algumas destas técnicas conforme o objetivo de produção de plantas.

Segundo BAJAJ 1986, a micropropagação envolve três estágios:

- a) Estabelecimento da cultura,
- b) Regeneração das plantas e
- c) Transferência das plantas do tubo de ensaio para o solo.

A regeneração das plantas "in vitro" pode se dar de duas maneiras:

- a) Direta, de meristemas, segmentos ou embriões,
- b) Indireta, via formação e diferenciação de calos.

O primeiro método implica na formação de clones enquanto o segundo geralmente resulta em variação genética.

Segundo GEORGE & SHERRINGTON 1984 citado por WIECHIETEK 1990, novas plântulas podem ser obtidas sob três formas, através das técnicas de cultivo "in vitro":

a) A partir de gemas pré existentes de gemas axilares (ou gemas primárias/meristemas), as quais são estimuladas a se desenvolverem e proliferarem;

b) A partir da morfogênese de brotações, quando novas brotações são induzidas a partir de tecidos desorganizados ou diretamente de tecidos da planta mãe.

c) Através da formação de embriões somáticos, os quais assemelham-se com embriões de sementes, e que da mesma forma podem se desenvolver e se transformar em mudas.

Estas formas são mais comumente conhecidas respectivamente por micropropagação ou cultura de meristemas, cultura de tecidos ou calos e embriogênese somática.

WILKINS et alii 1985, indicam diversas vantagens para o cultivo "in vitro" como: a alta taxa de multiplicação para a clonagem de híbridos com heterose, árvores de elite ou enxertos comprovadamente superiores; a obtenção de plantas livres de vírus para uso em programas de melhoramento; o ganho de tempo relacionado com o longo período de

rotação das essências florestais; a possibilidade de obtenção de plantas haplóides para uso em programas de cruzamento; a recuperação de embriões zigóticos de cruzamentos incompatíveis; a possibilidade de se obter um método de rápida comercialização de propágulos e a rápida multiplicação em qualquer época do ano independente da estação.

BONGA & DURZAN 1985, citados por WIECHETECK 1990 apontam ainda que as técnicas “in vitro” podem ser usadas na modificação genética de árvores. Usos possíveis seriam a seleção “in vitro” de variantes úteis e específicos, hibridação somática através das técnicas de fusão de protoplastos na produção de linhas de híbridos intra e inter-específicos e transformação genética através da combinação de genes.

2 - Cultura “in vitro” de *Eucalyptus*

Vários autores estudaram a produção de calo e suspensão de célula de várias espécies de eucalipto a partir de diferentes explantes e em diferentes meios de cultura com objetivos diversos (GONÇALVES 1982).

Para a obtenção de calos, diferentes explantes foram utilizados incluindo sementes, hipocótilos, raízes de mudas, segmentos de pecíolo, caules ou cascas, lâminas de folhas, brotações apicais, tecidos de lignotubers, anteras e grãos de pólen.

Na regeneração de plantas através do cultivo de órgãos “in vitro”, já foram utilizados explantes nodais, folhas, pecíolos, entrenós e raízes (DURAND-CRESSWELL et alii 1985, citado por WIECHETECK 1990) e mais recentemente brotações epicórmicas de galhos adultos como fonte inicial de explante (IKEMORI 1987, citado por WIECHETECK 1990).

3 - Cultura de órgãos de *Eucalyptus* em sistemas “in vitro”

Diversas espécies de *Eucalyptus* podem ser propagadas através de técnicas de cultura de órgãos. Tais técnicas vem sendo preferencialmente utilizadas em relação aos métodos tradicionais de propagação vegetativa devido às elevadas taxas de multiplicação possíveis de serem obtidas.

Entre os diversos órgãos de *Eucalyptus* que já foram cultivados “in vitro”, observa-se explantes de folhas, pecíolos, entrenós, raízes e segmentos nodais (DURAND-CRESSWELL et alii 1985).

4 - Aspectos relacionados ao estado de maturação no cultivo "in vitro"

Diversos estudos tem indicado que a micropropagação de plantas a partir de material adulto é mais difícil de ser obtida quando comparada ao material juvenil.

STOUTMYER & BRITT (1963, 1965 e 1969), citados por GONÇALVES 1982, estudaram a produção de calo de *Hedera helix* a partir de material revertido à juvenilidade, adulto e juvenil a partir de plântulas originadas da progênie do material adulto. Nos trabalhos, os autores utilizaram a subcultura sucessiva de calos e os resultados mostraram que:

a) Existe variação da taxa de crescimento dentro do clone, dentro e entre populações de clones;

b) Existem efeitos da variação estacional na taxa de crescimento dos calos;

c) o calo de origem juvenil é mais produtivo que aqueles de origem de material revertido, e estes mais produtivos que aqueles de origem adulta;

d) Os calos de origem juvenil são menos estáveis que os demais e produzem raízes mais prontamente que estes últimos.

BARKER et alii 1977, advertem que os resultados experimentais obtidos com mudas não podem ser extrapolados para material adulto. Segundo BENNETT & McCOMB 1982, para *Eucalyptus marginata*, a percentagem de enraizamento de segmentos nodais ou de calos de estames de plantas adultas foi mais baixo quando comparado com explantes oriundos de mudas.

Como já foi dito, o uso de material adulto para a micropropagação é essencial para que se conheça o potencial genético dos clones a serem produzidos. Embora não se conheça inicialmente o potencial genético de clones obtidos de mudas oriundas de sementes, a micropropagação de progênies valiosas de cruzamentos controlados ou de pomares de sementes de elite pode ser de grande interesse ao se obter um número ilimitado de plantas a partir de uma quantidade limitada de sementes (BARKER et alii 1977). Ainda segundo estes autores, tais clones podem ser testados para algumas características de interesse ou sítio específico e mais tarde um grande número de plantas pode ser obtido a partir de um banco clonal de micropropagação.

5 - Reversão à juvenilidade

A reversão à juvenilidade em meristemas apicais de plantas lenhosas foi descrita por vários autores citados por GONÇALVES, 1982: BRIAN (1953), HESS (1959, 1961, 1962 a. b. c. , 1964, 1965, 1966), ROBBINS (1957 a. b., MUZIK & CRUZADO (1958), SCURFIELD & MOORE (1958), TRIPPI (1963), CHALLENGER et alii (1964), LANGNER (1964), BOCHERT (1965), GIROUARD (1966, 1967, 1969), PATON et alii (1970), LIBBY & HOOD (1976), FRANCLLET (1977, 1980) e KLEINSCHIMIT (1977).

Os métodos descritos e usados para a reversão à juvenilidade de meristemas apicais de plantas lenhosas são:

- a) Tratamento térmico, frio ou calor;
- b) Tratamento com raio X;
- c) Aplicação de ácido giberélico;
- d) Propagação vegetativa sucessiva;
- e) Poda drástica ou poda de gemas apicais;
- f) Neodiferenciação de gemas;
- g) Apomixia e a meiose para células.

III - Bibliografia consultada

- WIECHETEK, M. S. S. Micropropagação de *Eucalyptus viminalis* Labill. a partir de material juvenil. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.
- GONÇALVES, A. N. Reversão à juvenilidade e clonagem de *Eucalyptus urophylla*, S. T. BLAKE "in vitro". ESALQ/USP, Piracicaba, 1982.
- BAJAJ, Y. P. S. Biotechnology in Agriculture and Forestry 1. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 1986, 515p.
- VIEIRA, M. I. C. coord. Cultivo "in vitro" e manipulação genética de plantas. CBAB/ESALQ, Piracicaba, 1993.
- FANTINI JR., M., GRAÇA, M. E. C. Propagação "in vitro" de *Eucalyptus saligna*. IV Congresso Florestal Brasileiro, São Paulo, 1990.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”
ESALQ/USP

MONOGRAFIA

MICROPROPAGAÇÃO DE VIOLETA AFRICANA
(Saintpaulia ionantha)

BOLSISTA: PATRÍCIA POMPERMAYER

PIRACICABA/SP

INTRODUÇÃO

A propagação de plantas *in vitro* tem atraído a atenção dos pesquisadores desde o início do século. A tecnologia da cultura de células, protoplastos e tecidos de plantas constitui uma das áreas de maior êxito da biotecnologia. Após quase meio século de progresso, esta tecnologia conquistou destacada posição na propagação comercial e industrial de plantas, no melhoramento genético, no manejo, no intercâmbio e conservação de germoplasma e em outras aplicações como as pesquisas em fisiologia vegetal e produção industrial *in vitro* de compostos secundários.

Os países em desenvolvimento têm-se preocupado com a privatização das pesquisas em biotecnologia nos países do primeiro mundo devido às restrições aos seus resultados, mormente quando protegidas pelo patenteamento, o que tende a perpetuar e agravar a dependência tecnológica. Entretanto, a proteção de invenções e materiais obtidos pela biotecnologia, através de patentes no Brasil, constitui assunto a ser tratado com atenção e eficiência, não somente à pesquisa, mas, sobretudo, ao desenvolvimento da economia brasileira.

O Brasil ocupa posição de destaque entre os países em desenvolvimento, nas pesquisas com cultura de tecidos de plantas, graças aos esforços e investimentos, nos últimos anos.

MICROPROPAGAÇÃO INDUSTRIAL E COMERCIAL

A propagação rápida em larga escala foi desenvolvida na Inglaterra e na França a partir de 1966. As orquídeas, o crisântemo e o cravo dominaram a fase inicial. Depois, desenvolveram-se plantas ornamentais de vaso, as bromélias, dracenas e *Dizygotheca* e, na década de 80, a expansão das plantas lenhosas, os rododendrons, o dendê, a tamareira e a banana.

A micropropagação pode utilizar embriogênese de células somáticas, formação de brotações adventícias ou brotações axilares forçadas. A produção de calos pode preceder os processos embriogênicos e a formação da brotação adventícia. As brotações adventícias e axilares devem posteriormente emitir raízes adventícias para se obter a planta.

Entre as inúmeras vantagens da micropropagação, destacam-se a manutenção do genótipo e o fenótipo de híbridos, mutações ou variantes genéticas selecionadas, e o excelente estado fitossanitário das plantas obtidas.

O estabelecimento de uma infra-estrutura comercial de micropropagação através da cultura de tecidos, visando à produção de plantas de alta qualidade e garantindo lucros possui os seguintes requisitos essenciais:

- 1) laboratórios adequados para as diversas fases;
- 2) capacidade para indexar doenças ou acesso a plantas indexadas;
- 3) capacidade técnica da produção em bases econômicas de material uniforme de acordo com as especificações do mercado;
- 4) condições técnicas para remover as plantas do meio de cultura com alto índice de pegamento.

ETAPAS DE MICROPROPAGAÇÃO

O processo geral de micropropagação, foi dividido por Murashige (1974), nos estágios I, II, e III. Essa divisão tem sido largamente utilizada nos processos de propagação comercial. Um estágio precedente a introdução da cultura, citado mas não numerado por Murashige, recebeu a denominação de estágio zero. O estágio III foi subdividido em estágios IIIa e IIIb por Deberg e Maene.

Estágio 0

O estágio zero antecede a introdução do material em cultura. Trata-se da seleção da planta a ser propagada, escolha do explante a ser introduzido em cultura, estágio fisiológico do explante etc. A planta, dentro do possível, deve ser cultivada num ambiente relativamente controlado. É importante fazer alguns tratamentos prévios para erradicação de patógenos como termoterapia para limpeza de vírus, etc.

Estágio I

O estágio I é a introdução do explante em cultura. Para tanto, o explante deve sofrer tratamentos adequados de esterilização para erradicação total de microrganismos, sem causar injúrias drásticas aos explantes, evitando assim, necrose parcial ou total do mesmo. Para isto, quando não se tem experiência anterior com o material, torna-se necessário a execução de uma série de testes com substâncias desinfectantes como hipoclorito de sódio ou potássio, bicloreto de mercúrio, combinações de antibióticos e fungicidas e outros.

A introdução do explante deve ser feita em meios de cultura já definidos de acordo com os objetivos da cultura, tais como formação de gemas adventícias, calos, brotos etc. Para tanto, se tratar de cultura desconhecida, elaboram-se testes com diferentes meios de cultura com combinações de reguladores de crescimento. Geralmente, isso é feito num sistema de quadrado latino. O meio de cultura a ser

utilizado na início é geralmente alguma formulação básica já estabelecida como Murashige e Skoog (1962), meio B₅ de Gamborg e meio de White.

Estágio II

O objetivo do estágio II é a multiplicação das estruturas ou órgãos e regeneração de plantas a partir dos mesmos já obtidos no estágio I. Para isto, são feitos novos ensaios visando a indução dos centros meristemáticos através de combinações de reguladores de crescimento.

Estágio III

Esse estágio, segundo Murashige, compreende ou não, alongamento e enraizamento dos brotos. Deberg e Maene (1981), sugerem a subdivisão desse item em dois, quais sejam:

IIIa - Alongamento dos brotos isolados ou não;

IIIb - Enraizamento dos brotos alongados.

A separação do alongamento e enraizamento em dois itens se justifica pelo fato das metodologias e formulações dos meios de cultura, na maioria das vezes, serem diferentes.

Estágio IV

Apesar desse estágio não ter recebido especificação numérica por Murashige, o passo é considerado tão importante quanto os outros. Trata-se da transferência da cultura *in vitro* para condições *ex vitro*. Esse estágio apresenta algumas dificuldades:

- As plantas originaram e desenvolveram-se em condições de umidade relativamente alta (próxima de 100%), e intensidade luminosa relativamente baixa.
- A cultura sempre foi suplementada com carboidratos em seu meio. Portanto, as reservas de carbono e nitrogênio, na fase de aclimação encontram-se reduzidas.

Sendo assim, a transferência das plantas para condições *ex vitro* necessita de uma metodologia que vá devolvendo aos poucos as características autotróficas da planta. Para isto, as mesmas são transferidas para substratos colocados em condições controladas, cuja umidade relativa vai gradualmente decrescendo, enquanto que a intensidade luminosa vai aumentando até a equivalência ambiental natural.

ORGANOGENESE DIRETA EM VIOLETA AFRICANA (*Saintpaulia ionantha*)

O explante mais viável para essa cultura é o limbo foliar. A planta escolhida para micropropagar deve ser uma planta sadia, e que seu cultivo ao longo de sua vida tenha sido num ambiente com certo grau de higiene, isto é, não deve utilizar plantas que estiveram expostas a toda sorte de microrganismos contaminantes como se observa em plantas expostas em uma atmosfera rica em poeira. Sendo assim, a planta escolhida é trazida ao laboratório para introdução em cultura cuja esterilização tem os seguintes passos:

- O limbo foliar é isolado e previamente lavado com detergente neutro Tween 20, numa concentração de aproximadamente 0.5%, enxaguado em abundância em água, preferivelmente destilada.
- Em condições assépticas (câmara de fluxo laminar) o órgão é imerso em solução de hipoclorito de sódio (solução 20% v/v a partir do produto comercial Q.Boa), preparada em frascos com água deionizada esterilizada. Colocar sob agitação por 20 minutos;
- Se o órgão não apresentar-se aparentemente muito contaminado, a concentração da solução de hipoclorito de sódio pode ser reduzido pela metade. Isso é interessante pelo fato de que o limbo foliar de violeta é muito sensível a esterilização, culminando quase sempre com a morte do tecido;
- Novamente em condições assépticas, enxaguar os órgãos 4 a 5 vezes com água deionizada esterilizada;
- Em placas de Petri esterilizada, com auxílio de pinças e bisturis também esterilizados, faz-se o retalhamento do órgão em pedaços de mais ou menos 1,5 cm² e inocula-os em meio de cultura MV₅ (meio para cultura de violeta);
- A cultura é incubada em sala de climatização com temperatura em torno de 25°C ± 1, fotoperíodo de 16/8 horas-claro/escuro.

BIBLIOGRAFIA

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas. Brasília, ABCTP/EMBRAPA CNPH, 1990. 433p.

OLIVEIRA, E. T.; AMARAL, A.; CROCOMO, O. J. Práticas de Cultura de Tecidos de plantas. Piracicaba: CEBTEC, ESALQ/USP. 1989. 22P.

ESALQ-USP

MONOGRAFIA

“Mapeamento do(s) gene(s) de Resistência à Raça 2 de *Fusarium oxisporum*
f.sp.*conglutinans* e Análise de Ligação entre Marcadores Morfológicos e Genes de
resistência em *Brassica oleraceae*”

Mauricio P. M. Barbosa

1995

1) Resumo do projeto

Fragmentos de restrição de comprimento polimórfico (RFLPs) previamente utilizados na construção de um mapa de ligação de *Brassica oleracea* baseado no cruzamento das linhagens “Badger Inbred” (BI) e “OSU Cr-7”, serão utilizados para mapear genes de resistência à raça 2 de *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (FOC). Cultivares “Louco de Piracicaba(LP) e “AF19” e populações F2 segregantes serão utilizadas para mapear o(s) gene(s) de resistência à raça 2 de FOC (FOC2), cujo modo de herança é desconhecido, e determinar uma possível relação alélica entre os genes de resistência à FOC2. Os resultados obtidos neste estudo também permitirão averiguar a existência de ligação entre marcadores morfológicos e genes de resistência e se estes, a exemplo do que ocorre em outras espécies vegetais, estão organizados na forma de “clusters”.

2) Introdução e justificativa

Fragmentos de restrição de comprimento polimórfico (RFLPs) têm sido utilizados como marcadores genéticos na construção de mapas de ligação e mapeamento de genes que controlam características quantitativas (QTL) e qualitativas de importância agrícola, tais como genes de resistência à fitopatógenos (Young et al., 1988; Keim et al., 1990; Landry et al., 1992; Heun, 1992; Bubeck et al., 1993; Nodari et al., 1993; Kreike et al., 1993; Young et al., 1993; Concibido et al., 1994; Camargo et al., 1994b; Ferreira et al., 1994). RFLPs ligados a genes de resistência, por sua vez, podem ser utilizados como marcadores genotípicos na seleção de indivíduos superiores, dispensando a análise fenotípica tradicional que, em alguns patossistemas, é muito trabalhosa e demorada (Melchinger, 1990; Dudley, 1993). Também podem ser utilizados para se estudar as interações entre genótipo e ambiente (Paterson et al., 1991; Beavis et al., 1991; Stuber et al., 1992; Vicente & Tanksley, 1993; Bubeck et al., 1993) e auxiliar na seleção precoce (Zaitlin et al., 1993; Camargo et al., 1994b). Além das aplicações no melhoramento vegetal, RFLPs também têm possibilitado um melhor entendimento da organização genômica dos genes de resistência. Estudos genéticos em vários patossistemas, por exemplo, sugerem que genes de resistência ocorrem na forma de séries multialélicas em um mesmo locus gênico ou na forma de “clusters” (Hooker & Saxena 1971; Saxena & Hooker 1974; Shepherd & Mayo 1972; Mayo & Shepherd 1980; Wise & Ellingboe, 1985; Hulbert and Michlemore 1985; Farrara et al. 1987; Islam et al. 1989), sendo que a localização de tais clusters tem sido grandemente facilitada por meio do mapeamento com RFLPs, permitindo avanços no estudo da genética e evolução das interações hospedeiro-patógeno (Bennetzen et al., 1991; Hulbert & Bennetzen, 1991; Dickinson et al., 1993; Kesseli et al., 1993).

Brassica oleracea compreende algumas das mais importantes culturas hortícolas, tais como repolho, brócolo, couve-flor e couve. Todas estas culturas, e demais espécies do gênero *Brassica*, são hospedeiras naturais do fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*

(Wr.) Sny. & Hans., agente causal da murcha de fusarium, sendo que o desenvolvimento de variedades resistentes tem sido apontado como o meio mais efetivo para o controle desta enfermidade (Williams, 1980; Giordano, 1988).

A podridão negra das crucíferas é de ocorrência generalizada em regiões hortícolas do Brasil (Schuck & Berton, 1981; Henz et al., 1988; Leite et al., 1994). Esta doença é apontada como um fator limitante ao cultivo de repolho e brócolo em regiões quentes e úmidas (Williams, 1980; Henz et al., 1991).

A murcha de fusarium foi descrita em plantios no Estado de São Paulo (Galli & Tokeshi, 1962), aonde ocorre esporadicamente. *F. o. conglutinans* ocorre na forma de duas raças fisiológicas (Ramirez-Villapadua et al., 1985) designadas raça 1 (FOC1) e raça 2 (FOC2). Resistência à raça 1 pode ser do tipo monogênica (tipo A) ou oligogênica (tipo B), ao passo que o modo de herança da resistência à FOC2 é desconhecido. O gene que confere resistência do tipo A, descrito por Walker & Smith (1930), é dominante e efetivo contra FOC1, e tem sido utilizado intensivamente em programas de melhoramento. Apesar da extrema utilidade e eficácia deste gene e do número razoável de mapas genéticos baseados em RFLPs existentes para *B. oleracea* (Slocum et al., 1990; Kianian & Quiros, 1992; Landry et al., 1992, Camargo et al., 1994a), a posição genômica de tal gene e suas relações de ligação com outras características agronômicas, particularmente com genes de resistência à outras enfermidades, e em especial à raça 2 de *Fusarium*, permanece desconhecida.

O presente estudo utilizará RFLPs previamente mapeados por Camargo et al. (1994a) em *B. oleracea* para identificar marcadores moleculares e morfológicos ligados a genes de resistência à FOC2, e conseqüentemente incluir tais genes no mapa de *B. oleracea* e averiguar a presença de “clusters” de genes de resistência nesta espécie vegetal.

3)Objetivos

O presente projeto objetiva:

Mapear os genes de resistência à raça 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*.

Efetuar uma análise de ligação entre marcadores morfológicos e genes de resistência.

4 Populações segregantes

Diferentes populações segregantes constituídas por indivíduos F2 e famílias F3 serão utilizadas. Para o mapeamento dos genes de resistência à raça de FOC duas populações segregantes foram desenvolvidas cruzando-se duas plantas resistentes às duas raças (plantas LC1 e LC2) com uma planta suscetível (planta LC201). LC1 é uma planta da linhagem endogâmica auto-incompatível de repolho “Badger Inbred-16” e LC2 é uma planta da linhagem endogâmica auto-incompatível de brócolo “Cr-7”, ao passo que LC201 é uma planta auto-compatível de uma linhagem endogâmica “fast cycling” de *B. oleracea* (Williams & Hill, 1986). Indivíduos híbridos F1 e sementes F2 já foram obtidos em ambos os cruzamentos, além de sementes resultantes do retrocruzamento (LC2xLC201) x LC201. A segregação do gene de resistência tipo A à FOC1 nestas populações foi confirmada em ensaios preliminares (Camargo & Burkhammer, dados não publicados). Aproximadamente 100 famílias F3 serão obtidas do cruzamento LC2 x LC201 para estudar relações alélicas entre os genes de resistência à raça 2 de FOC.

Para a análise de ligação entre genes de resistência à FOC e marcadores morfológicos, serão utilizados indivíduos F2 resultantes do cruzamento entre LC2 e a linhagem “fast cycling” LC207 que é suscetível à FOC, homozigota dominante para *Wfl* (flor branca) e *Sc* (auto-compatível), e homozigota recessiva para *Dwf* (nanismo) e *Rta* (Camargo, dados não publicados). Indivíduos F2 resultantes do cruzamento entre LC1 x LC206 e LC1 x LC201

serão utilizados para análise de ligação entre genes de resistência à Xcc e FOC e os marcadores morfológicos folha de samambaia, flor branca, e auto-compatibilidade.

5 RFLPs

Sondas moleculares de três bibliotecas genômicas serão utilizadas para a detecção de RFLPs. Tais sondas foram utilizadas anteriormente na construção de um mapa de RFLP de *B. oleracea* (anexo 1) descrito por Camargo et al. (1994a) e foram gentilmente cedidas pelo Dr. Thomas Osborn, da Universidade de Wisconsin (EUA). A construção e seleção das sondas foi descrita por Thormann et al. (1994) e Camargo et al. (1994a). O conhecimento prévio da posição de tais sondas no mapa facilitará o mapeamento dos genes de resistência conforme descrito abaixo. As sondas serão preparadas para hibridização por meio de amplificação de insertos plasmidiais via PCR e concomitante marcação usando-se o método não radioativo da digoxigenina.

5.1) Mapeamento do gene de resistência à raça 2 de *Fusarium oxysporum f. sp. conglutinans*

Alguns RFLPs foram previamente identificados como potenciais marcadores ligados ao gene de resistência tipo A (Burkhamer, Camargo e Osborn, dados não publicados) usando-se o método “bulked segregant analysis” descrito por Michlemore et al. (1991). Este método é apropriado para a identificação de marcadores moleculares em ligação com genes responsáveis por características qualitativas, i.e., de herança simples. Indivíduos de uma mesma população segregante são agrupados em diferentes classes fenotípicas determinadas pelo genótipo do gene que se quer mapear. Marcadores ligados ao gene em questão diferenciam os grupos, i.e., são polimórficos, ao passo que marcadores posicionados em outras regiões do genoma são monomórficos. No caso da resistência à FOC1, plantas F2 dos cruzamentos LC1 x LC201 e LC2 x LC201 foram inoculadas com o patógeno e agrupadas

em resistentes e suscetíveis. O DNA das plantas suscetíveis foi combinado para formar o “bulk” suscetível, o mesmo sendo feito com as plantas resistentes. O marcador TG3D1 do grupo de ligação 4 diferenciou os bulks resistentes e suscetíveis no cruzamento LC2 x LC201 e WG6G9b, WG2D6, WG2D1 e WG4C9 do grupo de ligação 8 diferenciaram os bulks do cruzamento LC1x LC2 respectivamente. Com base nestes resultados preliminares, proceder-se-á ao mapeamento de tais genes onde aproximadamente 100 indivíduos F2 de cada cruzamento serão inoculados e classificados como resistente ou suscetível, e serão genotipados com relação aos RFLPs previamente mapeados nos grupos de ligação 4 e 8. As plantas LC1, LC2 e LC201 também serão genotipadas para distinguir a origem parental dos RFLPs. O DNA genômico das plantas será extraído conforme Kidwel & Osborn (1992) e digerido com *EcoRI* ou *HindIII*. Os fragmentos digeridos de DNA serão separados por eletroforese e serão transferidos para membranas de nitrocelulose por meio de Southern blotting para posterior genotipagem. A análise da co-segregação entre resistência/suscetibilidade e RFLPs será efetuada pelo software MAPMAKER/EXP v 3.0 (Lincoln et al., 1992a). Tal análise permitirá esclarecer se LC1 e LC2 possuem diferentes genes de resistência e possibilitará a inclusão de tais genes no mapa de *B. oleracea*.

5.2) Análise de ligação entre marcadores morfológicos e genes de resistência

Populações F2 que segregam simultaneamente para mais de uma característica serão utilizadas para se estudar possíveis ligações entre genes de resistência e marcadores fenotípicos e conseqüente inclusão de tais marcadores no mapa de *B. oleracea*. Para tal, aproximadamente 150 plantas F2 de cada cruzamento (vide item 4.1) serão avaliadas para resistência à *Fusarium oxysporum* f.sp.conglutinans raça 1 (FOC1), FOC2 e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* aos 15 dias de idade. Plantas suscetíveis serão resgatadas mediante aplicação de fungicidas e bactericidas, e serão avaliadas fenotípicamente para as

características segregantes em cada cruzamento. A análise da co-segregação entre marcadores fenotípicos e resistência à FOC será efetuada pelo software MAPMAKER/EXP v 3.0.

6) Referências bibliográficas

- Beavis WD, Grant D, Albertsen M, Fincher R (1991) Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. *Theor Appl Genet* 53: 141-145
- Bubcek DM, Goodman MM, Beavis WD, Grant D (1993) Quantitative loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Sci.* 33: 838-847.
- Bennetzen JL, Hulbert SH, Lyons PC (1991) Genetic fine structure analysis of a maize disease resistance gene. *Molecular strategies of pathogens and host plants.* S. S. Patil, ed. Springer-Verlag, New York.
- Camargo LEA, Savides L, and Osborn TC (1994a) Linkage arrangement of RFLP in *Brassica oleracea* and comparison with *B. napus*. *Theor Appl Genet* (submetido para publicação).
- Camargo LEA, Williams PH, Osborn PH (1992) Inheritance of resistance to black rot in a cabbage by broccoli cross. *Phytopathology* 82:1142 (abs).
- Concibido VC, Denny RI, Boutin SR, Hautea R, Orf JH, and Young ND (1994) DNA marker analysis of loci underlying resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). *Crop Sci.* 34: 240-246
- Dickinson MJ, Jones DA, Jones JDG (1993) Close linkage between *CF2/Cf5* and *Mi* resistance loci in tomato. *MPMI* 6:341-347
- Dudley JW (1993) Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Sci* 33: 660-668.
- Farrara BF, Ilott TW, Michelmore RW (1987) Genetic analysis of factors for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). *Plant Pathol* 36: 499-514
- Galli F & Tokeshi H (1962) Murcha em repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*. *Rev. Agric.* 37:24-27
- Heun M (1992) Mapping quantitative powdery mildew resistance of barley using a restriction fragment length polymorphism map. *Genome* 35: 1019-1025.
- Hooker AL, Saxena KMS (1971) Genetics of disease resistance in plants. *Ann Rev Genet* 5: 507-424
- Hulbert SH, Bennetzen JL (1991) Recombination at the *Rp1* locus of maize. *Mol Gen Genet* 226: 377-382
- Hulbert SH, Michelmore RW (1985) Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*) *Theor Appl Genet* 70: 520-528
- Islam MR, Shepherd KW, Mayo GME (1989) Recombination among genes at the *L* group in flax conferring resistance to rust. *Theor Appl Genet* 77: 540-546
- Keim P, Diers BW, Olson TC, Shoemaker RC (1990) RFLP mapping in soybean: associations between marker loci and variation in quantitative traits. *Genetics* 126: 735-742.

- Kesseli R, Witsenboer H, Staghellini M, Vandermark G, Michelmore R (1993) Recessive resistance to *Plasmopara lactucae-radialis* maps by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance genes in lettuce. *MPMI* 6:722-728
- Kianian SF, Quiros CF (1992) Generation of a *Brassica oleracea* composite RFLP map: linkage arrangements among various populations and evolutionary implications. *Theor Appl Genet* 84: 544-554
- Kidwell KK, Osborn TC (1992) Simple plant DNA isolation procedures. In: J Beckman and TC Osborn (eds). *Plant genomes: methods for genetic and physical mapping*. Kluwer Academic Publishers Group AH Dordrecht. The Netherlands, p 1-13
- Kreike CM, de Koning JRA, Vinke JH, van Ooijen JN, Gebhart C, Stiekema WJ (1993) Mapping of loci involved in quantitatively inherited resistance to the potato cyst-nematode *Globodera rostochiensis* pathotype Ro1. *Theor Appl Genet* 87:464-470.
- Landry BS, Hubert N, Crete R, Chang M, Lincoln SE, Etoh T (1992) A genetic map of *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora Brassica* (Woronin). *Genome* 35: 409-419
- Lincoln S, Daly M, Lander E (1992a) Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP v. 3.0 Whitehead Institute Technical Report 3 rd edition
- Mayo GME, Shepherd KW (1980) Studies of genes controlling specific host-parasite interactions in flax and its rust. 1. Fine structure analysis of the M group in the host. *Heredity* 44: 211-227
- McGrath JM, Quiros CF (1991) Inheritance of isozyme and RFLP markers in *Brassica campestris* and comparison with *B. oleracea*. *Theor Appl Genet* 82: 668-673
- Melchinger AE (1990) Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding* 104: 1-19.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Genetics* 88: 9828-9832.
- Nodari RO, Tsai SM, Guzmán P, Gilbertson RL, Gepts P (1993) Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* 134:341-350
- Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, and Tanksley SD (1991) Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations, and environments. *Genetics* 127: 181-197.
- Ramirez-Villapadua J, Endo RM, Bosland P, and Williams PH (1985) A new race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* that attacks cabbage with type A resistance. *Plant Dis.* 69:612-613
- Saxena KMS, & Hooker (1974) A study on the structure of gene *Rp3* rust resistance in *Zea mays*. *Can J Genet Cytol* 16: 857-860
- Shepherd KW, Mayo GME (1972) Genes conferring specific plant disease resistance. *Science* 175: 375-380
- Slocum MK (1989) Analyzing the genomic structure of *Brassica* species and subspecies using RFLP analysis. In: Helentjaris T, Burr B (eds) *Development and applications of molecular markers to problems in plant genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y. pp 73-80

- Slocum MK, Figdore SS, Kennard WC, Suzuki JY, Osborn TC (1990) Linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 80: 57-64
- Stubber CW, Lincoln SE, Wolff DW, Helentjaris T, Lander ES (1992) Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132:823-839.
- Thormann CE, Ferreira ME, Camargo LEA, Tivang JG, Osborn TC (1994) Comparison of genetic relationship estimates within and among cruciferous species based on RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* (in press)
- Vicente C, Tanksley SD (1993) QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics* 134: 585-596.
- Zaitlin D, DeMars S, Ma Y (1993) Linkage of *rhm*, a recessive gene for resistance to southern corn leaf blight, to RFLP marker loci in maize (*Zea mays*) seedlings. *Genome* 36: 555-564.
- Walker JC, and Smith R (1930) Inheritance of Fusarium resistance in cabbage. *J. Agric. Res.* 40:721-745.
- Whitkus R, Doebly J, Lee M (1992) Comparative genome mapping of sorghum and maize. *Genetics* 132: 1119-1130
- Williams PH (1985) *CrGe Resource Book*. Crucifer Genetics Cooperative, Dept. Plant Pathology, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.
- Williams PII, and Hill CB (1986) Rapid-cycling populations of *Brassica*. *Science* 232:1385-1389.
- Wise RP, Ellingboe AH (1985) Fine structure and instability of the *Ml-a* locus in barley. *Genetics* 111:113-130
- Young ND, Danesh D, Menancio-Hautea D, Kumar L (1993) Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. *Theor Appl Genet* 87: 243-249.
- Young ND, Zamir D, Ganai MW, and Tanksley SD (1988) Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato. *Genetics* 120: 579-585.

USO DE RAPD PARA CARACTERIZAÇÃO DE HÍBRIDOS E SEGREGANTES DE MEIOSES COMPLETAS DE *Saccharomyces cerevisiae*; Juan Lucas Argueso; Luiz H. Gomes; Keila M. R. Duarte; Flavio C. A. Tavares. Departamento de Genética, ESALQ / USP, Piracicaba, SP.

O polimorfismo molecular do tipo RAPD em segregantes de *Saccharomyces cerevisiae* em cruzamentos controlados poderia ser correlacionado à produção de etanol. Os cruzamentos foram feitos com linhagens parentais divergentes quanto à produção de etanol, AH 22 e X 2180, obtendo o híbrido XAH-1, e segregantes deste. As amplificações foram feitas em volume de 25 µl contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM de KCl, 3.75 mM MgCl₂, 100 µM de cada um dos quatro deoxinucleotídeos, 30 ng de primer (10 bp), 40 ng de DNA genômico e 1.5 U de Taq DNA Polimerase (Gibco BRL). A pré denaturação foi de 2 minutos a 92°C, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 92 °C, 1 minuto a 37 °C e 2 minutos a 72 °C, e feita uma extensão final de 3 minutos a 72 °C. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.3%, e corados com brometo de etídio. Utilizando esta metodologia não foi possível identificar o número de bandas polimórficas necessário para uma análise estatística significativa. De fato entre os 74 primers testados apenas 3 apresentaram polimorfismo de apenas uma banda cada. Possivelmente, a origem endogâmica das linhagens parentais, AH 22 e X 2180, dificultou a identificação de polimorfismo e conseqüentemente não foi adequada para este estudo.

Apoio Financeiro: CAPES e PADCT.

DNA RECOMBINANTE E DOENÇAS GENÉTICAS

O diagnóstico de doenças genéticas é uma das mais importantes aplicações medicinais da clonagem de genes. Ela pode prevenir o nascimento de uma criança doente e em um futuro distante pode provar possível a introdução de genes normais em células de pessoas geneticamente doentes. Está sendo possível atualmente diagnosticar doenças genéticas a nível de DNA.

São conhecidas mais de 500 doenças genéticas, estas doenças atacam bebês e pessoas jovens e suas vítimas não alcançam maturidade sexual. A maioria dessas doenças são raras mas representam muito sofrimento às vítimas.

As mutações que provocam estas doenças geralmente inativam enzimas ou outras proteínas essenciais como a hemoglobina do sangue. Em quase 200 das mais de 500 doenças genéticas sabe-se precisamente qual a proteína defeituosa.

Com o diagnóstico de fetos doentes, tem-se a oportunidade de aborto. Este diagnóstico é feito obtendo células fetais através do processo de amniocentese. Fig17-

Correntemente testes clínicos eram feitos para deficiência de uma enzima ou proteínas de constituição defeituosa. Se a enzima em questão não é expressada nos fibroblastos ou células do sangue obtidos por amniocentese, a doença não pode ser testada.

β Talassemia

Os polipeptídeos de hemoglobina humana são codificados por dois grupos de genes: do tipo α no braço curto do cromossomo 10, e o do tipo β situado no cromossomo 11.

A doença talassemia é caracterizada por um baixo nível de síntese de um dos polipeptídeos, ou até mesmo a ausência total.

Os defeitos que provocam a doença podem ser devido a mutações pontuais, que levam a uma mudança de estrutura ou mutações "nonsense", e até mesmo deleção de toda ou parte do gene.

Existe a β^0 Talassemia que é causada por uma mutação pontual no codon 17 ou no codon 39. Nesta doença há uma completa ausência de síntese de β globina. Outros tipos de β^0 Talassemia encontradas são devido a deleções ou inserções na sequência codificadora da β globina.

Uma das β Thalasseмииs mais interessante descoberta são aquelas devido à "splicing" aberrantes de β globina. O gene de β globina possui dois introns que devem ser removidos, este gene possui na "splice junção" uma sequência GT sempre encontrada no 5'. Na β^0 Thalasseμία esta sequência GT é mudada para AT no primeiro ou no segundo intron. Dessa forma o "splicing" é evitado e outras sequências semelhantes ao gt são usadas e isto leva ao "splicing" incorreto.

Outros tipos de mutações podem ocorrer dentro do intron, criando-se assim um novo 3' que competirá com o 3' correto. Por outro lado mutações podem ocorrer criando um novo sítio 5' de "splicing".

Anemia de células-sickle

A anemia de células-sickle é uma mutação que muda resíduos de ácido glutâmico (codificado por GAG) por um resíduo de valina (codificada por GTG), na posição 6 do gene de β globina. O resultado destas mutações é a cristalização de células vermelhas do sangue, as quais tornam-se menos flexíveis e são removidas pelo baço, resultando em anemia.

A mutação de A para T elimina um sítio de restrição da enzima DdeI (e outros sítios de restrições). O DNA normal digerido com DdeI gerará dois fragmentos de 201 e 175 pares de bases, ao passo que o DNA de célula-sickle gerará um fragmento de 376 pares de bases. Fig 17.2

No entanto a enzima DdeI não é ideal para detectar a mutação, porque o gene de β globina possui vários sítios DdeI de restrição. Consequentemente produz-se vários fragmentos de DNA que são difíceis de separar por gel de eletroforese. Está sendo usada uma outra enzima, a MstII que corta sequência CCTNAGG que ocorre com menos frequência.

Deficiência de α_1 Antitripsim

A α_1 Antitripsim é produzida no fígado e sua função é inibir a elastase. Em uma pessoa normal o balanço entre antitripsim e elastase é cuidadosamente controlado. Em indivíduos com deficiência de α_1 Antitripsim este balanço é perturbado e a elastase destrói vagarosamente as fibras elásticas do pulmão.

Os deficientes de α_1 Antitripsim são 30 a 40 vezes mais propensos a desenvolver emphysema pulmonar e cirrose infaltil.

Os genes de pessoas com deficiência de α_1 Antitripsim tem sido clonados e foi descoberto que o gene mutado tem uma substituição G→A que confere uma substituição no amino ácido (GLU→LYS) no resíduo 324, produzindo uma proteína não funcional.

Para que se possa fazer um diagnóstico prenatal, está sendo usado um oligonucleotídeo sintético de 19 bases que é complementar à sequência de α_1 Antitripsina normal. O oligonucleotídeo é usado como uma sonda para distinguir o gene normal do gene mutante. Fig 17.3

Citrulinemia

A doença citrulinemia é causada pela ausência da enzima argininosuccinato sintetase e é caracterizada por envenenamento por amônia, retardamento mental e morte prematura. Esta enzima catalisa a conversão de citrulina e aspartato para argininosuccinato.

Análises do DNA de pacientes com citrulinemia foram usando a hibridização Southern Blot. Nenhuma diferença entre indivíduos normais e com citrulinemia foram encontradas.

Foi então usado análises de Northern blot do RNA_m. O uso do cDNA clonado como uma sonda revelou que 6 dos 5 pacientes com citrulinemia tem uma alteração no RNA_m da Argininosuccinato sintetase.

Diagnosticando mutações por Linkage

Na população negra dos Estados Unidos a mutação sickle em genes de β globina está associada em 60% dos casos com outra mutação no DNA. Esta segunda mutação elimina um sítio de restrição HpaI que está presente em pessoas sem a característica (sem a doença).

Como resultado, quando o DNA de negros dos Estados Unidos é digerido com a enzima HpaI o gene de β globina aparece como fragmento de 13 kilobases, enquanto que o DNA de pessoas normais aparece um fragmento de 7,6 kilobases. Fig 17.5. Este teste foi substituído por ensaio para mutação sickle usando-se MstII.

A procura de genes mutados

Recentemente o gene da hypoxanthineguanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) foi clonado e isto pode levar a novos métodos para diagnosticar a síndrome Lesch-Nyhan, uma doença ligada ao cromossomo X causada por carência de HGPRT. A HGPRT é uma enzima que é usada para reutilizar guanina livre e hypoxantina que foram produzidas a partir da destruição do ácido úrico.

- Análises usando o gene HGPRT humano como sonda para DNA de pessoas normais e com Lesch-Nyhan não tem revelado diferenças entre os dois grupos. No entanto análises de RNA_m de HGPRT de fibroblastos normais e mutantes mostra diferenças entre os dois grupos.

Mapeamento de cromossomos humanos

O mapeamento de genes é essencial para diagnosticar muitas doenças genéticas.

O primeiro gene mapeado era o que causava Color blindness. Estudos de 1911 provaram que a doença era ligada ao sexo (cromossomos X). Entre 1911 e 1970 vários outros genes foram mapeados no cromossomo X.

Células híbridas de Camundongo-humano

Células humanas e de ratos em cultura são fusionadas e as células híbridas resultantes sobrevivem e dividem-se, mas progressivamente perde os cromossomos humanos.

Análises são feitas nas células híbridas para a presença de proteínas humanas. Esta técnica indica a presença de um cromossomo humano como os genes desejados. Fig17.7. Porém nem sempre os genes humanos introduzidos em células de rato serão expressos.

O gene pode então ser clonado e uma sonda hibridizante é usada para localizar as mesmas sequências no cromossomo das células híbridas. Esta técnica pode localizar a presença de β globina com o uso da hibridização Southern blot. Fig17.8. Através de tais procedimentos 12 oncogenes, que ainda não se sabe ser malignos, já foram mapeados para cromossomos específicos. Fig17.9

Localização subcromossomal de genes

Para se saber a ordem dos genes ao longo do cromossomo os geneticistas recorrem a fenômenos alternativos, tais eventos correspondem à quebras na ligação entre os genes no mesmo cromossomo, incluindo deleções espontâneas e translocações recíprocas bem como fragmentação do cromossomo induzida experimentalmente.

Translocações recíprocas espontâneas na qual dois diferentes cromossomos foram alterados são relativamente frequentes nos humanos, causando anormalidades congênitas ou altas taxas de abortos espontâneos. As posições das translocações recíprocas podem ser identificadas por que elas alteram o padrão das bandas que são observadas ao longo do cromossomo por microscopia ótica após a coloração apropriada.

A posição do gene no cromossomo pode ser determinada estudando as suas translocações recíprocas. Mais de 100 genes humanos foram posicionados em regiões subcromossomais. Fig17.10

Quando dois genes para características diferentes estão unidos, eles podem ser induzidos a separar-se por intermédio da fragmentação ao acaso dos cromossomos

sendo que a célula híbrida contém um cromossomo humano possuidor das enzimas thymidina kinase e galactose kinase. Fig 11

Translocações cromossômicas e câncer

Estudos citogenéticos têm indicado que muitas diferentes leucemias e linfonas estão correlatadas com translocações cromossômicas. Estas translocações são de algum modo responsáveis por um fenótipo maligno.

Desde que foi descoberto que o genoma humano contém genes se expressados inapropriadamente podem causar câncer, tem-se estudado se a translocação cromossômica nestes linfonas e leucemias resulta no transporte de oncogenes silenciosos para novas localizações no cromossomo onde serão ativados.

Com as tecnologias de DNA recombinante mostrou-se que este é o caso de várias leucemias de ratos e talvez uma doença humana, Burkitt's linfoma. O gene de camundongo (c-myc) análogo ao oncogene do vírus MC29, foi clonado e usado como uma sonda para localizar este gene em algumas células normais e em células de linfoma. Em algumas linfonas de camundongo o gene c-myc foi transferido de locais normais no cromossomo 15 para locus heavy-chain de anticorpos no cromossomo 12. Na doença humana Burkitt's linfoma, o gene c-myc é movido da sua localização normal no cromossomo 8, para a região heavy-chain de imunoglobulina no cromossomo 14. Este oncogene equivocadamente colocado próximo a uma região promotora de heavy-chain poderá ocasionar uma transformação maligna, Fig 17.12

Hibridização in situ

A hibridização in situ revela qual cromossomo que carrega um gene particular como também onde o gene está localizado ao longo do cromossomo.

A hibridização in situ envolve uma sonda de DNA clonado marcada radioativamente. A hibridização é feita na fase de mitose, aonde os cromossomos são sistinguidos no microscópio. Autoradiografia é usada em conjunto com a coloração de cromossomos para revelar qual banda a sonda hibridizou.

Em cromossomos de glândula salivar de *Drosophila* os genes são amplificados 1000 vezes e mantidos um ao lado do outro. Esta característica faz com que a hibridização in situ seja viável contudo para o mapeamento de genes humanos de cópia única é necessário uma sonda muito radioativa para dar um sinal detectável. Recentemente sondas de DNA marcadas com isótopo ^{125}I e novos métodos de marcação não radioativa têm sido usados.

Perspectivas para uma terapia

A transferência de genes é uma possibilidade estudada para se obter a cura de doenças genéticas.

Em 1981 foi publicada a tentativa de curar dois pacientes terminalmente doentes sofrendo de β talassemia removendo algumas células da medula óssea e transferindo-as com os genes de β globina humana normal. Para se obter o sucesso na terapia de transfêrencia de genes será necessário:

1-Um abundante fornecimento do gene e um entendimento de como sua expressão é regulada.

2-Um método eficiente de introduzir genes em cromossomos de células de tal maneira uma vez que eles são integrados, eles serão expressados de uma maneira normalmente regulada.

3-Vetores que transportarão genes de substituição para células específicas nos tecidos e órgãos nos quais os genes normalmente funcionaram

4-A habilidade de introduzir genes de substituição para uma proporção significantes de células apropriadas. Isto é essencial para existir um benefício medicinal significativo.

Introdução de hemoglobina fetal em thalasseмииs.

Indivíduos adultos normais tem hemoglobina do tipo $\alpha_2\beta_2$, durante a vida fetal as cadeias de β globina não são fabricadas até mesmo em indivíduos normais. Fetos fabricam uma cadeia de γ globulina que associa-se com a cadeia de α globina para constituir a hemoglobina fetal. Após cerca de 30 semanas de gestação a síntese de γ globina começa a decrécer e a de β globina a crescer. Depois de poucas semanas após o nascimento a síntese de hemoglobina é completamente diferente em pessoas normais.

Atualmente estudos estão sendo feitos com indivíduos que tem uma doença rara chamada "persistência hereditaria de hemoglobina fetal". Estas pessoas podem viver normalmente, sem a β globina.

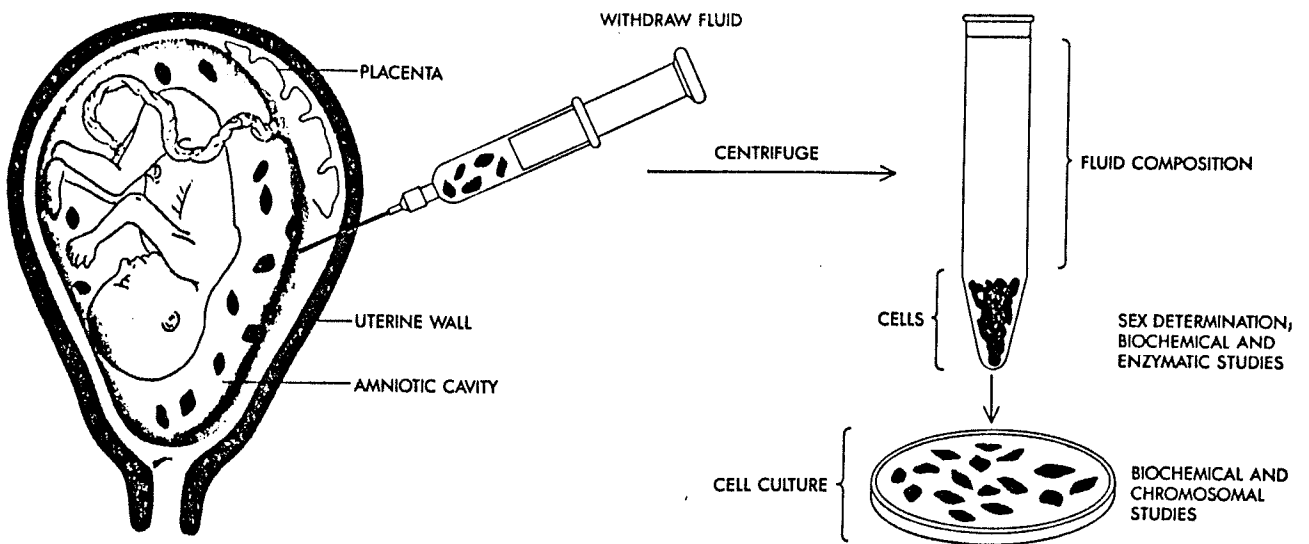


Figure 17-1
 Amniocentesis. A sample of amniotic fluid (mostly fetal urine and other secretions) is taken by inserting a needle into the amniotic cavity during or around the 16th week of gestation. The fetal cells are separated from the fluid by centrifugation. The cells are then cultured so that a number of biochemical, enzymatic, and chromosomal analyses can be made.

Table 17-2

Genetic Diseases That Can Currently Be Diagnosed Prenatally

<i>Enzymopathies*</i>	<i>Hemoglobinopathies</i>
<p><i>Diseases of lipid metabolism</i> There are eight, including: Tay-Sachs disease Gaucher's disease Krabbe's disease Fabry's disease</p> <p><i>Diseases of amino acid metabolism</i> There are seven in all.</p> <p><i>Diseases of carbohydrate metabolism</i> There are four, including: Galactosemia</p> <p><i>Diseases of mucosaccharide and mucolipid metabolism</i> There are ten, including: Hurler's syndrome Hunter's syndrome San Filippo disease</p> <p><i>Other metabolic errors</i> There are five, including: Lesch-Nyhan syndrome Xeroderma pigmentosum</p>	<p>Sickle-cell anemia β-Thalassemia</p>

*Among the enzymopathies (another name for inborn errors of metabolism), by far the largest number of tests have been made for Tay-Sachs disease in Ashkenazi Jewish populations. The incidence of cases among the tested fetuses proves to be 25 percent, as is consistent with Mendel's laws.

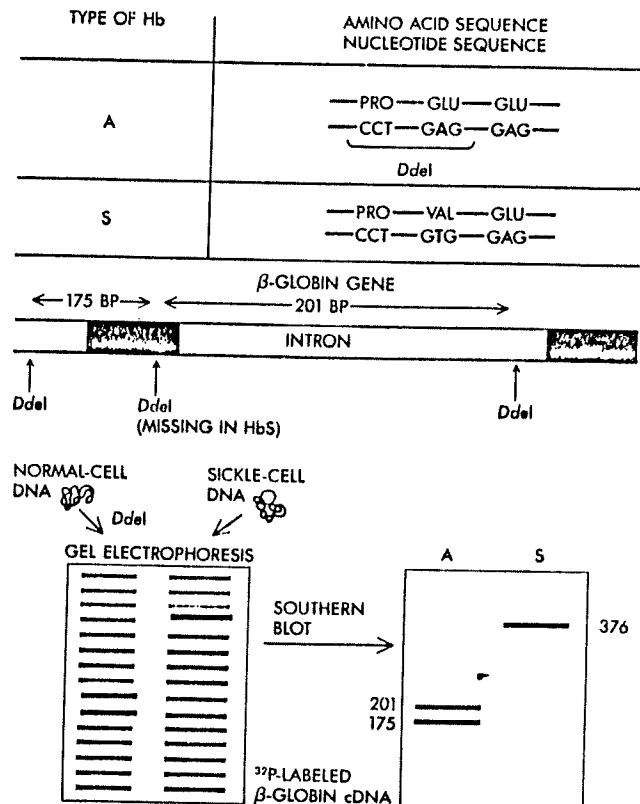


Figure 17-2
 Detection of the sickle-cell globin gene by Southern blotting. The base change (A \rightarrow T) that causes sickle-cell anemia destroys a *DdeI* site that is present in the normal β -globin gene. This difference can be detected by Southern blotting.

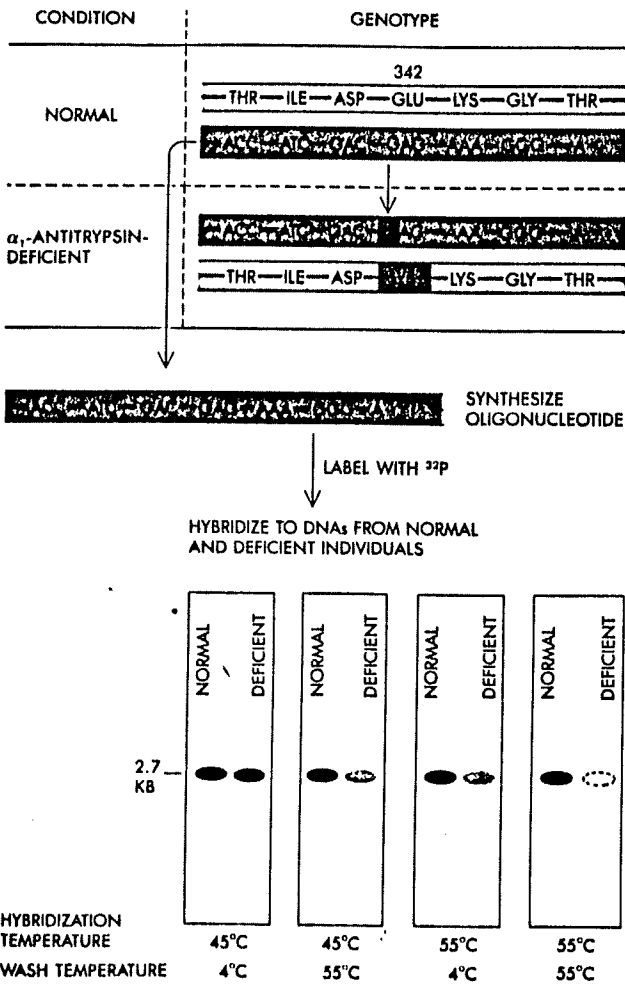


Figure 17-3

Diagnosis of α_1 -antitrypsin deficiency by using a synthetic oligonucleotide. DNA from a patient with α_1 -antitrypsin deficiency was analyzed and found to have a single base change (G → A) in the protein-coding region. A 19-base oligonucleotide was synthesized chemically to be complementary to the normal gene (and therefore to have one mismatch with the mutant gene). This oligonucleotide can distinguish between the normal and mutant genes when it is used as a probe in Southern blot analysis (Chapter 6).

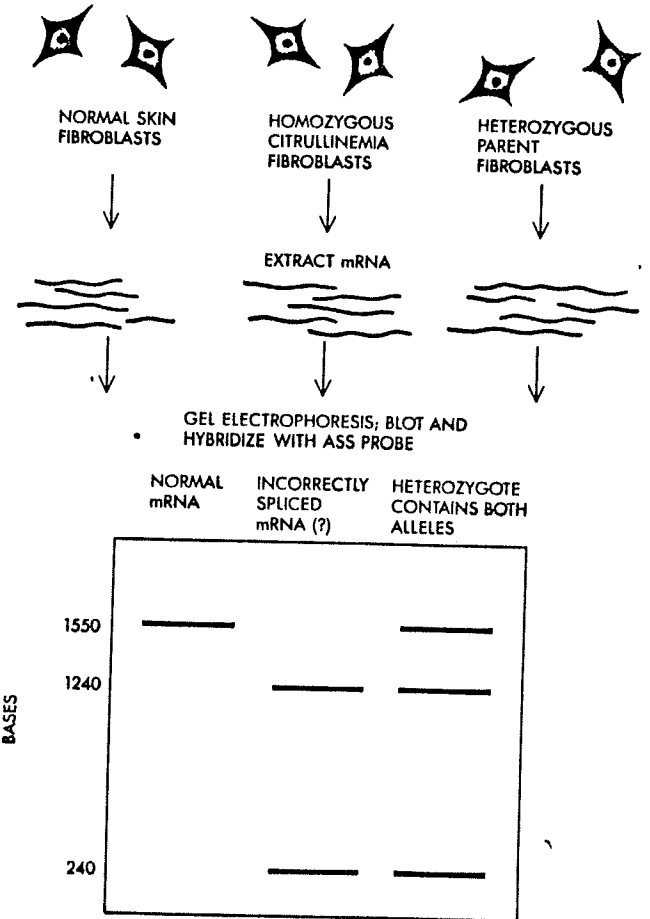


Figure 17-4

Altered argininosuccinate synthetase (ASS) mRNA in a citrullinemia patient. A comparison of mRNA from normal vs. mutant skin fibroblasts demonstrates that citrullinemia patients have incorrectly spliced (and therefore nonfunctional) mRNA for argininosuccinate synthetase.

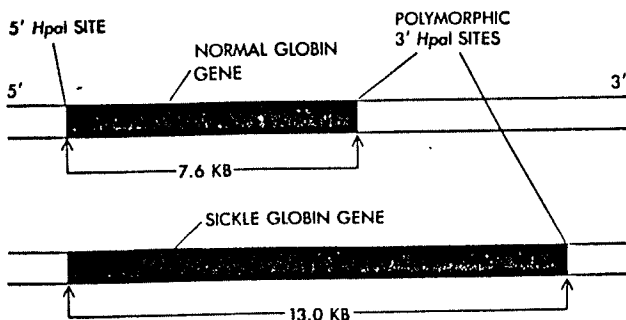


Figure 17-5

*Hpa*I-site polymorphism is diagnostic for the sickle β -globin gene in humans.

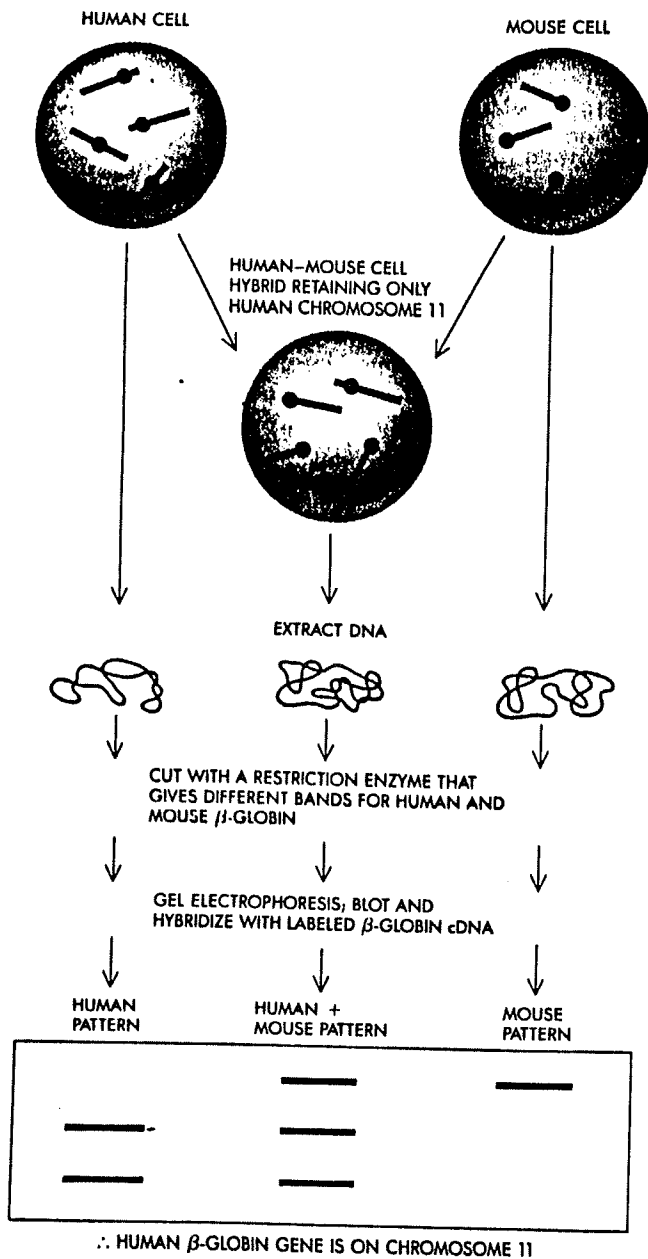


Figure 17-8
Human-mouse cell hybrids are made as described in Figure 17-7. If the gene under study is not expressed in the hybrid cells, its presence can be detected by Southern blot hybridization with a suitable probe. Human-mouse cell hybrids retaining human chromosome 11 are found to have the human β -globin gene.

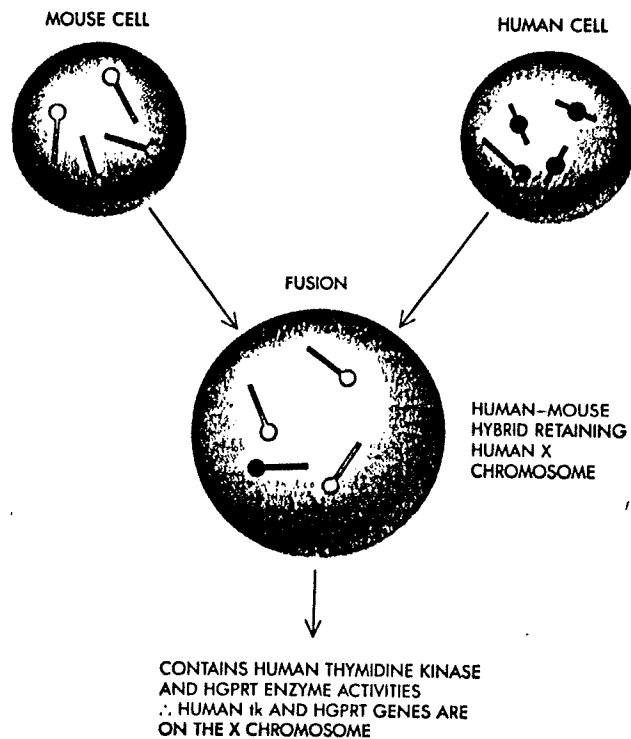


Figure 17-7
Assigning genes to chromosomes by somatic-cell hybridization. Human and mouse cells are fused (by using either Sendai virus or polyethylene-glycol), and the hybrid cells progressively shed chromosomes until they retain only one human chromosome. In cell hybrids retaining the human X chromosome, human thymidine kinase and HGPRT enzyme activities are found, indicating that these genes are on the X chromosome.

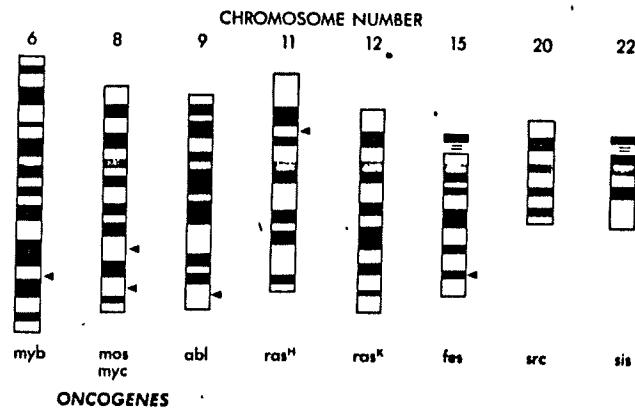


Figure 17-9
Mapping human oncogenes. The chromosomal location of several human oncogenes has been determined by somatic-cell hybridization.

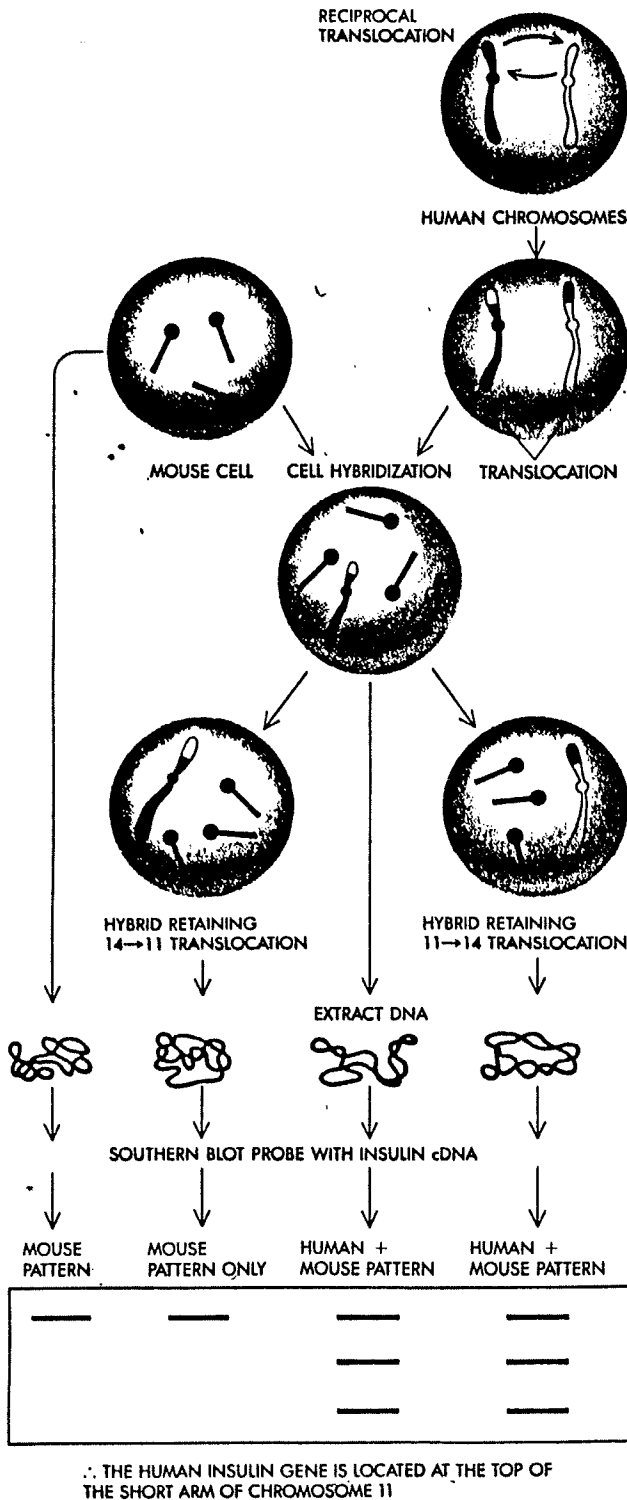


Figure 17-10
 Subchromosomal localization of genes. The position of a gene along a chromosome can be determined by using naturally occurring chromosomal translocations. In this example, a human cell line that contained a reciprocal translocation exchanging the distal portions of the short arms of chromosomes 11 and 14 was obtained. The cell line was fused to mouse cells, and hybrids retaining either the 11 → 14 translocation or the 14 → 11 translocation were isolated. Southern blot hybridization was used to determine that the human insulin gene (which had been mapped to chromosome 11) was found in the cell hybrid that retained the distal portion of the short arm of chromosome 11.

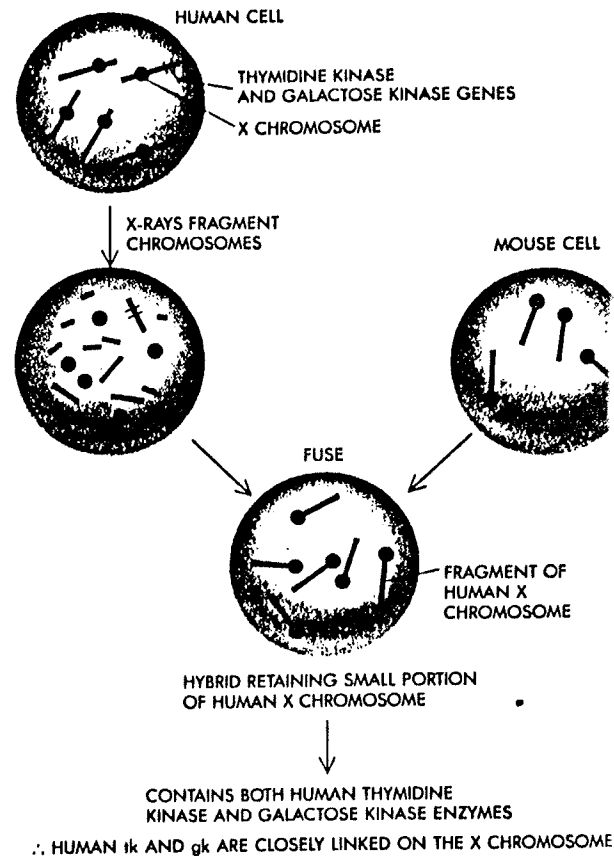


Figure 17-11
 X-Rays can be used to fragment the human chromosomes into small pieces before fusion with mouse cells. In cell hybrids retaining only a small fragment of the human X chromosome, both human thymidine kinase and galactose kinase enzyme activities are found, indicating that these genes are closely linked on the X

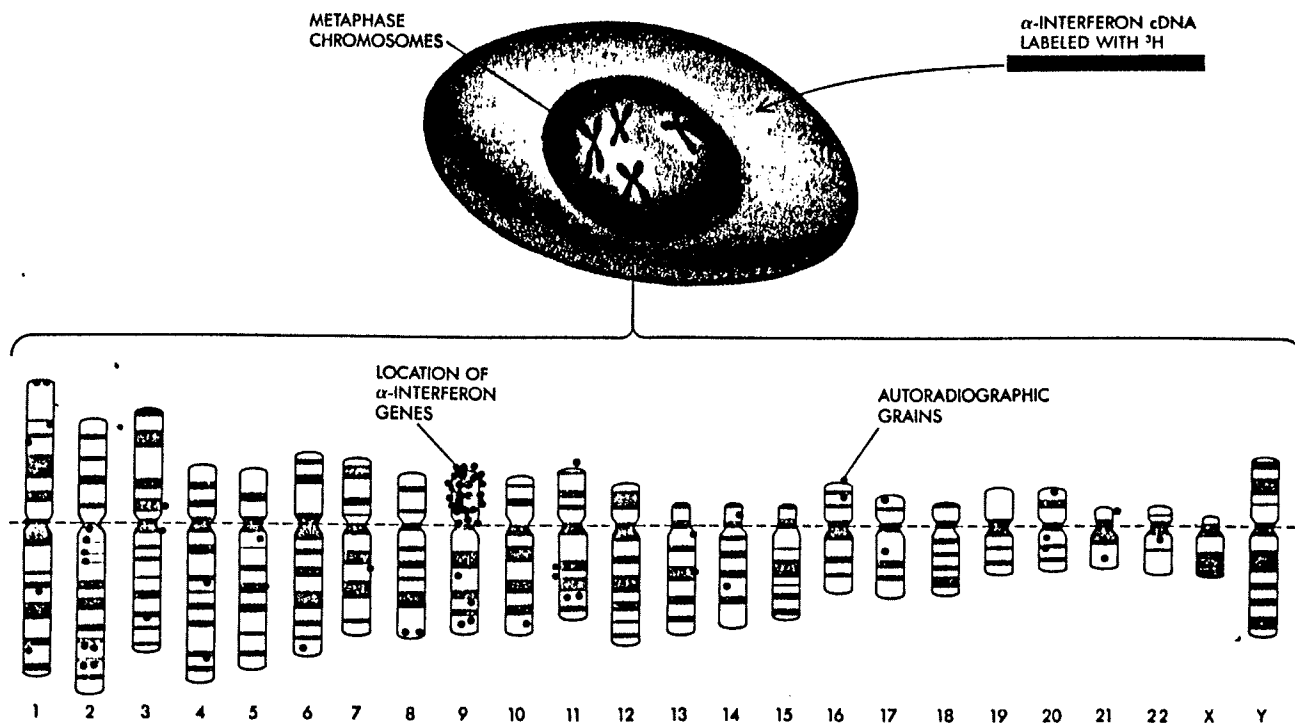


Figure 17-13
 Mapping the human α -interferon gene by *in situ* hybridization. Metaphase spreads of human cells were prepared and hybridized to a cloned human α -interferon cDNA labeled with ^3H . Autoradiographic grains from 50 such spreads were totaled and clearly showed that the α -interferon genes are on chromosome 9.

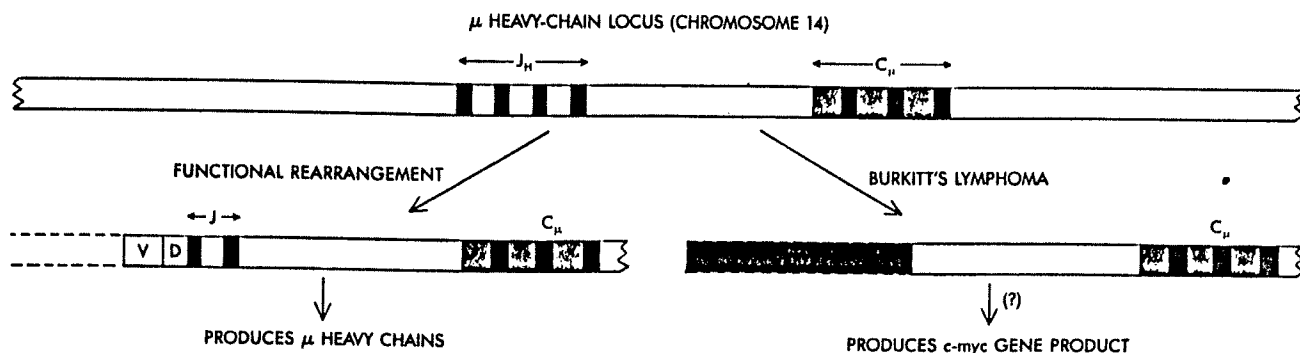


Figure 17-12
 Gene rearrangements in Burkitt's lymphoma. In cell lines obtained from a Burkitt's lymphoma patient, the *c-myc* gene was found to be translocated from its normal position on chromosome 8 into the μ heavy-chain locus on chromosome 14. This may lead to overexpression of the *c-myc* gene.

VIRAL VECTORS (Vetores Virais)

A biologia molecular dos DNA e RNA tumor viruses tem sido extensivamente estudada. Muita coisa se sabe sobre o ciclo desses vírus e sua entrada na célula e por ele integrar seu DNA no cromossomo hospedeiro, eles se tornaram candidatos para serem usados como vetores para introdução de DNA exógeno em células animais.

A infecção viral é um método de transformação muito eficiente, pode-se afirmar que toda célula possui muitas cópias do DNA exógeno. E como o genoma viral inclui fortes promotores, pode-se assegurar expressão eficiente do gene inserido no DNA viral.

Vetores SV40

SV40 tem sido o vetor mais usado para introdução de genes exógenos em células animais. O DNA do SV40 pode ser dividido em *early* e *late regions*. Entre essas regiões encontra-se a origem de replicação do DNA viral. Os produtos dos genes da *early region*, as proteínas T, são responsáveis pela transformação maligna das células não permissíveis (células onde os vírus não podem completar sua replicação), bem como pela iniciação da replicação do DNA viral nas células permissivas.

Dois métodos têm sido explorado para utilizar o SV40 como vetor. O primeiro é produzir um DNA recombinante entre o DNA do SV40 e uma sequência de DNA exógeno e colocá-lo numa célula permissível, eventualmente produzindo virions encapsulados contendo o DNA recombinante. Outro método é produzir um recombinante entre o SV40 e um DNA exógeno e não empacotá-lo em virions. O DNA recombinante irá se replicar transitóriaamente como um plasmídeo, independentemente do DNA celular, ou integrado no cromossomo.

Virions SV40 como Vetores

Para produzir partículas virais contendo DNA recombinante, tanto a *early* como a *late regions* podem ser substituídas pelo segmento de DNA exógeno. A molécula recombinante não pode sintetizar as funções vitais do vírus (proteínas T no caso de substituição da *early region* e proteínas do capsídeo viral no caso da *late region*). Entretanto pode-se obter partícula virais contendo o DNA exógeno utilizando-se uma coinfeção com um vírus "helper".

Substituição da *Late Region* do SV40

Quando a *late region* do SV40 é substituída por um DNA exógeno, é usado um SV40 helper mutante, cuja *early region* foi deletada. Células permissíveis são infectadas simultaneamente pelo SV40 contendo o DNA exógeno e pelo SV40 helper mutante. O SV40 recombinante produz os produtos da *early region*, enquanto que o helper mutante produz as proteínas do capsídeo (*late region*). Como resultado é produzida uma população mista de vírus, alguns contendo o DNA exógeno e outros o genoma mutante. Frequentemente não há meios de separar os dois tipos de vírus, mas essa população mista pode ser usada para infectar tanto células permissíveis como não permissíveis.

Substituição da *Early Region* do SV40

Quando a *early region* do SV40 é substituída pelo DNA exógeno, a produção de partículas virais recombinadas depende do suprimento dos produtos da *early region* (proteínas T). Um modo de obter as proteínas T sem utilizar coinfeção de um helper mutante é introduzindo o DNA recombinante em linhagens de células de macaco conhecidas como COS. Células COS são células transformadas por um SV40 que contém as *early* e *late regions* funcionais, mas possui um centro de replicação defeituoso. Como resultado, a integração do SV40 no cromossomo hospedeiro proporciona proteínas T funcionais, mas o vírus não pode se replicar independentemente do cromossomo celular. Quando o DNA do SV40, que possui um centro de replicação e cuja *early region* foi substituída, é introduzido na célula, ele se replicará, porque as proteínas T serão produzidas pela célula. A vantagem de se substituir a *early region* pelo DNA exógeno e propagar os virions numa célula COS é que toda a progênie de vírus terão o genoma recombinante, não havendo contaminação com os vírus helper.

Replicação (como plasmídeo) do DNA nas Células COS

Os vetores SV40 dependem do ciclo de replicação do vírus se completar. Nas células COS, qualquer pedaço de DNA contendo a origem de replicação do SV40 será replicado devido à presença da proteína T na célula. O DNA exógeno irá se replicar independentemente do DNA celular.

O DNA recombinante contendo a origem de replicação do SV40, quando introduzido numa célula COS, irá se replicar em enormes quantidades de cópias. A transcrição do DNA exógeno a partir da molécula de DNA na forma de plasmídeo pode ser estudada.

Recuperação do DNA Integrado do SV40 Através da Fusão de Célula COS

Células não permissíveis de rato infectadas com um plasmídeo contendo a origem de replicação do SV40 ligado com algum marcador, incorporam esse DNA em seu cromossomo. Se essas células forem fundidas com células COS (a fusão pode ser feita com PEG), a proteína T produzida pelas células COS irá se difundir para o núcleo das células de rato e iniciar a replicação do DNA do SV40.

Descoberta de Sequências Enhancer Usando Vetores SV40

Nas construções de moléculas recombinantes contendo o promotor da *early region* do SV40 e a origem de replicação, uma descoberta foi feita: certas sequências, ^{Anteriores} anteriores ao promotor da proteína T do SV40, aumentava a transcrição de qualquer promotor contido próximo a ele, no mesmo plasmídeo. Exemplo: quando essa sequência foi clonada em um plasmídeo com o gene da β -globina do coelho e introduzido em células humanas, grandes quantidades de mRNA são produzidas. Plasmídios sem a sequência enhancer não produzem mRNA da β -globina.

Ainda é desconhecido como as sequências enhancer produzem seus efeitos. O que se sabe é que essas sequências não possuem polaridade, elas podem aumentar a transcrição de um promotor que esteja à sua direita ou à esquerda (5' ou 3'). Essas sequências enhancer também podem aumentar a transcrição de um promotor "ilegítimo". Frequentemente, quando um DNA clonado é introduzido numa célula, RNA é transcrito a partir de DNA que normalmente não é usado para transcrição, mas que possui sequências que a RNA polimerase pode reconhecer (TATA e CAT boxes). Os enhancers também aumentam a transcrição dessas sequências.

Um modelo que pode explicar como age os enhancers é o seguinte: o enhancer "pega" o DNA aberto, numa conformação de proteína livre, e providencia sítios de entrada para a RNA polimerase. Neste modelo, a RNA polimerase se liga ao DNA aberto no enhancer e então "escorrega" através do DNA, procurando a sequência que ele reconhece como promotor. Uma observação suporta esse modelo: se dois promotores são clonados em tandem após a sequência enhancer, um aumento na transcrição é observado somente pelo primeiro promotor, próximo ao enhancer. De acordo com esse modelo, a polimerase entra no enhancer, se move pelo DNA até encontrar o primeiro promotor e iniciar a transcrição.

DNA do Vírus Papilloma se Replica como um Plasmídeo em Células de Rato

Outro adenovírus que é usado como vetor em células eucarióticas é o vírus papilloma de bovinos (BPV). O DNA circular do BPV tem a habilidade de

transformar células de rato no fenótipo maligno. Nessas células transformadas, o DNA do BPV permanece circular e extracromossomal, em 30 a 100 cópias por célula. Este é o único caso de um plasmídeo permanecer estável em eucariotos superiores.

DNA exógeno pode ser clonado no genoma de BPV e introduzido em células de rato. A molécula recombinante permanece extracromossomal.

RNA Tumor Viruses Podem Ser Usados como Vetores

Os retrovirus podem ser usados como vetores em eucariotos. Uma vez integrado, o provirus é transcrito como um gene celular. O RNA resultante pode ou não ser empacotado em partículas virais.

O provirus integrado possui uma mesma sequência em ambas as bordas do DNA, as sequências LTR. O único promotor para a expressão do gene viral está contido no LTR, e a produção de RNA codificando para diferentes proteínas é regulado pela via de processamento do RNA (splicing).

Os provirus podem ser usados como veículos para a introdução de genes em células animais através da substituição de um dos genes virais pela sequência exógena. Se um virus helper for incluído, a cópia do RNA do vírus recombinante será empacotado em partículas virais. Se o provirus recombinante conter um gene heterólogo (que possui introns), a cópia desse RNA deve ter esses introns removidos. Entretanto a remoção desses introns é um processo muito lento, que requer muitas gerações do virus para ser detectado. A primeira geração da progênie do virus têm introns em seu genoma de RNA. Isto implica que durante a replicação dos retrovirus, o RNA proviral transcrito, que é destinado a ser empacotado em partículas virais, é protegido de alguma forma dos mecanismos de processamento (splicing), que agem sobre o RNA que é destinado a agir como mensageiro.

A CIÊNCIA USADA NA INDÚSTRIA DE DNA RECOMBINANTE

Os biólogos moleculares os quais tinham desenvolvido a clonagem de genes, foram os primeiros a constatar que a nova tecnologia tinha grande potencial comercial quanto científico. Com o advento do DNA recombinante, a possibilidade de converter bactérias e leveduras em organismos fermentadores para a produção de proteínas imediatamente acessível.

Por toda a parte era debatido uma política para DNA recombinante. As primeiras posições foram regulamentos especiais de segurança na investigação do DNA na recombinação, e quando tais regras de segurança poderiam ser desfeitas, bem como o potencial prático de aplicação dos métodos e sua importância.

O benefício comercial que o DNA promove é a longo prazo, o que requer trabalho e persistência por parte dos biólogos e investimentos por parte dos investidores.

POTENCIAL COMERCIAL DO DNA RECOMBINANTE

O objetivo da indústria do DNA recombinante é envolver para fins comerciais sua habilidade em manipular, mudar e transferir genes. A meta é produzir com eficiência proteínas a baixo custo e mais pura por clonagem de genes. Um bom exemplo é produção da insulina humana, inserindo no gene da insulina num microrganismo apropriado; outro exemplo é a produção comercial de proteínas com valor farmacêutico: Agente antiviral **Interferon**, **ativator plasminogen**, um destruidor em potencial de coágulos sanguíneos, o fator de coagulação sanguíneo VIII (que os hemofílicos utilizam), produção de proteínas virais por microrganismos para utilização em vacinas (principalmente os vírus que não crescem em culturas de células como por exemplo vírus hepatite B). Outra meta é utilizar microrganismos engenherados capazes de processar produtos químicos, como petróleo e indústria mineradora.

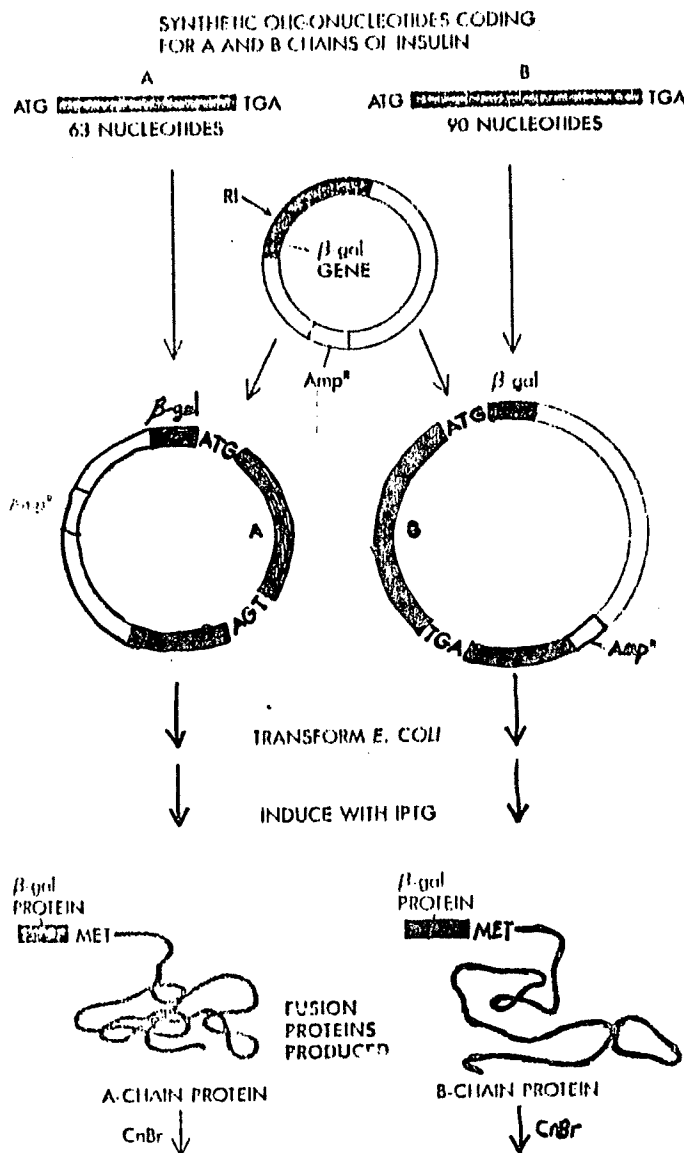
Há também o potencial de genes clonados para aumento de produção na agricultura.

MÉTODO COMERCIAL DE CLONAGEM DE GENES

Os métodos utilizados para clonagem comercial de genes são os mesmos utilizados nos laboratórios. Como muitas das proteínas comerciais estão presentes em pequenas quantidades nas células e nos tecidos animais, faz-se necessário a clonagem a partir dos cDNA (obtidas através de mRNA) presentes em pequenas quantidades nas células. Outro recurso para obter a insulina humana é a síntese química do gene.

INSULINA HUMANA A PARTIR DA BACTÉRIA

A insulina humana é única proteína animal que é sintetizada por uma bactéria cuja estrutura é absolutamente igual à molécula original. Considerando a complexidade da síntese da insulina pelas células do pâncreas, esse processo foi um sucesso. Devemos esse sucesso para a insulina engenherada geneticamente sem usar a composição de aminoácidos da proteína. Infelizmente esse método não pode ser usado para proteínas grandes com sequência de aminoácidos complexa, embora possa ser utilizado para proteínas pequenas que não contemham metionina e triptofano.



A ESTRUTURA DA INSULINA HUMANA

A insulina humana que é secretada pelas células do pâncreas para a corrente sanguínea é uma proteína que contém uma sequência sinal utilizada para condução da cadeia polipeptídica através da membrana intercelular.

O peptídeo sinal é clivado durante esse transporte, e o restante é estocado em vesículas nas células do pâncreas. A forma de insulina estocada é conhecida como proinsulina, para distingui-la da outra forma de insulina a preproinsulina, que por outro lado tem uma cadeia polipeptídica completa e unida diferenciando-a da insulina madura ativa.

A proinsulina e a insulina se diferenciam drasticamente uma da outra, a proinsulina é uma cadeia polipeptídica simples, circular, com suas extremidades ligadas por três pontes dissulfeto; a insulina madura consiste em 2 cadeias separadas uma com 21 aa (cadeia A) e outra de 30 aa (cadeia B) permanecendo juntas pelas mesmas 3 pontes dissulfeto.

A proinsulina é convertida a insulina nas vesículas da células pancreáticas por clivagem enzimática da curva polipeptídica que as conecta (35 aa), conhecida como peptídeo C. A insulina é então estocada nas células como um cristal de sal de zinco, pronto para ser utilizado.

Em outras palavras a insulina tem três formas:

Preproinsulina primeiro produto da tradução, com as sequências sinais e os segmentos A, B e C.

Proinsulina não possui a sequência sinal.

Insulina consiste nas cadeias A e B separadas, unidas por 3 pontes dissulfeto.

A insulina não carrega nenhuma cadeia de açúcar.

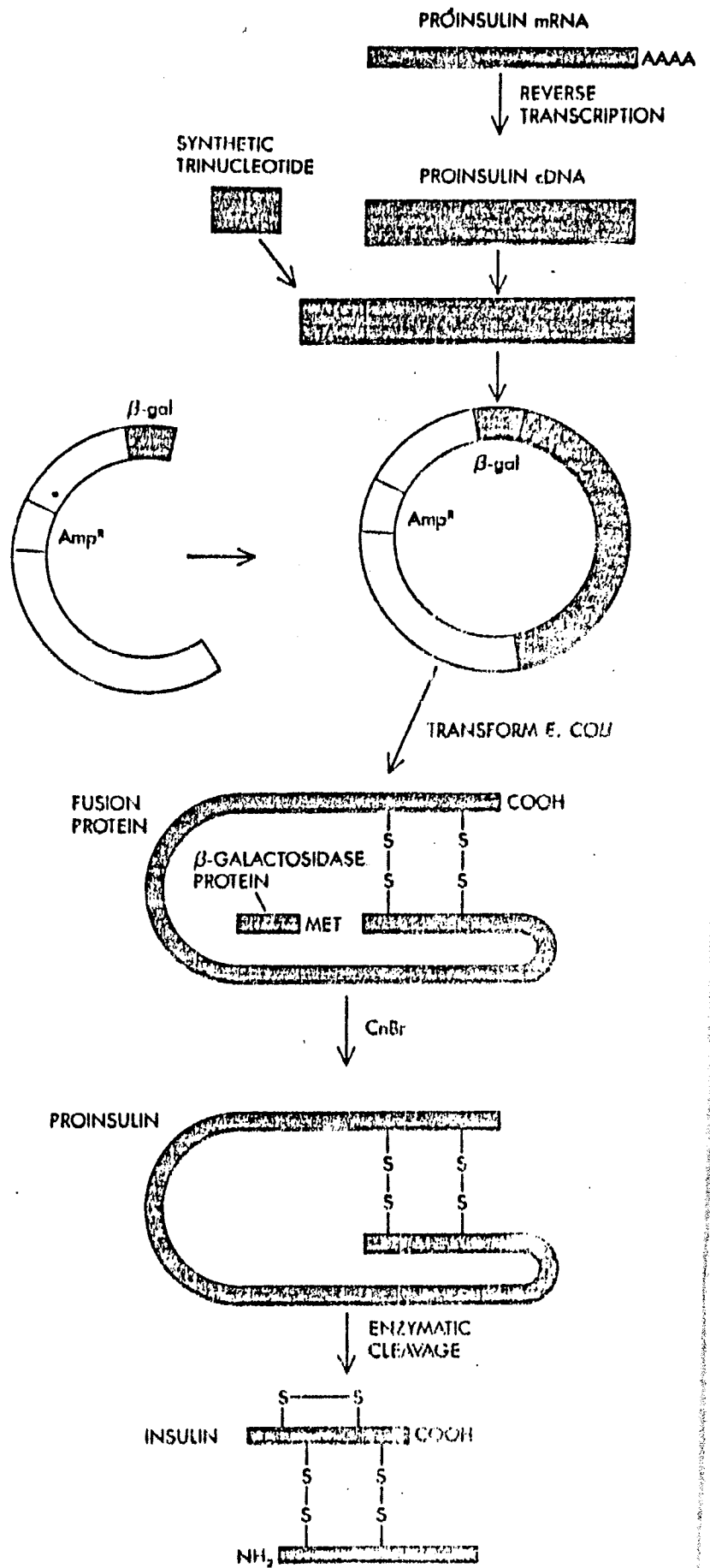
GENES SINTÉTICOS DA INSULINA

Como obter insulina em bactérias?

Seria muito ineficiente começar pelo gene cromossômico. Não só por ele especificar a preproinsulina como por conter sequências não codificantes.

Para superar essas dificuldades, foram quimicamente sintetizadas cadeias de DNA com sequência de nucleotídeos especificando as cadeias A e B. Isto foi possível porque ambas as cadeias polipeptídicas eram conhecidas e porque elas eram curtas; 63 nucleotídeos foram requeridos para a cadeia A e 90 para a B, e um códon foi necessário no fim da cadeia para sinalizar o final da síntese de proteína. Um códon de metionina foi colocado no começo de cada cadeia para permitir a remoção do polipeptídeo de insulina dos aminoácidos procarióticos.

Os genes sintéticos das cadeias A e B foram inseridos separadamente no gene da enzima B-galactosidase da bactéria que é carregado num vetor (plasmídeo). Os plasmídios recombinados foram introduzidos em E. Coli. Na bactéria eles se replicam sob o controle da sequência sinal do gene da B-galactosidase, e mRNA é produzido e lido em proteína, que consiste em parte da B-galactosidase fundida com o resíduo de metionina e com a cadeia



A e B da insulina. Neste ponto a composição de aa que não faz parte da insulina e a methionina ligada serão exploradas. Nem a methionina nem o triptofano ocorrem nas cadeias A e B, com reagentes químicos (cyanogen bromide) destroe-se a methionina e o triptofano e então as cadeias A e B são separadas do fragmento de B-galactosidade. Depois de purificado, as 2 cadeias são misturadas e reagidas para formar as pontes dissulfeto. O resultado é insulina pura.

cDNA DA PROINSULINA

Outro método para síntese de insulina humana é: mRNA é copiado em cDNA e o codon de methionina (ATG) é sintetizado quimicamente e colocado na extremidade 5' do cDNA do provirus. Isto é colocado num plasmídeo vetor e cresce em E. COLI. A proinsulina fundida com a enzima bacteriana pode ser separada dela destruindo a methionina. A cadeia de proinsulina em sua estrutura tridimensional normal, são formados pontes dissulfato e peptideo C é clivado com enzimas, obtendo-se insulina humana pura.

BACTÉRIAS QUE SECRETAM INSULINA

Quando foi obtida a bactéria que produzia essas cadeias, várias manipulações genéticas foram feitas para aumentar essa produção. Para uma maior exploração comercial, é crucial que seja aumentada a produção da proteína por células. A situação ideal é ter grandes quantidades da proteína exógena sendo secretada no meio pela bactéria engenherada. Fermentadores contínuos podem ser usados, sem a necessidade de destruir a célula.

Uma solução para esse problema é inserir uma cópia de cDNA do mRNA da insulina do rato no gene da B-lactamase da bactéria carregado num plasmídeo vetor. Quando esse plasmídeo recombinante é introduzido em E. Coli, as células bacterianas secretam no meio uma proteína consistindo na cadeia de proinsulinas do rato e parte da B-lactamase.

A B-lactamase age como um carregador para a secreção da proinsulina. O resultado sugeriu que seria possível produzir clones de bactérias que não somente sintetizam insulina como também a secretam no meio.

CLONANDO O HORMÔNIO DE CRESCIMENTO HUMANO

HGH é uma cadeia polipeptídica simples que tem 191 aas e que é produzida na glândula pituitária. Como a insulina, não é glicosilada o GH controla o crescimento do nosso corpo. A pequena estatura dos anões é devido à deficiência de GH.

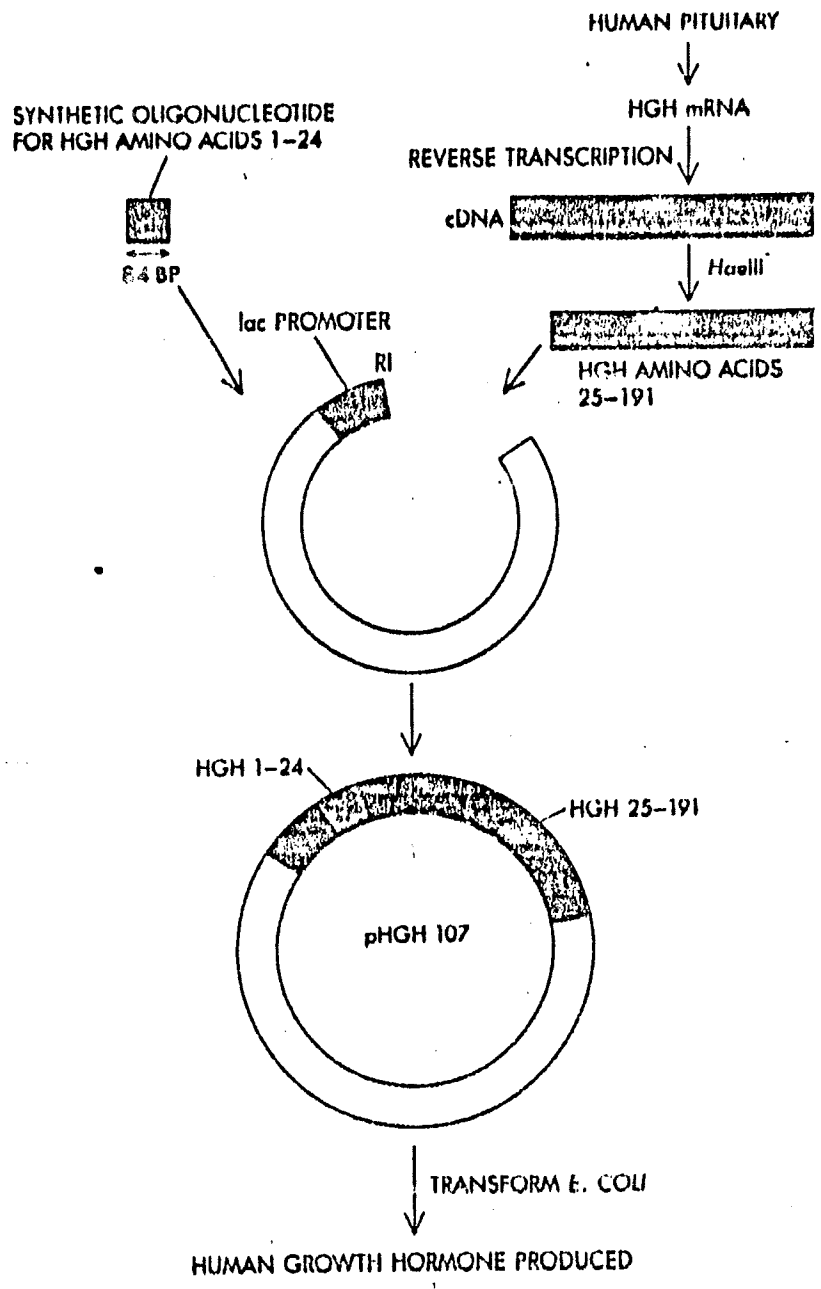


Figure 18-5

Production of human growth hormone in *E. coli*. An oligonucleotide coding for the first 24 amino acids of human growth hormone (HGH) was synthesized chemically. HGH cDNA was then prepared and cut with *Hae*III, which cleaves the nucleotide sequence exactly in front of the codon for amino acid 25 of HGH. These two HGH fragments were then cloned downstream from the *lac* promoter in pBR322. This plasmid produces large amounts of HGH when introduced into *E. coli*.

OBTENÇÃO DO GENE DO GH

Combinando os métodos de síntese química de DNA e a síntese enzimática de cDNA, a sequência codifica essa proteína pode ser produzida.

O fragmento de DNA codificando para os aa 1 ao 24 foi sintetizado quimicamente, imediatamente em frente ao primeiro códon, um trio de bases (ATG) especificando para o aa methionina foi adicionado. Uma vez que o começo do gene foi quimicamente sintetizado para ter certeza do início correto da proteína, uma sequência de DNA codificado para o resto da cadeia polipeptídica, resíduo do 25 aa até o 191, foi obtido fazendo-se cópias de cDNA a partir do mRNA preparado a partir de células da pituitária de humanos. Estes 2 fragmentos de DNA foram clonados separadamente. Os fragmentos de DNA foram repurificados e ligados juntos para completar a sequência de DNA do HGH, começando com um códon iniciador (de methionina), seguido pela sequência de 191 aas da proteína madura e terminando com um sinal para finalizar a síntese proteica. O gene foi então inserido num vetor expressivo e introduzido em E. Coli, que direciona a síntese de GH.

O PROBLEMA DA METHIONINA

A única desvantagem do GH feitos em bactérias é que o resíduo iniciador de methionina não pode ser removido do resto do polipeptídeo de GH nas células bacterianas.

A bactéria produz o GHC que é idêntico em todos os aspectos, incluindo a atividade biológica, ao hormônio produzido pelas glândulas pituitária dos humanos, exceto que o hormônio a partir da bactéria começa com resíduo adicional de methionina.

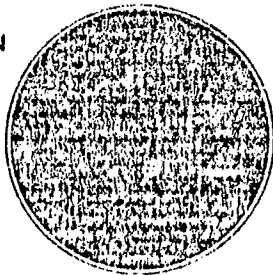
DIFERENTES TIPOS DE INTERFERON

Antes do advento da clonagem de gem, três diferentes tipos de interferon fossem identificados: interferon leucócito (alfa), interferon fibroblasto (beta) e o interferon imune (gama). Mas nada se sabia sobre sua sequência de aminoácidos ou estrutura de seus genes. A atividade antiviral dos interferons era a única propriedade da molécula que se conhecia.

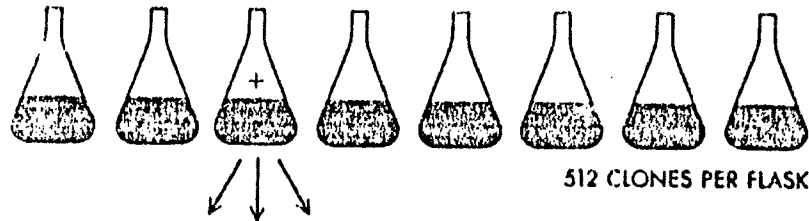
A chave do primeiro sucesso em isolar o cDNA do alfa-interferon foi a descoberta de oócitos muito grandes de xenopus grandes quantidades de interferon quando eles são injetados com mRNA de células que produzem interferon

O tamanho aproximado do RNA do alfa-interferon pôde ser determinado por fracionamento do polipeptídeo A do mRNA a partir de leucócitos produtores de interferon (células brancas do sangue), injetando amostras de várias frações em oócitos de xenopus e medindo a atividade antiviral do interferon excretado pelos oócitos. Esses experimentos revelaram que a fração 12 S do

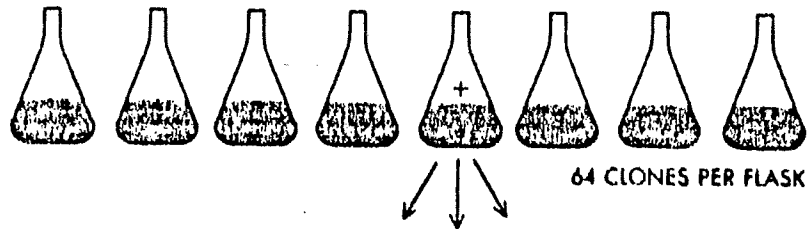
4096 CLONES
(ONE INTERFERON
cDNA CLONE)



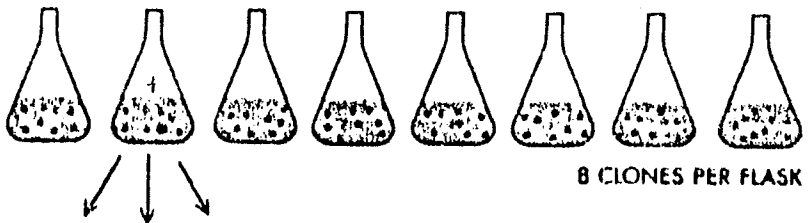
ASSAY DNA FROM EACH
FLASK FOR THE ABILITY TO
BIND INTERFERON mRNA



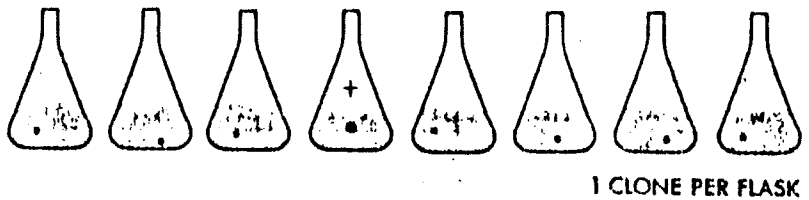
512 CLONES PER FLASK



64 CLONES PER FLASK



8 CLONES PER FLASK



1 CLONE PER FLASK

Figure 18-6

Cloning of human interferon cDNA. A cDNA library was prepared from human leukocytes. Interferon represents less than 0.1 percent of the total mRNA in these cells. The cDNA library was broken down into eight groups, and total plasmid DNA was prepared from each group. The presence of interferon cDNA in each group was determined by using the hybrid-selection procedure (Figure 6-6). When an interferon⁺ group of clones was identified, it was subdivided into groups containing fewer clones, and the

mRNA tem a maior atividade, e ela foi usada para fazer cDNA para posterior inserção em plamídeo pBR227.

A percentagem de mRNA de interferon no total de RNA do leucócito é de 0,1 a 0,01%. 10.000 clones de E. coli transformados por esse cDNA foram individualmente testados para ver se eles continham as sequências de DNA de alfa-interferon. Essas sequências foram procuradas observando-se onde o clone de cDNA se hibridizava com o mRNA do alfa-interferon. Se tal mRNA do interferon se ligar ao cDNA imobilizado no filtro, esse cDNA pode ser diluído e injetado em oócitos para ver se ele induz a síntese detectável de interferon. Por causa da expectativa de clones de baixa produção de interferon, diferentes lotes de cDNA foram testados. Quando um lote que dava positivo era achado, ele era subdividido em grupos menores até finalmente um único clone de DNA, que hibridizava com o mRNA do alfa-interferon, era isolado. Para mostrar que esse clone era específico de alfa-interferon e não de outra molécula que tinha atividade anti-viral, a região codificadora foi colocada num vetor expressivo que foi capaz de sintetizar o alfa-interferon biologicamente ativo. Segundo esse sucesso inicial uma grande quantidade de diferentes quantidades de cDNAs de interferons foram isoladas em diferentes laboratórios.

A partir da sequência de nucleotídeos de cDNA foi possível, usando código genético, deduzir a sequência de aminoácidos de vários interferons.

Nenhum dos genes do alfa e beta-interferon possui introns. Beta-interferon e muitos, mas não todos, os alfa-interferon são glicosilados, ter glicosilação é essencial para a função atividade viral.

TUMOR VIRUSES (Vírus que causam tumores)

A pequena quantidade de DNA encontrada nos DNA tumor viruses, como o SV40 (5243 bp), polyoma virus (5292 bp) e os adenovirus (cerca de 36000 bp), bem como a viabilidade do uso das enzimas de restrição em 1970 permitiu as primeiras análises moleculares para diagnosticar os defeitos metabólicos que evoluem ao câncer.

Os fragmentos de restrição produzidos pela *EcoRI* são pouco numerosos e podem ser separados em géis de agarose. Sendo assim as sequencias de nucleotídeos do SV40 e polyoma virus podem ser trabalhadas e distinções podem ser feitas quanto suas funções antes (*early region*) e depois (*late region*) no ciclo viral. A *early region* transcreve proteínas para a transformação (large T e small t) e a *late region* transcreve proteínas do capsídeo viral (VP1, VP2 e VP3).

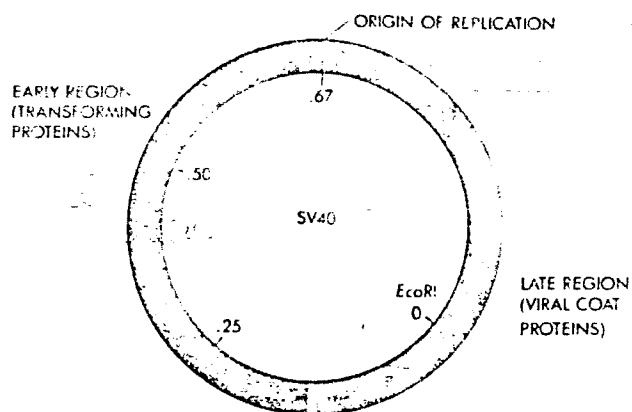


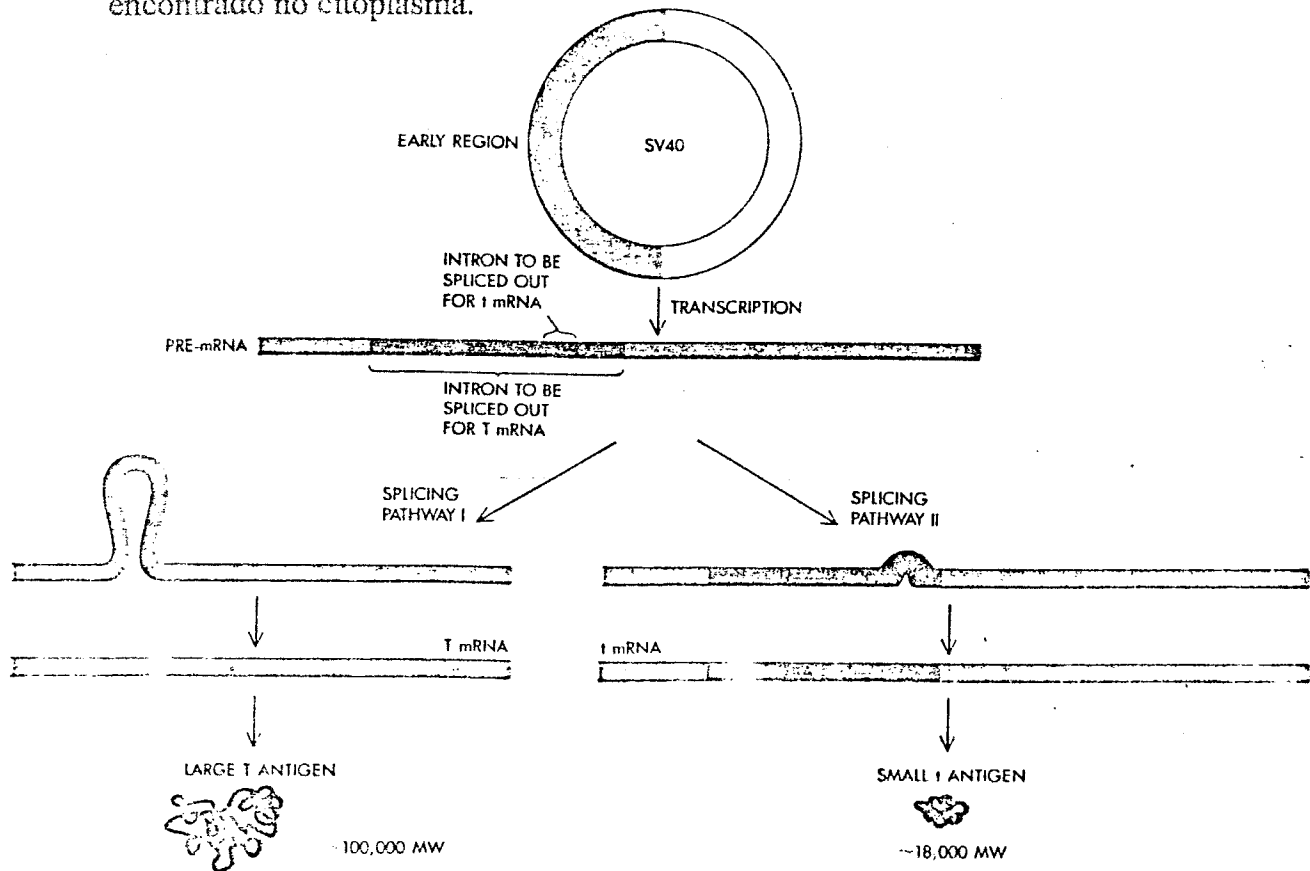
Figure 10-1
The SV40 chromosome. The early-region primary transcript codes for the transforming (large T and small t) proteins. The late primary transcript codes for the viral coat proteins (VP1, VP2, and VP3).

Proteínas de tumor do SV40 e Polyoma

Inicialmente acreditava-se que o genoma do SV40 e do polyoma continham um simples *early gene* codificando uma proteína chave do tumor (T), cuja presença tornava algumas células cancerosas. As primeiras análises genéticas usando virus mutantes sugeriu que essa proteína, cujas função era iniciar a replicação do DNA viral, tinha participação vital na manutenção do estado canceroso da célula.

Essa dupla função dessa proteína só foi explicada quando se descobriu que o RNA primário (antes do processamento) era cortado (splicing) em duas vias

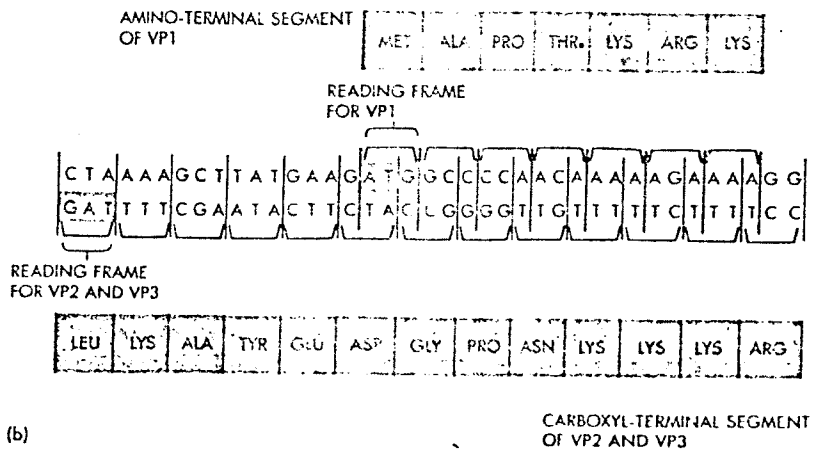
distintas. Um corte produzia uma molécula de peso molecular de 100.000 (*large T*) e o outro corte uma molécula de PM 18.000 (*small t*). O *large T* é encontrado no núcleo e se liga ao centro de replicação do DNA do SV40. O *small t* é encontrado no citoplasma.



A função exata dos diferentes tipos de proteínas T do SV40 e polyoma são desconhecidas, mas estão sendo investigadas utilizando-se mutagênese *in vitro* para promover deleções específicas para alterar as proteínas T. O fenótipo canceroso provocado por esses vírus requer o funcionamento de mais de um tipo de proteína T. Uma proteína T age imortalizando a célula transformada, talvez por provocar a síntese de um fator de crescimento essencial.

Genes sobrepostos codificam as proteínas estruturais que envolve a cromatina do SV40 e Polyoma

Originalmente acreditava-se que o capsídeo era formado por uma única proteína (VP1). Depois foram descobertas outras duas proteínas (VP2 e VP3). As três são codificadas pela *late region*. Os mRNA do VP1 (16S), do VP2 (18S) e do VP3 (19S) são todos obtidos a partir do processamento de um mesmo RNA primário. A via de processamento que mais prevalece é a que produz o mRNA de 16S (VP1). Os genes do VP1 e do VP2 (e VP3) estão parcialmente sobrepostos.



Até agora, genes sobrepostos foram observados apenas nos genomas de vírus, os quais devem ser empacotados dentro de capsídeos de tamanho fixo (este sistema complicado será devido à problemas com o tamanho da cromatina viral?). Este sistema de genes sobrepostos é uma via ineficiente, pois uma substituição num par de bases provoca mudanças de aminoácidos em ambos os produtos polipeptídicos.

Há diferentes sinais de controle para o início da síntese de mRNA do *Early* e *Late regions* do SV40 e Polyoma

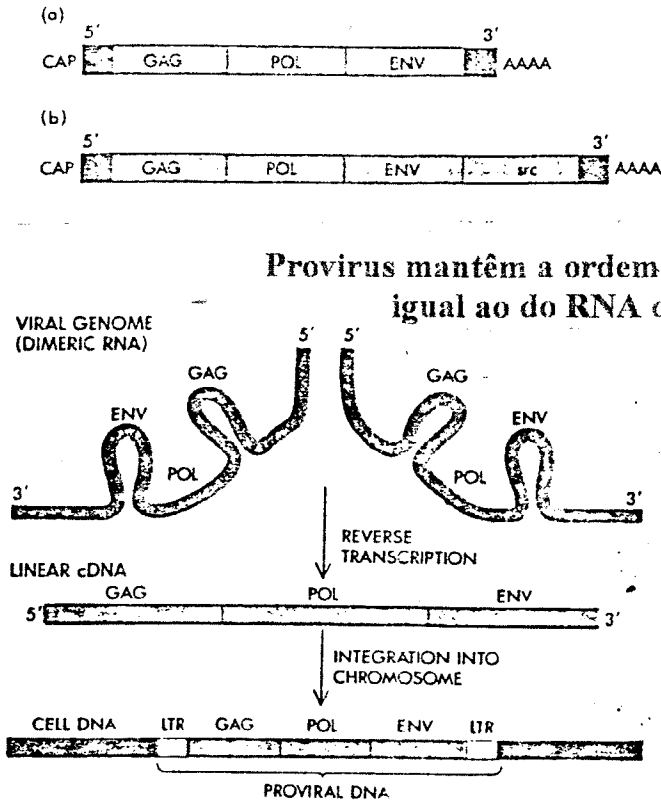
Como tanto o mRNA do *early* como o do *late regions* são sintetizados pelo RNA polymerase II, os sinais que determinam a hora de sintetizá-los são diferentes. O controle da transcrição da *early region* parece ser similar a dos genes da célula hospedeira, onde os sítios de início são precedidos pelo TATA e CAT boxes. A síntese do mRNA da *late region* começa somente após a replicação do SV40 (ou do polyoma) ter começado. Os mRNA da *late region* tem grande variabilidade em seu sítio de iniciação (numa distância de 300 nucleotídeos). Isto ocorre provavelmente devido à falta do TATA e CAT boxes precedendo o ponto de início.

A complexa organização dos RNA tumor viruses (Retrovirus)

O genoma dos RNA tumor viruses são compostos por duas cadeias idênticas de RNA (dímeros), normalmente de 8 a 10 Kb. Por que o genoma é dimérico ainda não se sabe. O RNA genômico dos retrovirus tem duas características das moléculas de RNA eucariótico: a extremidade 5' coberta e uma cauda poli-A na extremidade 3'. Tipicamente eles contém sequências de nucleotídeos para três proteínas virais: uma proteína estrutural (GAG) que se associa com o RNA na partícula viral; a transcriptase reversa (POL); e uma glicoproteína (ENV) constituinte do envelope e relacionada com a fixação do vírus na célula hospedeira.

Retrovirus altamente oncogênicos contêm sequências oncogênicas específicas

Muitos dos RNA tumor viruses contêm um quarto gene, um oncogene, que codifica uma proteína responsável pela transformação da célula para o estado canceroso. Um vírus que perdeu o oncogene torna-se fracamente oncogênico.



Quando um RNA tumor virus infecta uma célula, a transcriptase reversa sintetiza uma dupla hélice de DNA a partir do RNA viral. Esse DNA vai para o núcleo da célula, onde ele pode ser encontrado na forma linear ou mais frequentemente na forma circular. O DNA viral é inserido no cromossomo hospedeiro, tornando-se um provirus, cuja sequência de genes é exatamente igual à molécula de DNA viral. O DNA viral inserido está, provavelmente, na forma circular.

Não se sabe como o DNA celular é cortado formando duas terminações livres onde se encaixa o DNA viral. O que se sabe é que as sequências que distinguem as terminações 5' da 3' são repetidas em ambas as extremidades do DNA durante sua síntese e integração. Desse modo o provirus integrado tem em ambas as extremidades uma "longa terminação repetida" (LTR) de algumas centenas de bp. De 4 a 6 bp do DNA hospedeiro imediatamente adjacente aos dois LTRs virais são duplicados em tandem, sendo esta situação similar aos transposons. Isto não causa surpresa visto que os mecanismos de integração do

deuho

DNA retroviral têm muito em comum com os mecanismos com que os transposons se movem pelo genoma.

O promotor para a síntese de RNA esta localizado no LTR

O promotor para a transcrição do DNA retroviral esta localizado na sequência LTR da esquerda (5') e posicionado de modo que a transcrição comece exatamente no nucleotídeo 5' do RNA genômico. Alguns dos mRNA primários são cortados para formar a proteína ENV. Outros são cortados para formar a proteína GAG e alguns RNA primários são empacotados em partículas virais.

Como o LTR da esquerda funciona como promotor do DNA viral, às vezes são detectados casos em que o LTR da direita (3') funciona como promotor do DNA da célula hospedeira.

Oncogenes retrovirais às vezes codificam para proteínas quinases

Rous sarcoma virus (RSV) possui oncogenes que rapidamente transformam os células para o estado canceroso. O oncogene v-src do RSV codifica uma sarc proteína que tem atividade de quinase, e pode fosforilar resíduos de tirosina nas proteínas. Foram descobertos virus onde o oncogene era inserido entre o gene GAG, POL ou ENV. Esta descoberta explicou porque certos vírus eram incapazes de se replicar na ausência de coinfeção de um vírus normal ("helper"). A inserção do oncogene destrói a função de um dos três genes, aonde ele foi inserido, cujo produto é essencial à replicação viral. Portanto, nas células infectadas por esses vírus, são encontrados proteínas fundidas com partes de GAG, POL ou ENV.

Grande parte dessas proteínas oncogênicas fundidas possuem atividade de quinase, levantando a hipótese de que a transformação para o estado canceroso que elas provocam é devido à fosforilação de alguma proteína regulatória chave da célula (relacionada com sua multiplicação).

Genes celulares normais são progenitores de oncogenes retrovirais

Como os oncogenes (v-src do RSV e de outros virus altamente oncogênicos) surgiram? Será que o v-src era um gene celular que foi incorporado no vírus? Para responder essas questões foram feitos screenings do DNA de células normais com sondas feitas a partir do DNA viral. Esse gene (c-src) foi encontrado no DNA de galinhas, de mamíferos, peixes e de *Drosophila*.

A hipótese de que os oncogenes são provenientes da assimilação de genes normais das células é suportada por um experimento onde uma estirpe de RSV que perdeu parte de seu gene v-src foi propagada em células de galinha. A progênie foram vírus com o gene v-src reconstituído. A porção perdida do gene

263
c - SRC
viral foi suprida com o gene celular. Há outros exemplos de oncogenes que são muito semelhantes com genes de células normais.

O fato de que esses genes não sofreram grandes mudanças durante a evolução dos vertebrados (dos peixes aos humanos) demonstra que eles codificam para proteínas regulatórias chaves (de muita importância, portanto sua modificação implica em problemas; câncer).

Explicações para o surgimento do câncer

O genoma do retrovirus esta sob o controle de um promotor muito forte (LTR). Sendo assim serão produzidos grandes quantidades da suposta proteína regulatória. É possível que essa grande quantidade de proteína regulatória, que é presente em baixa quantidade na célula normal, modifique uma via regulatória vital provocando um fenótipo canceroso. Outra hipótese da oncogenese retroviral é de que há ligeiras diferenças entre a sequência nucleotídica do oncogene e do gene correspondente na célula, provocando diferenças no funcionamento desses produtos protéicos. Essas mudanças tornam as células cancerosas.

Agora que os genes podem ser isolados, clonados e manipulados *in vitro*, essas hipóteses podem ser testadas.

Câncer induzido por retrovirus fracamente carcinogênicos

Alguns virus contêm somente os três genes virais (GAG, POL e ENV) e não possuem oncogenes. Entretanto um grande número deles são capazes de induzir tumores em animais depois de longos períodos de latência (muitos meses, comparados com poucas semanas dos virus altamente carcinogênicos).

A explicação para este fato é de que esses virus inserem promotores fortes em oncogenes celulares. Esses promotores fortes são, muitas vezes, a região LTR da direita (3'), os quais acabam provocando um grande aumento na expressão de um gene regulatório da célula.

Teoria Geral para a indução de câncer

Há suspeitas de que a maioria, senão todos, os câncers são devidos à superexpressão (expressão ruim) de genes regulatórios chaves. De acordo com essa teoria as células cancerosas provém de: 1) a introdução de cópias adicionais (modificadas) de genes regulatórios chave com um forte promotor, como ocorre com a infecção de um retrovirus altamente oncogênico; 2) a introdução de um promotor que aumente a expressão do gene regulatório da célula, como ocorre com um virus fracamente oncogênico; ou 3) uma mutação num gene regulatório celular que altere sua expressão, o que ocorre como resultado da exposição a químicos carcinogênicos, radiação ionizante ou luz UV.

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

PROPOSTA DE
RESIDÊNCIA AGRONÔMICA

Jefferson Willians de Gaspari

Departamento de Genética

Piracicaba - SP

Março de 1995

1. DISCIPLINA

L11 - 601: Residência Agronômica

2. ALUNO

Jefferson Willians de Gaspari

3. CAMPO DE ATUAÇÃO

Pesquisa

4. TÍTULO DO PROGRAMA

"Seleção e Melhoramento de Linhagens de *Kluyveromyces marxianus* quanto à atividade inulinolítica."

5. DEPARTAMENTO

Departamento de Genética, ESALQ/USP

6. ORIENTADOR RESPONSÁVEL

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

7. SUPERVISOR RESPONSÁVEL

Biólogo Luiz Humberto Gomes

8. EMPRESA/INSTITUIÇÃO

O Programa de Residência será realizado no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

9. LOCAL

Piracicaba, SP

10. RESUMO DA PROPOSTA

O xarope de frutose é obtido, atualmente, pela conversão do amido de milho em glicose através de hidrólise, com posterior isomerização. A bioconversão da inulina é uma via alternativa para a produção desse xarope, o qual resulta em concentrações de frutose maiores que os obtidos pela utilização do amido de milho.

Os tubérculos de *Helianthus tuberosus* L. apresentam altos teores de inulina, polímero de frutose com 1 glicose terminal. O extrato desses tubérculos é uma matéria prima adequada à fermentação para produção de biomassa, etanol e xarope de frutose.

Kluyveromyces marxianus demonstrou ser a levedura mais adequada à fermentação de extrato de *H. tuberosus*, com rendimentos de até 97%, segundo LAGUNA, 1986, o qual afirma também que essa espécie apresenta grande variabilidade natural em termos de capacidade fermentativa e de produção de inulinase, o que viabiliza um programa de melhoramento genético.

O Projeto avaliará diversas linhagens de *K. marxianus* quanto à sua atividade inulinolítica extracelular e quanto a capacidade de fermentar em meio de extrato bruto de tubérculos de *H. tuberosus*. As linhagens serão selecionadas e entrarão num processo de melhoramento, obtendo-se, dessa forma, linhagens alto produtoras de inulinase com grande capacidade fermentativa.

A hidrólise enzimática será avaliada em processos de imobilização de enzimas, visto que por este processo pode-se obter xaropes mais puros e concentrados.

11. OBJETIVOS

Pretende-se, com este trabalho, selecionar híbridos de *K. marxianus* hiperprodutores de inulinase visando avaliar a hidrólise enzimática como alternativa de obtenção de xarope de frutose, a partir de extrato bruto de *H. tuberosus*.

12. PROGRAMA DE ATIVIDADES

As atividades a serem desenvolvidas são:

a) **Processamento dos tubérculos de *H. tuberosus*.**

O plantio já foi realizado no início de março na Fazenda Anhembi, do Depto. de Genética, com colheita prevista para junho. O processamento, que envolve limpeza, seleção e extração do caldo, será realizado no mês de julho para dar condições para o início dos trabalhos de avaliação das linhagens de *K. marxianus*, previsto para iniciar em

agosto.

b) Avaliação das linhagens de *K. marxianus*.

As linhagens serão avaliadas quanto à produção de inulinase em “Meio para Produção de Inulinase”, descrito por LAGUNA, 1986, e medida por espectrofotometria.

Serão testadas também quanto à capacidade fermentativa em extrato bruto de tubérculos de *H. tuberosus* através do conteúdo de etanol medido por cromatografia gasosa.

c) Cruzamento entre as melhores linhagens (produtoras de inulinase e fermentadoras).

Obtenção de mutantes haplóides auxotróficos, permitindo a seleção dos híbridos.

d) Avaliação dos híbridos

Metodologia igual à descrita no ítem b.

e) Avaliação da hidrólise enzimática em processos de imobilização de enzimas.

13. CRONOGRAMA DE TRABALHO

	AGOSTO		SETEMBRO		OUTUBRO		NOVEMBRO	
	1a quinzena	2a quinzena	1a quinzena	2a quinzena	1a quinzena	2a quinzena	1a quinzena	2a quinzena
Avaliação das linhagens produtoras de Inulinase	X	X						
Teste de fermentação em extrato de <i>H. tuberosus</i>	X	X						
Cruzamento entre as melhores linhagens			X	X				
Avaliação dos híbridos para produção de inulinase				X	X			
Teste dos híbridos para fermentação em extrato de <i>H. tuberosus</i>				X	X			
Avaliação da hidrólise em processos de imobilização de enzimas					X	X	X	
Análise dos dados obtidos nos ensaios							X	X
Elaboração do Relatório Bimestral				X				X
Elaboração do Relatório Final								X

14. ACOMPANHAMENTO

Visto que o trabalho será realizado principalmente no Laboratório de Genética de Leveduras do Departamento de Genética da ESALQ, o aluno estará em contato direto com seu orientador e supervisor.

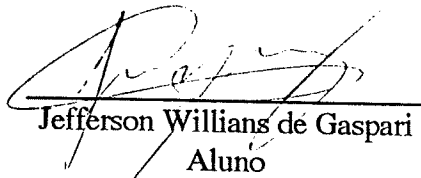
15. RECURSOS E FONTES ORÇAMENTÁRIAS

Este projeto tem um custo estimado de R\$ 800,00 e será desenvolvido com recursos do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

O Seguro Obrigatório será coberto pela ESALQ/USP, visto que o projeto será integralmente conduzido nessa Instituição.

16. LITERATURA CITADA

LAGUNA, S.E. Genética e Melhoramento de Leveduras para a Bioconversão de Extratos de *Helianthus tuberosus* L. Piracicaba, 1986. 173p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

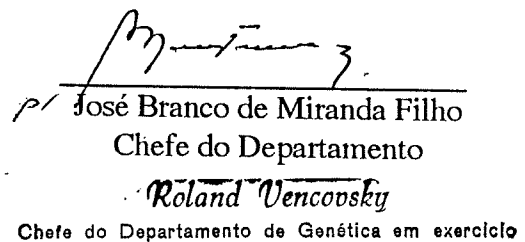


Jefferson Willians de Gaspari
Aluno



Prof. Dr. Flavio C.A. Tavares
Orientador

Aprovado pelo Conselho do Departamento em / / .



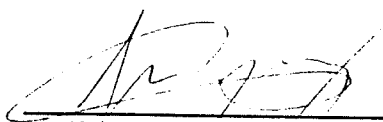
pt José Branco de Miranda Filho
Chefe do Departamento
Roland Vencovsky
Chefe do Departamento de Genética em exercício

ANEXOS

JUSTIFICATIVA PARA RESIDÊNCIA NO ÚLTIMO SEMESTRE

A principal justificativa para a realização da Disciplina L11-601: Residência Agronômica no segundo semestre diz respeito à certas características agronômicas do *Helianthus tuberosus* L. Durante o desenvolvimento desse vegetal, ocorrem variações na proporção frutose/glicose do polímero inulina, sendo esta mais elevada no outono. Portanto, apesar da possibilidade de seu cultivo durante todo o ano, é vantajoso realizar a colheita o mais tarde possível, visto que o rendimento em açúcar triplica nesse período.

Outra justificativa diz respeito à minha aspiração em realizar Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas no Depto. de Genética da ESALQ/USP após a conclusão da graduação, sendo que essa Residência será um rico exercício para um bom desempenho no mestrado.


Jefferson Willians de Gaspari
Aluno


Prof. Dr. Flavio C.A. Tavares
Orientador

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

MONOGRAFIA

A SÍNDROME DO *STRESS* DO SUÍNO E A CONSEQÜENTE FORMAÇÃO
DA CARNE PÁLIDA, MOLE E EXSUDATIVA (PSE): UMA VISÃO
GERAL

Bolsista: PAULA MARQUES MEYER

JULHO DE 1995

INTRODUÇÃO:

A síndrome hipermetabólica conhecida como porcine stress syndrome (PSS) acomete certas linhagens de suínos, freqüentemente de alta deposição muscular. A principal consequência da PSS, entretanto, é a indesejável ocorrência da PSE (carne pálida, mole e exsudativa), após o abate. PSS e PSE possuem um fator etiológico miogênico em comum e este se manifesta pelo anormal metabolismo do cálcio e se reflete no desencadeamento de uma acelerada glicólise, levando a acidificação, desnaturação de proteínas e perda das propriedades funcionais do músculo.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Três síndromes relacionadas ao *stress* têm sido freqüentemente descritas em várias raças de suínos desde o final dos anos 60. Estas são a *Porcine Stress Syndrome* (PSS) ou Síndrome do Stress do Suíno; *Porcine Malignant Hyperthermia* (PMH) ou Hipertermia Maligna dos Suínos e a carne *Pale, Soft and Exsudative* (PSE) ou Pálida, Mole e Exsudativa. Todas estas síndromes estão inter-relacionadas e apresentam várias características patofisiológicas em comum. No início, o desenvolvimento e os processos que as regulam acontecem ao nível molecular, mas estão todos integrados em um nível geral no animal (Kolataj, 1986). De acordo com Sybesma (1980), PSS, PMH e PSE são membros de uma mesma família e compartilham de um fator etiológico e miogênico em comum.

Em termos clínicos, a PSS pode ser definida como um estado hipermetabólico de caráter hereditário que se desenvolve em certas raças de suínos, como o Piétran, o Poland China, Landrace e ainda em linhagens cruzadas dessas raças. O termo PSS foi primeiramente introduzido na literatura veterinária por Topel et al (1986). Um ano mais tarde, Sybesma & Eikelenboom (1969) introduziram o termo PMH. Este termo é derivado de uma complicação anestésica análoga e incomum em humanos, porém freqüentemente fatal, iniciada por potentes agentes inalatórios, notavelmente o fluotano, comumente referido como halotano (Hall et al, 1980). Apesar de pequenas diferenças terem sido descritas entre Hipertermia Maligna em suínos e humanos, estas parecem ser mais quantitativas, e a expressão da doença é mais pronunciada em suínos do que em humanos (Louis et al, 1990).

A relação entre PMH induzida pelo halotano e a ocorrência da carne PSE foi primeiramente reportada por Eikelenboom & Minkema (1974). Estes autores, ao mesmo tempo que Christian (1974), citado por Topel & Cristian (1986), criaram o chamado "Teste do Halotano", que logo se tornou uma das ferramentas mais usadas nas pesquisas das alterações metabólicas, hormonais e bioquímica da PSS, da PMH e da PSE. O advento do teste do halotano também ajudou a chegar a um entendimento do modelo hereditário das três síndromes.

A ocorrência da PSS e da PMH é dependente da existência de um único gene que provavelmente controla a síntese de uma discreta proteína nas fibras musculares esqueléticas

(Morméde & Dantzer, 1987). A origem deste gene é desconhecida. Ele pode ser originário de mutações relativamente recentes, ou pode ainda ser parte antiga do genoma do suíno que foi revelada pela moderna seleção para crescimento e deposição muscular (Swatland, 1984). Este gene está localizado na região centrométrica do cromossomo 6, e o seu *locus* é chamado "locus do halotano", sendo indicado como "Hal" (Archibald, 1987; Davies et al, 1988; Louis et al, 1990). De acordo com Southwood (1986), o gene do halotano oferece um dos poucos exemplos de um gene maior e identificável de importância econômica na produção animal.

As características bioquímicas, fisiológicas e metabólicas da PSS e PMH têm sido assunto de extensos estudos em anos recentes. Entretanto, um número de discordâncias tem surgido com respeito à caracterização da PSS com uma reação convencional do *stress*. É provavelmente verdade que os efeitos da PSS estão relacionados bem de perto com o bem-estar do suíno (Morméde & Dantzer, 1987). Topel & Hallberg (1985) sugerem que a PSS e a PSE formam uma complexa desordem neuromuscular, que é propagada geneticamente num modelo autossoma recessivo. Baseados na avaliação de sintomas clínicos, Williams et al (1975) sugeriram que a PSS e a PMH fossem idênticas. Posteriormente isto foi questionado por Marple et al (1977), Mitchell & Heffron (1982) e Heffron & Mitchell (1985). Na verdade, na literatura veterinária, a grande maioria dos estudos considera PSS e PMH como sendo a mesma síndrome e, mais ainda, que a carne PSE é uma consequência de ambas. De fato, do ponto de vista da produção animal, as diferenças entre PSS e PMH são meramente teóricas, já que uma ou outra pode resultar na indesejável ocorrência da PSE pós-abate.

O teste do halotano feito a campo consiste em conter o animal numa idade aproximada de 12 semanas e forçá-lo a respirar uma mistura do gás anestésico e do gás que serve como veículo, freqüentemente o oxigênio. A concentração do anestésico usualmente varia entre 3 e 8 % de halotano em oxigênio, e a duração do teste varia entre os investigadores de 3 a 10 minutos num volume de 1,5 a 4 litros por minuto. O teste é comumente realizado usando-se um aparelho anestésico com sistema fechado ou semifechado equipado com um vaporizador que fornece a mistura gasosa para o animal através de um tubo de borracha contendo uma máscara cônica para o focinho (Eikelenboom & Minkema, 1974). O princípio do teste do halotano consiste em iniciar uma reação de PMH durante uma curta duração do gás anestésico. Uma severa estimulação da musculatura esquelética é o sinal macroscópico mais precoce do desenvolvimento da PMH (Tucke et al, 1976). Uma vez observado este sinal, o halotano é imediatamente desligado para prevenir um avanço na reação da PMH que é freqüentemente fatal. O termo "gene do halotano" é derivado da reação do suíno ao teste do halotano. O locus responsável pela sensibilidade ao halotano (Hal) tem dois alelos: N (alelo normal) e n (alelo responsável pela resposta ao halotano) (Pazdera et al, 1983). A presença do Haln em homozigose é também responsável pelo desencadeamento de uma alterada reação bioquímica e conseqüentemente pelo aparecimento dos eventos fisiológicos anormais freqüentemente observados em suínos propensos à PSS. Rigidez dos membros traseiros ou uma combinação com outras respostas, são usadas como uma indicação padrão no diagnóstico de resistência ou susceptibilidade ao halotano (Ahern et al, 1980).

O modelo genético da PSS tem sido estudado em termos do resultado do teste halotano. como consequência, a hereditariedade para sensibilidade ao halotano e PSS tem sido apresentada como uma e a mesma. Atualmente, é bem estabelecido que a predisposição genética, PSS é controlada por um único gene (Mabry et al, 1981) no modo autossoma recessivo. Entretanto, este modelo hereditário parece não ser aplicável a todas as raças. O

teste do halotano classifica os suínos em dois genótipos: halotano-positivo e halotano-negativo, ou propenso à Pss e resistente à PSS, respectivamente. Com tal modelo Mendeliano e com resultados de cruzamentos envolvendo suínos de fenótipos conhecidos, três genótipos foram estabelecidos. O homocigoto recessivo (nn) é o halotano sensível, enquanto que o heterocigoto (Nn) e o homocigoto dominante (NN) são não-sensíveis ao halotano (Webb et al, 1985). Apesar deste aparentemente simples modelo genético, a reação ao halotano pode apresentar variações entre as populações que estão sendo estudadas. Foi mostrado que o gene do halotano pode não ser totalmente recessivo em certas populações, isto é, uma porcentagem de heterocigotos pode reagir ao halotano. Mais ainda, a penetração do gene, isto é, a porcentagem de nn sensíveis dentro de uma dada população pode variar. Penetração variável pode ser explicada por variáveis níveis de energia no músculo e adequados para promover as reações bioquímicas necessárias para produzir uma reação positiva a exposição ao halotano (Mabry et al, 1981).

Apesar de ter sido amplamente utilizado por criadores e pesquisadores, o teste do halotano é propenso a resultados falso-positivos e/ou falso-negativos da ordem de 5% a 9% indicando uma grande estimulação do metabolismo aeróbico. Este aumento no metabolismo representa uma tentativa da fibra muscular de produzir ATP a uma taxa que compense a hidrólise de ATP pela ATPase do mecanismo de contração. Deste ponto agudo do episódio de PSS/PMH, muitas outras reações irreversíveis ocorrem, especialmente um aumento na lise das membranas mitocondriais, já que a concentração de ATP diminui a zero. Isto leva a um aumento da permeabilidade da membrana plasmática e conseqüente vazamento de grandes moléculas (creatina quinase, lactato desidrogenase e proteínas como a mioglobina) aumentando desta maneira a concentração sérica destas. A acidose metabólica concomitante com a acidose respiratória junto a alta temperatura causa danos na membrana e desnaturação de enzimas e outras proteínas funcionais.

Nos estágios terminais da PSS/PMH, o metabolismo anaeróbico muscular é responsável, em grande parte, pela produção total de calor. Estas alterações metabólicas no músculo são autoperpetuadoras, já que elas por sua vez produzem um aumento maior no metabolismo e acidose, resultando numa progressiva perfusão inadequada de oxigênio. Nos estágios finais, suínos susceptíveis a PSS/PMH apresentam acentuada dispnéia, coloração pálida e avermelhada na pele, cianose e extrema acidose. O estágio seguinte resulta em colapso total, acentuada rigidez muscular e hipertermia; a morte ocorre num estado semelhante ao choque.

A carne pálida, mole e exsudativa (PSE) é uma desordem do desenvolvimento do músculo esquelético causada por uma produção incontrolável e muito rápida de lactato a partir do glicogênio. Também é referida como uma miopatia latente que ocorre na musculatura esquelética com alto potencial glicolítico. Historicamente a PSE foi a primeira das síndromes relacionadas ao stress a ser descrita. Foi primeiramente chamada de degeneração muscular e o termo PSE foi subsequentemente introduzido por Briskley em 1964.

Das três síndromes relacionadas ao stress, a PSE é a única que pode ocorrer independentemente do defeito genético. Foi mostrado que as alterações metabólicas induzidas pelo abate que resultam em PSE diferem, até certo ponto, daquelas induzidas pelo fator genético -o gene do halotano- as quais irão também resultar em PSE. Estudos na hereditariedade da PSE em muitas raças de suínos geralmente concordam com um moderado coeficiente de herdabilidade entre 0,2 e 0,5. Assim sendo, fatores não genéticos irão participar amplamente na ocorrência da PSE. A herdabilidade também foi mostrada ser

dependente da raça. Estes chamados fatores não-genéticos são o abate e o manejo pré-abate dos suínos que levam a um stress físico e psicológico, e ainda o manejo pós-abate das carcaças.

Os caminhos metabólicos que levam à formação e ao desenvolvimento da PSE são bem documentados na literatura. A carne na carcaça do suíno é derivada da musculatura estriada esquelética. As unidades celulares básicas do músculo esquelético são as fibras musculares, que estão primariamente categorizadas em tipos de fibra de acordo com seu conteúdo da enzima adenosina miofibrilar alcalina trifosfatase (ATPase). As fibras musculares são ainda subdivididas com base no potencial aeróbico.

Em animais de carne, incluindo o suínos, fibras musculares são também diferenciadas em tipos de contração rápida e lenta, com diferenças próprias na ultra-estrutura e na atividade da ATPase miofibrilar. Entretanto, "a classificação histoquímica das fibras musculares por qualquer método, incluindo o conteúdo de ATPase miofibrilar, é meramente uma subdivisão útil, porém artificial, de um espectro continuamente variável. Acontece nas fibras musculares uma alteração contínua durante toda a vida, em decorrência de um processo de adaptação as alterações das demandas funcionais, e a denominação tipo de fibra meramente reflete a constituição de uma fibra em um dado momento". Esta colocação é suportada também por Stecchini et al, 1990.

Tem sido mostrado que alterações morfológicas nas fibras musculares já estão presentes no músculo do suíno susceptível para a PSS *in vivo*, o que caracteriza a PSE como uma miopatia letante, no mínimo em suínos sensíveis ao halotano (nn). Os achados relevantes a PSE neste fenômeno *ante-mortem* são a abundância de material não-miofibrilar acumulado entre feixes individuais de miofibrilas, hipercontração, degeneração e dissolução das miofibrilas, e o acúmulo de material semelhante ao mioplasma dentro e entre as células musculares. O alargamento do espaço interfibrilar e a desorientação dos feixes individuais das miofibrilas estão provavelmente relacionados à segregação de fluidos nas células musculares. É sabido que, em músculos PSE, a quebra prematura das barreiras funcionais da membrana celular ocorre logo após o abate. Ao mesmo tempo o espaço extracelular torna-se aumentado às custas do espaço intracelular, e as membranas ficam mais permeáveis ao transporte de íons. O mau funcionamento do sistema de membranas, levando ao aumento da permeabilidade, foi mostrado ocorrer no músculo esquelético e em outros tecidos de suínos sensíveis ao halotano. Assim sendo, a alteração de membrana pode ser considerada como uma característica *in vivo* em suínos susceptíveis ao stress. Propriedades alteradas da membrana causadas pelo defeituoso canal liberador de cálcio do RS, e a composição alterada de fosfolípidios e/ou ácidos graxos ligados a fosfolípidios, fazem suínos susceptíveis ao stress mais sensíveis a perturbações exógenas na membrana, do que suínos normais. Tem-se como hipótese que os defeitos da membrana permitem que íons cálcio fluam da área extracelular ou das subestruturas da célula, como o RS, para a área miofibrilar.

No animal vivo, músculos normais e propensos à PSE contêm compostos ricos em energia, como fosfato de creatina, ATP e glicogênio. Estes compostos ricos em energia são consumidos *post-mortem* para a manutenção de um estado de *quase-vida* por algum tempo. Em suínos halotano-positivos (nn), o excesso de cálcio livre é responsável pelo consumo de ATP, através da ativação da ATPase miofibrilar, e também converte a fosforilase da sua forma inativa *b* para a sua forma ativa *a*. Como a fosforilase é uma das mais importantes enzimas com funções regulatórias durante a glicogenólise, sua ativação irá acelerar a quebra do glicogênio com subsequente formação de ácido láctico. De fato, foi mostrado que, no

abate, suínos halotano-positivos apresentam uma menor concentração de glicogênio muscular, ATP, um pHi mais baixo e uma concentração de lactato mais alta do que suínos halotano-negativos (NN). Também foi demonstrado que o pH muscular é mais baixo no momento da sangria, em carcaças que irão desenvolver PSE, quando comparado com carcaças normais. O tempo necessário para que um músculo PSE atinja seu pH anormal é sabido ser dependente do grau e velocidade da glicólise. A glicólise gera calor, e isto contribui para uma temperatura mais alta do que a normal numa carcaça PSE logo após o abate. A glicólise *post-mortem* é influenciada pela quantidade de glicogênio dentro de cada tipo de fibra no momento do abate, temperatura do músculo, pelo aumento do volume de água livre no espaço extracelular e pela composição e atividade das enzimas glicogenolíticas. Em suínos susceptíveis ao stress (nn), o baixo pH no abate também pode ser explicado pelo rápido acúmulo de lactato no músculo, devido à baixa densidade de capilares e ainda devido à grande área média das fibras. Uma baixa densidade de capilares no músculo limita o suprimento de oxigênio para as fibras e dificulta a taxa na qual o lactato e outros catabólitos são eliminados.

A chegada a um pH final enquanto o músculo ainda está quente resulta na desnaturação de aproximadamente 20% de proteínas sarcoplasmáticas (creatina fosfoquinase) e miofibrilares. Um consumo acelerado de ATP, aliado à desnaturação proteica e mudanças estruturais nas membranas da célula muscular, são responsáveis pela palidez, textura mole e perda de fluido que caracterizam a carne PSE.

Em suínos halotano-negativos (Nn ou NN) a ocorrência de PSE é também devida a uma aceleração da glicólise, porém considera-se que a glicólise neste caso é exacerbada por um estímulo diferente. Isto é substanciado pelos achados que mostram que, em suínos não-sensíveis ao halotano, o stress induzido por um exercício estimula a glicogenólise, inibe a glicólise oxidativa, e estimula o metabolismo anaeróbico, e também pela evidência de que a atividade da ATPase não está aumentada em suínos halotano-negativos. Desta maneira, em suínos resistentes ao stress, a rápida glicólise *post-mortem* não é um resultado de atividade muscular como ocorre em suínos susceptíveis ao stress. Tem sido postulado que, em suínos resistentes ao stress, a rápida glicólise *post-mortem* seria induzida pelo aumento da liberação de catecolaminas da medula adrenal ou nervos simpáticos, facilitando a liberação de acetilcolina. Por sua vez, isto causa vasoconstrição que estimula a glicogenólise muscular, fazendo com que tudo isso resulte em rápido início da glicólise anaeróbica. Também foi mostrado que a glicólise induzida por catecolaminas ocorre via ativação de receptores β -adrenérgicos. Embora um aumento da taxa de glicólise seja causado por diferentes mecanismos em suínos halotano-positivos e halotano-negativos, os dois mecanismos podem desta forma ser sinérgicos e não são necessariamente mutuamente exclusivos; ou seja, ambos mecanismos podem ocorrer ao mesmo tempo. Na prática isto vai depender da presença do gene do halotano no animal e ainda das condições de abate e pré-abate às quais o animal é submetido. Estas condições podem desencadear as alterações bioquímicas e fisiológicas que levam à PSE.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AHERN, C. P.; MILDE, J. H. & GRONERT, G. A. Electrical stimulation triggers porcine malignant hyperthermia. Research in Veterinary Science, 39:257-258, 1985.

BRISKEY, E. J. Etiological status and associated studies of pale, soft, exsudative porcine musculature. Advances in Food Research. 13:89-94, 1964.

BRITT, B. A. Etiology and pathophysiology of malignant hyperthermia. Federation Proceedings. 38:44-48, 1979.

EIKELEMBOMM, G.; MINKEMA, D. & SYBESMA, W. The halothane test, a new selection tool in pig breeding. World Animal Review. 28: 9-12, 1978.

PELOSO, J. V. A síndrome do stress suíno e a conseqüente formação da carne pálida, mole e exsudativa: uma visão geral. A Hora da Veterinária. 14(80), 1994.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA
SEÇÃO DE RADIOGENÉTICA

ESTABELECIMENTO DO SISTEMA ISOLAMENTO-CULTIVO-
REGENERAÇÃO DE PROTOPLASTOS DE ARROZ BRASILEIRO

Irving Joseph Berger

Orientação: Prof. Dr. Akihiko Ando

PIRACICABA - SP

JULHO DE 1995

1. INTRODUÇÃO

Entre os cereais, o arroz (*Oryza sativa* L.) é a segunda cultura de maior importância no mundo. Constitui-se na principal fonte de proteínas e calorias na Ásia e outras centenas de milhões em países da África e América Latina, como o Brasil.

De acordo com dados da FAO QBS, o Brasil produziu cerca de 10,4 milhões de toneladas em 1993, com produtividade de 2,3 t/ha, bem superior as 1,4 t/ha do período 1979-81. Porém, ano a ano os acréscimos são decrescentes, não compatíveis com a demanda.

Das limitações da atual produção de arroz, principalmente no Estado de São Paulo onde há predomínio do cultivo de sequeiro, culmina o complexo seca-brusone. Segundo a International Rice Research Institute, já em 1982 eram utilizadas técnicas de manipulação genética para a resolução de problemas tais como esse. Através da inserção de genes podem ser obtidas plantas de arroz com resistência a doenças, pragas ou fatores ambientais adversos, assim como a melhoria de tantas outras características. Alguns trabalhos já comprovaram o alto potencial do processo, entre eles CHAUDHURY et al.(1993).

Protoplastos, células desprovidas de parede celular, são atualmente muito utilizados na obtenção de plantas transgênicas - portadoras de genes inseridos por manipulação genética. Assim, o presente trabalho visa estabelecer um sistema rápido de regeneração de plantas de arroz a partir de protoplastos, servindo de base para futuras transformações em cultivares brasileiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Indução de calos

Trabalhos de regeneração de plantas de arroz têm seu princípio na indução de calos - massa de células com crescimento desorganizado, obtidos na presença de quantidade relativamente grande de auxinas, aumentando de tamanho por divisões contínuas das células (ABBOTT, 1977 citado por PASQUAL, 1985). Há citações de três tipos de explantes: embriões maduros (SURESHKUMAR et al., 1993; MARASSI & RAPELA, 1989; RANCÉ et al., 1994; CHOWDHRY et al., 1993; BISWAS & ZAPATA, 1993), embriões imaturos (GHOSH BISWAS et al., 1994; YIN et al., 1993) e anteras (SUN, SI, CHENG & ZHAN, 1993; NGUYEN, HUNG & ZAPATA, 1993).

Basicamente o meio de cultura utilizado na indução de calos é o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) ou variantes deste, suplementados com 2,4-D - 2,4 - Dichlorophenoxyacetic acid. YIN et al.(1993) utilizaram macro e micronutrientes MS, vitaminas B5 (GAMBORG et al., 1968) e suplementaram com caseína hidrolizada, leite de côco, sucrose e 2,4-D. RANCÉ (1994) induziu calos em meio NB: sais inorgânicos N6 (CHU et al., 1975), microelementos e vitaminas B5, caseína hidrolizada, prolina, glutamina, sucrose, 2,4-D, NAA (naphtalene acetic acid) e BAP (6 - benzyl amino purine).GHOSH BISWAS et al.(1994) testaram MS, AA (MÜLLER & GRÄFE, 1978) e N6.

Em geral os explantes são inoculados câmara de fluxo estéril e mantidos no escuro em temperaturas entre 25 e 30°C por aproximadamente 3 semanas, quando podem ser subcultivados.GHOSH BISWAS & ZAPATA (1993) promoveram subcultivo em meio fresco por mais 6 semanas, também promoveram iniciação de suspensões celulares sem subcultivo anterior.

2.2. Suspensões celulares

Suspensões celulares são frequentemente usadas como material para o isolamento de protoplastos (ELLA & ZAPATA, 1993).

ELLA & ZAPATA (1993) selecionaram calos embriogênicos - são friáveis, lisos e amarelos brilhantes - para iniciar a suspensão celular. Aproximadamente 2g de calos foram colocados em Erlenmeyer de 125ml contendo 30ml meio líquido. Os frascos eram colocados em “shaker” (120 rpm) na ausência de luz e a $25\pm 1^\circ\text{C}$. Aproximadamente $\frac{3}{4}$ do meio líquido eram repostos duas vezes por semana nas primeiras 3-4 semanas e após isso semanalmente. Os calos menores e de superfícies lisas e amarelas brilhantes eram selecionados e transferidos para outros frascos contendo meio fresco. As culturas foram mantidas no mesmo meio até que fossem utilizadas no isolamento de protoplastos. Basicamente utilizaram-se dos meios MS, N6 e R2 suplementados com ácido nicotínico, piridoxina-HCl, tiamina HCl, myo-inositol, 2,4-D, sucrose, maltose, agarose, glicina, caseína hidrolizada e prolina, com pH ajustado a 5,8.

YIN et al. (1993) selecionaram 1g de calos após 3 ou 4 subcultivos, os quais foram transferidos para frascos contendo 30ml de meio líquido S₁ (meio AA modificado) para o estabelecimento de culturas em suspensão. Depois de 3 a 4 meses após o seu estabelecimento foram mantidas alternativamente (1 a 2 passagens em cada meio) em meio S₁ e meio S₂. Os frascos foram colocados em “shaker” a 120 rpm e 26°C , subcultivados a cada 3 a 5 dias.

SCHMITZ & LÖRZ (1990), investigando a influência de diversos fatores na absorção de nutrientes em suspensões celulares de arroz, concluíram que a proporção inóculo:meio, o tipo de frasco, a troca gasosa e o tempo de subcultivo devem ser rigorosamente fixados para não comprometer a reprodutividade de um determinado sistema de estudo da cinética do crescimento.

2.3. Isolamento e cultivo de protoplastos

Para o isolamento de protoplastos, após a introdução do método enzimático (COCKING, 1960) combinações enzimáticas envolvendo celulase e pectoliase, ou, celulase e Macerozyme, têm sido extensivamente utilizadas (ABDULLAH et al., 1986; KYOZUKA et al., 1987; MASUDA et al., 1989; DATTA et al., 1992; GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1993, citados por MOURA, 1994).

Fatores tais como tempo de digestão, “osmoticum”, concentração e tipo de enzimas influem no isolamento de protoplastos. Em arroz, as enzimas mais utilizadas são celulase RS, 1 a 4%, e pectolyase Y-23, 0,02 a 0,5%. Concentrações baixas de pectolyase Y-23 geralmente estão acompanhadas de macerozyme R-10, 0,5 a 1%. Estas concentrações são válidas tanto para obtenção de protoplastos derivados de suspensões celulares, quanto derivados de calos (MOURA, 1994) - embora ainda não citado, protoplastos podem ser isolados diretamente de calos embriogênicos.

O uso de células auxiliares (“nurse cells”) da divisão na etapa de cultivo e protoplastos tem sido considerado essencial para a obtenção de alta eficiência na formação de colônias, embora alguns autores tenham conseguido obter resultados positivos sem a sua utilização, tais como DATTA et al., 1990 e DATTA et al., 1992, citados por MOURA, 1994.

Divisões e formação de colônias a partir de protoplastos têm sido obtida usando-se meios complexos como o de KAO & MICHAYLUK (1975) ou derivados e também com meios simples, N6 e R2.

2.4. Regeneração de plantas

Sucessos têm sido obtidos na regeneração de plantas de arroz tanto para variedades japônicas (RUEB et al., 1994 e SURESHKUMAR et al., 1993) como para índicas (CHAUDHURY et al., 1993; YIN et al., 1993; GHOSH BISWAS et al., 1994; GHOSH BISWAS & ZAPATA, 1993; OINAM & KOTHARI, 1993; CHHOWDIIRY et al., 1993; RANCÉ et al., 1994).

OINAM & KOTHARI (1993) trabalharam com quinze variedades de arroz, concluindo que a capacidade de regeneração está diretamente ligada ao fator genótipo.

CHOWDHRY et al. (1993) constataram a partir de vários experimentos que a suplementação de meios com L-prolina refletiu numa maior porcentagem de regeneração. Um incremento na concentração de prolina de 3 a 12mM resultou em proporcional incremento na taxa de regeneração de plantas (atingiu-se um máximo de 63%, enquanto que 23% sem prolina); a resposta decresceu a partir da concentração de 15mM. Constataram, ainda, que L-triptofano também atua no sentido de incrementar a porcentagem de regeneração de planta de arroz.

Segundo MOURA (1994), existem somente dois trabalhos que relatam a regeneração de plantas a partir de protoplastos derivados de calos: LEE et al. (1989) regeneraram 158 plantas a partir de calos derivados de embriões imaturos do cultivar IR52 e WU & ZAPATA (1992), também utilizando embriões imaturos, regeneraram mais de 2000 plantas de 4 cultivares do tipo japônica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivares

Para o presente trabalho foram escolhidos inicialmente quatro cultivares brasileiros a serem testados, visando posterior escolha de dois deles para o desenvolvimento do objetivo inicial. São eles:

- a) IAC-101;
- b) IAC-1246;
- c) IAC-4440 e
- d) BR IRGA-409

3.2. Seleção de sementes

A seleção de sementes foi feita em duas etapas. Primeiramente fez-se uma seleção baseada em gravidade específica (0,75) em solução salina de NaCl, de acordo com ZAPATA & ELLA (1988). Posteriormente, após retirada da casca fez-se seleção visual para eliminar sementes defeituosas, contaminadas com fungos ou que apresentem dano mecânico no embrião.

3.3. Assepsia das sementes

As sementes foram colocadas em tratamento com etanol 70% por 1 minuto sob agitação, seguido de 30 minutos em solução de hipoclorito de sódio a 2% acrescida de duas gotas do detergente Tween 20 a cada 100ml, sob agitação e vácuo (50 cm.Hg).

Após estes tratamentos, as sementes foram lavadas em água destilada estéril, 3 a 4 vezes, em fluxo laminar. A água excedente foi retirada e as sementes inoculadas imediatamente em placas de Petri com meio de indução de calos.

3.4. Indução de calos

Todos os calos foram induzidos a partir de embriões maduros (sementes). Utilizaram-se placas de Petri contendo cada uma aproximadamente 30 ml de meio semi sólido. Em cada placa foram inoculadas 10 sementes em disposição radial, sem considerar a posição do embrião em relação ao meio. Utilizaram-se como meios básicos o MS e R2, suplementados exclusivamente com o regulador de crescimento sintético 2,4-D (auxina). As placas foram colocadas no escuro em incubadoras tipo B.O.D., à temperatura de $26\pm 1^{\circ}\text{C}$. O período de incubação variou de 30 a 40 dias. Ao menos a cada 15 dias foram feitas avaliações quanto ao número de calos e número de calos embriogênicos sob estereoscópio.

3.5. Isolamento de protoplastos

Aproximadamente 1g (peso fresco) de calos embriogênicos primários, selecionados sob estereoscópio, foi colocado em uma placa de Petri plástica (90x150mm) contendo 11 ml de solução enzimática. Após os calos serem levemente macerados com espátula, a placa foi vedada com filme plástico e posta em agitador orbital, 30 rpm, no escuro a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 5 horas. Findo este tempo, à mistura enzimática e protoplastos foi adicionado um igual volume de CPW 13M, e então peneirada em malhas de nylon de 60, 30, 25 e 20 μm . A solução peneirada foi então centrifugada a 1000 rpm por 8 minutos. Os protoplastos precipitados foram

colocados em suspensão com 8 ml de CPW 13M, de onde retirou-se uma amostra para contagem em câmara de Neubauer. Após nova centrifugação, os protoplastos precipitados foram homogeneizados com o meio de cultivo. O meio de cultivo consiste do meio propriamente dito em dupla concentração, misturado minutos antes a um mesmo volume de uma solução aquecida e 1,2% de agarose Sigma tipo II. O meio somente foi misturado aos protoplastos quando atingiu uma temperatura de 25 a 30°C.

Na contagem dos protoplastos somente eram considerados aqueles esféricos e que apresentam vacúolos pequenos. O número de protoplastos por mililitro é a média do número encontrado nos 10 campos da câmara a multiplicado pelo fator 10^4 . Este fator é utilizado uma vez que cada campo de contagem representa um volume de $0,1\text{mm}^3$.

4. RESULTADOS

Devido ao longo período dispendido em absorção de técnicas e a problemas diversos que resultaram no abandono do projeto de pesquisa em questão, basicamente foram obtidos somente resultados relacionados à indução de calos.

Foram testados os quatro cultivares anteriormente citados em quatro tratamentos distintos: meio MS suplementado com 1mg de 2,4-D/litro, meio MS suplementado com 2 mg de 2,4-D/litro, meio R2 suplementado com 1mg de 2,4-D/litro e meio R2 suplementado com 2 mg de 2,4-D/litro.

Conclusões:

- Para todos os 4 cultivares a porcentagem de calos embriogênicos induzidos foi maior no tratamento R2 + 2 mg de 2,4-D/l;

- O cultivar BR IRGA-409 mostrou-se inapto para o desenvolvimento do trabalho sob os tratamentos apresentados devido a grande incidência de oxidação de calos;
- Dentre os cultivares utilizados o IAC-4440 foi o que melhor respondeu aos tratamentos especificados;
- Em único experimento de isolamento de protoplastos a partir de calos originados do cultivar IAC-4440, obteve-se uma concentração de protoplastos considerada viável ao desenvolvimento de técnicas que se utilizam deste como explante.

5. LITERATURA CONSULTADA

CHOWDHRY, C.N.; TYAGI, A.K.; MAHESHWARI, N. & MAHESHWARI, S.C.

Effect of L-proline and L-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169) **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, **32**: 357-361, 1993.

ELLA, E.S. & ZAPATA, F.J. Suspension initiation in indica rice requires proline.

IRRN, **18**:(1), march, 1993.

FAO QUARTERLY BULETIM STATISTICS Vol. 7, No. 1, 1994.

FUNGARO, M.I.L.P. & VIEIRA, M.L.C. Protoplastos de plantas: isolamento e regeneração. **Ciência e Cultura**, **41**:(12), 1151-1159, dezembro, 1989.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE A plan for IRRI's third decade. IRRI, Philippines, 1982.

INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE Rice tissue culture planning conference. IRRI, Philippines, 1982.

KIIUSII, G.S. & TOENNIESSEN, G.II. **Biotechnology in agriculture n° 6: Rice Biotechnology**. IRRI/CAB International, UK, Oxford, 1991.

MOURA, D.S. de Regeneração de plantas de cultivares brasileiros de arroz (*Oryza sativa* L.) a partir de protoplastos de calos de embriões maduros. **Dissertação de Mestrado**, ESALQ/USP, Piracicaba, 1994.

OINAM, G.S. & KOTHARI, S.L. Genotypic differences in embryogenic callus formation and plant regeneration in indica rice. **IRRN**, **18**:(3), september, 1993.

RUEB, S.; LENEMAN, M.; SCHILPEROORT, R.A.; HENSGENS, L.A.M. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, **36**:(2) 359-364, 1994, appud **Rice Abstracts**, vol. 17, No. 3, 1994.

ZAPATA, F.J. & ELLA, E.S. Specific gravity of the grain - a factor to consider in rice tissue culture. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, **132**:294-7, 1988.

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

Departamento de Genética
Piracicaba-1995

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
4. MATERIAL E MÉTODO.....	11
5. DADOS E CONCLUSÕES.....	13
6. LITERATURA CITADA.....	17
7. ANEXOS (GRÁFICOS).....	ANEXOS

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 Itaueira 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 estádios, 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 cinco, para se eliminar os resíduos dos desinfetantes.

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 exôgenos 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 (citicininas 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)**, ortodihidroxifenóis 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)**, propuzeram 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 exôgenas 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 macroelementos em meios de enraizamento (QUOIRIN et al. 1977, SKIRVIN et al. 1980, HAMMERSCHLAG 1982), citados por **NÉMETH (1986)**.

Enraizamento bem sucedidos 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, SRISKANDARAHAI & 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 florizin 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-hidroximetilfurfural 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 benéficamente 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 *Anacardium 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 morfogenéticos. 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, NÉMETH 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, (CNPc), 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.

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 estêrco : 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.

A necessidade de autoclavar a vermiculita, utilizada nas caixas de semeadura dos frutos de caju, esta sendo revista, uma vez que, não se usa mais terra nesta operação.

Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de explantes coletados de plantas jovens (até 30 cm), em boas condições de fitossanidade e de nutrição. Assim, as mudas, na casa de vegetação, devem ser adubadas e pulverizadas com fungicidas e inseticidas periodicamente.

O experimento G, utilizando meio de cultura líquido, sem carvão ativado,

sob agitação, no escuro, a 25°C por 14 dias foi realizado com a finalidade de testar nova metodologia, mais econômica, na fase de estabelecimento da cultura, uma vez que, os explantes contaminados ou oxidados seriam descartados com menor volume de meio.

Mais experimentos como este devem ser realizados, utilizando meios com 50% da concentração normal do MS.

A calibração do pH da solução desinfetante para condições ácidas (pH < 7,0), foi testado com resultados negativos. Os explantes sofreram um processo de oxidação química das paredes celulares, proporcionando maiores taxas de oxidação prematura em condições "in vitro". Não houve redução da taxa de contaminação, porém, deve-se realizar mais testes variando tempo de imersão e concentração da solução desinfetante.

O experimento J, conduzido com a utilização do fungicida benomyl (Benlate), em concentrações de 1 a 4 g/l e o antibiótico Rifampicina filtrado na concentração de 5 g/l, não mostrou eficiência no controle da germinação. Uma das causas prováveis do insucesso, foi a autoclavação do benomyl, o 2, benzimidazole carbamic acid methyl ester é termo-instável, além da baixa concentração utilizada do antibiótico. Também foi observado um aumento da oxidação dos meristemas causado pelo excesso de fungicida, não dissolvido, no meio de cultura. Tais problemas poderão ser contornados com a utilização de concentrações maiores de Rifampicina, ou outro antibiótico, e filtração do fungicida Benomyl.

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.

Experimento colocado sob condições de 10 dias de escuro, a 17°C e 15 dias na sala de vegetação (25°C), sem luz, provocou um estiolamento dos explantes, resultando em bons restos nesta etapa de estabelecimento de cultura. O problema encontrado foi a oxidação de meristemas após a exposição à luz por 12 horas/dia.

5.3. Enraizamento

Como citado no ítem 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 meio MS com hormônio IBA 1,0 mg/l e 15 g de sacarose, 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.

Ressaltamos 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.

Deve-se realizar outros experimentos utilizando variações nas concentrações de IBA, e utilizando combinações de auxinas como realizados por **D'SILVA & D'SOUZA (1992)**, e pelo estagiário (experimento E).

Observamos que com o aumento da concentração de auxinas deve-se diminuir o tempo de cultivo neste meio de enraizamento. Meios de cultura com mais de 1,5 mg/l de IBA , não devem ser utilizados por mais de 14 dias.

5.4. 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 transplantio; 2) umidade relativa do ambiente; 3) substrato de transplantio 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 recente estão sendo conduzidos com a utilização de soluções nutritivas na fase de aclimatização. Bons resultados obtidos mostram que tal metodologia poderá a ser empregada em programas de obtenção de mudas micropropagadas de cajueiro (experimento B). Mais experimentos deverão ser realizados com a obtenção de melhores plântulas enraizadas.

6. LITERATURA CITADA

ABBOTT,A.T. 1978. Practice and promise of micropropagation of 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 1 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,ORTO,F.A.C.; OJIMA,M.; CAMPOS,S.A.F.; TOMBOLATO,A.F.C. 1986. Micropropagação Vegetativa das macieiras "rainha" e "gala". O Agrônomo, **38** (1), 45-47.

CHENG,T.Y. 1978. Clonal propagation of woody plant species throuht tissue culture techniques. Proc.Fut.Plant Propagator'sSoc. **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 of water to in vitro cultures using different brands of agar. In Plant Biotechnology. Acta Horticulturae. **289**:331-333.

DRUART,Ph.& De WULF,O. 1993. Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving. Plant Cell,Tissue and OrganCulture. **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/EMBRAPA-CNPH. 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 requeriment 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 and 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,Q.M.S.; CAVALCANTE,R.D. A Cultura doCajueiro no Nordeste do Brasil, p. 9-11.

MARTINELLI,L.,SCIENZA,A.& SY,M.O. 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.

NÈMETH,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 Horticulturae. **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.

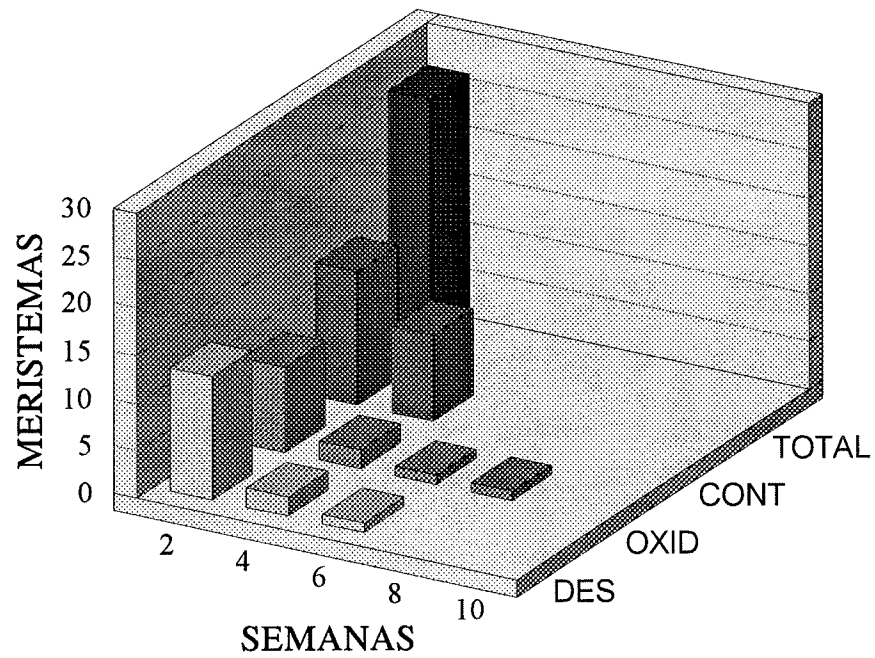
VASIL,I.K.& VASIL,V. 1981. Clonal propagation. International Rev. of Cytology. Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. 145-173.

Anexos

(gráficos)

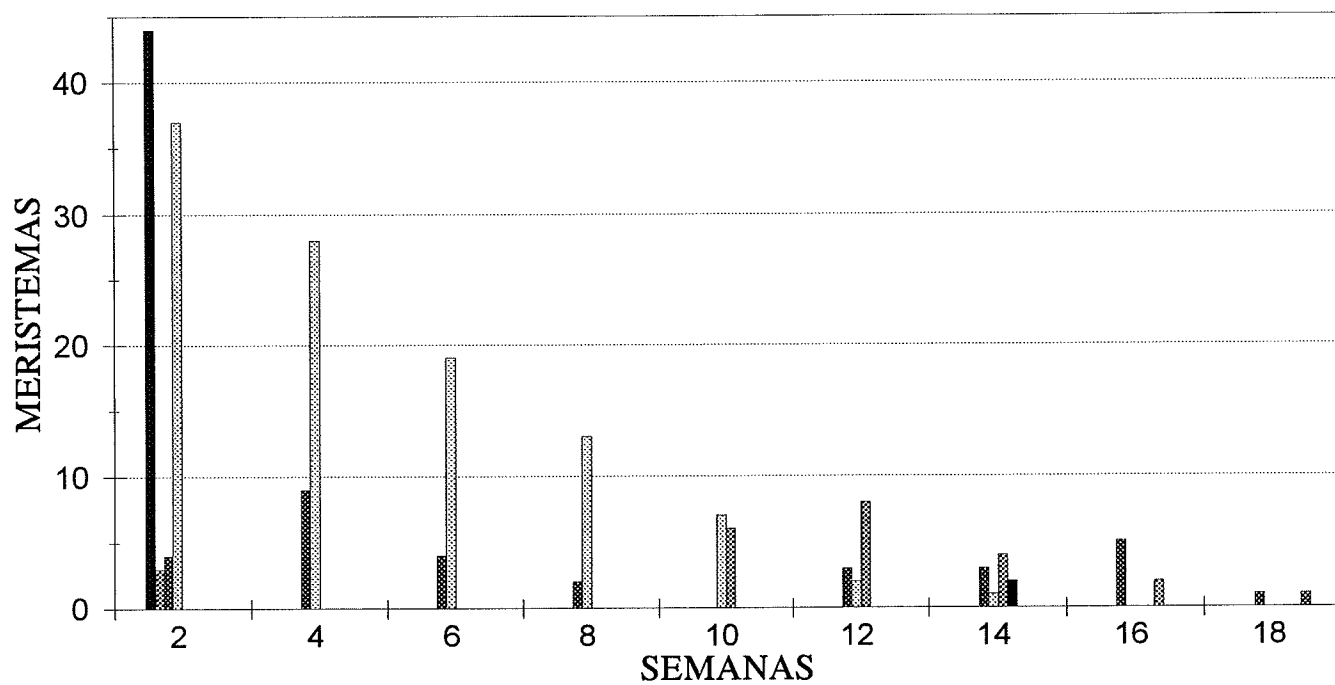
EXPERIMENTO A

PLANTAS VELHAS



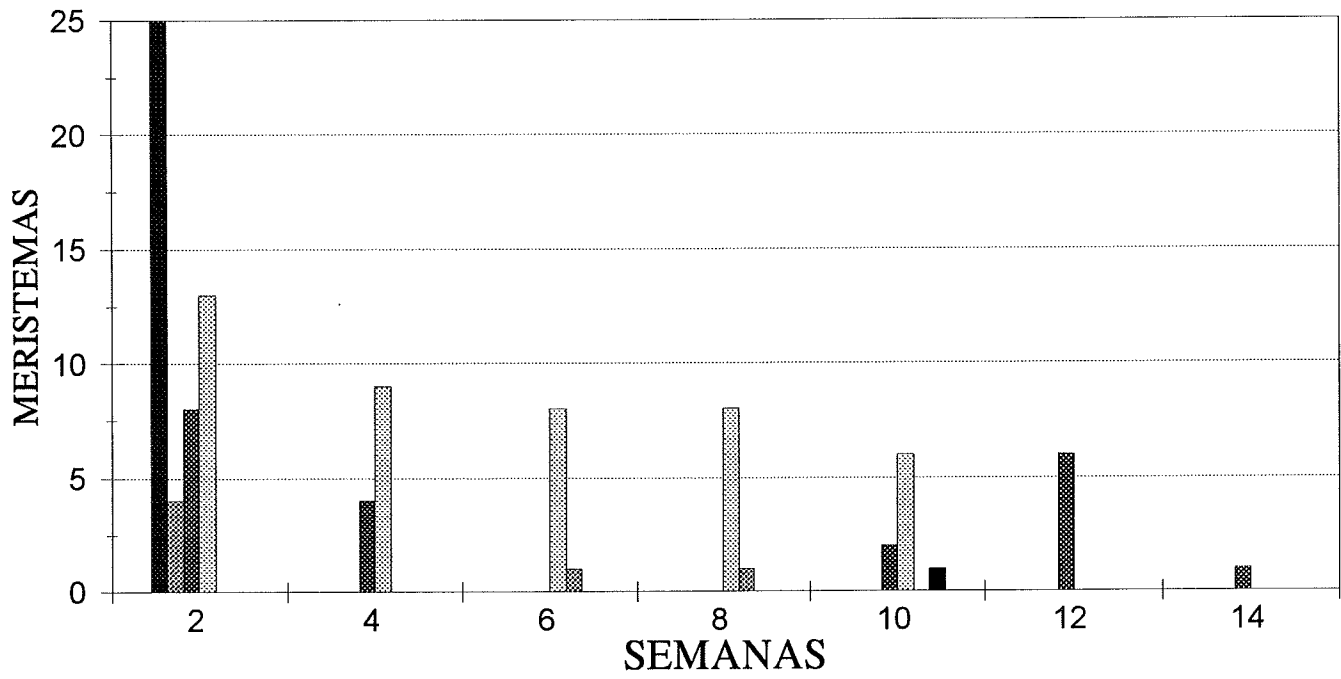
EXPERIMENTO B

1 APICAL + AXILAR



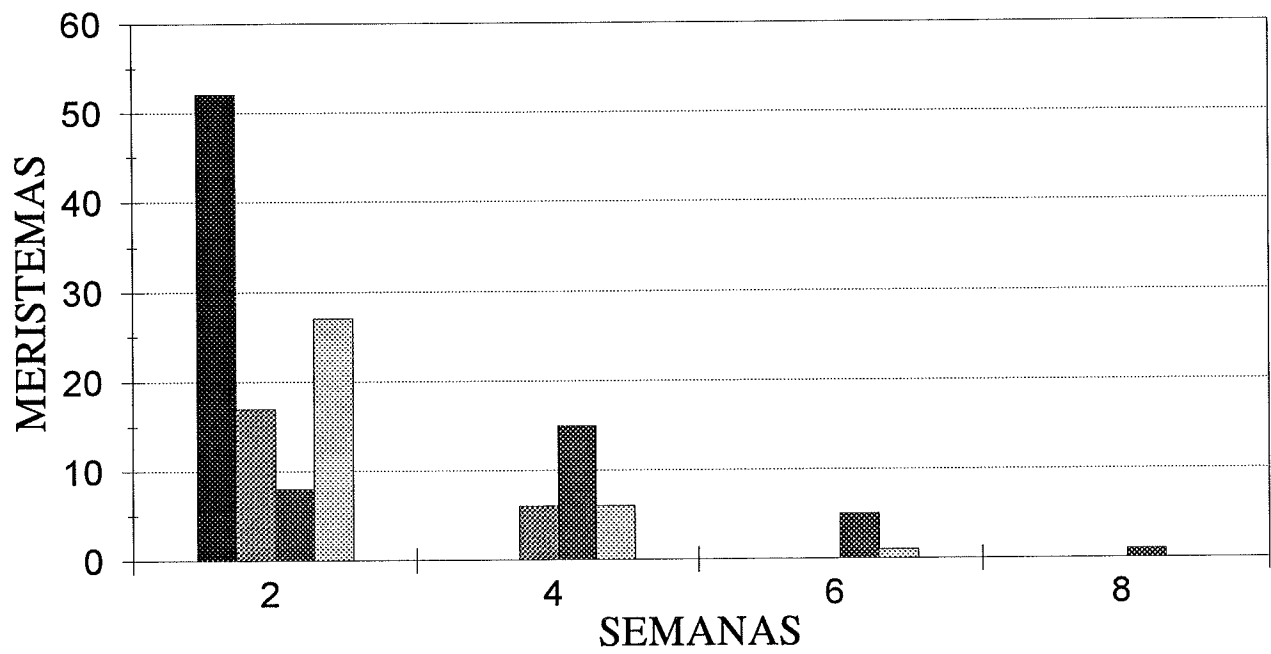
EXPERIMENTO C

1 APICAIS + AXILARES



EXPERIMENTO D

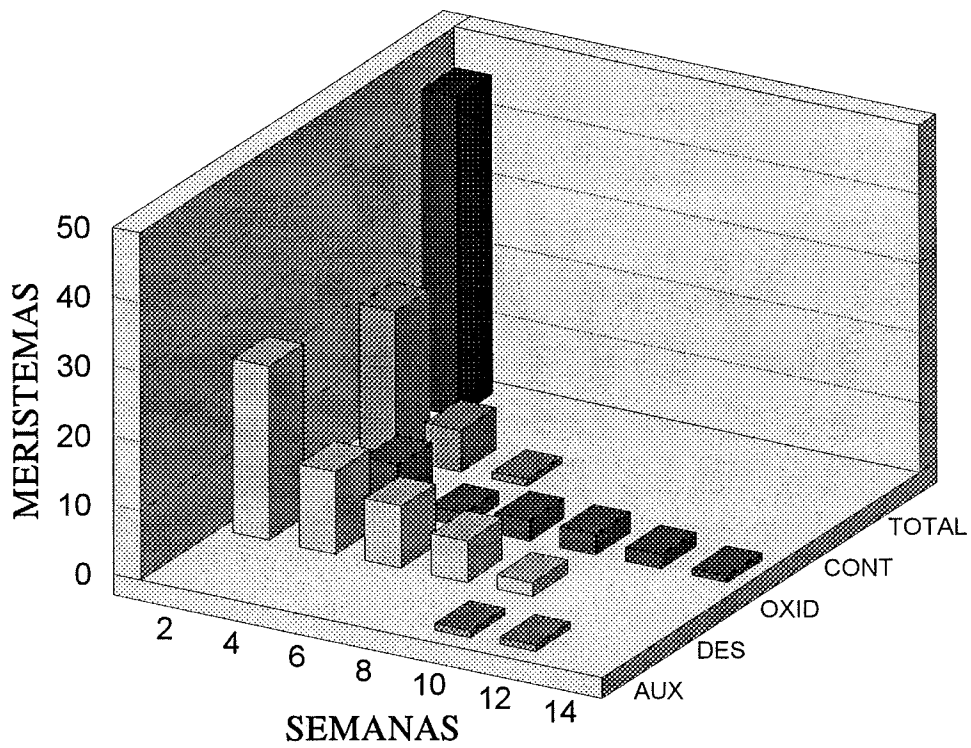
2 APICAIS



TOTAL **CONT** **OXID** **DES**

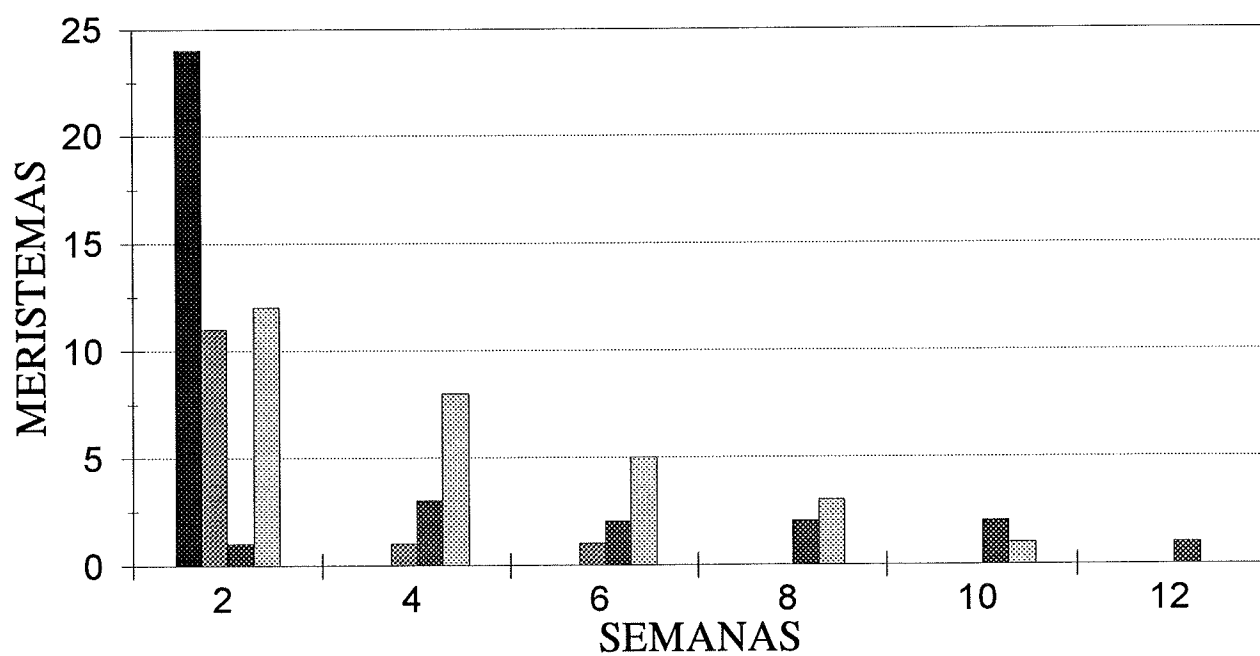
EXPERIMENTO E

IBA + ANA + 1/2 SACAROSE



EXPERIMENTO F

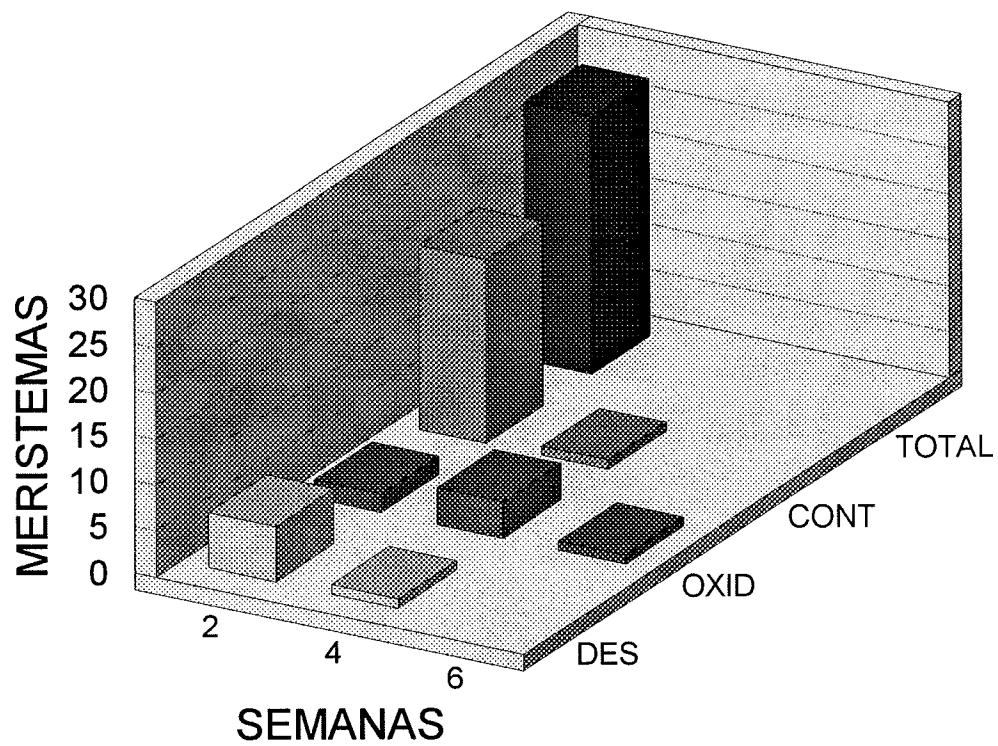
2 APICAIS



TOTAL **CONT** **OXID** **DES**

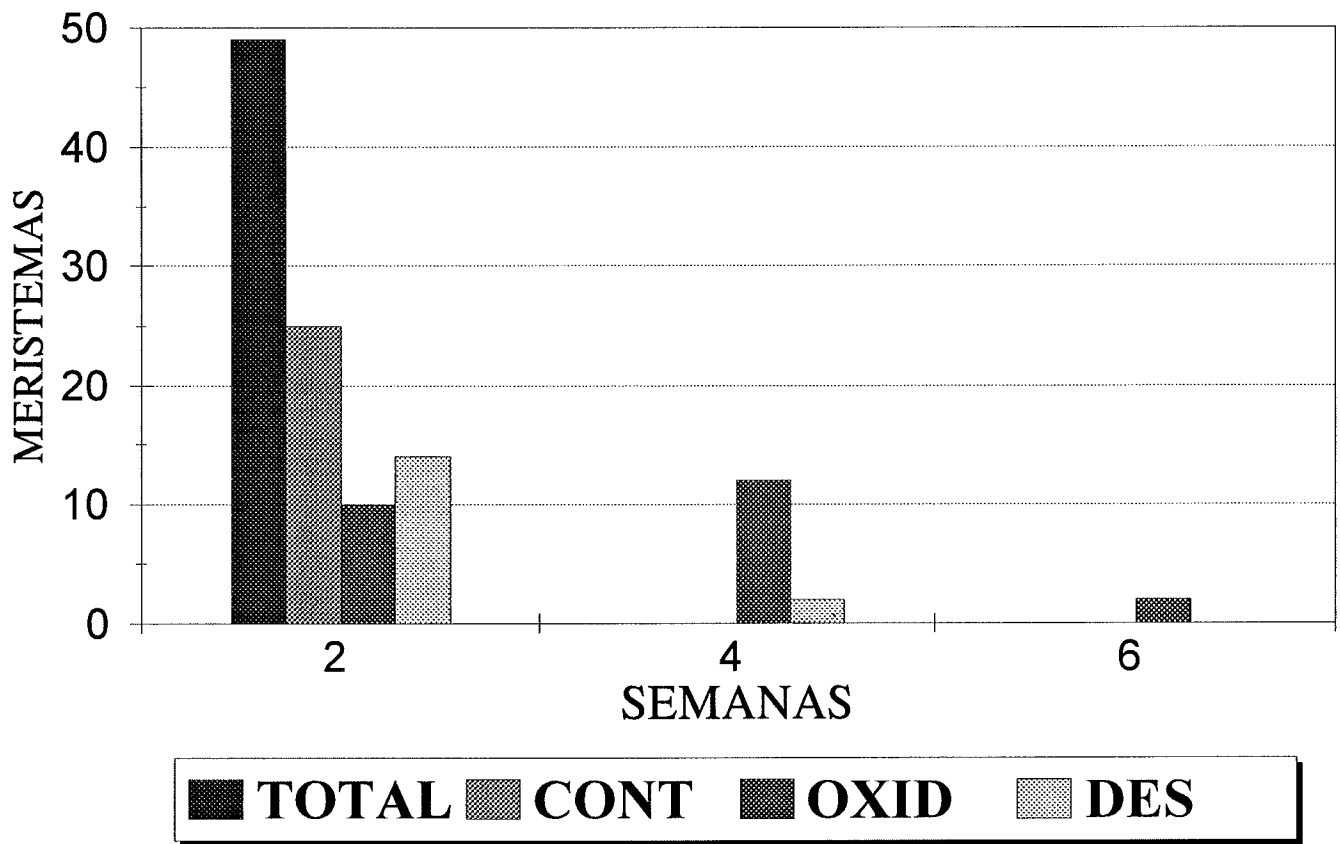
EXPERIMENTO G

MEIO LÍQUIDO - 3 GEMA



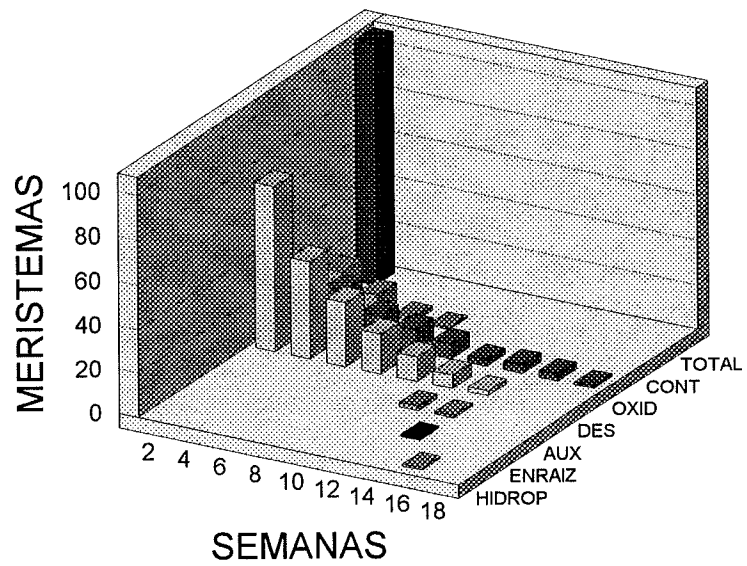
EXPERIMENTO H

TUBINHOS



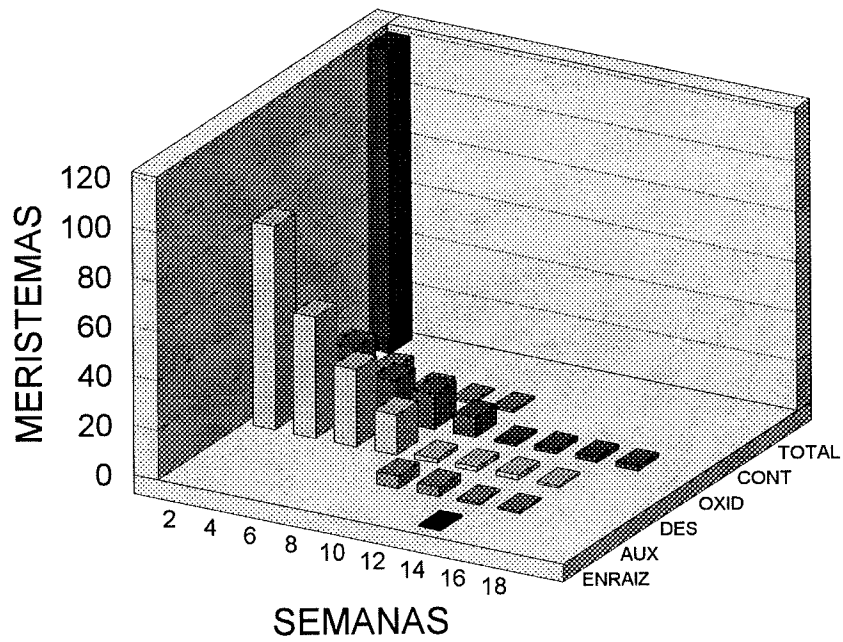
EXPERIMENTO I

1 APICAL



EXPERIMENTO J

1 APICAL - BENOMYL+RIFAMPICINA



! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 3674182 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !

! ALUNO: ELAINE CRISTINA CASTELHANDO !
! FILIACAO: FRANCISCO CASTELHANDO !
! APARECIDA ZONETE CASTELHANDO !
! LOCAL DE NASCIMENTO: PIRACICABA SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 04/11/74 IDENTIF: SP RG 252245076 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: !
! DATA DA EMISSAO: !
! REPARICAO EXPEDIDORA: !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 256482470116 UF: SP ZONA: 270 SECAO: 170 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: EEPSG PROF JOSE DE MELLO MORAES !
! ANO DA CONCLUSAO: 92 !
! SEDE: PIRACICABA !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1994 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 197 !
! MATEMATICA: 00,5 FISICA : 02,1 QUIMICA : 01,7 !
! BIOLOGIA : 05,0 PORTUGUES : 07,5 REDACAO : 03,8 !
! HISTORIA : 04,2 GEOGRAFIA : 02,5 INGLES : 04,2 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
! !
! !

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
! !
! !
! !
! !
! !
! !

 ! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 2 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 3674182 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: ELAINE CRISTINA CASTELHANDO !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA VEGETAL	97	7,4	4	1	AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	94	7,3	5		AP
LME120	CALCULO I	90	6,4	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	89	5,1	5	1	AP
LS0113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	100	9,3	2	1	AP
LS0118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	96	6,7	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	4	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	93	8,3	4	1	AP
LFM200	FISICA	97	6,0	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	86	5,9	5		AP
LME220	CALCULO II	100	5,8	4	1	AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	100	9,0	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	100	7,5	4		AP
LS0218	PEDOLOGIA	86	6,8	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	97	6,7	4		AP
LER340	TOPOGRAFIA BASICA	100	6,6	6		AP
LFM306	METEOROLOGIA AGRICOLA	90	6,4	4		AP
LF1321	MICROBIOLOGIA	96	8,2	4		AP
LME210	ESTATISTICA GERAL	97	5,5	4		AP
LS0319	FERTILIDADE DO SOLO	90	6,0	4		AP
LZO212	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	96	6,2	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30		
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					

 ! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA !R:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: ELAINE CRISTINA CASTELHANDO

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	CUMPRIU PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			85	8	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:01515					
*****	MEDIA PONDERADA DAS DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO OBTVEU APROVACAO: 6,81 (NAO INCLUI NOTAS DE AE)					

SAG/519-95

Piracicaba, 12 de julho de 1995.

Eliana Filomena Zandoná
 ELIANA FILOMENA ZANDONÁ
 Chefe da Seção de Eng. Agrônômica

V I S T O:

Raquel Degaspari Leite
 Raquel Degaspari Leite
 Chefe Administrativo de Serviço
 Graduação

AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 KN: REPROVADO POR NOTA TR: TRANC EM DISCIP VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1761072 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
! ALUNO: ELIZABETH BILSLAND !
! FILIACAO: DEREK HOWARD BILSLAND !
! KARIN BILSLAND !
! LOCAL DE NASCIMENTO: SAO PAULO SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 31/01/73 IDENTIF: SP RG 19539646 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: !
! DATA DA EMISSAO: !
! REPARTICAO EXPEDIDORA: !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 246768930124 UF: SP ZONA: 211 SECAO: 106 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: COLEGIO VISCONDE DE PORTO SEGURO UNIDADE II !
! ANO DA CONCLUSAO: 90 !
! SEDE: VALINHOS !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1991 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 33 !
! MATEMATICA: 04,4 FISICA : 08,0 QUIMICA : 06,0 !
! BIOLOGIA : 06,8 PORTUGUES : 03,6 REDACAO : 03,0 !
! HISTORIA : 03,6 GEOGRAFIA : 02,7 INGLES : 07,6 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
!
!

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
!
!
!
!
!
!
!

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 2 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1761072 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: ELIZABETH BILSLAND !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1991					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA E ANATOMIA VEGETAL	100	9,2	4		AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	98	7,6	5		AP
LME120	CALCULO I	93	8,6	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	100	8,7	5	1	AP
LSG113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	100	5,8	2	1	AP
LSG118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	93	8,7	5		AP
LZO112	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	95	7,8	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	3	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1991					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	100	9,1	4	1	AP
LER228	TOPOGRAFIA I	78	6,6	4	1	AP
LFM200	FISICA	100	8,8	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	100	9,2	5		AP
LME220	CALCULO II	100	6,9	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	70	7,8	4		AP
LSG218	PEDOLOGIA	71	6,4	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1992					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	100	8,0	4	1	AP
LER329	TOPOGRAFIA II	94	6,8	4	1	AP
LFM405	AGROMETEOROLOGIA	94	9,0	4		AP
LF1321	MICROBIOLOGIA	87	8,1	4		AP
LME420	ESTATISTICA GERAL	94	5,0	4	1	AP
LSU319	FERTILIDADE DO SOLO	92	6,9	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	3	

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 3 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1761072 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: ELIZABETH BILSLAND !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1992					
LES300	CIENCIA: CONCEPCAO E METODOLOGIA	82	7,8	2	2	AP
LET322	ENTOMOLOGIA GERAL	100	7,0	4		AP
LFT424	FITOPATOLOGIA	98	7,7	4		AP
LGN413	MELHORAMENTO GENETICO	100	7,0	4		AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	94	9,0	4	1	AP
LQI420	NUTRICAO MINERAL DAS PLANTAS	90	7,3	4	1	AP
LSU409	ADUBOS E ADUBACAO	96	7,0	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			27	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1993					
LAG501	AGRICULTURA I	100	7,4	4		AP
LCI554	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	94	8,2	4		AP
LCI558	TECNOLOGIA SUCRO-ALCOOLEIRA BASICA	80	7,2	4		AP
LER332	MECANICA E MAQUINAS MOTORAS	93	8,1	3		AP
LES333	ECONOMIA AGRICOLA	96	8,5	4		AP
LET430	PRAGAS DAS PLANTAS CULTIVADAS	88	8,5	4		AP
LHO524	HORTICULTURA	93	8,4	4		AP
LZO313	ANATOMIA E FISIOLOGIA ANIMAL	93	7,2	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			31		
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1993					
LAG502	AGRICULTURA II	97	8,3	4		AP
LBO600	ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS	94	8,1	4		AP
LER432	MAQUINAS E IMPLEMENTOS AGRICOLAS	87	7,5	4		AP
LSO650	MICROBIOLOGIA DO SOLO	82	7,7	4		AP
LZO493	FISIOLOGIA ANIMAL APLICADA	100	9,2	4		AP
LZO495	FISIOLOGIA DA LACTACAO	100	8,5	4		AP
LZ1427	ZOOTECNIA I - MELHORAMENTO ZOOTECNICO	93	8,9	4		AP
LZ1442	NUTRICAO ANIMAL	94	7,8	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			32		

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 4 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1761072 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: ELIZABETH BILSLAND !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
LER418	CONSTRUCOES RURAIS	100	8,7	4	1	AP
LER471	HIDRAULICA	85	6,7	4		AP
LES229	SOCIOLOGIA E EXTENSAO RURAL	93	8,5	2		AP
LGN477	PRINCIPIOS GENETICOS EM BIOTECNOLOGIA	94	9,0	4		AP
LH0670	CONTROLE DAS PLANTAS DANINHAS	91	7,7	4	1	AP
LZT432	ZOOTECNIA II (RUMINANTES)	93	7,7	4		AP
LZT693	BIOTECNOLOGIA ANIMAL	85	9,0	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			26	2	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
BMP101	METODOLOGIA DO DNA RECOMBINANTE E EXPRESSAO GENICA	100	10,0	8		AP
LER571	IRRIGACAO E DRENAGEM	94	6,8	4		AP
LGN617	ECOLOGIA DE POPULACOES	100	7,4	4		AP
LH0528	FRUTICULTURA I	83	8,3	4		AP
LZI551	FORRAGICULTURA	93	7,8	4		AP
LZT644	SUINOCULTURA	88	8,9	4		AP
LZT650	BOVINOCULTURA DE CORTE	93	7,9	4		AP
LZT652	MANEJO DE BOVINOS LEITEIROS	87	5,8	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			36		
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LCF581	SILVICULTURA	97	7,8	4		AP
LCI662	BIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS E BEBIDAS	87	8,2	4		AP
LZI550	OVINOCULTURA E CAPRINOCULTURA	87	9,5	4		AP
LZI570	CULTURAS FORRAGEIRAS PARA ALIMENTACAO SUPLEMENTAR DE RUMINANTES	87	7,3	4		AP
LZT614	MELHORAMENTO DE ANIMAIS	93	9,5	4		AP
LZT648	MANEJO DA REPRODUCAO E DA INSEMINACAO ARTIFICIAL	100	10,0	4		AP

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: ELIZABETH BILSLAND

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
L21697	FORMULACAO E PREPARACAO DE RACOES	93	8,2	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			28		
*****	CONCLUSAO - ENGENHARIA AGRONOMICA					
*****	CUMPRIU PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			265	16	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:04455					
*****	MEDIA PONDERADA DAS DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO OBTIVE APROVACAO: 7,98 (NAO INCLUI NOTAS DE AE)					

SAG/520-95

Piracicaba, 12 de julho de 1995.

Eliana F. Zandoná
 ELIANA FILOMENA ZANDONA
 Chefe da Seção de Eng. Agrônoma

V I S T O:

Raquel Degaspari Leite
 Raquel Degaspari Leite
 Chefe Administrativo de Serviço
 Graduação

AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 RN: REPROVADO POR NOTA TR: TRANC EM DISCIP VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 2965055 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !

! ALUNO: FERNANDO DE MESQUITA SAMPAIO !
! FILIACAO: PAULO DE MESQUITA SAMPAIO !
! TEREZA CRISTINA FILPI DE MESQUITA SAMPAIO !
! LOCAL DE NASCIMENTO: ARARAQUARA SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 28/07/75 IDENTIF: SP RG 327740218 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: CERTIFICADO DE DISPENSA !
! DATA DA EMISSAO: 03/08/93 NUM: 050062198101 SERIE: CATEGORIA: !
! REPARTICAO EXPEDIDORA: MINISTERIO DO EXERCITO !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 229884980108 UF: SP ZONA: 13 SECAO: 28 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: COLEGIO SAO FRANCISCO DE SALES !
! ANO DA CONCLUSAO: 92 !
! SEDE: TERESINA !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1993 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 2 !
! MATEMATICA: 04,4 FISICA : 07,6 QUIMICA : 08,4 !
! BIOLOGIA : 05,2 PORTUGUES : 06,8 REDACAO : 08,0 !
! HISTORIA : 08,4 GEOGRAFIA : 04,4 INGLES : 08,4 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
! !
! !

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
! !
! !
! !
! !
! !
! !
! !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 2 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 2965055 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: FERNANDO DE MESQUITA SAMPAIO !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1993					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBU103	MORFOLOGIA VEGETAL	91	8,4	4	1	AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	80	8,0	5		AP
LME120	CALCULO I	90	6,7	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	97	8,5	5	1	AP
LS0113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	90	8,8	2	1	AP
LS0118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	94	6,9	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	4	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1993					
LBU204	BOTANICA SISTEMATICA	93	8,1	4	1	AP
LFM200	FISICA	93	6,5	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	93	8,1	5		AP
LME220	CALCULO II	97	6,6	4	1	AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	100	9,0	4	1	AP
LQ1208	BIOQUIMICA	97	5,7	4		AP
LS0218	PEDOLOGIA	94	6,5	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	87	6,3	4	1	AP
LER228	TOPOGRAFIA I	97	7,9	4	1	AP
LFM405	METEOROLOGIA AGRICOLA	97	7,7	4		AP
LF1321	MICROBIOLOGIA	86	6,9	4		AP
LME420	ESTATISTICA GERAL	94	5,1	4	1	AP
LS0319	FERTILIDADE DO SOLO	91	6,0	5		AP
LZU112	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	91	6,5	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	3	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LER329	TOPOGRAFIA II	100	7,2	4	1	AP
LES333	ECONOMIA AGRICOLA	94	5,5	4		AP
LE1322	ENTOMOLOGIA GERAL	93	7,0	4		AP

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIPL ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Pg 3
 USP DATA DA EMISSAO NO. USP
 HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 2965055

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: FERNANDO DE MESQUITA SAMPAIO

COODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
LFT424	FITOPATOLOGIA	88	6,6	4		AP
LGN413	MELHORAMENTO GENETICO	93	9,1	4		AP
LQI420	NUTRICAO MINERAL DAS PLANTAS	97	6,8	4	1	AP
LS0409	ADUBOS E ADUBACAO	100	6,7	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			29	2	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LAG501	AGRICULTURA I	87	6,0	4		AP
LCT444	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	86	6,1	4		AP
LCT458	TECNOLOGIA SUCRO-ALCOOLEIRA					
	BASICA	80	7,6	2		AP
LER332	MECANICA E MAQUINAS MOTORAS	79	5,7	2		AP
LET430	PRAGAS DAS PLANTAS					
	CULTIVADAS	94	7,0	4		AP
LH0505	HORTICULTURA I	100	6,7	4		AP
LS0515	GENESE E CLASSIFICACAO DE					
	SOLOS	100	7,5	4	1	AP
LZO313	ANATOMIA E FISIOLOGIA ANIMAL	78	5,7	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			28	1	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					
*****	CUMPRIU					
	PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO					
	COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			142	14	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:02550					
*****	MEDIA PONDERADA DAS					
	DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO					
	OBTEVE APROVACAO: 7,04					
	(NAO INCLUI NOTAS DE AE)					

AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 3672792 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
! ALUNO: GILDEMBERG AMORIM LEAL JUNIOR !
! FILIACAO: GILDEMBERG AMORIM LEAL !
! CLARICE CORREIA LEAL !
! LOCAL DE NASCIMENTO: TEIXEIRA DE FREITAS BA !
! DATA DE NASCIMENTO: 25/10/76 IDENTIF: SP RG 272579804 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: CERTIFICADO DE ALISTAMENTO !
! DATA DA EMISSAO: 26/07/94 NUM: 180622118495 SERIE: CATEGORIA: !
! REPARICAO EXPEDIDORA: MINISTERIO DO EXERCITO !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: UF: ZONA: SECAO: !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: COLEGIO KOELLE !
! ANO DA CONCLUSAO: 93 !
! SEDE: RIO CLARO !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1994 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 82 !
! MATEMATICA: 02,1 FISICA : 06,3 QUIMICA : 04,6 !
! BIOLOGIA : 07,1 PORTUGUES : 05,0 REDACAO : 01,3 !
! HISTORIA : 02,5 GEOGRAFIA : 00,9 INGLES : 03,4 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
!
!

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
!
!
!
!
!
!
!
!

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 2 !
 ! USP ! DATA DA EMISSÃO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 3672792 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: GILDEMBERG AMORIM LEAL JUNIOR !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA VEGETAL	87	7,7	4	1	AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	86	5,6	5		AP
LME120	CALCULO I	97	5,4	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	85	5,0	5	1	AP
LSO113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	100	9,1	2	1	AP
LSO118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	85	6,3	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	4	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	86	7,0	4	1	AP
LFM200	FISICA	97	6,3	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	71	6,5	5		AP
LME220	CALCULO II	80	5,0	4	1	AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	75	8,3	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	94	5,0	4		AP
LSO218	PEDOLOGIA	74	5,7	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	87	5,4	4		AP
LFM306	METEOROLOGIA AGRICOLA	80	5,3	4		AP
LF1321	MICROBIOLOGIA	80	7,1	4		AP
LME210	ESTADISTICA GERAL	93	7,6	4		AP
LSO319	FERTILIDADE DO SOLO	91	5,9	4		AP
LZO212	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	93	6,2	4		AP
LER340	TOPOGRAFIA BASICA	77	4,7	6		MA
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			24		
*****	CREDITOS PRETENDIDOS DO SEM.			6		

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 3 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 3672792 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: GILDEMBERG AMORIM LEAL JUNIOR !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					
*****	CUMPRIU					
	PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO					
	COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			79	8	
*****	TOTAL CREDITOS PRETENDIDOS			6		
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:01425!					
*****	MEDIA PONDERADA DAS					
	DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO					
	OBTEVE APROVACAO: 6,27					
	(NAO INCLUI NOTAS DE AE)					
	SAG/522-95					

Piracicaba, 12 de julho de 1995.

Eliana Filomena Zandoná
 ELIANA FILOMENA ZANDONÁ
 Chefe, da Seção de Eng. Agrônômica

V I S T O:

Raquel Degaspari Leite
 Raquel Degaspari Leite
 Chefe Administrativo de Serviço
 Graduação

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIPL ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 2938331 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !

! ALUNO: IRVING JOSEPH BERGER !
! FILIACAO: CLAUDIO BERGER !
! EDNEA LOPES BERGER !
! LOCAL DE NASCIMENTO: MOGI DAS CRUZES SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 18/11/75 IDENTIF: CE RG 2256535 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: CERTIFICADO DE DISPENSA !
! DATA DA EMISSAO: 20/10/93 NUM: 040172096287 SERIE: CATEGORIA: !
! REPARTICAO EXPEDIDURA: MINISTERIO DO EXERCITO !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 247670850159 UF: SP ZONA: 219 SECAO: 218 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: COLEGIO ODILON BRAVEZA !
! ANO DA CONCLUSAO: 92 !
! SEDE: FORTALEZA !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1993 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 39 !
! MATEMATICA: 04,0 FISICA : 06,8 QUIMICA : 06,0 !
! BIOLOGIA : 06,0 PORTUGUES : 07,6 REDACAO : 03,0 !
! HISTORIA : 05,2 GEOGRAFIA : 06,0 INGLES : 03,6 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
!
!

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
!
!
!
!
!
!
!
!

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Pg 2
 USP DATA DA EMISSAO NO. USP
 HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 2938331

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: IRVING JOSEPH BERGER

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1993					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA VEGETAL	94	9,6	4	1	AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	93	8,6	5		AP
LME120	CALCULO I	90	8,0	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	94	9,1	5	1	AP
LSO113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	80	8,3	2	1	AP
LSO118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	100	8,3	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	4	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1993					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	83	9,5	4	1	AP
LFM200	FISICA	93	7,8	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	94	8,2	5		AP
LME220	CALCULO II	90	7,2	4	1	AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	96	10,0	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	93	8,2	4		AP
LSO218	PEDOLOGIA	100	7,2	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	94	7,5	4	1	AP
LER228	TOPOGRAFIA I	93	7,5	4	1	AP
LFM405	METEOROLOGIA AGRICOLA	84	8,8	4		AP
LFT321	MICROBIOLOGIA	81	6,9	4		AP
LME420	ESTATISTICA GERAL	91	8,3	4	1	AP
LSO319	FERTILIDADE DO SOLO	92	6,0	5		AP
LZO112	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	91	7,0	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	3	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LER329	TOPOGRAFIA II	100	8,4	4	1	AP
LES333	ECONOMIA AGRICOLA	91	7,7	4		AP
LEI322	ENTOMOLOGIA GERAL	100	7,7	4		AP

AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA:MATRICULADO NC:NAD COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 3 !
 ! USP ! DATA DA EMISSÃO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 2938331 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: IRVING JOSEPH BERGER !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
LF1424	FITOPATOLOGIA	84	8,1	4		AP
LGN413	MELHORAMENTO GENETICO	93	8,8	4		AP
LWI420	NUTRICAO MINERAL DAS PLANTAS	87	7,3	4	1	AP
LSU409	ADUBOS E ADUBACAO	89	7,2	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			29	2	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LAG501	AGRICULTURA I	97	7,6	4		AP
LCT444	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	100	8,2	4		AP
LCT458	TECNOLOGIA SUCRO-ALCOOLEIRA					
	BASICA	93	8,9	2		AP
LER332	MECANICA E MAQUINAS MOTORAS	86	6,9	2		AP
LE1430	PRAGAS DAS PLANTAS					
	CULTIVADAS	94	6,2	4		AP
LGN477	PRINCIPIOS GENETICOS EM					
	BIOTECNOLOGIA	93	9,0	4		AP
LH0505	HORTICULTURA I	94	8,0	4		AP
LZ0313	ANATOMIA E FISIOLOGIA ANIMAL	81	7,6	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			28		
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					
*****	CUMPRIU					
	PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO					
	COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			142	13	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:02520					
*****	MEDIA PONDERADA DAS					
	DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO					
	OBTEVE APROVACAO: 8,00					
	(NAO INCLUI NOTAS DE AE)					

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1783932 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !

! ALUNO: JEFFERSON WILLIANS DE GASPARI !
! FILIACAO: PAULO JOSE DE GASPARI !
! ISABEL CARONE DE GASPARI !
! LOCAL DE NASCIMENTO: PIRACICABA SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 20/09/72 IDENTIF: SP RG 19444031 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: CERTIFICADO DE RESERVISTA !
! DATA DA EMISSAO: 17/02/91 NUM: 141222278915 SERIE: CATEGORIA: 2 !
! REPARTICAO EXPEDIDURA: MINISTERIO DO EXERCITO !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 98431010230 UF: MG ZONA: 276 SECAO: 85 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: COLEGIO CIDADE DE PIRACICABA PSG !
! ANO DA CONCLUSAO: 90 !
! SEDE: PIRACICABA !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1991 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 6 !
! MATEMATICA: 07,2 FISICA : 06,0 QUIMICA : 08,0 !
! BIOLOGIA : 07,2 PORTUGUES : 07,6 REDACAO : 07,0 !
! HISTORIA : 00,9 GEOGRAFIA : 02,7 INGLES : 04,4 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
! !
! !

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
! !
! !
! !
! !
! !
! !

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Pg 2
 USP DATA DA EMISSAO NO. USP
 HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 1783932

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: JEFFERSON WILLIANS DE GASPARI

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1991					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA E ANATOMIA VEGETAL	94	7,9	4		AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	100	9,0	5		AP
LME120	CALCULO I	95	7,0	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	100	6,8	5	1	AP
LSG113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	100	9,4	2	1	AP
LSG118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	89	6,9	5		AP
LZO112	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	100	6,2	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	3	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1991					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	100	7,3	4	1	AP
LER228	TOPOGRAFIA I	91	7,6	4	1	AP
LFM200	FISICA	97	5,8	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	100	7,5	5		AP
LME220	CALCULO II	96	6,8	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	100	7,2	4		AP
LSG218	PEDOLOGIA	79	6,9	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1992					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	99	6,8	4	1	AP
LER329	TOPOGRAFIA II	94	8,3	4	1	AP
LES300	CIENCIA: CONCEPCAO E METODOLOGIA	94	9,1	2	2	AP
LFM405	AGROMETEOROLOGIA	97	6,9	4		AP
LFT321	MICROBIOLOGIA	98	6,9	4		AP
LME420	ESTATISTICA GERAL	97	7,6	4	1	AP
LSO319	FERTILIDADE DO SOLO	95	6,8	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			27	5	

AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 KN: REPROVADO POR NOTA TR: TRANC EM DISCIP VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Pg 3
 USP DATA DA EMISSAO NO. USP
 HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 1783932

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: JEFFERSON WILLIANS DE GASPARI

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1992					
LET322	ENTOMOLOGIA GERAL	100	6,9	4		AP
LF1424	FILOPATOLOGIA	98	6,6	4		AP
LGN413	MELHORAMENTO GENETICO	93	9,0	4		AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	94	8,6	4	1	AP
LQ1420	NUTRICAO MINERAL DAS PLANTAS	94	6,3	4	1	AP
LSO409	ADUBOS E ADUBACAO	98	7,1	5		AP
LSU650	MICROBIOLOGIA DO SOLO	100	8,2	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			29	2	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1993					
LAG501	AGRICULTURA I	100	7,8	4		AP
LCT554	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	100	7,2	4		AP
LCT558	TECNOLOGIA SUCRO-ALCOOLEIRA					
	BASICA	87	7,3	4		AP
LER332	MECANICA E MAQUINAS MOTORAS	100	5,8	3		AP
LET430	PRAGAS DAS PLANTAS					
	CULTIVADAS	88	7,3	4		AP
LH0524	HORTICULTURA	93	7,6	4		AP
LZ0313	ANATOMIA E FISIOLOGIA ANIMAL	100	6,3	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			27		
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1993					
LAG502	AGRICULTURA II	100	6,8	4		AP
LBO600	ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS	94	7,6	4		AP
LER432	MAQUINAS E IMPLEMENTOS					
	AGRICOLAS	100	6,5	4		AP
LES229	SOCIOLOGIA E EXTENSAO RURAL	94	6,0	2		AP
LGN617	ECOLOGIA DE POPULACOES	100	6,0	4		AP
LME602	ESTATISTICA EXPERIMENTAL	100	7,8	5		AP
LZ1427	ZOOTECNIA I - MELHORAMENTO					
	ZOOTECNICO	81	7,4	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			27		

AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIPL VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Pg 4
 USP DATA DA EMISSÃO NO. USP
 HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 1783932

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: JEFFERSON WILLIANS DE GASPARI

COU0100	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
LCF581	SILVICULTURA	81	7,1	4		AP
LER471	HIDRAULICA	100	5,5	4		AP
LGN449	GENETICA QUANTITATIVA	100	10,0	4		AP
LGN477	PRINCIPIOS GENETICOS EM BIOTECNOLOGIA	89	7,5	4		AP
LH0670	CONTROLE DAS PLANTAS DANINHAS	94	5,8	4	1	AP
LQI512	BIOQUIMICA EXPERIMENTAL	94	5,9	4		AP
LZI432	ZOOTECNIA II (RUMINANTES)	87	5,8	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			28	1	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LAG509	PLANTAS ALIMENTICIAS II	86	6,8	4		AP
LCI658	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL	92	7,6	4		AP
LER418	CONSTRUCOES RURAIS	88	7,5	4	1	AP
LER571	IRRIGACAO E DRENAGEM	100	6,6	4		AP
LES333	ECONOMIA AGRICOLA	94	5,2	4		AP
LH0528	FRUTICULTURA I	90	7,6	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			24	1	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LCI682	BIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS E BEBIDAS	100	7,7	4		AP
LES504	ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DO ENSINO DE 1.0 E 2.0 GRAUS	81	6,0	4		AP
LES669	INICIACAO CIENTIFICA EM ECONOMIA AGRARIA	100	0,0			RN
LES682	INTRODUCAO A PRATICA INTELLECTUAL E CIENTIFICA NA UNIVERSIDADE	94	9,0	2	1	AP
LZT614	MELHORAMENTO DE ANIMAIS	93	9,0	4		AP
LZT693	BIOTECNOLOGIA ANIMAL	70	9,0	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			18	1	

AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 KN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: JEFFERSON WILLIANS DE GASPARI

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					
*****	DISPENSADO DE					
	PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO					
	COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			240	17	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:04110					
*****	MEDIA PONDERADA DAS					
	DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO					
	OBTEVE APROVACAO: 7,24					
	(NAO INCLUI NOTAS DE AE)					
	SAG/524-95					

Piracicaba, 12 de julho de 1995.

Eliana F. Zandoná
 ELIANA FILOMENA ZANDONA
 Chefe da Seção de Eng. Agrônoma

V I S T O:

Raquel Degaspari Leite
 Raquel Degaspari Leite
 Chefe Administrativo de Serviço
 Graduação

AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1787835 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !

! ALUNO: JUAN LUCAS ARGUESO GOMES DE ALMEIDA !
! FILIACAO: OSCAR ANTONIO ARGUESO !
! MARIA BEATRIZ GOMES DE ALMEIDA ARGUESO !
! LOCAL DE NASCIMENTO: BUENOS AIRES !
! DATA DE NASCIMENTO: 13/08/72 IDENTIF: MG RG M2067289 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: !
! DATA DA EMISSAO: !
! REPARTICAO EXPEDIDORA: !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: UF: ZONA: SECAO: !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: COLEGIO SAO VICENTE DE PAULO !
! ANO DA CONCLUSAO: 90 !
! SEDE: RIO DE JANEIRO !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1991 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 4 !
! MATEMATICA: 05,6 FISICA : 08,4 QUIMICA : 08,4 !
! BIOLOGIA : 08,4 PORTUGUES : 06,8 REDACAO : 03,0 !
! HISTORIA : 05,2 GEOGRAFIA : 05,2 INGLES : 09,2 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
!
!

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
!
!
!
!
!
!
!

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 2 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1787835 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: JUAN LUCAS ARGUESO GOMES DE ALMEIDA !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1991					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LB0103	MORFOLOGIA E ANATOMIA					
	VEGETAL	87	6,3	4		AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	100	8,4	5		AP
LME120	CALCULO I	100	5,0	4	1	AP
LQ1108	QUIMICA INORGANICA E					
	ANALITICA	100	5,9	5	1	AP
LSG113	INTRODUCAO A ENGENHARIA					
	AGRONOMICA	100	8,8	2	1	AP
LSG118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	98	6,1	5		AP
LZ0112	ZOOLOGIA GERAL E					
	PARASITOLOGIA	95	5,2	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	3	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1991					
LB0204	BOTANICA SISTEMATICA	93	6,1	4	1	AP
LER228	TOPOGRAFIA I	88	8,8	4	1	AP
LFM200	FISICA	86	6,6	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	94	8,5	5		AP
LME220	CALCULO II	92	5,0	4	1	AP
LQ1208	BIOQUIMICA	90	7,0	4		AP
LSG218	PEDOLOGIA	71	6,4	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1992					
LB0311	FISIOLOGIA VEGETAL	91	5,9	4	1	AP
LER329	TOPOGRAFIA II	75	6,5	4	1	AP
LES300	CIENCIA: CONCEPCAO E					
	METODOLOGIA	82	7,3	2	2	AP
LFM405	AGROMETEOROLOGIA	87	5,8	4		AP
LF1321	MICROBIOLOGIA	83	6,3	4		AP
LME420	ESTATISTICA GERAL	88	5,5	4	1	AP
LS0319	FERTILIDADE DO SOLO	89	5,5	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			27	5	

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA !R:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 3 !
 ! USP ! DATA DA EMISSÃO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1787835 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: JUAN LUCAS ARGUESO GOMES DE ALMEIDA !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1992					
LET322	ENTOMOLOGIA GERAL	93	6,5	4		AP
LFT424	FITOPATOLOGIA	93	5,9	4		AP
LGN413	MELHORAMENTO GENETICO	93	8,1	4		AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	94	8,9	4	1	AP
LQI420	NUTRICAO MINERAL DAS PLANTAS	94	5,6	4	1	AP
LS0409	ADUBOS E ADUBACAO	88	6,7	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	2	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1993					
LAG501	AGRICULTURA I	88	6,6	4		AP
LCT558	TECNOLOGIA SUCRO-ALCOOLEIRA					
	BASICA	80	5,5	4		AP
LER332	MECANICA E MAQUINAS MOTORAS	100	6,2	3		AP
LE1430	PRAGAS DAS PLANTAS					
	CULTIVADAS	88	6,3	4		AP
LGN477	PRINCIPIOS GENETICOS EM					
	BIOTECNOLOGIA	100	8,3	4		AP
LH0524	HORTICULTURA	90	6,5	4		AP
LQI512	BIOQUIMICA EXPERIMENTAL	94	6,2	4		AP
LZ0313	ANATOMIA E FISIOLOGIA ANIMAL	93	6,0	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			31		
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1993					
LAG502	AGRICULTURA II	97	6,9	4		AP
LBU600	ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS	94	5,2	4		AP
LCT554	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	93	5,1	4		AP
LER432	MAQUINAS E IMPLEMENTOS					
	AGRICOLAS	87	6,7	4		AP
LES229	SOCIOLOGIA E EXTENSAO RURAL	88	7,5	2		AP
LES333	ECONOMIA AGRICOLA	87	6,6	4		AP
LGN617	ECOLOGIA DE POPULACOES	94	5,0	4		AP
LZ1427	ZOOTECNIA I - MELHORAMENTO					
	ZOOTECNICO	81	6,6	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30		

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIPL ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 4 !
 ! USP ! DATA DA EMISSÃO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1787835 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: JUAN LUCAS ARGUESO GOMES DE ALMEIDA !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
LCF581	SILVICULTURA	81	8,1	4		AP
LCT685	TECNOLOGIA DO ALCOOL		0,0			TR
LER418	CONSTRUÇÕES RURAIS	94	7,7	4	1	AP
LER471	HIDRAULICA	94	5,3	4		AP
LGN449	GENÉTICA QUANTITATIVA	80	9,3	4		AP
LHD670	CONTROLE DAS PLANTAS					
	DANINHAS	96	5,9	4	1	AP
LZ1432	ZOOTECNIA II (RUMINANTES)	93	6,1	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			24	2	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
BMP101	METODOLOGIA DO DNA					
	RECOMBINANTE E EXPRESSÃO					
	GENICA	100	10,0	8		AP
LAG508	PLANTAS ALIMENTÍCIAS I	81	7,2	4		AP
LC1690	MICROBIOLOGIA E DETERIORAÇÃO					
	DE ALIMENTOS	88	6,3	4		AP
LER571	IRRIGAÇÃO E DRENAGEM	88	5,5	4		AP
LH0528	FRUTICULTURA I	90	6,6	4		AP
LME602	ESTATÍSTICA EXPERIMENTAL	87	5,4	5		AP
LS0650	MICROBIOLOGIA DO SOLO	100	6,2	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			33		
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
011601	RESIDÊNCIA AGRÔNOMICA	100	0,0			RN
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					
*****	CUMPRIU					
	PRÁTICA ESPORTIVA DE ACORDO					
	COM A LEGISLAÇÃO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			230	16	

! AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS ! CA = CREDITO AULA !
 ! MA: MATRICULADO NC: NÃO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC: RECUPERAÇÃO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS !
 ! RN: REPROVADO POR NOTA IR: TRANC EM DISCIPL ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS !

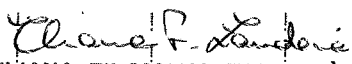
! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 5 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1787835 !

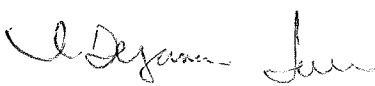
! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
! ALUNO: JUAN LUCAS ARGUESO GOMES DE ALMEIDA !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:03930					
*****	MEDIA PONDERADA DAS DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO OBTVE APROVACAO: 6,62 (NAO INCLUI NOTAS DE AE)					
	SAG/525-95					

Piracicaba, 12 de julho de 1995.


ELIANA FILOMENA ZANDONÁ
Chefe da Seção de Eng. Agrônômica

V I S T O:


Raquel Degaspari Leite
Chefe Administrativo de Serviço
Graduação

! AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS ! CA = CREDITO AULA !
! MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
! RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS !
! RN: REPROVADO POR NOTA TR: TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS !

! PARA USO DA UNIDADE !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 3674176 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
! ALUNO: LEANDRA MARIA SCARPARI !
! FILIACAO: EDUIR JOSE SCARPARI !
! ELIZA DA CRUZ SCARPARI !
! LOCAL DE NASCIMENTO: PIRACICABA SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 22/04/74 IDENTIF: SP RG 235435302 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: !
! DATA DA EMISSAO: !
! REPARTICAO EXPEDIDORA: !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 237228540183 UF: SP ZONA: 93 SECAO: 74 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: EEPSE PROF JOSE DE MELLO MORAES !
! ANO DA CONCLUSAO: 91 !
! SEDE: PIRACICABA !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1994 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 23 !
! MATEMATICA: 01,7 FISICA : 05,0 QUIMICA : 05,9 !
! BIOLOGIA : 08,4 PORTUGUES : 09,2 REDACAO : 03,8 !
! HISTORIA : 05,0 GEOGRAFIA : 04,2 INGLES : 00,9 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
! !
! !

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
! !
! !
! !
! !
! !
! !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 2 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 3674176 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: LEANDRA MARIA SCARPARI !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA VEGETAL	100	9,1	4	1	AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	86	7,6	5		AP
LME120	CALCULO I	93	7,7	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	97	6,4	5	1	AP
LSU113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	100	9,3	2	1	AP
LSU118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	96	7,9	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	4	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	93	8,0	4	1	AP
LFM200	FISICA	100	8,0	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	86	7,4	5		AP
LME220	CALCULO II	93	7,1	4	1	AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	87	8,0	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	100	8,2	4		AP
LSU218	PEDOLOGIA	93	6,1	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	88	6,6	4		AP
LER340	TOPOGRAFIA BASICA	100	6,4	6		AP
LFM306	METEOROLOGIA AGRICOLA	83	8,6	4		AP
LF1321	MICROBIOLOGIA	93	8,6	4		AP
LME210	ESTATISTICA GERAL	93	7,5	4		AP
LSO319	FERTILIDADE DO SOLO	87	7,7	4		AP
LZO212	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	93	7,5	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30		
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					

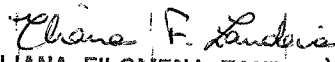
! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA !R:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ ! 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA ! 010 !
 ! ALUNO: LEANDRA MARIA SCARPARI !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	CUMPRIU					
	PRATICA ESPORTIVA DE ACURDO					
	COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			85	8	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:01515					
*****	MEDIA PONDERADA DAS					
	DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO					
	OBTEVE APROVACAO: 7,59					
	(NAO INCLUI NOTAS DE AE)					
	SAG/526-95					

Piracicaba, 12 de julho de 1995.


 ELIANA FILOMENA ZANDONÁ
 Chefe da Seção de Eng. Agrônômica

V I S T O:


 Raquel Degaspari Leite
 Chefe Administrativo de Serviço
 Graduação

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 10:29 ! 3673604 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
! ALUNO: MAURICIO PIRES MACHADO BARBOSA !
! FILIACAO: JOSE LUIS BARBOSA !
! NOEMIA PIRES MACHADO BARBOSA !
! LOCAL DE NASCIMENTO: PIRACICABA SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 02/06/76 IDENTIF: SP RG 267556741 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: CERTIFICADO DE DISPENSA !
! DATA DA EMISSAO: 01/08/94 NUM: 141222369029 SERIE: CATEGORIA: !
! REPARTICAO EXPEDIDORA: MINISTERIO DO EXERCITO !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 237279470191 UF: SP ZONA: 93 SECAD: 125 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: EEPSE MUN SENHOR JERONIMO GALLO !
! ANO DA CONCLUSAO: 93 !
! SEDE: PIRACICABA !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1994 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 99 !
! MATEMATICA: 02,1 FISICA : 03,8 QUIMICA : 02,1 !
! BIOLOGIA : 06,3 PORTUGUES : 03,4 REDACAO : 03,1 !
! HISTORIA : 05,9 GEOGRAFIA : 03,4 INGLES : 05,9 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
! !
! !

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
! !
! !
! !
! !
! !
! !

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 2 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR ! 11/07/95 10:29 ! 3673604 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ ! 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA ! 010 !
 ! ALUNO: MAURICIO PIRES MACHADO BARBOSA !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA VEGETAL	100	7,6	4	1	AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	88	6,8	5		AP
LME120	CALCULO I	90	7,5	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	93	6,0	5	1	AP
LSO113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	94	8,1	2	1	AP
LSO118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	91	6,7	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	4	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	96	7,6	4	1	AP
LFM200	FISICA	100	6,7	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	100	6,7	5		AP
LME220	CALCULO II	93	7,8	4	1	AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	85	7,7	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	100	6,7	4		AP
LSU218	PEDOLOGIA	93	6,9	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	94	6,7	4		AP
LER340	TOPOGRAFIA BASICA	95	5,5	6		AP
LES130	CIENCIA CONCEPCAO E METODOLOGIA	87	7,7	2		AP
LFM306	METEOROLOGIA AGRICOLA	90	5,3	4		AP
LFT321	MICROBIOLOGIA	93	7,8	4		AP
LME210	ESTATISTICA GERAL	88	7,4	4		AP
LZO212	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	90	6,4	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			28		

! AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS ! CA = CREDITO AULA !
 ! MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS !
 ! RN: REPROVADO POR NOTA TR: TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS !

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Pg 3
 USP DATA DA EMISSAO NO. USP
 HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 10:29 3673604

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: MAURICIO PIRES MACHADO BARBOSA

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					
*****	CUMPRIU					
	PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO					
	COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			83	8	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:01485					
*****	MEDIA PONDERADA DAS					
	DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO					
	OBTEVE APROVACAO: 6,92					
	(NAO INCLUI NOTAS DE AE)					
	SAG/527-95					

Piracicaba, 12 de julho de 1995.

Eliana Filomena Zandoná
 ELIANA FILOMENA ZANDONÁ
 Chefe da Seção de Eng. Agrônômica

V I S T O:

Raquel Degaspari Leite
 Raquel Degaspari Leite
 Chefe Administrativo de Serviço
 Graduação

AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 2955619 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
! ALUNO: PATRICIA POMPERMAYER !
! FILIACAO: WALTER PEDRO POMPERMAYER !
! ROSA MARIA TOLINI POMPERMAYER !
! LOCAL DE NASCIMENTO: PIRACICABA SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 10/12/74 IDENTIF: SP RG 252854512 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: !
! DATA DA EMISSAO: !
! REPARTICAO EXPEDIDORA: !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 23/156020141 UF: SP ZONA: 93 SECAO: 2 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: COLEGIO CIDADE DE PIRACICABA PSG !
! ANO DA CONCLUSAO: 92 !
! SEDE: PIRACICABA !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1993 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 182 !
! MATEMATICA: 01,0 FISICA : 03,6 QUIMICA : 04,0 !
! BIOLOGIA : 04,0 PORTUGUES : 06,8 REDACAO : 08,0 !
! HISTORIA : 03,6 GEOGRAFIA : 01,8 INGLES : 06,0 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
! !
! !

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
! !
! !
! !
! !
! !
! !
! !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 2 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 2955619 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: PATRICIA POMPERMAYER !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1993					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA VEGETAL	100	7,9	4	1	AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	100	6,3	5		AP
LME120	CALCULO I	100	7,8	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	100	7,4	5	1	AP
LS0113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	100	9,1	2	1	AP
LS0118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	100	6,0	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	4	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1993					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	100	9,3	4	1	AP
LFM200	FISICA	100	8,0	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	93	7,5	5		AP
LME220	CALCULO II	90	7,1	4	1	AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	100	9,5	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	100	5,4	4		AP
LS0218	PEDOLOGIA	100	7,2	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	99	5,7	4	1	AP
LER228	TOPOGRAFIA I	100	6,3	4	1	AP
LFM405	METEOROLOGIA AGRICOLA	100	6,4	4		AP
LFT321	MICROBIOLOGIA	98	7,1	4		AP
LME420	ESTATISTICA GERAL	100	7,7	4	1	AP
LS0319	FERTILIDADE DO SOLO	97	6,0	5		AP
LZO112	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	97	6,7	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	3	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LER329	TOPOGRAFIA II	100	5,7	4	1	AP
LES333	ECONOMIA AGRICOLA	94	6,6	4		AP
LE1322	ENTOMOLOGIA GERAL	100	7,8	4		AP

! AP:APROVADO AE:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! MA:MATRICULADO NC:NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC:RECUPERACAO RF:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 3 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 2955619 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !
 ! ALUNO: PATRICIA POMPERMAYER !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
LF1424	FITOPATOLOGIA	100	8,2	4		AP
LGN413	MELHORAMENTO GENETICO	100	6,6	4		AP
LQI420	NUTRICAO MINERAL DAS PLANTAS	100	6,0	4	1	AP
LSO409	ADUBOS E ADUBACAO	100	5,0	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			29	2	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LAG501	AGRICULTURA I	97	5,9	4		AP
LCT444	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	100	8,9	4		AP
LCT458	TECNOLOGIA SUCRO-ALCOOLEIRA					
	BASICA	93	6,1	2		AP
LER332	MECANICA E MAQUINAS MOTORAS	93	6,8	2		AP
LET430	PRAGAS DAS PLANTAS					
	CULTIVADAS	100	7,8	4		AP
LGN477	PRINCIPIOS GENETICOS EM					
	BIOTECNOLOGIA	100	8,5	4		AP
LHO505	HORTICULTURA I	94	7,2	4		AP
LZU313	ANATOMIA E FISIOLOGIA ANIMAL	100	6,8	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			28		
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					
*****	CUMPRIU					
	PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO					
	COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			142	13	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:02520					
*****	MEDIA PONDERADA DAS					
	DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO					
	OBTEVE APROVACAO: 7,08					
	(NAO INCLUI NOTAS DE AE)					

! A:APROVADO A:APROVEITAMENTO DE ESTUDOS! CA = CREDITO AULA !
 ! M:MATRICULADO N:NAO COMPAECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! R:RECUPERACAO R:REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS!
 ! RN:REPROVADO POR NOTA TR:TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS!

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 1 !
! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
! HISTORICO ESCOLAR 11/07/95 09:47 ! 1782186 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11 !
! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010 !

! ALUNO: PAULA MARQUES MEYER !
! FILIACAO: JOSE ESTEVO MEYER !
! MARIA APARECIDA DE ARAUJO MARQUES MEYER !
! LOCAL DE NASCIMENTO: BAURU SP !
! DATA DE NASCIMENTO: 18/01/73 IDENTIF: SP RG 22010892 !
! NACIONALIDADE: BRASILEIRA !

! SERVICIO MILITAR !
! DOCUMENTO APRESENTADO: !
! DATA DA EMISSAO: !
! REPARTICAO EXPEDIDORA: !

! TITULO ELEITORAL !
! NUMERO DO DOCUMENTO: 186733100116 UF: SP ZONA: 300 SECAO: 110 !

! CURSO DE SEGUNDO GRAU OU EQUIVALENTE !
! ESTABELECIMENTO: EPSG (RISTAO DE ATHAIDE) !
! ANO DA CONCLUSAO: 90 !
! SEDE: BAURU !

! CONCURSO VESTIBULAR !
! ANO DE REALIZACAO: 1991 CLASSIFICACAO NA CARREIRA: 179 !
! MATEMATICA: 04,0 FISICA : 03,2 QUIMICA : 05,2 !
! BIOLOGIA : 04,0 PORTUGUES : 03,6 REDACAO : 03,0 !
! HISTORIA : 01,8 GEOGRAFIA : 03,6 INGLES : 04,4 !
! APTIDAO : 00,0 !

! OBSERVACOES: !
! !
! !

! DIPLOMA DE _____ !
! DATA DA COLACAO DE GRAU: _____ DATA DE CONCLUSAO: _____ !
! DATA DA EXPEDICAO DO DIPLOMA: _____ !

! PARA USO DA UNIDADE !
! !
! !
! !
! !
! !
! !
! !

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Pg 2
 USP DATA DA EMISSÃO NO. USP
 HISTORICO ESCULAR 11/07/95 09:47 1782186

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: PAULA MARQUES MEYER

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1991					
*****	ENGENHARIA AGRONOMICA					
LBO103	MORFOLOGIA E ANATOMIA VEGETAL	97	5,9	4		AP
LGN114	BIOLOGIA CELULAR	100	7,0	5		AP
LME120	CALCULO I	90	6,0	4	1	AP
LQI108	QUIMICA INORGANICA E ANALITICA	100	6,7	5	1	AP
LSG113	INTRODUCAO A ENGENHARIA AGRONOMICA	82	8,8	2	1	AP
LSG118	MINERALOGIA E PETROLOGIA	96	6,5	5		AP
LZU112	ZOOLOGIA GERAL E PARASITOLOGIA	86	5,3	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	3	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1991					
LBO204	BOTANICA SISTEMATICA	93	8,1	4	1	AP
LER228	TOPOGRAFIA I	78	6,6	4	1	AP
LFM200	FISICA	91	7,9	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	89	0,8			RN
LME220	CALCULO II	80	7,5	4	1	AP
LQI208	BIOQUIMICA	80	5,7	4		AP
LSG218	PEDOLOGIA	79	6,2	5	1	AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			25	4	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1992					
LBO311	FISIOLOGIA VEGETAL	88	6,4	4	1	AP
LER329	TOPOGRAFIA II	94	5,0	4	1	AP
LES300	CIENCIA: CONCEPCAO E METODOLOGIA	100	8,4	2	2	AP
LFM405	AGROMETEOROLOGIA	91	5,4	4		AP
LFI321	MICROBIOLOGIA	91	6,4	4		AP
LME420	ESTATISTICA GERAL	100	6,4	4	1	AP
LSU319	FERTILIDADE DO SOLO	89	5,2	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			27	5	

AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 RN: REPROVADO POR NOTA TR: TRANC EM DISCIPL VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

! UNIVERSIDADE DE SAO PAULO ! Pg 3 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR ! 11/07/95 09:47 ! 1782186 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ ! 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA ! 010 !
 ! ALUNO: PAULA MARQUES MEYER !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1992					
LCT554	TECNOLOGIA DE ALIMENTOS	94	8,3	4		AP
LET322	ENTOMOLOGIA GERAL	100	6,7	4		AP
LFI424	FITOPATOLOGIA	96	7,2	4		AP
LGN215	GENETICA GERAL	100	7,7	5		AP
LME430	PROCESSAMENTO DE DADOS	80	8,2	4	1	AP
LQI420	NUTRICAO MINERAL DAS PLANTAS	94	7,4	4	1	AP
LSO409	ADUBOS E ADUBACAO	95	6,3	5		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	2	
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1993					
LAG501	AGRICULTURA I	84	7,3	4		AP
LCT558	TECNOLOGIA SUCRO-ALCOOLEIRA					
	BASICA	80	7,2	4		AP
LER332	MECANICA E MAQUINAS MOTORAS	93	7,1	3		AP
LES333	ECONOMIA AGRICOLA	96	6,5	4		AP
LES603	ESTUDO DE PROBLEMAS					
	BRASILEIROS I	100	9,5	1		AP
LET430	PRAGAS DAS PLANTAS					
	CULTIVADAS	94	9,0	4		AP
LET633	INSETOS UTEIS	100	8,1	4		AP
LHOS24	HORTICULTURA	89	9,0	4		AP
LZO313	ANATOMIA E FISIOLOGIA ANIMAL	90	7,3	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			32		
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1993					
LAG502	AGRICULTURA II	88	7,4	4		AP
LBO600	ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS	94	7,7	4		AP
LER432	MAQUINAS E IMPLEMENTOS					
	AGRICOLAS	90	8,4	4		AP
LGN413	MELHORAMENTO GENETICO	94	8,5	4		AP
LHOS28	FRUTICULTURA I	90	7,8	4		AP
LZO493	FISIOLOGIA ANIMAL APLICADA	100	8,1	4		AP
LZI427	ZOOTECNIA I - MELHORAMENTO					
	ZOOTECNICO	81	7,7	4		AP
LZI442	NUTRICAO ANIMAL	94	7,0	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			32		

! AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS ! CA = CREDITO AULA !
 ! MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS !
 ! RN: REPROVADO POR NOTA TR: TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS !

! PARA USO DA UNIDADE !

! UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ! Pg 4 !
 ! USP ! DATA DA EMISSAO ! NO. USP !
 ! HISTORICO ESCOLAR ! 11/07/95 09:47 ! 1782186 !

! ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ ! 11 !
 ! CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA ! 010 !
 ! ALUNO: PAULA MARQUES MEYER !

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1994					
LCF581	SILVICULTURA	94	6,6	4		AP
LCT660	PRINCIPIOS E METODOS DE CONSERVACAO DE ALIMENTOS	88	6,9	2		AP
LER418	CONSTRUCOES RURAIS	94	9,0	4	1	AP
LER471	HIDRAULICA	100	7,5	4		AP
LHD670	CONTROLE DAS PLANTAS DANINHAS	88	8,3	4	1	AP
LS0623	ADUBACAO E NUTRICAO DE PLANTAS CULTIVADAS	93	8,3	4		AP
LZ1432	ZOOTECNIA II (RUMINANTES)	87	6,9	4		AP
LZ1696	BIOTECNOLOGIA ANIMAL	80	9,0	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			30	2	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1994					
LAG509	PLANTAS ALIMENTICIAS II	100	6,7	4		AP
LER571	IRRIGACAO E DRENAGEM	100	5,8	4		AP
LZ1651	ALIMENTACAO DE BOVINOS LEITEIROS	88	6,3	4		AP
LZ1652	MANEJO DE BOVINOS LEITEIROS	87	7,0	4		AP
LZ1666	ZOOTECNIA E BIOLOGIA DE ANIMAIS SILVESTRES	100	8,1	4		AP
LZ1694	CUNICULTURA	93	8,4	4		AP
LZ1697	FORMULACAO E PREPARACAO DE RACOES	87	8,6	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			28		
*****	PRIMEIRO SEMESTRE DE 1995					
LAG504	PLANTAS ESTIMULANTES	94	9,0	4		AP
LCF591	MANEJO DA FAUNA SILVESTRE	81	7,2	4	1	AP
LCT662	BIOTECNOLOGIA DE ALIMENTOS E BEBIDAS	87	9,3	4		AP
LES129	SOCIOLOGIA E EXTENSAO RURAL	86	8,5	2		AP
LHD645	FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS	94	7,3	4		AP
LZ1648	MANEJO DA REPRODUCAO E DA INSEMINACAO ARTIFICIAL	100	10,0	4		AP

! AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS ! CA = CREDITO AULA !
 ! MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU ! CT = CREDITO TRABALHO !
 ! RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA ! VALOR DE 1 CA = 15 HORAS !
 ! RN: REPROVADO POR NOTA !R: TRANC EM DISCIP ! VALOR DE 1 CT = 30 HORAS !

! PARA USO DA UNIDADE !
 !

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ 11
 CURSO: ENGENHARIA AGRONOMICA 010
 ALUNO: PAULA MARQUES MEYER

CODIGO	NOME DA DISCIPLINA	FREQ	NOTA	CA	CT	RESULT
L27650	BOVINOCULTURA DE CORTE	93	6,7	4		AP
*****	CREDITOS ACUM. NO SEM			26	1	
*****	SEGUNDO SEMESTRE DE 1995					
*****	MATRICULADO					
*****	CUMPRIU					
	PRATICA ESPORTIVA DE ACORDO					
	COM A LEGISLACAO VIGENTE					
*****	TOTAL CREDITOS ACUMULADOS			260	17	
*****	CARGA HORARIA ACUMULADA:04410					
*****	MEDIA PONDERADA DAS					
	DISCIPLINAS EM QUE O ALUNO					
	OSTEVE APROVACAO: 7,32					
	(NAO INCLUI NOTAS DE AE)					

SAG/529-95

Piracicaba, 12 de julho de 1995.

Eliana R. Zandoná
 ELIANA FILOMENA ZANDONÁ
 Chefe da Seção de Eng. Agrônômica

V I S T O:

Raquel Degaspari Leite
 Raquel Degaspari Leite
 Chefe Administrativo de Serviço
 Graduação

AP: APROVADO AE: APROVEITAMENTO DE ESTUDOS CA = CREDITO AULA
 MA: MATRICULADO NC: NAO COMPARECEU CT = CREDITO TRABALHO
 RC: RECUPERACAO RF: REPROVADO POR FREQUENCIA VALOR DE 1 CA = 15 HORAS
 RN: REPROVADO POR NOTA TR: TRANC EM DISCIPLINA VALOR DE 1 CT = 30 HORAS

PARA USO DA UNIDADE

ENTREVISTA REALIZADA COM O PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO
DIRETOR DA ESALQ - GESTÃO 1994
10 DE JUNHO DE 1994

1. Objetivo:

Conhecer com maiores detalhes a implantação do Núcleo de Apoio à Biologia Celular e Molecular na Agricultura (BIOCEMA).

2. Conclusões:

- O Núcleo de Apoio à Biologia Celular e Molecular na Agricultura (BIOCEMA) foi implantado na ESALQ em 1986, supervisionado pelos professores pesquisadores Carlos Alberto Labate e Luiz Lehmann Coutinho, com o propósito de integrar os diversos pesquisadores envolvidos na área distribuídos nos diversos departamentos do campus, pois estes não apresentavam objetivos em comum.
- O BIOCEMA não cumpriu seus objetivos, uma vez que a USP não demonstra interesse em investir na área agropecuária.

ENTREVISTA COM O PROF. DR. LUIZ LEHMANN COUTINHO
PROF. TITULAR DO DEPTO. DE ZOOTECNIA
15 DE JUNHO DE 1994

1. Objetivo

Conhecer com maiores detalhes a implantação do Núcleo de Apoio à Biologia Celular e Molecular na Agricultura (BIOCEMA).

2. Conclusões

- A USP não apóia mais Centros de Pesquisa e sim Núcleos de Apoio à Pesquisa.
- A criação do BIOCEMA teve por objetivo unir forças para organizar cursos, simpósios e fornecer treinamento na área de Biologia Celular e Molecular.
- A proposta quando enviada à USP sofreu fortes críticas, consideradas infundadas.
- Uma das importâncias do BIOCEMA seria a maior facilidade no recebimento de investimentos por parte de empresas privadas, pois estas valorizam trabalhos desenvolvidos em equipe.

Relatório referente à viagem ao Rio de Janeiro

Período: 3/05/95 a 6/05/95

Participantes: Flavio C. A. Tavares (tutor), Elaine C. Castelhana, Elizabeth Bilsland, Fernando M. Sampaio, Gildemberg A. Leal Jr., Irving J. Berger, Jefferson W. de Gaspari, Juan Lucas Argueso G. de Almeida, Leandra M. Scarpari, Maurício P. Barbosa e Patrícia Pompermayer.

Objetivos: entrar em contato com pesquisadores e instituições de destaque bem como favorecer a integração entre os membros do grupo.

Visitas realizadas:

**Jardim Botânico:*

Local onde o Grupo pôde entrar em contato com diversas espécies vegetais de interesse agrônômico, ornamental, medicinal e florestal.

Além do aspecto botânico, o parque dispõe de importantes marcos históricos, como, por exemplo, a antiga sede do Engenho Nossa Senhora de Conceição da Lagoa.

**Instituto Bio-manguinhos:*

No Instituto, o único produtor de vacina contra febre amarela da América Latina (80% da produção mundial), o Grupo acompanhou a fabricação da mesma.

A matéria prima básica para sua produção, são ovos de galinha embrionados. Os mesmos são produzidos sob condições assépticas pela Granja Resende (MG). Quando chegam ao Instituto, passam por uma desinfecção superficial antes de serem encubados a 37°C por 9 dias. Após esse período os mesmos são inspecionados para verificação da viabilidade dos embriões. Os ovos que passarem por essa seleção são inoculados com lotes sementes de estirpes atenuadas do vírus causador da doença, sendo então encubados por mais 72 horas. Depois desse período, os embriões são coletados, homogencizados até a formação de uma polpa embriônica. Esta é então centrifugada para que o sobrenadante possa ser liofilizado. Este produto é então embalado, rotulado e enviado aos postos de saúde. Para que o mesmo seja utilizado,

deve sofrer diluição em solução salina. Em geral, cada pastilha produzida pela liofilização, dissolvida em 25ml, equivale a cinquenta doses.

**Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ):*

Departamento de Imunologia:

O grupo foi recebido pela Dra. Marisa Morgado, chefe do Departamento, a qual apresentou as linhas de pesquisa sobre a Leishmaniose e o vírus HIV, realizadas no mesmo. Foi salientada a importância das diferentes estirpes do vírus na fabricação de vacinas e diagnóstico da doença. Isso ocorre, pois, devido à grande variabilidade da alça "V", vacinas desenvolvidas segundo os métodos convencionais para algumas estirpes podem não ser eficientes contra outros. Além disso, pacientes diagnosticados como soro negativos podem apresentar a doença. Por esse motivo, o Departamento realiza intensas pesquisas quanto aos tipos predominantes de HIV presentes no Brasil e restante da América Latina, que muito diferem das proporções que ocorrem nos EUA, Europa e principalmente em regiões da África, onde a doença apareceu a mais tempo.

Laboratório de Biologia Celular:

Neste laboratório, quem recebeu o Grupo foram as Dras. Helene Barbosa e Maria Nazaré Meireles. A primeira apresentou ao grupo as principais linhas de trabalho e alguns dos artigos publicados nos últimos anos pelos membros do Departamento. A principal linha de trabalho apresentada foi a de elaboração de modelos de infecção do *Trypanosoma cruzii* em fibroblasto de músculo cardíaco de embriões, sendo essas células cultivadas *in vitro*. Foram apresentados os mecanismos de invasão celular e destruição de miofibrilas, alteração na conformação dos vacúolos e saída do RNA do núcleo. Com caráter ainda mais ilustrativo, a Dra. Maria Nazaré Meireles simulou o preparo de amostras de *Toxoplasma* (emblocamento, coloração e microtomia) para sua posterior análise em microscópio eletrônico, o qual pôde ser manipulado pelos membros do Grupo.

Departamento de Parasitologia:

O Grupo foi recebido pela Dra. Patricia Azambuja, a qual trabalha com o modelo patógeno-vetor da Doença de Chagas. São mantidas no laboratório criações dos percevejos *Oncopeltus sp.* e Barbeiro. O primeiro é fitófago, podendo ser alimentado com os mais diversos materiais (no caso, o que é utilizado é girassol moído), além do fornecimento de água em abundância. Esta espécie não é exigente em temperatura, assim, o único cuidado especial para a procriação é a necessidade de canudos de gaze ligeiramente inclinados para a postura de ovos. A finalidade dessa

criação é o estudo da bioquímica, controle neuroendócrino, fisiologia, controle hormonal e os efeitos de substâncias extraídas de plantas sobre seu desenvolvimento e reprodução (fases do desenvolvimento, mecanismos de alimentação e postura)

A criação do Barbeiro, além das finalidades citadas para o *Oncopeltus sp.*, visa o estabelecimento de um modelo mais elaborado das interações patógeno-vetor, de fundamental importância para o controle da doença. Devido ao comportamento hematófago da espécie, sua criação já é um pouco mais complicada, pois implica num sistema de alimentação especial, a qual pode ser através do contato direto dos percevejos com as orelhas dos coelhos mantidos no laboratório ou através do fornecimento de sangue (humano, ovino, caprino, avícola, etc...) por meio de alimentadores especiais chamados de "mamadeiras". Além das maiores exigências quanto à alimentação, os barbeiros necessitam também de um maior controle da temperatura, para que possa ocorrer a postura e eclosão dos ovos.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular:

O Grupo foi recebido pela chefe do Departamento, a Dra. Iara Cseko, a qual apresentou algumas das linhas de pesquisa desenvolvidas nos laboratórios.

Sob sua responsabilidade, está sendo desenvolvido um projeto para estudo do mecanismo reprodutivo da *Leishmania sp.* intramacrófago e as proteínas atuantes nesse estágio, para poder interferir no processo e, futuramente, através de transfecção ou mutação gerar uma vacina para a Leishmaniose.

Outro estudo importante desenvolvido no mesmo laboratório é com relação a fitomonas, que são tripanossomatídeos que infectam muitas plantas, entre elas a mandioca e o dendê. Devido à transmissão da doença se dar por insetos vetores, sua disseminação é muito rápida e se torna fator limitante para a produção das espécies vegetais na região endêmica. O trabalho no laboratório está sendo realizado com estirpes isoladas de tomate, nas quais está sendo constatada a presença de uma rede especial de DNA na mitocôndria única de cada microrganismo. Essa rede é composta por um DNA circular grande e vários minúsculos (cerca de 1400pb), os quais tem a finalidade de editar o RNA feito a partir do DNA circular grande. Eles podem ser digeridos com enzimas de restrição e, através da corrida e análise de géis, possibilitar a formação de um padrão para diferenciação de linhagens, ou podem ser usados para PCR e sequenciados.

Sob a responsabilidade do Dr. Ricardo Garlei, estão projetos de estudos dos vírus da dengue e febre amarela bem como trabalhos em biologia molecular de vetor da malária. O Dr. Carlos Moréu pesquisa o diagnóstico da doença de Chagas por PCR, principalmente na forma crônica. O Dr. Giovane Dessimone realiza sequenciamento, modelagem e síntese de peptídeos, o que é extremamente importante para trabalhos com biologia molecular.

No laboratório do Dr. Wildegrav, estuda-se os componentes genéticos do câncer de mama, o diagnóstico de Leishmaniose e produz-se insumos para biologia

molecular, como *Taq*-polimerase e enzimas de restrição. Além dos pontos apresentados, o pesquisador merece especial destaque por estar envolvido no Projeto Genoma. Outro pesquisador do Departamento é o Dr. Samuel Goldemberg, que estuda o ciclo do *Trypanossoma cruzi* e as enzimas do seu metabolismo para a produção de quimioterápicos através da modelagem de proteínas.

Conclusões:

retorno à fiocruz

divulgação de cursos rápidos

PROGRAMA DE ATIVIDADES

No período da manhã serão realizadas palestras sobre:

-Desenvolvimento de trabalho em equipe

Palestrante: representante do Projeto DRI.

-Processo de seleção e perfil do profissional desejado pelas empresas.

Palestrante: Maria Luiza Nascimento.

-Experiências de um ex-bolsista PET.

Palestrante: Luiz Henrique Conti.

No período da tarde haverá discussões internas do Grupo, seguindo a ordem exposta na Pauta de Discussões.

Cada um dos itens propostos para discussão será de responsabilidade de um bolsista, o qual fará uma exposição inicial, seguido por um debate por todo o Grupo.

PAUTA DE DISCUSSÕES

- 1) Avaliação qualitativa do Grupo.
- 2) Avaliação do que foi feito e o que foi proposto para 1994.
- 3) Compatibilidade entre as Orientações Básicas do PET-CAPES e o Programa Anual do PET-BIOTECNOLOGIA.
- 4) Formas de Interação do Grupo com o corpo docente e discente e a participação do Grupo para a melhoria do ensino de graduação.
- 5) Estágio - como deve ser, quais os objetivos, acompanhamento do Grupo, etc.
- 6) Extensão - divulgação do PET e da Biotecnologia dentro e fora da ESALQ.
- 7) Compatibilidade entre o Programa PET e o profissional desejado pelas empresas.
- 8) Perfil do candidato desejado para o PET, bem como sugestões para melhorar o processo de seleção.
- 9) Sugestões para aprimorar a qualidade do desempenho do Grupo visando torná-lo mais eficiente e eficaz.
- 10) Planejamento de atividades para 1995/96 confrontando com os objetivos do PET.
- 11) Metodologia de acompanhamento interno.
- 12) Elaboração de um Regimento Interno para o PET - Biotecnologia.

PATENTEAMENTO DE SERES VIVOS

MESA REDONDA COM:

DAVID HATHAWAY -AS-PTA

PAULO VELHO -UNICAMP

CARLOS ROSSETO -IAC

MILTON KRIEGER-ESALQ

PAULO SODERO -ESALQ.

DIA 08/06 ÀS 19:00 H NO MARACANÃ

**PROMOÇÃO: LABORATÓRIO DE SEMENTES DO DEPARTAMENTO
DE ENGENHARIA FLORESTAL, PET- ECOLOGIA E PET
BIOTECNOLOGIA.**

III CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

16 de Setembro de 1994

Departamento de Genética
ESALQ/USP

**PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO
EM
BIOTECNOLOGIA
CAPES**

PROMOÇÃO: PET - BIOTECNOLOGIA

CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Local: Anfiteatro do Dept. Genética, ESALQ/USP

Data: 16/09/94 - Sexta-feira 8:30 - 18:30

Inscrições: R\$ 3,00

Informações pelo ☎(0194) 29-4100 r.4317



Palestras:

Biotecnologia na ESALQ/USP

Biotecnologia na FLEISCHMANN ROYAL

Biotecnologia na ALLTECH do BRASIL AGROINDUSTRIAL

Biotecnologia Vegetal na MONSANTO

Biosecurana no Brasil

Mesa Redonda:

"Liberaao de Produtos Transgênicos"

Os riscos e benefcios, sua aceitaao pelo consumidor, propostas de legislaao para o Brasil, potencial de mercado.

Participaao de representantes de empresas, pesquisadores e um advogado,

VAGAS LIMITADAS

**Apoio: BANESPA
NABISCO**

III CURSO DE ATUALIZAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Programa :

8:30 - 9:00	Inscrições
9:00 - 9:15	Abertura
9:15 - 10:15	Biotecnologia na Fleischmann - Royal Sr. Neil Hamilton Jr. Eng. Pesquisa e Desenvolvimento
10:15 - 10:45	Intervalo
10:45 - 11:45	Biotecnologia na ALLTECH do Brasil Sr. Aidan Connolly, Diretor
11:45 - 14:00	Intervalo para almoço
14:00 - 15:00	Biotecnologia Vegetal na Monsanto Sr. Alexandre Kossoy Rep. Desenvolvimento de Produtos
15:00 - 16:00	Biossegurança no Brasil Dr. Elibio Rech, CENARGEN - EMBRAPA
16:00 - 16:30	Intervalo
16:00 - 18:30	Mesa Redonda: "Liberação de Produtos Transgênicos" Coord.: Dra. Maria Lucia C. Vieira

Grupo PET - BIOTECNOLOGIA:

Elisabeth Bilslund
Irving Joseph Berger
Jefferson Willians de Gaspari
Juan Lucas Argueso
Luciana Viriato Saboya
Mario Cesar Sesso
Patricia Pompermayer
Paula Marques Meyer

Tutor: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO EM BIOTECNOLOGIA

A CAPES possui espalhados pelas mais destacadas unidades de ensino superior do Brasil cerca de 300 grupos PET. O Programa tem por objetivo formar, dentro destas escolas, profissionais diferenciados, com uma visão crítica e aprofundada da ciência. Os bolsistas PET/CAPES desenvolvem atividades que estimulam o trabalho em grupo, a capacidade de liderança e o desenvolvimento intelectual.

O Grupo PET-BIOTECNOLOGIA foi instituído na ESALQ/USP no ano de 1988, no Departamento de Genética. Desde então, o Grupo desenvolve uma série de atividades visando atingir os objetivos do Programa, incluindo participação em cursos e congressos, apresentação de seminários, estudo dirigido, extensão universitária, trabalhos de iniciação científica, etc.

Uma das atividades do Grupo que tem tido maior repercussão sobre a comunidade do campus e também de outras instituições é a realização anual do Curso de Atualização em Biotecnologia. Em sua terceira edição, o curso pretende apresentar uma visão empresarial da Biotecnologia, diferente daquela normalmente exposta nas salas de aula. Através deste enfoque objetivamos despertar o interesse dos estudantes por um ramo de atividade que, infelizmente, é visto desvinculado da produção e do mercado de trabalho. Em pesquisa realizada dentro do campus "Luiz de Queiroz" pelo Grupo PET-BIOTECNOLOGIA, constatou-se que os graduandos associam a Biotecnologia apenas à pesquisa e ao meio acadêmico, desconhecendo o aspecto econômico do setor, no Brasil e no exterior.

Reflexo da perplexidade do meio discente diante do impacto que a Biotecnologia gera sobre a sociedade, foi a pouca repercussão que produziu a liberação pelo FDA do primeiro produto transgênico no mercado para consumo humano, a variedade de tomateiro "Flavr Savr", da CALGENE, EUA. Este fato foi motivo de muitas discussões, debates e matérias nos mais importantes veículos de comunicação internacionais, não apenas no meio científico. Consideramos que questões como biosegurança e liberação de produtos transgênicos devem ser amplamente discutidas, no meio acadêmico e fora dele, devido ao grande impacto que este assunto causa na sociedade como um todo. É obrigação do Grupo PET incentivar este tipo de debate, uma vez que, de agora em diante, estas questões serão cada vez mais frequentes devido à rapidez com que as inovações estão surgindo.

A Mesa Redonda intitulada "Liberação de Produtos Transgênicos" visa discutir esse assunto de forma mais ampla possível. Para tanto foram convidados diversos setores envolvidos com o problema: representantes da iniciativa privada, expondo uma visão empresarial; do meio acadêmico, apresentando os riscos e benefícios e um advogado mostrando os aspectos legais envolvidos.

A definição de regras para o uso criterioso da Tecnologia do DNA Recombinante é o maior incentivo que as empresas podem ter para investir em produtos dessa categoria, gerando benefícios incalculáveis para a humanidade. Deste modo, as pesquisas serão norteadas em função das regras estabelecidas, correndo menor risco de investimento em produtos não aceitáveis ou seguros. Precisamos de um posicionamento claro no que se refere aos aspectos éticos, legais e científicos, antes que tenhamos que remediar os problemas que surgirão.

BIOTECNOLOGIA NA ALLTECH DO BRASIL AGROINDUSTRIAL

Sr. Aidan Connolly
Diretor da Alltech do Brasil

Uma panorâmica das técnicas, processos e produtos oferecidos para tentar resolver os problemas da produção animal no presente e no futuro.

Em uma entrevista recente se comentava que 17 anos depois do princípio da era da biotecnologia, existem na atualidade 1.200 empresas com um total de 80 mil empregados. Se é certo que a indústria está dominada por aqueles que têm objetivos terapêuticos (66%), não podemos nos esquecer que um claríssimo 9% está ocupado pelo setor agropecuário com vendas em 1992 estimadas em um pouco mais de 1 bilhão de dólares. É nesse âmbito da agricultura onde foram realizados os avanços mais significativos, ainda que os menos atrativos.

Nossa própria empresa, criada em 1980, é possivelmente um exemplo típico das muitas novas empresas que começaram. Aproximando-nos de nossos 14 anos de vida, este "adolescente" emprega agora 250 pessoas e exporta produtos a 60 países em todo o mundo. A pesquisa e desenvolvimento se concentram em dois centros de biociência, e muito em breve será inaugurado o terceiro centro na China. A companhia, orientada ao mercado através de seu próprio centro internacional de marketing, encontra-se em contato com os desenvolvimentos básicos desse campo e possivelmente está qualificada a fazer especulações sobre a direção que vai adotar a indústria.

O impacto da biotecnologia na alimentação animal tem sido muito significativo, tal como revela qualquer revisão dos temas debatidos recentemente em congressos sobre produção animal. Abundam títulos como os seguintes:

- | | |
|-----------------------------|---|
| - Imunomodulação | - Biocatalizadores enzimáticos |
| - Hormônios de crescimento | - Cepas de cultivo de levedura específicos para dieta |
| - Absorventes da Aflatoxina | - Fatores de tolerância a glicose |
| - Leveduras do cromo | - Selênio-Metionina |
| - Controle da contaminação | - Proteínatos minerais |

O leitor não informado poderia pensar que ministrar vitaminas, minerais e gorduras já não é interessante para os nutricionistas atuais. Mas está bem claro que não é assim, é certo que a atenção se há desviado a outros horizontes e seguirá fazendo a medida que a nova ciência da biotecnologia nos permita resolver problemas potencializando ao mesmo tempo a produtividade e reduzindo a contaminação.

O duplo papel das agências reguladoras que permitem a utilização de um novo produto, como ocorre no caso da recente aprovação do BST, ou limitando o uso de outro antiquado como a selenita sódica, também merece nossa atenção. Por conseguinte, uma revisão sobre o impacto da biotecnologia na produção animal é muito adequada. Apesar disso o campo é tão grande que seria impossível pensar em todos e em cada um dos avanços realizados até esta data. Por conseguinte, neste breve resumo citaremos apenas alguns dos temas mais importantes (Tabela 1).

TABELA 1. Alguns dos avanços mais importantes no campo da biotecnologia

- | | |
|---|--|
| - Ácidos e peptídeos baseados no Boro | - Biomoléculas vegetais |
| - Imunomoduladores vegetais e microbianos | - Absorventes de toxinas |
| - Modificadores da microflora intestinal | - Selênio orgânico |
| - Cromo orgânico | - Cultivos de leveduras específicos para dieta |
| - Enzimas específicas para substrato | - Ligantes de gases nocivos |
| - Fontes de proteínas ideais | |

Aminoácidos Baseados no Boro

A química do carbono pode ser chamada de química da vida, pois o carbono é fundamental para a nossa existência. Quando se combina com o nitrogênio, o hidrogênio e o

oxigênio, esse elemento constitui as moléculas mais básicas para a vida, como os aminoácidos, as proteínas e os ácidos nucléicos.

Apesar disso, nos últimos anos os cientistas começaram a pensar em um elemento que se encontra próximo ao carbono na tabela periódica dos elementos, o Boro. Tanto o boro como o carbono formam compostos simples com o hidrogênio. Se por uma parte é estruturalmente similar ao metano, o hidreto de boro tem uma carga negativa global e é particularmente sensível à hidrólise em água formando o ácido bórico. Contudo, os avanços realizados recentemente superaram esta carga negativa e foram produzidas biomoléculas de boro que atravessam a barreira da membrana muito mais facilmente que suas correspondentes do carbono.

Os novos análogos quadricordenados do boro, como a boroglicina, demonstram possuir efeitos anticancerosos e antibacterianos. Estes compostos indubitavelmente serão de interesse para a alimentação do gado a medida que nosso conceito de nutrição siga se ampliando.

Proteínas Ideais

Com os recentes avanços conseguidos na capacidade de produção de aminoácidos, como a lisina, os nutricionistas presenciaram uma diminuição espetacular no custo da formulação que inclui a lisina a níveis mais altos com um impacto direto na produtividade. Por outro lado, a contaminação ambiental devido aos desperdícios nitrogenados foi reduzida. O aumento da efetividade da lisina elevou-se a certo nível em muitas dietas onde o uso se restringiu devido aos seguintes aminoácidos limitados: Treonina e Triptofano.

Contudo, esta restrição durará pouco já que a biotecnologia está se preocupando agora com a produção desses aminoácidos de formas menos custosas. É muito provável pois que vejamos muito em breve a utilização sistemática na dieta desses três aminoácidos sintéticos.

A disponibilidade desses aminoácidos levanta também a questão de se deveria ou não ministrar-se alguns aminoácidos aos animais na forma de peptídeos. Sabe-se que os peptídeos são biologicamente mais ativos que os aminoácidos para algumas finalidades; efetivamente, muitos aminoácidos são absorvidos na forma de peptídeos. No futuro, graças a um melhor entendimento da atividade dos peptídeos, é possível que seja mais adequado uma combinação de aminoácidos, di, tri e tetrapeptídeos devido tanto a sua ação biológica como nutricional. Muitas das ações hormonais que são produzidas em nosso corpo estão sob o controle desses peptídeos, e sabe-se que os complexos minerais peptídicos são muito importantes.

Biomoléculas Derivadas das Plantas

O reino vegetal possui uma longa história como fonte de fármacos úteis, que vão desde a morfina e a codeína a medicamentos contra a leucemia derivados de alcalóides naturais e de terpinas. Na atualidade se conhecem milhares de espécies vegetais e ainda assim, apenas uma pequena porcentagem das mesmas têm sido examinada para a determinação de seu potencial no melhoramento do crescimento dos animais. Também vale a pena indicar que a perda de milhares de acres de selva tropical significa que muitas plantas importantes talvez não possam mais ser usadas em benefício do homem.

Em nossa empresa estamos estudando uma planta que cresce no deserto, a *Yucca schidigera*. Foi identificado um componente dessa planta que possui a capacidade de tamponar e reduzir os gases nocivos como o amoníaco. O impacto desse acontecimento na indústria tem sido espetacular, cada vez existem mais empresas que utilizam esse material para reduzir significativamente o nível de amônio, tanto nas unidades de estabulação como nas lagoas anaeróbicas. Talvez o impacto mais espetacular que houve foi sobre aquelas zonas onde os animais são produzidos em altitudes consideráveis e onde a ascite é um elemento importante que contribui para a mortalidade.

Contudo a aplicação desta planta não se limita à redução da ascite. Sua incorporação às dietas de qualquer tipo, desde as dietas para suínos, para aves e para os animais de estimação tem levado uma melhoria no rendimento e na saúde. Como se calcula que a eficiência média do suíno pode ser reduzida até 0,2 unidade devido à prática da castração, o uso do extrato de *Yucca* poderia ter um impacto econômico significativo. Resulta sumamente atrativo pensar que talvez o uso desse extrato de planta poderia contribuir para apaziguar não somente aos defensores do

meio ambiente mediante a redução na contaminação, mas também aos defensores dos direitos dos animais, melhorando as condições de vida dos mesmos.

Imunomoduladores

O controle dos patógenos intestinais têm sido durante muito tempo um objetivo dos produtores de gado e dos microbiologistas. Os métodos para conseguir o dito objetivo inclui a utilização de antibióticos, a acidificação da água potável e a exclusão competitiva dos patógenos utilizando pró-bióticos. Contudo mais recentemente tem se utilizado hidratos de carbono complexos baseados na frutose, manose e galactose para manipular a microbiota intestinal.

Como os hidratos de carbono dominam a superfície das células eucarióticas, desempenham um papel importante na interação celular. Entre os hidratos de carbono complexos mais interessantes estudados recentemente estão os extraídos de *Saccharomyces cerevisiae*. O açúcar se chama oligossacarídeo de manana e é constituído por uma cadeia longa de manana, extraída da parede celular. Sabe-se que a parede da célula contém três grupos importantes: um polissacarídeo de manose, um de glucose e uma proteína. A incorporação na ração do oligossacarídeo de manana tem demonstrado respostas de rendimento associadas a uma redução dos problemas patológicos. Em piscicultura, foi observado uma redução significativa da mortalidade quando os peixes jovens são submetidos à uma ação bacteriana. Em suínos, é reduzida a diarreia e é melhorada a eficiência da ração. Também tem se observado melhora no rendimento dos bezerros e dos frangos.

Ao buscar as possíveis razões para essas melhoras, os pesquisadores têm demonstrado que o oligossacarídeo de manana atua em benefício do animal de três formas distintas: devido à presença da manose, ele é capaz de bloquear a colonização de patógenos; a resposta imune não específica, se vê potencializada melhorando a resistência do animal às enfermidades; as bactérias úteis como as do ácido láctico e o *Streptococcus* contém um sistema enzimático capaz de utilizar a manana, proliferando em presença da manose enquanto os patógenos não o fazem.

Outra aplicação do oligossacarídeo de manana tem sido para reduzir o crescimento dos mofo e fungos dos cereais.

Absorventes de Toxina

As recentes inundações ocorridas no meio oeste norteamericano, voltaram a dirigir as atenções dos nutricionistas para os mofo e especificamente para as toxinas produzidas pelos mesmos. De especial interesse este ano são as fusariotoxinas nos suínos e a aflatoxina nos frangos. Quando no passado se deram níveis altos das ditas toxinas, uma observação de campo foi de que o cultivo de levedura tendia a aliviar os sintomas. Recentes estudos universitários indicaram que a parede celular das leveduras pode absorver as toxinas. Um estudo em que se incorporou à ração níveis crescentes de aflatoxina demonstrou que os efeitos deletérios podem ser contrabalançados mediante o uso de níveis crescentes de levedura. Ainda que o mecanismo de ação esteja por ser identificado, esta nova aplicação possui uma grande importância comercial.

Selênio Orgânico

Poucos elementos podem suscitar respostas mais conflitantes que o selênio. Por um lado, ele tem sido muito bem acolhido pelos nutricionistas humanos e pelos médicos como elemento importantíssimo na luta contra o câncer. É muito respeitado pelos nutricionistas animais pelo impacto em várias funções fisiológicas, incluindo a fertilidade. Por outro lado, os órgãos reguladores dos Estados Unidos estão preocupados devido às suspeitas de influências negativas ao meio ambiente.

Ao setor agropecuário foi concedido um ano durante o qual deveria-se reduzir os níveis de selênio presente na ração de 0,3 para 0,1 ppm, independentemente de sua adequação a saúde e rendimento.

Com esta limitação, os cientistas têm buscado uma forma de selênio que seja mais aceitável pelas autoridades reguladoras e que seja mais efetivo para os animais. O resultado foi o desenvolvimento do selênio orgânico em forma de levedura de selênio. Desta forma, o selênio presente predominantemente como metionina de selênio parece ser de 4 a 6 vezes biologicamente

mais ativo que a forma inorgânica. Ao utilizá-lo em substituição à forma orgânica, observa-se melhoras na fertilidade e redução na mastite.

Levedura de Cromo

A levedura tem também contribuído para o desenvolvimento de aplicações de outro mineral, o cromo. Ainda que se saiba que o cromo é um nutriente essencial, nunca foram definidos os níveis exigidos do mesmo. Seu papel como fator de tolerância à glucose e a potencialização da insulina têm suscitado muito interesse quando existe preocupação sobre a fisiologia dos animais em engorda. Pensa-se agora que o cromo é limitante se considerarmos as alterações na genética e a densidade da dieta que se tem produzido nos últimos vinte anos.

Proporcionar formas biodisponíveis do cromo e assegurar a segurança (perdoando a redundância), são os dois objetivos primordiais na hora de adicionar o nutriente a dieta. O cromo é considerado um metal pesado tóxico. Se isso é certo para o cromo exavalente, cabe dizer que somente o cromo trivalente possui ação biológica como fator de tolerância à glucose, e a toxicidade do cromo trivalente é pouco preocupante. Dispõe-se apenas de fontes inorgânicas de cromo, contudo o complexo de levedura de Cr+3 pode aumentar sua disponibilidade de 25 para 30%. As fontes de Cr+3 orgânico adicionadas à ração melhoram a deposição de carne magra em suínos e potencializam a resposta imune e o rendimento do gado que se acha em condições desfavoráveis.

Ao tentar superar os altos níveis de oligoelementos inorgânicos que são fornecidos em pequena quantidade para conseguir um efeito determinado, os nutricionistas têm recorrido ao uso de quelatos minerais e proteinatos. Nestas formas, o mineral fixa-se a um peptídeo que o protege durante sua passagem pelo estômago e com isso aumenta sua absorção. O efeito líquido tem sido um fluxo coerente de resultados positivos quando se inclui os ditos produtos na alimentação animal. Entre os mais importantes se encontra o uso do Bioplex Zinc que parece potencializar a resistência da vaca leiteira à mastite. Quando se incorpora à dieta da vaca leiteira, tem se observado uma série de reduções na incidência de mastite. Do mesmo modo, tem melhorado a disponibilidade do cobre fornecendo-se proteinato de cobre no lugar de óxidos ou sulfatos.

Enzimas: A Aparição de Complexos Substratos-Específicos

Se um dos axiomas da bioquímica é adaptar a enzima ao substrato, esta reivindicação só foi adotada recentemente pela indústria de ração. Com o êxito dos grupos de pesquisa como o Enzyme Consortium no Rowett e os amplos ensaios realizadas em campo, as enzimas têm demonstrado serem ingredientes importantes para a ração. Utilizando um enfoque de blocos de construção, por assim dizer, pode-se ir construindo pacotes enzimáticos individuais que se adaptem às combinações de matérias primas na dieta. O resultado líquido tem sido uma onda de aplicações satisfatórias em muitos países de todo o mundo. As novas técnicas analíticas têm demonstrado agora que as enzimas são capazes de sobreviver até 80 - 85 C, o que permite uma utilização na maioria das rações granuladas.

Estas são algumas das aplicações da biotecnologia em nossa indústria de ração. Se o interesse da pesquisa se mantiver orientado ao mercado, aparecerão, sem dúvida, outras novas aplicações.

O que é biotecnologia ?

Biotecnologia poderia ser definida como qualquer técnica que use organismos vivos e seus componentes celulares, sub-celulares ou moleculares na criação e/ou modificação de produtos e processos para usos específicos. A biotecnologia, cronologicamente pode ser subdividida em duas fases:

- tradicional, com foco em fermentação, microorganismos e enzimas;
- nova, caracterizada pela manipulação de DNA e cultura celular, utilizando-se dos recursos da engenharia genética, que é o processo de manipulação de gens e reprodução de DNA's recombinates (r-DNA), que por sua vez são moléculas de DNA que foram abertas e recombinadas com informações genéticas alteradas.

Quais seriam os benefícios desta nova tecnologia na agricultura?

Obtenção de alimentos melhorados através de:

- melhor sabor
- resistência a insetos e doenças
- melhor aparência
- resistência a seca
- maior composição nutricional
- maturação acelerada / retardada
- maior tempo de armazenamento
- tolerância a herbicidas
- resistência a temperaturas extremas
- maiores áreas geográficas de desenvolvimento
- crescimento acelerado
- melhor utilização de nutrientes

Qual o tamanho deste mercado a nível mundial ?

Hoje, o mercado proveniente da biotecnologia gira ao redor de 1,3 bilhões de dólares. Especialistas acreditam que as vendas anuais decorrentes de produtos transgênicos representará no ano 2010 cerca de 50 bilhões de dólares apenas nos Estados Unidos e, em 2020, 100 bilhões de dólares.

Portanto, esta nova tecnologia representa à níveis práticos uma revolução na agricultura hoje existente. Através de seus recursos, a agricultura será com certeza uma atividade extremamente rentável e cada vez menos sujeita as incertezas decorrentes de fatores externos, tanto ambientais, como, principalmente, politico-econômicos.

Quais são as plantas trabalhadas geneticamente hoje?

Tomate	Milho	Soja
Algodão	Batata	Canola
Alface	Beterraba	Arroz
Repolho	Couve-flor	Ervilha
Girassol	Cenoura	Maçã
Morango	Uva	Alfafa
Lotus	Crisântemo	Aspargo
Kiwi	Petúnia	Amêndoa
Beringela	Aipo	Papaia
... entre outras.		

Quais são as principais empresas envolvidas a nível internacional?

MONSANTO	HOECHST
ZENECA	ASGROW
DELTA AND PINE	DUPONT
CALGENE	MITSUI TOATSU
CIBA GEIGY	DEKALB

Dentre as empresas mencionadas, a Calgene é a que obteve a primeira aprovação à nível mundial de um vegetal transgênico. Trata-se de um tomate geneticamente modificado, que apresenta maturação retardada, mantendo-se consistente por mais tempo e, conseqüentemente, facilitando seu armazenamento.

Como saber se estas inovações são seguras?

Através da biotecnologia e sua especificidade, consegue-se uma precisão muito grande em se atingir somente o alvo almejado, não afetando nenhum outro organismo. Como exemplo, citamos plantas de algodão e milho que, através da introdução de um gen do *Bacillus thuringiensis*, produzem uma determinada proteína que é letal, quando injerida por determinadas lagartas que atacam as culturas, mas sem nenhum efeito sobre insetos benéficos, como as abelhas. Convém mencionar que esta substância também não possui nenhum efeito sobre plantas, animais, o homem e o meio ambiente.

Além da especificidade mencionada, através de avançados estudos na área de biosegurança, onde toda a comunidade científica mundial tem se mostrado ativa, existem hoje leis e regulamentações que conferem aos processos biotecnológicos total segurança quanto a sua liberação ao meio ambiente. Para melhor entendermos todo o processo, algumas definições devem ser mencionadas:

-Impacto Ambiental : qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causadas por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam: a saúde, a segurança e o bem estar da população; as atividades sociais e econômicas; ...; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais (fonte: CONAMA n. 001 de 23.01.86).

-Biosegurança: prevenção contra os eventuais riscos associados a experiências e investigações biológicas que possam afetar a segurança do homem (trabalhador) e do meio ambiente.

-Avaliação de Riscos na Engenharia Genética: processo de avaliação e gerenciamento dos riscos potenciais de impactos ambientais que possam ser causados pela liberação de organismos geneticamente engunherados e/ou produtos biotecnológicos no meio ambiente.

Qual o efeito da biotecnologia no mercado de trabalho de agrônomos?

Como conseqüências da alta tecnologia utilizada e das altas produtividades e rendimentos, técnicos envolvidos direta ou indiretamente com este processo, serão cada vez mais necessários e portanto, muito valorizados. Geneticistas, eng. agrônomos, veterinários, etc. terão a responsabilidade de, através de seu conhecimento, sustentar este crescimento gigantesco da demanda por tecnologia na atividade primária.

Quais as principais atividades da Monsanto na área de biotecnologia?

Estando entre as principais empresas envolvidas em biotecnologia à nível mundial, a Monsanto possui em Chesterfield - USA, um dos maiores e mais bem equipados centros voltados exclusivamente à área de biotecnologia. Este centro "Life Sciences Research Center", o maior dos 24 centros de pesquisa da Monsanto espalhados à nível mundial, possui 4 edifícios, que juntos ocupam cerca de 100.000 m², 250 laboratórios e 1.100 pessoas diretamente envolvidas. Através das 123 casas de vegetação totalmente controladas por computador, os diferentes climas apresentados em todo o mundo são perfeitamente reproduzidos, permitindo estudos precisos e eficientes.

A Empresa, investe todo ano, aproximadamente 610 milhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento e, dentre seu quadro total de pessoas, pelo menos um a cada onze funcionários está envolvido com esta área.

As áreas de pesquisa são as mais variadas possíveis:

- na área animal, são realizados estudos em proteínas naturais que regulam a produção de leite e carne;

- na área farmacêutica, proteínas envolvidas nos processos de doenças humanas são pesquisadas, resultando em um melhor entendimento de certas doenças e descoberta de novos remédios. Focando a saúde humana e, utilizando-se da engenharia genética, produtos direcionados a problemas como hipertensão, doenças cardíacas vasculares, câncer, asma e artrites reumáticas vem sendo tratadas com muita atenção;

- na área agrícola, quatro são as principais áreas de estudos: resistência a insetos, resistência a vírus, tolerância a herbicidas e características de melhoria no processamento de alimentos.

- **Resistência a insetos:** através da introdução de um gen do *Bacillus thuringiensis* em certas culturas, estas passam a produzir uma proteína letal a diversos insetos que são responsáveis por milhões de dólares de prejuízo em plantações de todo o mundo. As culturas que apresentam estudos mais avançados são o algodão, a batata e o milho.

- **Resistência a vírus:** funcionando de modo semelhante ao processo de imunização humana, uma proteína retirada do vírus Y é introduzida na planta da batata que, por sua vez produz sua própria resistência ao organismo.

- **Tolerância ao herbicida Roundup:** sendo o herbicida mais utilizado em todo o mundo, principalmente em manejo de áreas, até hoje o Glyphosate não apresentava seletividade para nenhuma cultura. Através da biotecnologia a Monsanto vem desenvolvendo culturas tolerantes ao Roundup, o que resultará em uma grande economia na aplicação do herbicida, além de contribuir com a manutenção da umidade, estrutura e microfauna do solo e, redução nos riscos de erosão, decorrentes da menor necessidade de movimentação deste. As plantas testadas são soja, canola, milho, algodão, beterraba e colza.

- **Melhoria na qualidade e processamento de alimentos:** foi extraído de uma bactéria de solo, um gen que reduz a produção de etileno (gás que provoca a maturação do fruto do tomate). Quando este gen é introduzido na planta, esta retarda sua maturação, possibilitando que o consumidor encontre frutos diretamente colhidos do pé durante todo o ano.

Outro estudo com tomate, assim como batata, é o de acréscimo no teor de sólidos destes, aumentando seu tempo de armazenamento. No caso da batata, através da extração de um gen de bactéria responsável pela produção de amido e, sua introdução nas referidas plantas, o teor percentual de água destas será reduzido. Isto resultará em menor absorção de óleo durante a fritura, reduzindo o tempo e custo desta fritura, reduzindo as calorias e melhorando o sabor e textura da batata a ser consumida.

BIOSEGURANÇA. UMA AVALIAÇÃO CRÍTICA

Dr. Elíbio Rech
CENARGEN-EMBRAPA

Muitas das características modificadas em um organismo utilizando a tecnologia do DNA recombinante, deverão ser semelhantes às características manipuladas utilizando os métodos de melhoramento. Normalmente, os métodos de melhoramento utilizam o conjunto gênico acessível através da hibridação sexual. Durante a história do melhoramento, vários métodos foram desenvolvidos e tem sido amplamente utilizados para a obtenção de animais, vegetais e microrganismos contendo características desejáveis, como resistência a doenças e aumento de produção. Entretanto, em termos taxonômicos, a utilização do conjunto gênico pelos melhoristas, tem estado limitado ao cruzamento com espécies compatíveis. Através da utilização da tecnologia do DNA recombinante, genes podem ser isolados e introduzidos em espécies incompatíveis de microrganismos, animais e vegetais, possibilitando combinações de genes e fenótipos que estão fora do alcance dos métodos de melhoramento.

Existem relatos onde a utilização dos métodos de melhoramento podem, algumas vezes, produzir combinações com altos níveis de produtos gênicos indesejáveis. Como exemplo em plantas, a produção de glucosinolases em algumas espécies de *Brassica* e glicocalcóides em batata. Como resultado destas possibilidades, foram desenvolvidos procedimentos para identificar e remover segregantes indesejáveis durante a fase de seleção. Procedimentos semelhantes deverão, indubitavelmente, serem desenvolvidos para os programas de melhoramento onde organismos transgênicos sejam integrados, de forma a prevenir que genótipos indesejáveis sejam liberados no meio ambiente e comercialmente utilizados.

Entretanto, devido a nossa recente experiência na transferência de genes utilizando a tecnologia do DNA recombinante, tem sido mundialmente aceito pela comunidade científica, melhoristas, cientistas ambientais, empresários e a sociedade em geral, da necessidade de que experimentos de "avaliação de riscos" sejam conduzidos, antes que cada organismo transgênico seja liberado no meio ambiente e utilizado comercialmente como uma nova variedade.

Em reconhecimento a necessidade da condução de experimentos de "avaliação de riscos", a liberação de organismos transgênicos, principalmente entre os vegetais, tem sido supervisionados por autoridades regulamentares que operam nos diferentes países. Como exemplo, todos os membros da Comunidade Européia (EEC) operam sob a supervisão da deliberação 90/220 da EEC. Nos Estados Unidos, diferentes agências governamentais dividem as responsabilidades primárias da regulamentação para a liberação de organismos transgênicos. Atualmente, existem movimentos a nível internacional objetivando uma harmonização dos critérios para a liberação de organismos modificados utilizando a tecnologia do DNA recombinante.

Na área industrial, tem sido desenvolvidos muitos procedimentos para a avaliação de riscos. Quando aplicados a organismos transgênicos, uma efetiva e realista avaliação dos riscos para a saúde humana e segurança ambiental, apresentam alguns desafios importantes, como:

1.) a dificuldade de separar fatos de valores, e a tendência para apresentar uma visão tendenciosa dos *pros* ou *cons*;

2.) a avaliação de riscos na área da engenharia genética tem sido mais ativa do que reativa. Normalmente procedimentos para a avaliação de riscos na área industrial têm envolvido principalmente uma análise reativa, ou seja, quando um evento perigoso ocorre, a atenção é focalizada para prevenir sua recorrência. Provavelmente, o maior desafio na avaliação de riscos para a liberação de plantas transgênicas no meio ambiente tem sido a tentativa de identificar soluções para problemas difíceis de serem definidos e quantificados e devido a enorme

complexidade do ecossistema, os valores previstos pelos nossos conhecimentos sobre as prováveis interações ecológicas, é limitado.

Isto posto, não existem evidências de que os princípios que governam a expressão de uma determinada característica em um organismo transgênico, e sua interação com as plantas não modificadas através da engenharia genética, bem como a dispersão do gene introduzido nas populações destas plantas, sejam essencialmente distintos daquelas características que operam nos genes nativos.

Portanto, é essencial que utilizemos nossos conhecimentos sobre a evolução vegetal dos organismos, e a experiência secular que o melhoramento vegetal e animal desenvolveu, de maneira lógica e objetiva, para informar e guiar o atual processo de avaliação de riscos.

AGRADECIMENTOS

O Grupo PET-BIOTECNOLOGIA gostaria de expor seus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas e instituições que colaboraram e tornaram possível a realização deste evento.

Gostaríamos de agradecer:

À ALLTECH do BRASIL AGROINDUSTRIAL, na pessoa de seu Diretor Sr. Aidan Connolly, pela participação no Curso bem como pelo patrocínio no custeio da passagem do Dr. Elíbio Rech desde Brasília

À MONSANTO do BRASIL, na pessoa do Sr. Alexandre Kossoy, pela participação do Curso como palestrante, bem como pelo patrocínio no custeio da passagem do Dr. Elíbio Rech desde Brasília;

À FLEISCHMANN - ROYAL, na pessoa de seu Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento Sr. Ronaldo Alves Barbosa e, como palestrante, Sr. Neil Hamilton Jr..
À unidade de Piracicaba da NABISCO, agradecemos o fornecimento das bolachas servidas aos participantes nos intervalos;

Ao BANESPA pelo fornecimento de blocos, pastas e lápis;

Ao Dr. Elíbio Rech, CENARGEN / EMBRAPA, palestrante e membro da Mesa Redonda;

Ao Dr. Claudinei Monteiro e ao Dr. Luiz Coutinho pela participação na Mesa Redonda;

À Dra. Maria Lucia C. Vieira pela colaboração no Curso;

À Secretaria do Dept. de Genética, na pessoa da Sra. Carmem Pilotto;

Ao Dr. Flavio C. A. Tavares, pela orientação, pelos incentivos e pelo idealismo sempre presente em sua dedicação como tutor do Grupo.



III Curso de Atualização em Biotecnologia
Setembro 1994

Palestra: Biotecnologia na Fleischmann & Royal



1. A Empresa Fleischmann & Royal.

A Produtos Alimentícios Fleischmann & Royal Ltda, empresa Norte-americana subsidiária da RJR Nabisco Inc., está no Brasil desde Janeiro de 1932, através da implantação de uma fábrica de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) em Petrópolis - RJ.

De lá para cá a Fleischmann & Royal Brasil cresceu muito, estando atualmente participando em uma significativa parcela da Indústria Nacional de Alimentos.

Estruturalmente a F&R está dividida em 4 divisões que controlam juntas um total de 14 fábricas:

Divisão Leite - Glória

Divisão Biscoito - Nabisco

Divisão Consumo - Fermento Químico, Gelatina e Misturas

Divisão de Produtos Industriais - Iracema, Maguary, Fermento Fleischmann ...

Esta apresentação norteia-se em uma das áreas de atuação da Fleischmann & Royal, no campo da biotecnologia, que trata especificamente da produção de levedura de panificação.



A F&R possui no Brasil três fábricas de levedura de panificação:

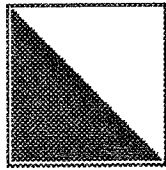
Fábrica Petrópolis - RJ

Fábrica Jundiaí - SP

Fábrica Escada - BA

A nível de América Latina a Empresa possui 10 fábricas (contando as do Brasil) que produzem Levedura de Panificação.

Dando suporte tecnológico a estas fábricas está o Centro de Biotecnologia Fleischmann & Royal, operando desde 1991, atuando nas áreas de genética, otimização de processos, desenvolvimento de produtos e qualidade.

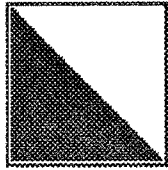


2. Fermento Biológico.

Fermento fresco - 70% umidade

Fermento seco - 8% umidade

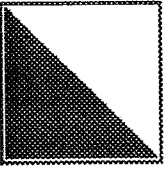
Fermento Instantâneo - 5% umidade



3. Funções do Fermento na Massa.

As funções da levedura no processo de panificação são:

- Aumentar o volume da massa pela liberação do gás resultante da fermentação dos açúcares disponíveis na massa.
- Alterar a estrutura e textura da massa.
- Produzir o flavor do pão
- Aumentar o valor nutritivo do pão.



Massa de Panificação

- Ambiente anaeróbio/microaerófilo
- Açúcares são fermentados pela via glicolítica com produção de etanol.
- Disponibilidade de açúcares na farinha de trigo:
 - Glicose
 - Frutose 0,4 %p/p - manteriam a fermentação por alguns minutos
 - Sacarose
 - Maltose
- Após umedecimento da farinha
 - amido -----> maltose (2,8% p/p da farinha)
 - alfa- e beta- amilases



4. Histórico da Produção de Levedura de Panificação.

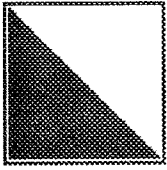
Acredita-se, através de pinturas em templos e tumbas egípcias, que a "arte de fazer crescer o pão" data de cerca de 2600 anos AC. Esta "arte" surgiu da observação do crescimento de "massas" (água + farinha) pela ação de fermentos selvagens. A mesma situação se dava na "arte" de fazer cerveja.

Durante o século 19 as leveduras produzidas, como sub-produto das destilarias e cervejarias, era usada para fermentação de massas a nível doméstico.

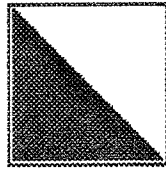
Apenas recentemente a produção de leveduras em culturas "puras" se iniciou (indústria cervejeira - Alemanha e Áustria).

A indústria de levedura de panificação (fermento fresco) iniciou nos EUA por Fleischmann em 1868 (imigrantes alemães Carlos e Max Fleischmann).

Exposição do Centenário da Filadélfia 1876, apresentação do fermento Fleischmann.



Os maiores avanços na área se deram durante a primeira Guerra Mundial onde os alemães, dada a es alto custo dos grão de cereais, aliado a bloqueio econômico (feito a países da Europa), levaram a pesquisas em termos de matérias-primas alternativas para produção de levedura de panificação. Com estes trabalhos levaram a matéria prima que hoje é mundialmente empregada: O MELAÇO DE CERVEJA como avanços em termos de rendimento (processo Viena x Processo aerado, escala Zulauf, etc).

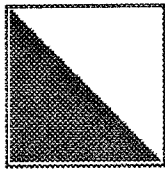


5. Mercado.

Estimativas falam de produção mundial em cifras da ordem de 2 milhões de toneladas/ano.

Jundiaí	- 36000 toneladas/ano
Petrópolis	- 24000 toneladas/ano
Escada	- 18000 toneladas/ano

Produto de baixo preço em relação a outros produtos de origem microbiana.



6. Forma de Produção.

A forma de produção baseia-se em um processo de batelada alimentada, onde inocula-se a fermentação com uma biomassa inicial e adiciona-se os nutrientes (fonte de carbono, nitrogênio e fósforo), de forma proporcional ao crescimento do microrganismo.

O substrato limitante, açúcar presente no melão, é adicionado de forma a evitar a efeito Crab Tree que reduz o rendimento e produz um produto de baixa qualidade.

Dependendo do produto a ser obtido (fermento fresco, fermento seco ou fermento instantâneo) é conduzida a fermentação de forma a garantir características específicas ao produto.

Controle de Qualidade

Matérias-Primas (melão)

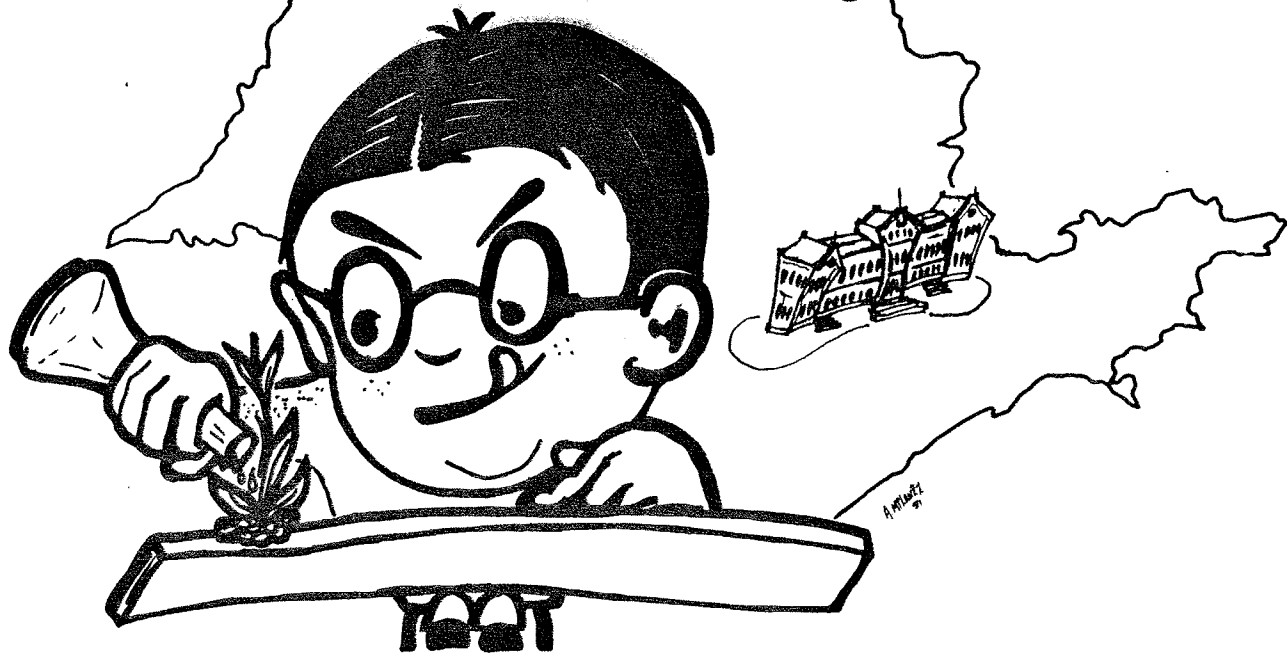
Produto acabado

Assistência Técnica

V REUNIÃO PAULISTA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

5 a 7 de
Dezembro de
1994

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