

Seminários apresentados pelos bolsistas

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”

Grupo PET - Biotecnologia Agrícola

SEMINÁRIO

“Controle Biológico de Plantas Daninhas”

Fernando de Mesquita Sampaio

1995

I - Plantas Daninhas

1. Definição

Plantas que crescem onde não são desejadas

2. Origem

Existem cerca de 350000 espécies de plantas das quais 100 espécies são utilizadas pelo homem. A domesticação e consequente fragilização destas espécies provocou o desenvolvimento de um grupo três vezes mais numeroso de plantas que hoje são consideradas invasoras por aproveitarem as condições favoráveis oferecidas pelo próprio homem na expansão de lavouras. Estas plantas levam vantagem na competição com as plantas cultivadas mas incontestavelmente mais frágeis.

3. Classificação

3.1 Quanto ao tipo de planta

- Folha larga
- Folha estreita

3.2 Quanto ao ciclo de vida

- Anuais
- Bianaais
- Perenes

3.3 Quanto ao habitat

- Terrestres
- Aquáticas
- Parasitas

4. Mecanismos de sobrevivência

- Grande número de sementes
- Formação de banco de sementes (sementes com grande longevidade)
- Facilidade de dispersão de sementes
- Grande agressividade competitiva
- Reprodução sexuada e assexuada

5. Importância do controle

- Provocam queda de 30 a 40% na produção agrícola
- Atrapalham práticas mecânicas
- Prejudicam maturação
- Portadoras de doenças
- Tóxicas para animais
- Diminuem qualidade do produto

6. Fatores que afetam a competição

- Espécie daninha presente
- Nível de infestação
- Espécie, variedade e espaçamento da cultura
- Nível de elementos vitais disponíveis
- Alelopatia

II - Controle Biológico de Plantas Daninhas

1. Histórico

O controle biológico de daninhas foi usado pela primeira vez para o combate do aguapé (*Eichhornia crassipes*), introduzido na Flórida em 1880 e disseminando-se de forma indesejável até 1960. Seu controle efetivo foi conseguido com o uso de duas espécies de insetos (*Neochetina eichhorniae* e *N. bruchi*) e de um fungo (*Cercospora rodmanii*).

2. Bioherbicidas existentes hoje

Nos Estados Unidos hoje, existem dois bioherbicidas utilizados comercialmente:

O DeVine, do laboratório Abbot, oferece um controle de 90% sobre a *Morrenia odorata*, invasora da cultura de cítricos.

O Collego, desenvolvido pelo laboratório Upjohn e pela Universidade da Flórida, oferece um controle de 85% das infestações de *Aeschynomene virginica*, invasora das culturas de arroz e soja.

No Brasil, o Centro Nacional de Pesquisas da Soja da Embrapa, em Londrina - PR, tem o trabalho mais completo sobre controle biológico de daninhas. O trabalho tem como alvo o amendoim bravo (*Euphorbia heterophylla*), que infesta 6 milhões de hectares de soja, a metade da área brasileira de soja.

O controle é feito usando-se o *Helminthosporium euphorbiae*, um fungo encontrado no Rio Grande do Sul em 1981. O *Helminthosporium* penetra no tecido das folhas do amendoim bravo e vai produzindo toxinas que matam o tecido da planta e então começa a produzir esporos. O desfolhamento da invasora a impede de produzir sementes. Os esporos são dissolvidos na proporção de 200 a 400 mil por milímetro cúbico de água e a mistura é aplicada quando a soja está com 25 a 30 dias evitando-se as horas mais quentes do dia.

3. Eficiência dos bioherbicidas

Depende da especificidade do agente utilizado e do clima.

4. Estratégias de aplicação

4.1 Estratégia clássica

Consiste em se importar um organismo que atue como um inimigo natural, atacando a planta invasora, e soltá-lo na lavoura. O inimigo se multiplica e passa a controlar a invasora restabelecendo o equilíbrio sem necessidade de novas interferências do homem

4.2 Estratégia inundativa

Consiste na liberação periódica de organismo que provocam doenças exclusivamente na invasora, como na aplicação de um herbicida. São patógenos alto grau de especificidade para hospedeiros e aceitável nível de segurança para as plantas não visadas.

5. Bioherbicidas sendo desenvolvidos

No CENARGEN estão pesquisando o uso do *Alternaria cassiae* para o controle do fedegoso (*Cassia obtusifoliae*) e o uso de *Cercospora sp.* para o controle da tiririca (*Cyperus rotundus*).

III - Bibliografia

DEUBER, R. Métodos de controle de plantas daninhas. In Ciência das Plantas Daninhas. Vol. I, FUNEP, cap. 4, 1992, 131-147.

CHARUDATTAN. Controle biológico de plantas daninhas através de fitopatógenos. Trad. R.A.Pitelli, FUNEP, Jaboticabal, 1993, 34p.

Controle biológico de plantas daninhas, Revista GLOBO RURAL, vol. 10 - 116, pág. 47-50, 1995.

• UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

CLONAGEM

Métodos de Criação de Moléculas Recombinantes

Leandra Maria Scarpari
Dez/95

Introdução

A clonagem foi definida como o isolamento e amplificação de uma determinada sequência em uma bactéria onde ela vai ser duplicada. Tem por objetivo obter um grande número de cópias puras de uma determinada sequência de DNA. Este trabalho é realizado a partir da introdução de uma molécula de DNA em uma célula hospedeira e esta deve ser mantida nesta célula, também é necessário que funcione no local e momento certos.

Para se obter a molécula recombinante com a condição de autoduplicação, que é fundamental para o novo material a ser perpetuado, há necessidade de se utilizar um vetor, isto é, um agente que irá levar a informação de um organismo para outro. O vetor se faz necessário porque a enzima DNA polimerase só inicia a replicação através de um sítio específico conhecido como origem de replicação.

Existem algumas opções em termos de vetores, porém os mais utilizados são os plasmídios. De um modo bem simples, pode-se dizer que um plasmídio é um segmento de DNA circular, que pode estar inserido ou não ao cromossomo bacteriano, mas que tem a capacidade de se auto-replicar no citoplasma das células procariontes e até mesmo eucariontes.

Para obter-se o plasmídio recombinante, tanto o plasmídio quanto o doador são tratados pela mesma enzima de restrição, por exemplo Hind III, e em seguida mistura-se os fragmentos de DNA do doador e do plasmídio na presença da enzima DNA ligase.

O próximo passo é inserir o plasmídio recombinante na bactéria de interesse. Para verificar se a bactéria receptora realmente contém o plasmídio utiliza-se como marcador a resistência a antibióticos.

Vetores

Um vetor necessita necessariamente possuir :

Origem de Replicação - É necessário para que a DNA polimerase possa iniciar a replicação.

Região com sítios únicos de restrição Para várias enzimas, permitindo o tratamento com várias enzimas de restrição e únicos para que não seja todo picotado quando tratado com a enzima.

Marcadores - Para permitir identificar o plasmídio que contém o fragmento a ser inserido. Alguns mecanismos de marcação serão tratados adiante.

Princípios da Clonagem pelo DNA Complementar - cDNA

Construção de Clones de cDNA

As ferramentas utilizadas na construção de clones de cDNA são:

- Transcriptase reversa - Esta enzima permite a conversão do mRNA em cDNA.
- Grupo de enzimas bacterianas - endonucleases de restrição que cortam o DNA em sítios específicos. Estes sítios podem ser: tetra, penta ou hexanucleotídeos. Os cortes, em geral, deixam extremidades adesivas que se ligam entre si ou com outros segmentos de DNA com a mesma extremidade terminal complementar.
- Plasmídios - Vetores de clonagem que carregam o cDNA da bactéria.

Seleção de Clones

Resistência a Antibióticos

Muitos plasmídios possuem 2 genes de resistência a antibióticos um dos quais é destruído durante a clonagem. No caso do pBR 322, a clonagem pela enzima de restrição PstI destrói a resistência a ampicilina deixando intacta a resistência à tetraciclina. Bactérias transformadas com um plasmídio recombinante serão sensíveis à ampicilina mas resistentes a tetraciclina. Esta simples seleção indica ao pesquisador quais as colônias que carregam uma cópia de cDNA de algum tipo.

Vantagens

1. Eliminação do DNA “intergênico” que em algumas espécies pode representar mais de 90% do genoma.
2. Eliminação de íntrons que são difíceis de localizar num clone genômico e podem requerer bastante trabalho para seu completo sequenciamento.
3. Enriquecimento do banco com cDNAs correspondentes a genes que têm alta expressão em certos tecidos ou em determinadas condições de crescimento.

Princípios de Clonagem Genômica

Por que clones genômicos são necessários além dos clones de cDNA ? Informações sobre estrutura do gene no cromossomo e sobre as sequências que estão ao seu redor (regiões flanqueadoras), podem apenas ser obtidas a partir dos clones genômicos.

A comparação entre os dois tipos de clones (cDNA e genômico) revela a presença ou ausência de íntrons ou sequências interpostas que interrompem a sequência gênica e que não estão presentes no mRNA..

Do ponto de vista biotecnológico, se os genes têm que ser modificados e devolvidos, provavelmente as sequências genômicas serão de maior utilidade.

Isolamento do DNA nuclear

Para facilitar a separação do DNA nuclear do DNA de organelas, a preparação frequentemente é feita a partir de núcleos isolados. Os núcleos permanecem intactos em condições que lisam mitocôndrias e cloroplastos e são coletados em uma forma razoavelmente pura.

Torna-se livre do RNA pelo tratamento com ribonuclease que por sua vez, é purificada para não conter deoxiribonucleases por tratamento pelo calor.

Clonagem das Sequências Genômicas

Plasmídeos acomodam apenas um segmento relativamente pequeno de DNA devido a problemas no processo de transformação quando se usam plasmídeos grandes. Em geral, é desejável a clonagem de grandes segmentos de DNA genômico, pois um clone maior tem maior possibilidade de conter uma cópia intacta do gene, além de algumas sequências que o rodeiam.

A clonagem genômica é frequentemente feita pela utilização do bacteriófago lambda (λ) como vetor. O genoma do fago é de fita dupla, é favorável para manipulação genética e a estrutura de seu genoma é bem conhecida.

Muitos diferentes vetores foram construídos permitindo substituição de parte do genoma pelo DNA exógeno:

- Parte da porção central não é essencial, de modo que pode ser substituída sem prejuízo para a reprodução do fago; este tipo de construção é chamada vetor de substituição.

Expressão dos Genes Clonados

Os genes eucarióticos transferidos frequentemente não se expressam no novo hospedeiro. Muitos processos estão envolvidos na expressão de um gene.

Para que um gene clonado se expresse em uma célula bacteriana é necessário que ele seja colocado sob o controle de um promotor de *E. coli*.

Genes de bactérias não contêm sequências intrônicas nem a maquinaria para a remoção das mesmas do mRNA precursor. Qualquer gene eucariótico contendo íntrons não dará uma molécula de mRNA funcional em bactérias, mesmo se transcrito eficientemente. É necessário, desta forma, usar clones de cDNA deste tipo de gene para estudos de expressão gênica.

Conclusões

A clonagem fornece as informações básicas que formam o ponto de início para estudos mais sofisticados. Pode ocupar um lugar na manipulação de

organismos para exploração pelo homem. Pode oferecer um instrumento adicional para o melhorista que tenta aumentar a produção.

Referências Bibliográficas

MANTELL, S.H. *et al* Princípios de Biotecnologia de Plantas,
Sociedade Brasileira de Genética, p. 39-70, 1994.

RAMALHO, M. *et al* Genética na Agropecuária, **Fundação de Apoio
ao Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2. ed., p.303-318,

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

CONTROLE BIOLÓGICO DE INSETOS

Max Francisco Fernandes

Dezembro 1995

INDICE

Apresentação.....	02
Vantagens.....	02
Métodos.....	02
Classificação.....	03
Bibliografia.....	03

I - Apresentação:

O controle biológico de insetos é hoje uma prática muito recomendada pelos técnicos e Engenheiros Agrônomos como forma de combate a várias pragas que atingem atualmente nossa agricultura.

Devido ao fato de utilizarem agrotóxicos, e, portanto, não agredindo o meio ambiente, vários produtores também aderiram a essa nova técnica, que tem como um dos maiores centros de pesquisas na área o Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Seria muito importante frisar que o controle biológico não visa o extermínio da espécie causadora da praga, e sim o seu controle pela utilização de um inimigo natural, ou seja, um predador.

II - Vantagens:

Uma das grandes vantagens de se utilizar o controle biológico é o fato de não se utilizar produtos que possam causar algum tipo de intoxicação tanto em pessoas quanto em animais, sejam eles domésticos ou selvagens.

Outra vantagem seria a conservação da fauna natural da região, mantendo desta forma o equilíbrio entre as espécies nativas, pois é de conhecimento geral que os agrotóxicos não acabam somente com os insetos, e sim com muitos outros integrantes importantes da fauna regional.

II - Métodos:

Os métodos utilizados pelo controle biológico podem ser divididos em dois grandes grupos: o dos predadores microscópicos e dos predadores macroscópicos.

II.1 - Predadores microscópicos:

Esse tipo de controle biológico requer a utilização de vírus ou bactérias (esporulantes ou não esporulantes) nocivos a um determinado grupo de insetos que se queira controlar.

II.2 - Predadores macroscópicos:

Neste tipo de controle, é necessário a utilização de um predador do referido inseto causador da praga, podem ser desde um inseto carnívoro até um anfíbio, uma ave ou um mamífero adequado.

III - Classificação:

A classificação dos agentes utilizados no controle biológico de uma praga é:

- OLÍGRAFOS;
- OLÍGRAFOS;
- ESTENÓFAGOS;
- MONÓFAGOS.

IV - Macropredadores e micropredadores:

Os macropredadores possuem uma vantagem sobre os micropredadores, pois não são tão específicos quanto os micro, podendo, então, serem utilizados para o controle de diversos tipos de pragas, enquanto que os micropredadores, normalmente, só podem ser utilizados para o controle de uma determinada praga.

V - Bibliografia:

Braga, A. et al - Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, Jaboticabal, 1990, Volume 19, fascículo 02, páginas 253-271.

Habib, Mohamed E. M. et al - Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 1991, Volume 15, fascículo 167, páginas 27-32.

Bueno, Vanda H. P. e Berti Filho, Evoneo - Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 1991, Volume 15, fascículo 167, páginas 41-52.

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

Seminário:

CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS
fungos, bactérias e vírus

Irving Joseph Berger

Piracicaba - SP
13 de dezembro de 1995

CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS

1. Introdução

Dentre as metodologias de controle de fitopatógenos, a mais conhecida, divulgada e utilizada é o controle através de agentes químicos, cuja utilização contínua resulta, invariavelmente, em altos custos, desequilíbrio ecológico, surgimento de resistência dos patógenos e ação residual prejudicial nos alimentos e no ambiente.

Visando amenizar estes problemas, algumas alternativas vêm sendo pesquisadas, tais como o controle integrado, em que o biocontrole vem assumindo posição destacada, visando principalmente minimizar o impacto dos produtos químicos no ecossistema e garantir a produção de alimentos menos poluídos.

Segundo MALOY (1993), o controle biológico de doenças de plantas é uma empolgante estratégia que tem produzido considerável interesse, entusiasmo, otimismo e publicações por 25 ou mais anos. Desde 1964 a "Annual Review of Phytopathology" tem publicado pelo menos 22 artigos com controle biológico como título ou assunto e agora inclui essa categoria como uma importante seção dentre seus tópicos. Existem muitos artigos, simpósios, conferências, compilações e livros, especialmente com múltiplos autores sobre esse tópico.

2. Conceito e Princípios Gerais

O termo controle biológico tem sido usado por fitopatologistas desde os primórdios dos anos 1900, embora não existisse uma definição formal do termo até cerca de 1963, quando Garret abriu um simpósio estabelecendo um conceito de agente de controle biológico. A partir daí, algumas conceitos foram formulados, dentre os quais predominou o de COOK & BAKER (1983), segundo o qual controle biológico pode ser definido como a redução da soma de inóculo ou atividades determinantes da doença provocada por um ou mais organismos, que não o homem. As atividades determinantes de doenças envolvem crescimento, infectibilidade, virulência, agressividade e outras

qualidades dos patógenos, ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. Em controle biológico doença é mais do que uma interação do patógeno com o hospedeiro, é o resultado de uma interação entre o hospedeiro, o patógeno e uma variedade de não patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno ou a resistência do hospedeiro.

Basicamente, o controle se dá através de relações de antagonismo, onde o agente de controle pode agir sobre o patógeno através de vários mecanismos, entre eles: amensalismo ou antibiose, competição, parasitismo ou simbiose antagônica e predação.

Amensalismo ou antibiose é a interação entre organismos na qual metabólitos produzidos por um deles tem efeito danoso sobre o outro, como exemplo, pode ser citada a produção de antibióticos. Competição refere-se à luta entre duas populações de nichos semelhantes para obter um recurso indispensável - nutriente, água, luz ou espaço - que no habitat se encontra em quantidade insuficiente para suprir a demanda biológica. Os competidores não causam prejuízos diretos um ao outro no sentido de uma célula se alimentar de outra ou pela produção de toxinas ou enzimas inibitórias; as influências adversas aparecem indiretamente pela luta por necessidades mútuas. Parasitismo ou simbiose antagônica pode ser definido como a relação onde um organismo se alimenta de células, tecidos ou fluidos de outro ser vivo, o hospedeiro, o qual comumente é prejudicado no processo. Predação é quando um organismo, o predador, se alimenta de um outro, a presa, e normalmente causa sua morte.

É importante salientar que um antagonista não age, necessariamente, através de uma única interação, mas pode agir através de vários mecanismos, que é uma característica importante do antagonista.

Doenças de plantas são causadas principalmente por microorganismos, sendo os fungos e os vírus os mais importantes fitopatógenos, com bactérias vindo em terceiro plano para a maioria das espécies cultivadas. Do mesmo modo, o controle biológico é estudado contra todos esses grupos de microrganismos, mas inevitavelmente maior atenção e enfoque são dados aos fitopatógenos do grupo dos fungos, devido a sua importância e sua aparentemente maior susceptibilidade perante ao biocontrole.

3. Exemplos

Segundo MALOY (1993) são agentes de controle biológico disponíveis comercialmente:

Tabela 1. Agentes de Controle Biológico que são ou tem sido comercialmente disponíveis.

Organismo controlador	Doença controlada
Viroses	
Vírus atenuado do mosaico do tomateiro	Mosaico do tomateiro
Vírus atenuado da tristeza dos citros	Tristeza dos citros
Vírus atenuado do enrolamento do mamão	Enrolamento do mamão
Bactérias	
<i>Agrobacterium radiobacter</i> K84	“Crown gall”
<i>Pseudomona fluorescens</i>	Doenças fúngicas e bacterioses de cereais, algodão e outras espécies
<i>Streptomyces</i> sp.	Doenças fúngicas de trigo, pepino, cravo e crucíferas
Fungos	
<i>Trichoderma viride</i>	Damping-off, doenças de raiz, podridões de caule
<i>T. harzianum</i>	Damping-off, doenças de raiz, podridões de caule
<i>T. hamatum</i>	Damping-off, doenças de raiz, podridões de caule
<i>Fusarium oxysporum</i>	Murcha de <i>Fusarium</i>
<i>Peniophora (Phlebia) gigantea</i>	Podridão de raiz (coníferas)
<i>Pythium oligandrum</i>	Damping-off
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Nematóides

DEACON (1983) também cita o uso de *Peniophora gigantea* para controlar *Heterobasidion annosum*, um fungo dentre os mais importantes patógenos de coníferas no hemisfério norte; cita o controle de “crown gall” por *Agrobacterium radiobacter*, doença que abrange muitas plantas como cereja, pêssigo, maçã, rosas, uva e amora, caracterizada pela produção de um tumor como galhas nas raízes ou caules e especialmente na copa das plantas; cita o controle do vírus do mosaico do tabaco (TMV) e o vírus da tristeza de citros na América do Sul, através do sistema de premunização (cross-protection), explicado por um fenômeno recíproco onde plantas sistematicamente infectadas por uma estirpe de vírus não apresentarão desenvolvimento de sintomas quando inoculadas com uma segunda estirpe.

Outros exemplos são o controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis* e o isolamento e seleção de microorganismos antagonistas à fungos fitopatogênicos do grupo das ferrugens, ambos trabalhos de dissertação para a obtenção do título de Mestre em Agronomia apresentados à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

4. Discussão

A utilização de controle biológico baseia-se em algumas vantagens, tais como:

- a) é um método seguro em comparação ao controle químico, normalmente tóxicos ao ambiente e ao homem;
- b) o microorganismo, uma vez introduzido e adaptado ao ambiente, pode manter as taxas do patógeno inferiores às taxas prejudiciais;
- c) diminui problemas com resistência do patógeno a produtos químicos;
- d) o agente de controle biológico tem menos efeito sobre os microorganismos não alvos, diminuindo, desta forma, problemas no desequilíbrio ecológico da região, e
- e) o agente de controle biológico pode ser associado a outras formas estratégicas de controle como o físico, químico e/ou cultural.

A viabilização do controle biológico vai depender de fatores como a utilização de microorganismos com boas características antagônicas, métodos de multiplicação que

produzam propágulos de qualidade e em quantidade suficientes e oferecer ao microorganismo agente de controle biológico, condições favoráveis ao seu desenvolvimento e competição.

5. Literatura Consultada

- DEACON, J.W. Microbial Control of Plant Pests & Diseases. Aspects of Microbiology, n.7. Van Nostrand Reinhold (UK) Co. Ltd., 88p. 1983.
- LAZZARETI, E. Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis*. Dissertação de mestrado. ESALQ/USP. nov. 1993.
- MALOY, O.C. Plant Disease Control - Principles and Practice. John Wiley & Sons, INC., New York, 346p. 1993.
- MARSIGLIO, A.F. Isolamento e seleção de microorganismos antagonistas à fungos fitopatogênicos do grupo das ferrugens. Dissertação de mestrado. ESALQ/USP. jan. 1993.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
GRUPO PET - BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

RAPD

POLIMORFISMOS DE DNA AMPLIFICADOS AO ACASO

ELAINE CRISTINA CASTELHANO

DEZEMBRO - 1996

1-Introdução:

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma técnica da Biologia Molecular surgida através de variações realizadas na técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction) visando diminuir sua especificidade, sendo portanto considerado uma modalidade desta, entretanto ambos são usados com finalidades diferentes, como será explicado posteriormente.

O RAPD possui um preceito simples, rápido desempenho, requer pequenas quantidades de DNA e não envolve radioatividade, sendo portanto adaptado para o uso em larga escala, é muito usado para análise comparativa de genótipos, raças e espécies com finalidade de obtenção de bandas polimórficas que funcionem como marcadores, servindo também para estudos de filogenia, entre outros, porém não apresenta bons resultados se utilizado para a comparação de categorias acima de espécie, isto se deve à provável presença de altos níveis de polimorfismo obtidos que impedirá a quantificação da taxa de similaridade entre os genomas. O RAPD também não pode ser utilizado para se fazer análise de populações porque segrega mendelianamente, sendo impossível a distinção dos heterozigotos.

Para que seja possível a amplificação de fragmentos de DNA *in vitro*, alguns ingredientes são necessários: DNA molde, primers que são sequências iniciadoras que se pareiam à sequência de bases correspondente na fita molde e são necessários para que ocorra a extensão das fitas, enzima (Taq Polimerase), Cloreto de Magnésio que funciona como um ativador enzimático, dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) que são os deoxinucleotídeos que irão constituir as novas fitas sintetizadas, tampão que serve para manter as condições ideais ao DNA dentro da solução. Depois de termos a mistura de todos os componentes citados acima, estes serão submetidos a ciclos que conterão, basicamente três temperaturas diferentes: Temperatura de denaturação (abertura das fitas), Temperatura de anelamento e Temperatura de Extensão.

Depois de atingidos todos os requisitos acima, ainda cabe lembrar que a distância entre os pontos de ligação de um primer e outro deve ser menor do que 3000pd, caso contrário o fragmento será muito grande não ocorrendo a amplificação nestas circunstâncias.

2-Diferenças entre RAPD e PCR:

As principais mudanças realizadas na técnica da PCR que permitiram o aparecimento do RAPD são relativamente simples e estão relacionadas aos primers utilizados com no que diz respeito a número, tamanho e sequência de bases, e também há uma variação na temperatura de anelamento utilizada nestas técnicas.

A função da PCR é, basicamente, "procurar" uma determinada sequência de DNA conhecida dentro do genoma de um organismo qualquer, esta sequência geralmente é correspondente a um determinado gene. Para isso, é usado um par de primers, um deles deverá se ligar a uma das extremidades 5' do gene e o outro deve se ligar à extremidade 5' oposta, localizada na outra fita. Para que isso ocorra, a sequência a ser amplificada deve ser conhecida e o primer construído de acordo com esta sequência. Para diminuir a probabilidade de haver um pareamento de primers em locais que não aqueles desejados, o número de bases destes deve ser alto, em torno de 30 pb e a temperatura de anelamento deve ser maior do que aquela utilizada no RAPD, variando entre 45°C a 65°C para que haja tempo de se estabelecer uma ligação bem específica entre os primers e a sequência a ser amplificada no genoma se esta estiver presente.

No caso do RAPD, o objetivo é de se obter a amplificação de fragmentos aleatórios que possam mostrar a presença de polimorfismo entre um genoma e outro, para isso se faz necessário o uso de apenas um primer e não de um par de primers como na PCR, este primer não precisa ter sua sequência conhecida, pode ser escolhido aleatoriamente e não precisa ser muito longo, geralmente possui cerca de 10 pb, entretanto, no caso da utilização do RAPD para a amplificação de genomas de plantas, pelo menos 50 a 60% das bases componentes do primer devem ser G e C. Esta composição, assim como o tamanho mais reduzido do primer, visa aumentar as probabilidades de se encontrar no DNA molde sequências homólogas a ele. Teoricamente, o número de fragmentos gerados através de RAPD é dependente do tamanho do primer, do comprimento do DNA alvo e baseado na probabilidade de ocorrência de sequências homólogas ao primer no genoma, sobre a fita oposta, em uma orientação oposta dentro de uma distância que permita uma boa amplificação (aproximadamente 3000 pb).

Para a maioria das plantas, primers de 9 a 10 nucleotídeos geram, em média, de 2 a 10 produtos de amplificação.

Os ciclos de RAPD, geralmente apresentam as seguintes temperaturas: temperatura de denaturação $\approx 92^{\circ}\text{C}$, temperatura de anelamento $\approx 35 - 40^{\circ}\text{C}$ e temperatura de extensão de $\approx 72^{\circ}\text{C}$, portanto como podemos observar, a temperatura de anelamento utilizada em RAPD é menor do que aquela usada em PCR, isso permite que o pareamento ocorra mais rapidamente, diminuindo a especificidade da PCR e causando um erro padronizado, ou seja, que tenderá a se repetir a uma mesma temperatura, portanto, se a temperatura de anelamento sofrer variações o "erro" também as sofrerá.

Os resultados das amplificações são observados através de eletroforese. No caso dos estudos de filogenia, são montadas matrizes em relação às bandas observadas permitindo a análise da similaridade entre os materiais amplificados. Esses resultados são colocados em programas específicos de computador que apresentarão como um dendograma que facilitará esta visualização.

O RAPD também pode ser muito útil se usado em conjunto com programas de melhoramento genético para facilitar a identificação de determinadas características de interesse como por exemplo em programas de retrocruzamento, uma vez que estas características já tenham sido mapeadas. Podemos citar como exemplo um programa de melhoramento visando obter plantas de algodão com um maior teor de óleo nas sementes. Sem o uso do RAPD, as plantas com as características desejadas só poderiam ser identificadas após a produção de sementes, além de haver a necessidade de se coletar essas sementes para se fazer uma posterior análise do seu teor de óleo, entretanto, com a associação deste tipo de programa ao RAPD, esta característica pode ser identificada assim que a planta for gerada, proporcionando uma grande economia de tempo.

3-Bibliografia:

Tibtech - vol 10 - June 1992
Using RAPD makers for crop improvement
Robbie Waugh and Wayne Powell

ESCOLA SUPERIOR AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
ESALQ/USP

RELATÓRIO DE SEMINÁRIO
MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO

Patrícia Pompermayer

ESALQ/USP
1995

MÉTODOS DE TRANSFORMAÇÃO

Introdução

Transformar é dar nova forma, feição ou caráter: mudar, modificar um vegetal, animal ou microrganismo.

Princípios gerais: a recombinação genética que consegue introduzir na célula DNA estranho à espécie, implica no sucesso de 4 operações sucessivas:

- é preciso romper, depois ligar entre si, duas moléculas de DNA de origens bem diferentes;
- é preciso encontrar um transportador genético conveniente, capaz de replicar-se e replicar o segmento de DNA estranho que lhe foi acrescido;
- a molécula de DNA composta deve ser introduzida numa célula em perfeito funcionamento;
- é absolutamente necessário possuir um método de seleção que permita isolar, dentre uma enorme população de células banais, um clone de células receptoras contendo DNA híbrido.

Histórico:

A síntese “in vitro” de moléculas de DNA biologicamente ativas, cuja informação genética provinha de duas linhagens diferentes, foi realizada pela primeira vez por A.Chang e S. Cohen em 1973.

Transformação via *Agrobacterium tumefaciens*:

Agrobacterium tumefaciens é uma bactéria que ocorre naturalmente no solo e é responsável por tumores nos vegetais superiores. Só ocorre em dicotiledoneas pois estas quando sofrem algum tipo de ferimento, seja por picada de insetos ou qualquer outro motivo, liberam substâncias que vão estimular a bactéria.

Esta bactéria possui um plasmídeo com a região Ti, responsável pela ação oncogênica da bactéria e produção de opinas. Quando estimulada rompe a parede da célula vegetal, através de enzimas, e transfere para dentro desta célula a região Ti do seu plasmídeo que é incorporado ao DNA da célula vegetal.

A planta por sua vez, passa a produzir opinas da qual a bactéria irá se alimentar.

Este processo ocorre naturalmente, mas observado esse fenômeno, passou-se a colocar na região Ti do plasmídeo da *Agrobacterium tumefaciens*, genes de interesse agrônomico, por exemplo resistência a herbicidas, obtendo-se portanto plantas transformadas resistentes à herbicidas.

Um exemplo dessa aplicação é o tomate da juventude, desenvolvido pela Calgene Inc, que traz a irresistível qualidade de vencer o talvez maior obstáculo da natureza que é o envelhecimento. Uma complexa investigação desenvolvida por engenheiros genéticos identificou e isolou o gene que provoca o envelhecimento, e conseqüentemente podridão, do tomate. A descoberta desencadeou uma outra ainda mais fantástica: a reprodução do gene que passou a agir “ao contrário” e, conseqüentemente, prolongar o tempo de vida útil do tomate. No mercado, o impacto começa a ser explosivo. Os tomates comuns simplesmente não conseguem competir em cor, sabor, tamanho e durabilidade e ainda o tomate da juventude também pode custar menos.

As etapas de sua obtenção são:

1. O gene PG (polygalaturonase) que provoca o amadurecimento do tomate, é isolado e copiado;
2. A seqüência do gene PG é revertida de forma que ele passa a atuar de trás para frente (o que os cientistas chamam de orientação anti-sentido);
3. O gene PG revertido é instalado numa das agrobactérias que infestam as plantas e são comumente usadas por engenheiros genéticos para obter genes modificados;
4. A agrobactéria é colocada num prato especialmente preparado com pedaços de folhas cortadas de um tomateiro. As extremidades das folhas então absorvem a agrobactéria e o gene anti-sentido nela instalado;
5. O gene anti-sentido se torna parte do material genético das células do tomateiro;
6. As folhas cortadas contendo o gene PG se regeneram e germinam;
7. Microplantas com raízes são então transplantadas para o solo e crescem até se transformarem em tomateiros;
8. As sementes desses tomateiros são então colhidas, nas estufas preparadas para estas plantas geneticamente alteradas, e plantadas em campos abertos para gerarem ainda maior volume de sementes;
9. No tomate criado pela engenharia genética, a produção natural da enzima causadora do amadurecimento é neutralizada pela ação oposta do gene PG anti-sentido. Isto dá ao tomate (agora pronto para ser comercializado) uma vida mais prolongada nas prateleiras e, portanto, mais tempo para ser amadurecido ainda no pé o que lhe confere mais sabor e tamanho.

Transformação em bactérias:

a) Descoberta:

O fenômeno foi observado pela primeira vez por Griffith

b) Princípio transformante:

O DNA só é absorvido eficientemente pelas bactérias se os fragmentos utilizados tiverem um peso molecular superior a 10^6 daltons.

c) A competência:

Uma célula bacteriana, para ser transformada, deve estar em estado de competência. A competência pode ser definida como a aptidão em absorver fragmentos de DNA livre.

A transformação em geral é realizada num meio salino, com uma fonte de energia. Não é necessário que as células receptoras estejam em crescimento.

O número de bactérias transformadas depende da concentração utilizada em DNA.

O número de sítios de fixação depende da espécie bacteriana.

d) Mecanismo de transformação:

A transformação corresponde à integração do DNA transformante no genótipo bacteriano com substituição ao DNA normal.

e) Possibilidade de aplicação da transformação:

As transformações permitiram estudos genéticos completos para um pequeno número de espécies como *Bacillus subtilis*. Mas essas transformações, até o momento, só foram obtidas para algumas espécies (pouco mais de 20). Algumas delas têm um interesse agrônomo (*Rhizobium*) ou industrial (*Bacillus subtilis*).

As possibilidades de utilização desse método para o melhoramento genético das linhagens com interesse econômico são limitadas.

É uma situação que já foi reconhecida: os mecanismos genéticos e as técnicas de estudo descritas pelos geneticistas fundamentalistas nem sempre são facilmente aplicáveis às espécies utilizadas pela indústria ou agricultura. Também, a obtenção de uma célula transformada exige que se disponha de uma seleção para o caráter pesquisado.

Animais transgênicos:

A terapia de gene é uma correção de um erro do metabolismo pela inserção dentro do organismo de um gene normal. Não muito distante será possível a cura de algumas doenças humanas da mesma maneira. No momento, há uma série de questões éticas.

Em animais algumas técnicas poderiam ser desenvolvidas dentro de um sofisticado programa de melhoramento animal para:

- introduzir novas características não disponíveis antes;
- ou para introduzir características já existentes mais rapidamente que o melhoramento convencional.

Humanos transgênicos não serão possíveis no futuro próximo devido à 3 razões básicas:

- primeiro, a técnica da microinjeção tem uma alta taxa de falha;
- segundo, a microinjeção pode produzir efeitos de deleção porque não há controle de onde é injetado;
- finalmente, há a questão das limitadas vantagens. Maioria dos desarranjos genéticos sérios resultam em morte antes da puberdade ou infertilidade em homocigotos.

Transformação em vegetais:

Os genes que deveriam ser selecionados para transformação com o objetivo de aumentar a produtividade agrícola das culturas deveriam ser:

- 1) genes conferindo pré-imunização contra doenças virais;
- 2) genes conferindo resistência à ataque de insetos e infecção por fungo; e
- 3) genes conferindo resistência à herbicidas.

Dentre o crescente número de genes de plantas clonados e caracterizado nos últimos anos esse três tipos de genes têm recebido um interesse particular.

A transformação genética é agora rotineiramente obtida com uma crescente escala de plantas economicamente importantes incluindo o tomate, batata, algodão, alfafa, colza, trevo branco. Recentemente, espécies florestais têm sido transformadas com sucesso.

Apesar do progresso, algumas limitações ainda existem com a transformação e regeneração de soja e, principalmente, os cereais. O maior obstáculo para transformação de cereais é provavelmente a regeneração da planta em que o gene foi transferido.

Dentro de mais algumas safras Americanos e Europeus estarão plantando e colhendo:

- batatas de polpa mais densa;
- milho imune ao ataque de insetos;
- tomates de amadurecimento retardado;
- soja resistente a herbicidas.

Na ESALQ, vem sendo pesquisado pelo professor doutor Marcio de Castro Silva Filho o controle de insetos através da produção de plantas transgênicas expressando inibidores de proteases.

Os danos causados pelo ataque de insetos às culturas de interesse agrônomico têm causado enormes perdas e prejuízos aos agricultores. Métodos químicos de controle são comumente utilizados, encarecendo os custos de produção além de apresentarem frequentes problemas de intoxicação aos aplicadores, efeito residual em alimentos e contaminação das águas subterrâneas entre outros.

Até recentemente, as tentativas de se melhorar geneticamente as plantas visando obter materiais resistentes a insetos limitava-se à busca de germoplasma resistente dentro de espécies sexualmente compatíveis. O desenvolvimento de técnicas modernas de engenharia genética permitiu o acesso a germoplasmas até então indisponíveis, uma vez que qualquer gene pode ser isolado e modificado para expressar-se adequadamente numa determinada planta. Além disso, técnicas de transformação de plantas tornaram-se disponíveis abrindo novos horizontes na obtenção de plantas geneticamente melhoradas.

Os insetos usam uma grande variedade de proteases intestinais necessárias à hidrólise das proteínas ingeridas, sendo a maior parte destas enzimas semelhante às tripsinas. O conhecimento do mecanismo de digestão das proteínas pelas proteases de insetos permite o desenvolvimento de estratégias visando interferir no processo digestivo e conseqüentemente, a obtenção de plantas tolerantes/resistentes a insetos. A partir do estudo das plantas cultivadas, observou-se que algumas delas, por exemplo a soja, apresentavam proteínas que inibiam a ação das proteases intestinais de insetos, sendo chamados de inibidores de proteases. Ao alimentarem-se destas plantas, os insetos ingerem quantidades significativas de inibidores de suas proteases intestinais. Conseqüentemente, observa-se uma inibição do crescimento provocado pela má nutrição, podendo causar a morte do inseto. Uma vez identificado os genes que codificam estes inibidores, torna-se possível a

introdução destes genes em diferentes plantas cultivadas. Desta forma, está sendo iniciado um projeto de pesquisa envolvendo os Departamentos de Genética e Entomologia da ESALQ com a co-participação de pesquisadores canadenses, no sentido de utilizar os inibidores de proteases no desenvolvimento de plantas tolerantes a insetos.

Bibliografia:

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

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

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

“UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO”

GRUPO “PET - BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA” - ESALQ”

“FOTOSSÍNTESE”

ILANA URBANO BRON

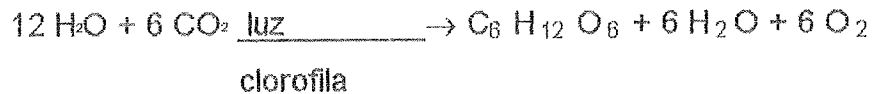
FOTOSSÍNTESE

- 1) Introdução
- 2) Cloroplastos
 - a) origem
 - b) estrutura
 - c) absorção de luz pelos pigmentos
- 3) Unidades fotossintéticas
- 4) Sistemas fotossintéticos
- 5) Etapas da fotossíntese
 - 1) etapa fotoquímica ou luminosa
 - a) fosforilação cíclica
 - b) fosforilação acíclica
 - 2) etapa escura, química ou enzimática
- 6) Fotorespiração
- 7) Plantas C3 e C4
- 8) Metabolismo das crassuláceas
- 9) Fatores que influenciam a fotossíntese
 - a) luz
 - b) CO₂
 - c) temperatura

FOTOSSÍNTESE

1) INTRODUÇÃO

A fotossíntese é o processo de conversão de energia luminosa em energia química, em que o vegetal sintetiza substâncias orgânicas a partir da água, dióxido de carbono e luz:



O órgão da planta adaptado para a fotossíntese é a folha.

As células dos parênquimas clorofilianos das folhas são ricas em cloroplastos. Os cloroplastos são as organelas em cujo interior ocorre a transformação de energia luminosa em química. Dentro dos cloroplastos estão os compostos responsáveis pela absorção de energia radiante:

- clorofila A e B
- carotenóides
- ficobilinas

Essa energia luminosa captada principalmente pela clorofila é que é transformada em química, a qual é utilizada para síntese da glicose. As células se utilizam da glicose para produzir energia através da respiração celular ou para síntese dos aminoácidos e gorduras.

A glicose, assim que é formada no cloroplasto se transforma em amido que fica estocado no estroma.

A medida que a célula necessita, esse amido é transformado em glicose.

2) CLOROPLASTOS

A) Origem

Os cloroplastos têm origem a partir do desenvolvimento de pequenas estruturas esféricas chamadas pró-plastos , as quais têm capacidade de autoduplicação.

A capacidade de autoduplicação dos plastos deve estar, como nas mitocôndrias, associada ao fato delas possuírem DNA e um sistema de síntese que lhes possibilita fabricar parte das suas proteínas.

Acredita-se que os plastos tenham se originado de seres prócariontes primitivos que faziam fotossíntese. Eles teriam colonizado as células de outros seres eucariontes (ancestrais de algas e plantas) , passando a viver dentro deles.

Os proplastos se desenvolvem em cloroplastos ou em leucoplastos dependendo se estiverem no escuro ou não.

A presença de luz é fundamental para que se forme a clorofila e para as membranas internas do plasto se organizem.

Os cloroplastos se apresentam de forma elipsoidal com 3 a 5 μ (micra) de comprimento por 2 μ (micra) de espessura e variam de 20 a 100 por célula (um nas algas).

B) Estrutura

Uma membrana dupla isola a organela do citoplasma. Inclusa numa matriz, denominada **estroma**, estão corpos em forma de discos - **tilacóides** dispostos em camadas chamadas **granás**.

Unindo as pilhas (granás) existem as membranas intergrana.

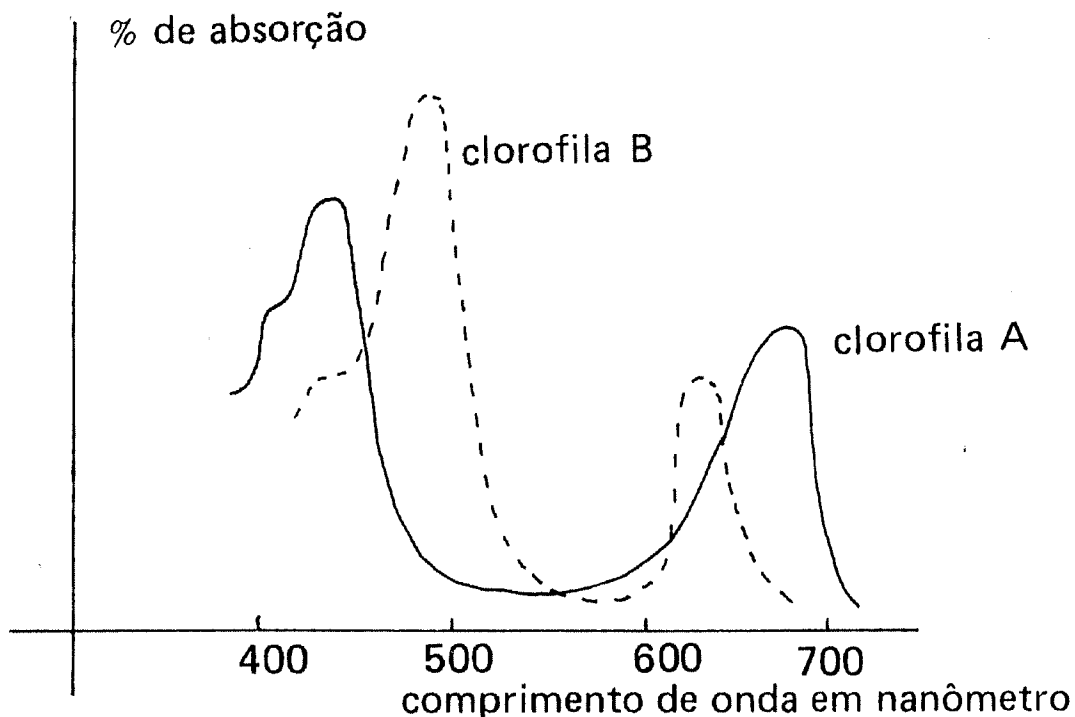
É nos tilacóides que se localizam as moléculas de clorofila.

C) Absorção de Luz pelos Pigmentos

A região do espectro de radiação solar, que pode ser absorvida pelas plantas para a realização da fotossíntese, concentra-se entre 400 e 700 NM aproximadamente que é a região do visível.

Exames mostram picos de absorção de luz pelas clorofilas nas regiões do azul - violeta (430 - 453 NM) e do vermelho (643 - 660 NM). Mas , existe também fotossíntese em comprimentos de onda que não são absorvidos pela clorofila (500 - 600 NM) .

Isso se explica , pois , os pigmentos acessórios (carotenóides e ficobilinas) absorvem essa luz e transferem energia para a molécula de clorofila .



*** Os picos de absorção da clorofila B se aproximam mais da região do verde.

***A clorofila não absorve luz na região do verde fazendo com que a radiação passe para as folhas mais abaixo da copa.

*** É por isso que nas umbrófilas há mais clorofila B.

A radiação luminosa é transportada com pacote de energia - ftons

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

↓
freqüência

Para que essa energia luminosa possa ativar o sistema fotossintético ela deve provocar uma excitação molecular.

Quando a energia radiante atinge os elétrons da molécula de clorofila , estes são deslocados para um nível energético maior e quando voltam perdem energia na forma de fluorescência.

3)UNIDADES FOTOSSINTÉTICAS

Estudos em concentração de oxigênio liberado por algas indicaram que a cooperação de um mínimo de 2.500 moléculas de clorofila eram necessárias para que ocorresse a liberação de uma molécula de oxigênio .

Por outro lado, a quantidade de radiação requerida para a produção de uma molécula de oxigênio foi calculada como 10 ftons.

A unidade fotossintética representa o número mínimo de moléculas de clorofila envolvidas na absorção de um foton , ou seja, $\frac{2.500}{10} = 250$ moléculas.

10

Na unidade fotossintética , os ftons incidentes são transferidos de molécula para molécula , ocorrendo uma concentração de energia em um único pigmento que é chamado de aprisionador.

As demais clorofilas funcionam como antena que capta radiação e transfere suas energias para um único ponto focal.

O excesso de energia absorvida pela unidade fotossintética pode provocar uma foto - oxidação da clorofila, processo esse que é impedido pela presença dos carotenóides.

4) SISTEMAS FOTOSSINTÉTICOS

Existem dois sistemas de pigmentos:

Fotossistema I e Fotossistema II, sendo que a diferença é que o fotossistema I contém mais clorofila A que B quando comparado com fotossistema II.

5) ETAPAS DA FOTOSSÍNTESE

Todas as reações envolvidas na transformação de energia luminosa em energia química, da fixação e redução do CO₂ e síntese de amido estão localizadas no estroma dos cloroplastos.

A síntese da sacarose ocorre no citoplasma das células.

Energia luminosa - energia química que aparece nas formas de agente redutor (NADPH) e ATP é utilizada pelas plantas para reduzir o CO₂ a carboidratos .

1) ETAPA FOTOQUÍMICA OU LUMINOSA

- absorção de luz pelas clorofilas
- transformação de energia luminosa em energia química, que leva à formação de dois compostos energéticos : ATP e NADPH₂ .

O ATP é formado por uma base nitrogenada chamada *adenina*, um açúcar (pentose) chamado *ribose* e *três grupos fosfatados* (onde se encontra a energia) .

A síntese de ATP ocorre a partir de ADP e Fosfato. Esse processo absorve energia luminosa captada pelas moléculas de clorofila.

O processo chama-se fotofosforilação:



a) Fosforilação cíclica

Ocorre em organismos que apresentam apenas fotossistema I, como é o caso das bactérias.

Neste processo, a clorofila A absorve ftons de luz provocando a excitação de seus elétrons e aumentando seu nível energético. Os elétrons excitados saltam para fora da molécula de clorofila e começam a passar pelos transportadores de elétrons. Os transportadores mais importantes são: Ferredoxina e Citocromo.

Ao passar pelos transportadores, os elétrons excitados perdem energia. Essa energia liberada pelos elétrons é utilizada na reação do ADP com o Fosfato para formar o ATP.

Nesta passagem pelos transportadores, os elétrons perdem energia e voltam ao potencial energético normal, retornando à molécula de clorofila A.

É por isso que é chamada de cíclica.

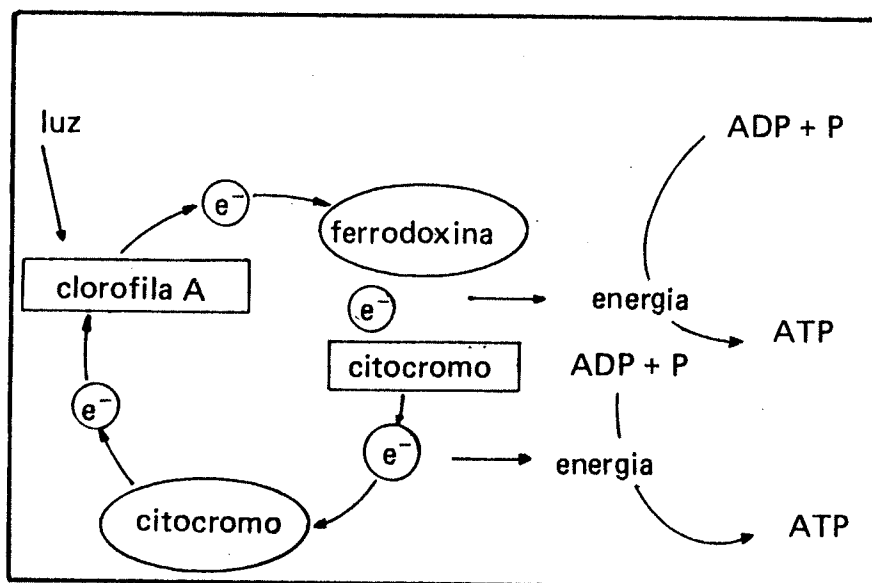


Fig. 51 – Fotofosforilação cíclica

b) Fosforilação Acíclica

Nesse processo ocorre a participação da clorofila A e da Clorofila B.

A clorofila B absorve luz, seus elétrons ficam excitados e saltam para fora da molécula de clorofila, passando pelos transportadores (plastoquinona, citrocromo) até chegar na clorofila A. Ao passar pelos transportadores, perdem energia e ocorre a síntese de ATP.

A clorofila A perde esses elétrons para a Ferredoxina, que por sua vez, os transfere para o NADP.

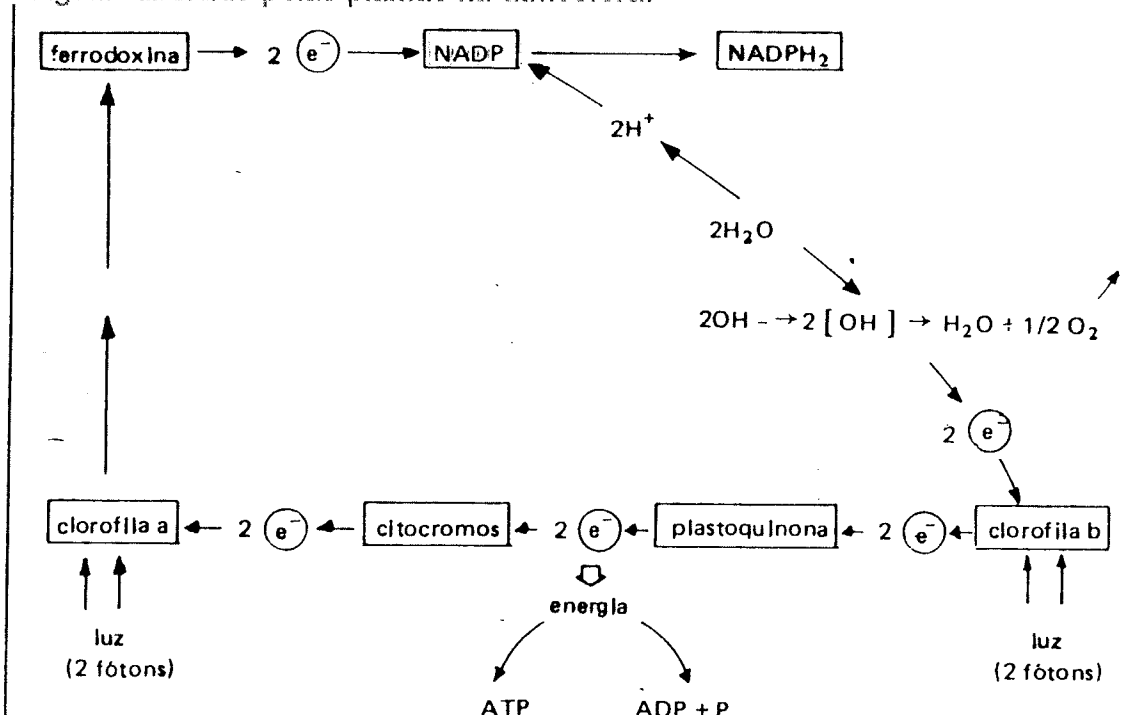
Como vimos, os elétrons que saíram da clorofila B não mais retornam a esse composto, é por isso que ela é acíclica. Portanto, alguma substância deve doar elétrons para a clorofila B. Essa substância é a água.

Ao mesmo tempo que está ocorrendo a fosforilação acíclica, ocorre também a fotólise da água, no qual as moléculas de água, por ação da luz, sofrem ionização quebrando-se em ions H^+ e OH^- .

Os ions H^+ são recebidos pela NADP. Esse composto é capaz de receber dois elétrons e dois prótons, formando assim, o $NADPH_2$.

Os grupos hidroxilas (OH^-) pedem elétrons que serão imediatamente recebidos pela clorofila B.

Ao perder elétrons, as hidroxilas transformam-se em grupos OH , que são instáveis. Quatro grupos OH reúnem-se para formar água e liberar oxigênio. Este é o oxigênio liberado pelas plantas na atmosfera.





*** Fluxo de elétrons

Na reação da fotossíntese , a energia absorvida pelos pigmentos é transferida para outros compostos através do transporte eletrônico .

Nessas condições , a substância doadora de elétrons, o pigmento , torna-se oxidada e o composto receptor de elétrons se reduz.

Tornar-se caracterizada uma reação de Oxido-redução, reação esta que ocorre graças ao diferencial de potencial de oxido-redução dos compostos envolvidos.

2) ETAPA ESCURA , QUÍMICA OU ENZIMÁTICA

- Utilização dos produtos da fase luminosa (ATP e NADPH₂)
- Absorção de CO₂
- Fixação do CO₂
- Redução do CO₂ e conseqüente formação do Carboidrato ou Açúcar:



Nesta fase, o desdobramento do ATP em ADP+P fornece a energia que será utilizada para a síntese do açúcar.

A redução do CO₂ se dá por uma série de reações que recebem o nome de Ciclo das Pentoses ou Ciclo de Calvin:

1 - Carboxilação

Essa fase começa com um açúcar (pentose) chamado ribulose 1,5 bisfosfato - aceptor do CO₂.

Esse açúcar reage com o CO₂ , formando um composto instável de 6 carbonos que imediatamente se rompe para formar 2 moléculas de ácido- 3 - fosfoglicérico.

2 - Fosforilação e redução

A fosforilação do ácido - 3 - fosfoglicérico pela enzima ácido - 3 - fosfoglicérico quinase produz ácido 1,3 bisfosfoglicérico (consumo de ATP).

O ácido 1,3 bisfosfoglicérico é reduzido pelo NADPH₂ à gliceraldeído - 3 - fosfato. Essa reação é catalisada pela enzima NADP - gliceraldeído - 3 - fosfato desidrogenase.

Finalmente , o aldeído fosfoglicérico pode seguir dois caminhos:

- formar a glicose
- regenerar a ribulose 1,5 bisfosfato

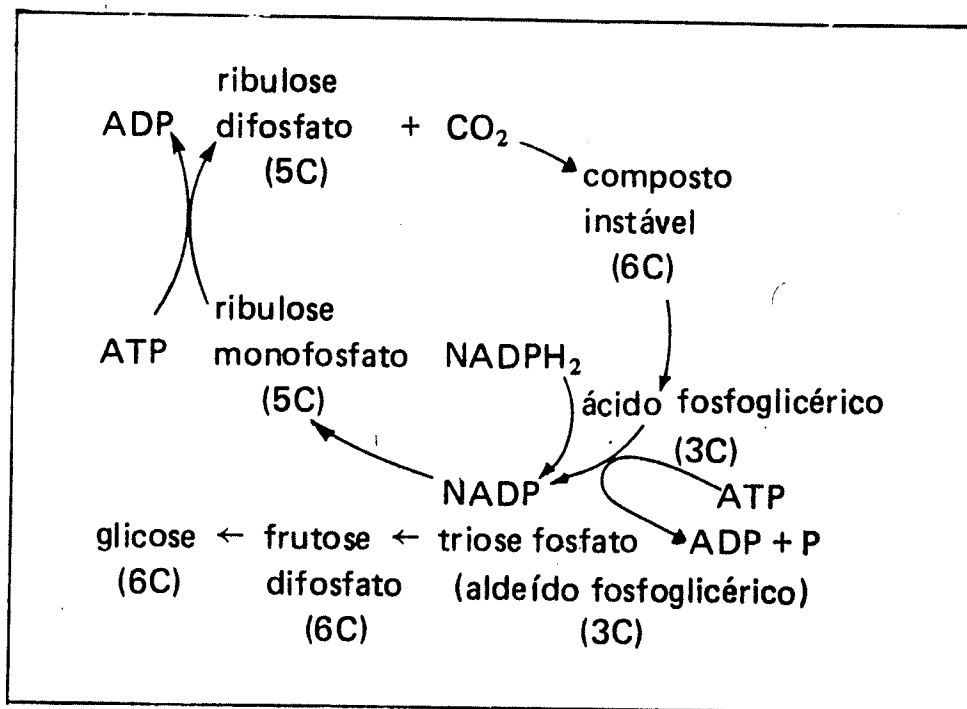


Fig. 53 – Esquema do ciclo de Calvin

*** A fixação do CO₂ em ribulose 1,5 bisfosfato formando 2 moléculas de ácido 3 fosfoglicérico é uma reação catalisada pela enzima ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/ oxigenase também conhecida como RUBISCO.

A atividade da Rubisco é regulada pela :

- Ativação pelo CO₂ e Mg²⁺
- PH do cloroplasto (PH ótimo = 8)

6) FOTORESPIRAÇÃO

É o processo de liberação de gás carbônico com maior intensidade na luz do que no escuro; É importante lembrar que a respiração ocorre tanto na luz quanto no escuro.

A diferença entre a respiração, é que neste caso também ocorre a liberação de gás carbônico (CO_2) mas, nenhuma energia é colocada a disposição da célula.

Outra diferença é que a fotorrespiração é aumentada com a concentração do oxigênio no meio, a partir de 1-2%, enquanto que a respiração satura quando o O_2 atinge aproximadamente 2%.

A fotorrespiração resulta da habilidade da Rubisco catalisar competitivamente também a fixação de O_2 na Ribulose 1,5 bisfosfato.

Em condições normais (0,03% CO_2 ; 21% O_2) a Rubisco apresenta duas atividades: a Carboxilase e Oxigenase (70% : 30%).

Agora, o produto não será mais duas moléculas de Ácido - 3 - Fosfoglicérico, mas sim, uma molécula de Ácido - 3 - Fosfoglicérico e uma molécula de Ácido - 2 - Fosfoglicólico.

O ácido fosfoglicólico é transformado em ácido glicólico (reação catalisada pela fosfatase).

Nos peroxissomos, o ácido glicólico é oxidado a ácido glioxílico e em seguida é produzida a glicina. A glicina é transferida para a mitocôndria onde é produzida a serina:



A serina volta ao peroxissomo, é transformada em ácido glicérico que vai para o cloroplasto. Em seguida, ocorre a produção de ácido fosfoglicérico que é incorporado ao Ciclo de Calvin.

7) PLANTAS C3 E C4

Ambas apresentam o processo de fotorrespiração (com intensidade diferente), mas a C4 tem capacidade de capturar o CO₂ no seu caminho em direção à atmosfera externa pela reação da pep-carboxilase que tem grande afinidade com o CO₂ . Assim elas não perdem o CO₂.

Nas plantas C4 , a fixação do CO₂ não é catalisada pela Rubisco , mas sim pela pep-carboxilase.

Nem o ácido - 3 - fosfoglicérico é o primeiro produto a ser formado, mas sim o oxalacetato que se transforma em aspartato ou malato. O substrato para a fixação do CO₂ não é a ribulose 1,5 bisfosfato mas sim , fosfoenolpiruvato.

Tabela 1 - Características diferenciais entre plantas com fotossíntese "C₃" e "C₄" (*)

PARÂMETRO	FOTOSSÍNTESE "C ₃ "	FOTOSSÍNTESE "C ₄ "
Fotorrespiração	Presente. 25-30% do valor da fotossíntese	Presente; não mensurável pelos métodos de trocas de gás com o ambiente
Primeiro produto estável	Ácido 3-fosfoglicérico	Ácido oxaloacético
Ponto de compensação	Alto: 50-150 ppm CO ₂	Baixo: 0-10 ppm CO ₂
Anatomia foliar	Auxência da bainha vascular. quando presente não contém cloroplastos	Diferenciação de células de mesófilo e bainha vascular contendo cloroplastos (existem algumas exceções)
Enzima primária de carboxilação	RuDP-carboxilase (Km ~ 20µM CO ₂)	PEP-carboxilase (Km ~ 5µMCO ₂)
Efeito do oxigênio (21%) sobre a fotossíntese	Inibição	Sem efeito
Relação CO ₂ : ATP:NADPH	1:3:2	1:5:2
Fotossíntese versus intensidade de luz	Satura em ~1/3 da luz solar máxima	Não atinge a saturação com aumento da intensidade luminosa
Temperatura ótima para a fotossíntese	~25°C	~35°C
Taxa de fotossíntese líquida em condições de saturação de luz	15-35 mg CO ₂ dm ⁻² h ⁻¹	40-80 mg CO ₂ dm ⁻² h ⁻¹
Consumo de H ₂ O para produção de matéria seca	450-1.000g H ₂ O/g peso seco	250-350g H ₂ O/g peso seco(a)
Conteúdo de N na folha para atingir fotossíntese máxima	6,5-7,5% peso seco	3,0-4,5% peso seco (a)

(*) Em folhas completamente diferenciadas.

- O processo de fixação

Inicia-se com a fixação de CO_2 no fosfoenolpiruvato formando oxalacetato que é convertido a malato ou aspartato.

Essa fixação é catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (pep-carboxilase). Isso ocorre nas células do mesófilo.

Tanto o malato quanto o aspartato são translocados para as células da bainha.

O malato é descarboxilado originando o piruvato que retorna às células do mesófilo - é fosforilado, regenerando o fosfoenolpiruvato.

O aspartato é convertido a oxalacetato que é descarboxilado formando o fosfoenolpiruvato ou é convertido a malato que sofre descarboxilação, originando o piruvato.

Tanto o fosfoenolpiruvato quanto o piruvato são transaminados para formar a alanina que origina piruvato -- fosfoenolpiruvato -- que inicia o processo de fixação.

8) METABOLISMO DAS CRASSULÁCEAS (PLANTAS CAM)

- Adaptação ao "stress" de água

- Aumento do PH no período noturno devido ao acúmulo de malato no vacúolo

As plantas CAM fecham os estômatos durante o dia. A noite, os estômatos se abrem e permitem a entrada de CO_2 que é fixado pela pep-carboxilase.

O oxalacetato produzido, é transformado em malato pela NADH - malatodesidrogenase e se acumula.

Na iluminação, o malato é descarboxilado (ácido málico NADP) sendo que o piruvato formado reage com o ATP e libera CO_2 que é captado pela pep-carboxilase e , pela operação do Ciclo de Calvin , resulta na produção de amido.

Dia - Cloroplasto

Noite - Citoplasma

Em ótimas condições , as plantas CAM se comportam como as plantas C3, ou seja , o CO_2 é fixado durante o dia pelo Ciclo de Calvin.

9) FATORES QUE INFLUENCIAM A FOTOSÍNTESE

A fotossíntese é influenciada por fatores internos, como o grau de abertura dos estômatos e quantidade de clorofila, e também por fatores externos como luz, concentração de dióxido de carbono e temperatura.

A) LUZ

A faixa de luz visível (400-700nm) é que é de interesse para a fotossíntese, sendo que o máximo de absorção ocorre nas radiações azul e vermelha e que a mínima absorção ocorre nas radiações verde e amarela.

Outro aspecto importante é o ponto de compensação fótico.

O ponto de compensação fótico é a intensidade luminosa em que a razão de fotosíntese é igual à razão de respiração, ou seja, toda glicose e oxigênio produzido na fotossíntese é consumido na respiração, assim como todo dióxido de carbono produzido na respiração é utilizado na fotossíntese.

Quando a intensidade luminosa está acima do ponto de compensação fótico, a taxa de fotossíntese é maior que a de respiração, havendo portanto um crescimento da planta.

O ponto de compensação fótico varia de acordo com a espécie. As espécies com baixo ponto recebem o nome de plantas umbrófilas, e as com alto ponto de heliófilas.

B)CO₂

Com o aumento da concentração de dióxido de carbono na atmosfera, a tendência da taxa de fotossíntese é também aumentar. Depois de um certo tempo, essa taxa se mantém constante, até que começa a diminuir quando a concentração de dióxido de carbono atinge níveis de toxidez.

C)TEMPERATURA

Uma vez que acima de 57°C as enzimas são desnaturadas, é perfeitamente compreensível que à altas temperaturas, a taxa de fotossíntese diminua consideravelmente.

A temperatura ótima para a realização da fotossíntese é 30-38°C.

De 0-40°C, a cada 10°C, as reações fotossintéticas dobram de velocidade.

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Universidade de São Paulo

RELATÓRIO DE SEMINÁRIO
RESPIRAÇÃO

Marília G. S. Della Vecchia

ESALQ/USP
1995

As plantas, de maneira geral acumulam amido como carboidrato de reserva, embora possam acumular sacarose, frutose e glicose. Para que estes compostos possam ser metabolizados pela via glicolítica ou pela via pentose fosfato, ambas vias degradativas da glicose, primeiramente devem ser fosforilados.

A via pentose fosfato foi percebida em tecidos que tinham a capacidade de degradar a glicose mesmo na presença de inibidores clássicos da glicólise como iodoacetato e fluoreto. É uma via multifuncional, que ocorre principalmente nos tecidos onde há síntese de ácidos graxos a partir de Acetil Coenzima A que requerem poder redutor na forma de NADPH, que é produto desta via. Em tecidos vegetais jovens a via glicolítica é mais intensa, a medida que o tecido vai se tornando maduro a via da pentose fosfato se intensifica para propiciar a deposição de lignina e demais compostos.

A via glicolítica, ou seja a sequência de reações da glicólise foi elucidada na década de 40 utilizando-se a levedura, como já foi mencionado anteriormente o primeiro passo seria a fosforilação do açúcar, porém se ele estiver na forma de amido a incorporação do fosfato se dá através da enzima fosforilase que utiliza apenas o fosfato inorgânico (portanto o rendimento energético da célula é maior quando degrada amido ou glicogênio do que quando degrada a glicose). A glicólise é um processo que ocorre predominantemente no citoplasma celular de tecidos onde houver demanda de energia (ATP).

Quando a degradação ocorre na ausência de oxigênio e é efetuada por microorganismo é denominada de fermentação. Quando na presença de oxigênio degradando o carboidrato até ácido láctico é usualmente chamada de glicólise. (Ver sequência de reações)

Na prática a glicólise e a fermentação são utilizadas para a produção de álcool, produção de ácido láctico para fins de conservação de alimentos e para estabelecer o momento adequado no abate de animais descansados, o que propicia uma carne mais macia e de fácil conservação.

Fisiologistas observaram que músculos estimulados a se contraírem, acumulavam ácido láctico, o que os levava a fadiga, porém esta habilidade poderia ser reestabelecida em presença de oxigênio molecular, quando então desaparecia o ácido láctico. Muitos pesquisadores ajudaram a compreender o processo, mas foi o bioquímico Sir Hans Krebs que postulou as reações que demonstravam a oxidação do piruvato até gás carbônico. O Ciclo de Krebs ocorre na organela citoplasmática denominada mitocôndria, funcionando como um canal para oxidação de metabólitos e produção de coenzimas reduzidas. Para que a oxidação de substrato orgânico seja contínua, as

coenzimas devem ser reoxidadas. Em células procariontes a reoxidação é realizada pelas enzimas da membrana plasmática e em eucariontes na mitocôndria(crista mitocondrial)

É importante a redução completa do oxigênio(aceitando 4 elétrons), até água, pois senão os sub-produtos como peróxido de hidrogênio e superóxido que são tóxicos atacam os ácidos graxos insaturados da parte lipídica da membrana causando lesões.

Os inibidores do ciclo de Krebs são : ácido malônico e fluoracetato.

A Cadeia Respiratória vem a ser uma sequência de reações de óxido-redução, em ordem estabelecida segundo o potencial de redução(do mais baixo para o mais alto), transportando os elétrons das coenzimas reduzidas para o oxigênio molecular, sendo o transporte auxiliado pelos citocromos onde o átomo de ferro se oxida e se reduz.

O oxigênio molecular é o último acceptor de elétrons, ocorrendo a formação da água.

Venenos respiratórios- Os citocromos podem ter seu átomo de ferro complexado pelo cianeto, monóxido de carbono ou gás sulfídrico, evitando que eles se oxidem ou reduzam , interrompendo assim o transporte de elétrons. Um aspecto interessante é que mitocôndrios de plantas com o envelhecimento podem adquirir alguma insensibilidade ao cianeto. Estudos recentes tem indicado que diferentes espécies da Família Rosaceae apresentam incompatibilidade em enxertos, pois uma variedade possui um nível mais elevado de glicosídeos cianogênicos do que a outra.

Portanto a respiração é a oxidação dos carboidratos pela remoção de hidrogênios(íons) que são canalizados para a cadeia respiratória onde os elétrons são transferidos de um composto a outro até o oxigênio.

A respiração nos órgãos dos vegetais :

Raízes, respiram intensamente, sendo que os açúcares vem pelo floema.

Caule, respiração mais intensa na zona do câmbio, onde novas células estão se formando e crescendo.

Folhas, o desprendimento de gás carbônico é praticamente constante.

Frutos, respiração intensa na fase inicial de divisão celular

Germinação de sementes, o peso vai diminuindo continuamente devido a liberação de gás carbônico da respiração que produz energia necessária para a síntese dos compostos celulares dos órgãos em formação.

Fatores que afetam a respiração:

- quantidade de substrato: carboidratos, lipídeos e aminoácidos.
- Oxigênio: A eliminação de gás carbônico está associada ao consumo de oxigênio-último acceptor de elétrons da cadeia respiratória.
- Quanto maior a temperatura mais intensificada é a respiração.
- O aumento da concentração de gás carbônico diminui a respiração.

Quociente respiratório- quociente entre gás carbônico e oxigênio

-quando o valor é aproximadamente 1 o composto oxidado é carboidrato

-quando o valor é menor que 1 indica que outros substratos que não são carboidratos estão sendo oxidados. Por exemplo nas sementes oleaginosas onde os compostos de reserva são lipídeos.

-quando o valor é maior que 1 indica oxidação via fermentativa, que não necessita de oxigênio ou então em tecidos fotossintetizantes quando a quantidade de gás carbônico liberada pela respiração é igual a quantidade de gás carbônico utilizada na fotossíntese (ponto de equilíbrio ou de compensação).

•
Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Departamento de Genética
PET- Biotecnologia

RFLPs: Conceitos

Mauricio Pires Machado Barbosa

I) Introdução

O termo “restriction fragment length polymorphism”(RFLP), ou “polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição” refere-se a diferenças (polimorfismos) de peso molecular existentes entre fragmentos homólogos de DNA ou RNA, fragmentos estes obtidos em condições laboratoriais através da digestão do ácido nucléico utilizando de nucleases conhecidas por enzimas de restrição”. O polimorfismo são resultantes de diferenças na sequência das moléculas do ácido nucléico e são herdados de maneira simples, de acordo com as bem conhecidas lei de Mendel. Um fragmento polimórfico define um “locus marcador” e para facilitar sua visualização é utilizada uma sonda “marcada” de sequência homóloga ao fragmento.

Os trabalhos pioneiros de utilização de RFLPs como marcadores genéticos na área de genética humana no início da década de 80, posteriores ao advento da tecnologia do DNA recombinante e da descoberta das enzimas de restrição na primeira metade da década de 70. Os resultados do primeiro mapa de RFLP do genoma humano foram publicados em 1980 (Botstein et al., 1980) ao mesmo tempo em que foram relatadas as primeiras ligações entre RFLPs e genes responsáveis por enfermidades de natureza genética (Little et al., 1980; Phillips et al., 1980). O ano de 1983 pode ser considerado como o ano em que a técnica “estreou” na área de genética vegetal com a publicação de quatro artigos científicos tratando de aspectos teóricos e práticos da técnica aplicada ao melhoramento vegetal (Beckmann & Soller, 1983; Soller & Beckmann, 1983; Burr et al., 1983; Tanksley, 1983). A característica do RFLP que garantiu-lhe enorme sucesso neste campo reside no número virtualmente ilimitado de loci marcadores gerados pela técnica. Se considerados que a digestão do DNA vegetal com enzimas de restrição comumente utilizadas são produzidos, a grosso modo, no mínimo 10^6 fragmentos e que este número é ainda maior se levarmos em conta a existência de mais de 100 enzimas, então perceberemos que o número de potenciais marcadores (cada fragmento é um marcador em potencial) é muito grande. As vantagens do RFLP não se restringem apenas à quantidade de polimorfismo, mas também à qualidade da informação genética.

II) Enzimas de restrição

Enzimas que digerem sequências não metiladas de DNA por meio de rompimento das ligações fosfodiéster recebem a denominação genérica de nucleases. As nucleases bacterianas desempenham a função de proteger a célula contra organismos invasores, tais como bacteriófagos e estão divididas em duas classes: enzimas do tipo I e enzimas do tipo II. As enzimas do tipo I são aquelas caracterizadas por requererem vários co-fatores e não possuem especificidade quanto ao sítio de restrição, isto é, elas clivam ácidos nucleicos em qualquer ponto da molécula. Já as do tipo II, são sítio-específicas, reconhecendo determinadas sequências de nucleotídeos que podem variar em comprimento, normalmente, não ultrapassando 8 pares de base, e requerendo apenas Mg^{2+} como co-fator. Entre as enzimas do tipo II ainda existem diferenças quanto ao tipo de fragmento gerado e ao tipo de sequência reconhecida, podendo clivar o DNA gerando fragmentos com extremidades protuberantes ou não (blunt ends).

Somente enzimas do tipo II são utilizadas em RFLP pois quando da digestão de certo espécime de DNA, devido a sua especificidade, geram uma população de fragmentos que pode ser reproduzida em outras reações de digestão envolvendo o mesmo espécime de DNA e a mesma enzima.

III) Bases Genéticas do RFLP

Amostras de DNA extraídas de duas plantas geneticamente idênticas (clones) produzirão a mesma população de fragmentos quando totalmente digeridas com uma enzima do tipo II. A base genética do RFLP está na recíproca desta afirmação, ou seja, DNA de indivíduos geneticamente distintos produzirão duas populações também distintas. As diferenças nas populações são fruto, em última instância, de diferenças quanto ao número e localização dos sítios de restrição de determinada enzima nas moléculas de DNA. Variações no número de sítio de restrição podem ser causadas tanto por mutações de ponto, aonde uma base é substituída por outra criando um novo sítio de restrição ou modificando um sítio de restrição preexistente, como também podem ser devidas a inserções ou deleções de bases dentro do sítio ou duplicações de regiões genômicas contendo sítios de restrição.

Variações no número de cromossomos por aneuploidia ou poliploidia também são responsáveis por diferenças no número de sítios de restrição. Por outro lado, variações nas posições de sítios podem ser causadas por mutações estruturais nos cromossomos tais como inserções, deleções e inversões.

IV) Metodologia

Uma amostra de DNA digerida por uma determinada enzima de restrição, quando feita a eletroforese, resultará em distribuição contínua de fragmentos, sendo impossível distingui-los. Para isso utiliza-se uma sequência homóloga de DNA que irá, providas as devidas condições, hibridizar com o fragmento alvo. Esta sequência é chamada de “sonda” e deve estar “marcada” para que possamos visualizar o resultado da hibridização.

As principais etapas do RFLP são:

- Extração e digestão DNA
- Eletroforese
- Southern blotting
- Preparo de sonda de Hibridização
- Autoradiografia

V) Vantagens como marcadores genéticos

1. **Abundância de loci marcadores:** O que faz com que a técnica seja utilizada em estudos aonde uma grande abundância de marcadores seja necessária, tal como em trabalhos de construção de mapas de ligação e mapeamento de loci que controlam características quantitativas (QTL) e qualitativas. Nestes, deve ser usado um número tal de marcadores que garanta uma cobertura satisfatória do genoma. A grosso modo, os mapas de ligação de primeira geração publicados na literatura científica utilizam de no mínimo, 100 loci marcadores, ao passo que mapas de alta densidade, tais como o existente para o genoma do tomateiro, que são utilizados em estudos avançados de genética e melhoramento, necessitam de mais de 300 loci. Tal grau de saturação só se tornou possível após advento do RFLP.

2. **Nível de polimorfismo:** Além da abundância de loci, é desejável que um marcador genético apresente alto nível de polimorfismo. A técnica do RFLP permite detectar pequenas variações na sequência de DNA, tais como pequenas mutações, inserções e deleções. Este nível de polimorfismo, por exemplo, não é possível de ser obtido por meio de marcadores morfológicos pois a maioria destas variações não causam alterações drásticas no fenótipo. Além disto, a técnica permite revelar polimorfismos tanto em regiões transcritas como em não transcritas do genoma, ao contrário das isoenzimas, por exemplo, que só revelam polimorfismos em regiões transcritas.
3. **Neutralidade fenotípica:** Quando dois genes interagem de modo que um gene interfere com a expressão fenotípica do outro, dizemos que há epístase. Uma grande desvantagem dos marcadores morfológicos é a frequente presença de epístase entre genes marcadores, o que sensivelmente reduz o número de loci marcadores que podem ser estudados concomitantemente em um cruzamento. Os loci de RFLP, por outro lado, são geneticamente neutros, isto é, não exercem nenhum efeito deletério sobre o fenótipo. Desta forma a segregação de um número ilimitado de loci marcadores pode ser acompanhada em um único cruzamento. Na prática, isto possibilita a construção de mapas saturados em reduzido espaço de tempo e elimina a necessidade de estoques mutantes para marcadores morfológicos.
4. **Codominância:** Um outro aspecto de muita importância a ser considerada quando se comparam marcadores genéticos diz respeito à qualidade da informação genética. RFLPs (e também isoenzimas) revelam loci marcadores que, em sua grande maioria, possuem alelos co-dominantes. Isto significa que podemos distinguir um planta híbrida das linhagens parentais baseando-se no padrão de bandeamento. Se as linhagens parentais forem homozigotas para alelos distintos de um determinado locus marcador, então o padrão de bandeamento do híbrido deve ser a combinação dos padrões parentais. Marcadores co-dominantes geram dados de melhor qualidade para cálculos de frequência de recombinação entre dois loci pois permite identificar todas as classes genotípicas possíveis incluindo, principalmente, os genótipos recombinantes.

VI) Conclusões

Os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição têm-se revelado como uma excelente fonte de marcadores genéticos. entre suas qualidades podemos destacar a abundância de loci marcadores, a sensibilidade em detectar pequenas variações nas sequências de DNA e na alta qualidade da informação genética devido à natureza codominante da maioria dos loci marcadores. Estas qualidades fazem dos RFLPs os marcadores ideais para estudos aonde um número elevado de marcadores é necessário, tais como em estudos de construção de mapas de ligação e mapeamento de genes responsáveis por características de importância agrônômica. As contribuições originais nestas áreas são inegáveis e se avolumam cada vez mais. o uso de RFLPs para identificar loci associados a características quantitativas, por exemplo, revolucionou o campo da genética quantitativa, pois permitiu identificar os componentes individuais das características poligênicas e estudar o efeito de cada um, isoladamente e em conjunto, no fenótipo. No campo do fitomelhoramento agora é possível utilizar marcadores para seleção indireta mais rápida e eficiente de genes de interesse agrônômico. a clonagem de um gene de Resistência do tomateiro também foi grandemente facilitada por RFLPs. Os exemplos são múltiplos e não se restringem apenas a estas áreas. Hoje, RFLPs são utilizados não apenas no fitomelhoramento, mas também em vários outros campos do conhecimento agrônômico e florestal.

Monografias

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
GRUPO PET - BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

OBTENÇÃO DE POLIMORFISMO RELACIONADO A
PRECOCIDADE EM MILHO UTILIZANDO A TÉCNICA DE RAPD

Elaine Cristina Castellano

Leandra Maria Scarpari

Patricia Pompermayer

Introdução:

Este trabalho tem como objetivo, encontrar marcas no DNA em diversas variedades de milho que se relacionem à precocidade de seu ciclo.

O milho é uma planta muito estudada nos programas de melhoramento genético, sendo uma das bases da economia agrícola brasileira e a obtenção de marcadores capazes de identificar variedades precoces e tardias, possibilitaria uma maior rapidez na utilização das técnicas empregadas pelos melhoristas com a finalidade de obter novas variedades.

Uma das vantagens do emprego de técnicas moleculares utilizando o DNA, é que a determinação das características morfológicas ou fisiológicas da planta como por exemplo a precocidade de seu ciclo podem ser determinadas antes mesmo de seu plantio, uma vez que estas estejam devidamente mapeadas.

A Técnica do RAPD

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma técnica da Biologia Molecular surgida através de variações realizadas na técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction) visando diminuir sua especificidade, sendo portanto considerado uma modalidade desta, entretanto ambos são usados com finalidades diferentes, como será explicado posteriormente.

O RAPD possui um preceito simples, rápido desempenho, requer pequenas quantidades de DNA e não envolve radioatividade, sendo portanto adaptado para o uso em larga escala, é muito usado para análise comparativa de genótipos, raças e espécies com finalidade de obtenção de bandas polimórficas que funcionem como marcadores, servindo também para estudos de filogenia, entre

outros, porém não apresenta bons resultados se utilizado para a comparação de categorias acima de espécie, isto se deve à provável presença de altos níveis de polimorfismo obtidos que impedirá a quantificação da taxa de similaridade entre os genomas. O RAPD também não pode ser utilizado para se fazer análise de populações porque segrega mendelianamente, sendo impossível a distinção dos heterozigotos.

Para que seja possível a amplificação de fragmentos de DNA *in vitro*, alguns ingredientes são necessários: DNA molde, primers que são sequências iniciadoras que se pareiam à sequência de bases correspondente na fita molde e são necessários para que ocorra a extensão das fitas, enzima (Taq Polimerase), Cloreto de Magnésio que funciona como um ativador enzimático, dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) que são os deoxinucleotídeos que irão constituir as novas fitas sintetizadas, tampão que serve para manter as condições ideais ao DNA dentro da solução. Depois de termos a mistura de todos os componentes citados acima, estes serão submetidos a ciclos que conterão, basicamente três temperaturas diferentes: Temperatura de denaturação (abertura das fitas), Temperatura de anelamento e Temperatura de extensão.

Depois de atingidos todos os requisitos acima, ainda cabe lembrar que a distância entre os pontos de ligação de um primer e outro deve ser menor do que 3000pd, caso contrário o fragmento será muito grande não ocorrendo a amplificação nestas circunstâncias.

Metodologia:

Inicialmente foram realizados testes de concentrações dos reagentes necessários para haver a amplificação *in vitro*. O ciclo e o protocolo inicial utilizados nesta pesquisa foram baseados no trabalho de Chin, E. e Smith, S. "Cycling

parameters for RAPD in maize”, no qual foram utilizados: 2,5µl de tampão 10x concentrado, 200 mM dNTP, 0,8 unidades de Taq polimerase, 30ng de primer, 6,7µl de MgCl₂, 4µl de DNA 5ng/µl e água para completar o volume, que deverá ser de 25µl ao final da reação.

O ciclo utilizado consta das seguintes etapas:

- Denaturação inicial a 94°C a 3,00 min
- 40 ciclos com denaturação a 94°C por 1 min., anelamento a 37°C por 1 min., e extensão a 72°C por 2,00 min.
- Extensão final a 72°C por 7 min. permanecendo a 4°C até a aplicação em gel de agarose 1,4%

Conclusões:

Durante a pesquisa foram feitas alterações nas concentrações dos componentes utilizados no RAPD, visando sua otimização. Os melhores resultados foram obtidos através de variações nas concentrações de Taq Polimerase e de MgCl₂, sendo possível observar polimorfismo entre as variedades utilizadas encerrando assim a primeira etapa da pesquisa, que terá continuidade com o estudo da relação entre as bandas polimórficas obtidas e a característica de precocidade do ciclo.

Bibliografia:

CHIN, E., SMITH, S. Cycling parameters for RAPD in maize, **Maize Genetics Cooperation Newsletter**. 1993, n° 67, 61.

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PET-BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMO EM *Crinipelis perniciosa*
ATRAVÉS DE RAPD E ANÁLISE DE PROTEÍNAS

GILDEMBERG AMORIM LEAL JUNIOR

MARÇO/1996

DETERMINAÇÃO DE POLIMORFISMO EM Crinipelis pernicisa , ATRAVÉS DE RAPD E ANÁLISE DE PROTEÍNA.

INTRODUÇÃO:

O Crinipelis pernicisa é um fungo que ataca os cacauzeiros afetando os tecidos meristemáticos da planta. A doença conhecida como vassoura de bruxa é natural da Amazônia e a seis anos encontra-se instalada na região produtora de cacau da Bahia, causando sérios prejuízos à lavoura e aos produtores.

A pesquisa tem por objetivo fazer uma análise do surgimento de raças fitopatológicas na região produtora de cacau da Bahia. Sendo um trabalho de base que auxiliará na elaboração de métodos de controle e desenvolvimento de cultivares resistentes ao patógeno. Já que teremos disponível uma análise da variabilidade do patógeno da região.

MÉTODO:

O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma técnica da Biologia Molecular surgida através de variações realizadas na técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction) visando diminuir sua especificidade, sendo portanto considerado uma modalidade desta, entretanto ambos são usados com finalidades diferentes, como será explicado posteriormente.

O RAPD possui um preceito simples, rápido desempenho, requer pequenas quantidades de DNA e não envolve radioatividade, sendo portanto adaptado para o uso em larga escala, é muito usado para análise comparativa de genótipos, raças e espécies com finalidade de obtenção de bandas polimórficas que funcionem como marcadores, servindo também para estudos de filogenia, entre outros, porém não apresenta bons resultados se utilizado para a comparação de categorias acima de espécie, isto se deve à provável presença de altos níveis de polimorfismo obtidos que impedirá a quantificação da taxa de similaridade entre os genomas. O RAPD também não pode ser utilizado para se fazer análise de populações porque segregam mendelianamente, sendo impossível a distinção dos heterozigotos.

Para que seja possível a amplificação de fragmentos de DNA *in vitro*, alguns ingredientes são necessários: DNA molde, primers que são sequências iniciadoras que se pareiam à sequência de bases correspondente na fita molde e são necessários para que ocorra a extensão das fitas, enzima (Taq Polimerase), Cloreto de Magnésio que funciona como um ativador enzimático,

dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) que são os deoxinucleotídeos que irão constituir as novas fitas sintetizadas, tampão que serve para manter as condições ideais ao DNA dentro da solução. Depois de termos a mistura de todos os componentes citados acima, estes serão submetidos a ciclos que conterão, basicamente três temperaturas diferentes: Temperatura de denaturação (abertura das fitas), Temperatura de anelamento e Temperatura de Extensão.

Depois de atingidos todos os requisitos acima, ainda cabe lembrar que a distância entre os pontos de ligação de um primer e outro deve ser menor do que 3000pd, caso contrário o fragmento será muito grande não ocorrendo a amplificação nestas circunstâncias.

Diferenças entre RAPD e PCR:

As principais mudanças realizadas na técnica da PCR que permitiram o aparecimento do RAPD são relativamente simples e estão relacionadas aos primers utilizados com no que diz respeito a número, tamanho e sequência de bases, e também há uma variação na temperatura de anelamento utilizada nestas técnicas.

A função da PCR é, basicamente, "procurar" uma determinada sequência de DNA conhecida dentro do genoma de um organismo qualquer, esta sequência geralmente é correspondente a um determinado gene. Para isso, é usado um par de primers, um deles deverá se ligar a uma das extremidades 5' do gene e o outro deve se ligar à extremidade 5' oposta, localizada na outra fita. Para que isso ocorra, a sequência a ser amplificada deve ser conhecida e o primer construído de acordo com esta sequência. Para diminuir a probabilidade de haver um pareamento de primers em locais que não aqueles desejados, o número de bases destes deve ser alto, em torno de 30 pb e a temperatura de anelamento deve ser maior do que aquela utilizada no RAPD, variando entre 45°C a 65°C para que haja tempo de se estabelecer uma ligação bem específica entre os primers e a sequência a ser amplificada no genoma se esta estiver presente.

No caso do RAPD, o objetivo é de se obter a amplificação de fragmentos aleatórios que possam mostrar a presença de polimorfismo entre um genoma e outro, para isso se faz necessário o uso de apenas um primer e não de um par de primers como na PCR, este primer não precisa ter sua sequência conhecida, pode ser escolhido aleatoriamente e não precisa ser muito longo, geralmente possui cerca de 10 pb, entretanto, no caso da utilização do RAPD para a

amplificação de genomas de plantas, pelo menos 50 a 60% das bases componentes do primer devem ser G e C. Esta composição, assim como o tamanho mais reduzido do primer, visa aumentar as probabilidades de se encontrar no DNA molde sequências homólogas a ele. Teoricamente, o número de fragmentos gerados através de RAPD é dependente do tamanho do primer, do comprimento do DNA alvo e baseado na probabilidade de ocorrência de sequências homólogas ao primer no genoma, sobre a fita oposta, em uma orientação oposta dentro de uma distância que permita uma boa amplificação (aproximadamente 3000 pb).

Para a maioria das plantas, primers de 9 a 10 nucleotídeos geram, em média, de 2 a 10 produtos de amplificação.

Os ciclos de RAPD, geralmente apresentam as seguintes temperaturas: temperatura de desnaturação $\approx 92^{\circ}\text{C}$, temperatura de anelamento $\approx 35 - 40^{\circ}\text{C}$ e temperatura de extensão de $\approx 72^{\circ}\text{C}$, portanto como podemos observar, a temperatura de anelamento utilizada em RAPD é menor do que aquela usada em PCR, isso permite que o pareamento ocorra mais rapidamente, diminuindo a especificidade da PCR e causando um erro padronizado, ou seja, que tenderá a se repetir a uma mesma temperatura, portanto, se a temperatura de anelamento sofrer variações o "erro" também as sofrerá.

Os resultados das amplificações são observados através de eletroforese. No caso dos estudos de filogenia, são montadas matrizes em relação às bandas observadas permitindo a análise da similaridade entre os materiais amplificados. Esses resultados são colocados em programas específicos de computador que apresentarão como um dendograma que facilitará esta visualização.

O RAPD também pode ser muito útil se usado em conjunto com programas de melhoramento genético para facilitar a identificação de determinadas características de interesse como por exemplo em programas de retrocruzamento, uma vez que estas características já tenham sido mapeadas. Podemos citar como exemplo um programa de melhoramento visando obter plantas de algodão com um maior teor de óleo nas sementes. Sem o uso do RAPD, as plantas com as características desejadas só poderiam ser identificadas após a produção de sementes, além de haver a necessidade de se coletar essas sementes para se fazer uma posterior análise do seu teor de óleo, entretanto, com a associação deste tipo de programa ao RAPD, esta característica pode ser identificada assim que a planta for gerada, proporcionando uma grande economia de tempo.

FASE DA PESQUISA:

No momento, os experimentos estão sendo realizados com três amostras do fungo (camacã, uruçuca e pimenta) utilizando-se de protocolos de extração de DNA e protocolos de RAPD, ambos para leveduras. Os resultados obtidos não estão sendo considerados pois os métodos estão em fase de adaptação para o fungo *Crinipeslis pernicioso*. As amostras dos fungos são provenientes das cicades de Camacã, Uraçuca. A terceira amostra é parasita de pimenteira da região da Amazônia.

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Campus de Piracicaba

Caracteres Quantitativos Associados a Marcadores Moleculares em
Saccharomyces cerevisiae.

Relatório Final de Programa de Residência Agronômica
1º Semestre de 1995

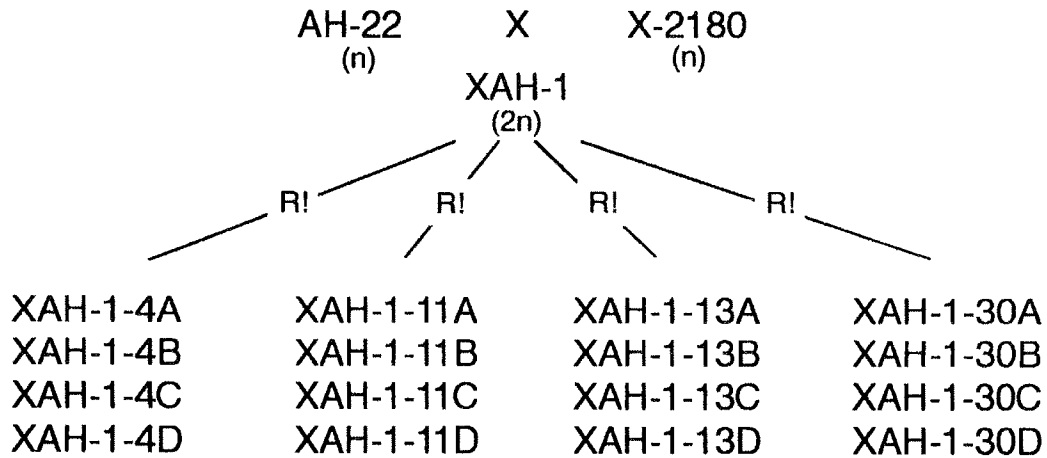
Aluno: Juan Lucas Argueso

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

Introdução:

Os estudos de caracteres quantitativos estão sendo realizados atualmente com o objetivo de identificar regiões genômicas associadas. Estas, conhecidas como “QTL’s” (Quantitative Trait Loci: Loci de caracteres quantitativos), estão sendo identificados através da amplificação de regiões discretas do genoma, utilizando-se sondas de oligonucleotídeos e outras metodologias que permitem análise genética a nível molecular. Isto permite analisar estas regiões relacionadas aos caracteres quantitativos como genes individuais, facilitando a interpretação de dados, mesmo porque deveriam ser isentos de efeitos ambientais.

O programa de residência agrônômica foi desenvolvido com o objetivo de encontrar marcadores de DNA que pudessem ser adequados a análise de caracteres quantitativos em leveduras, associando a produção de etanol em um esquema hierárquico de cruzamento de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* ao perfil de bandas fornecido por marcadores moleculares do tipo RAPD descritos por WILLIAMS et al. (1990), (Randomly Amplified Polymorphics DNA’s: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso. Esta análise viria complementar os dados obtidos por KIDO (1990). Neste estudo, foram associados os métodos de análise genética quantitativa e de tétrades. As linhagens analisadas compreendem parentais (AH-22 e X-2180), o híbrido entre eles (XAH-1), e segregantes meióticos a partir deste híbrido. A seguir está esquematizado o cruzamento e a meiose do híbrido.



Esquema 1: Linhagens utilizadas no trabalho, a genealogia existente entre elas e os níveis de ploidia.

As linhagens foram avaliadas em ensaios de fermentação quanto à produção de etanol e os dados obtidos utilizados em análise genética quantitativa e de tétrades, possível neste organismo por fornecer produtos meióticos individualmente separados e passíveis de análise. Estas análises revelaram haver uma distribuição da capacidade de produção de etanol entre as linhagens segregantes com amplitude semelhante à diferença de produção entre os dois parentais. Ou seja, existem linhagens próximas ao parental de alta produção e linhagens próximas ao parental de baixa produção.

O trabalho buscou identificar polimorfismo a nível molecular entre as linhagens com relação positiva com o caráter produção de etanol. A comparação dos perfis de bandas das linhagens segregantes permitiria então identificar marcas ligadas à alta produção. A identificação de "QTL's" ligados a este caráter de importância industrial é de grande interesse para o melhoramento genético da levedura. De posse de um marcador molecular desse tipo o trabalho de seleção de linhagens poderia ser agilizado, dando ao melhorista um parâmetro adicional de avaliação.

Desenvolvimento do Programa de Residência:

O programa foi conduzido em etapas de forma a cumprir os objetivos da proposta e sendo coerente com o cronograma original. A seguir as etapas cumpridas e os períodos de sua realização.

Primeira etapa: Adequação das condições de amplificação (01/02 a 01/03)

Anteriormente à elaboração da proposta de Residência Agrônômica foi feito um levantamento da literatura relativa à utilização da técnica de RAPD em leveduras e muito pouco foi encontrado. A publicação mais próxima do que se desejava encontrar estava relacionada com identificação molecular de leveduras do gênero *Candida*, LEHMANN et al (1992). Os dados eram insuficientes e portanto foi incluído no cronograma uma etapa de adequação da técnica às condições de nosso estudo.

As reações iniciais testaram as concentrações ideais de DNA genômico molde e de magnésio. Ambos parâmetros tem grande influência sobre o número e o tamanho dos produtos de amplificação. Os testes tomaram por base o oligonucleotídeo OPF-11, a quantidade de enzima Taq DNA polimerase (Gibco BRL) 1.5 U, 100 µM de dNTP (para cada um dos quatro deoxinucleotídeos) e um programa de variação de temperaturas com pré denaturação 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.

O teste de concentração de DNA utilizou a concentração de Mg^{2+} de 2.25 mM, variando a concentração de DNA genômico: 12.5, 25, 37.5, 50, 100 e 150 ng/reação de 25 µl. As concentrações não mostraram grande influência sobre o resultado da amplificação, a única diferença foi uma maior definição das bandas nas concentrações de 37.5 e 50 ng/reação. Foi adotada a concentração de 40 ng/reação como padrão. Um teste semelhante foi feito em relação à concentração de Mg^{2+} adotando a concentração de DNA genômico de 40 ng/reação. Os valores testados foram: 0.75, 1.5, 2.25, 3.0 e 3.75 mM de $MgCl_2$. As três primeiras concentrações tiveram uma amplificação semelhante e satisfatória, a quarta (3.0 mM) apresentou

poucas bandas e a quinta (3.75 mM) não apresentou amplificação. Foi mantida como padrão para as reações a concentração de 2.25 mM. As figuras destes ensaios, assim como de alguns outros realizados durante o programa de residência, não estão disponíveis por falha do equipamento fotográfico. Por precaução, todas as eletroforeses foram analisadas na própria fonte de luz ultravioleta e as anotações passadas na caderneta de laboratório evitando que algum dado fosse perdido.

Inicialmente utilizou-se para a eletroforese a concentração do gel de agarose de 1.4%. Entretanto como os produtos de amplificação resultaram um pouco maiores que o esperado a concentração do gel foi abaixada para 1.3%, permitindo uma melhor separação de bandas. As corridas foram feitas com tampão TBE 1x (trizma base 50 mM, ácido bórico 50 mM e EDTA 2.5 mM) e voltagem de 120 V em cuba com 25 cm de distância entre eletrodos. Os fragmentos amplificados foram corados com brometo de etido, foi usado como padrão de peso molecular o DNA do fago λ digerido com as enzimas de restrição Eco RI e Hind III. O programa utilizado no termociclador demonstrou ser adequado ao tipo de reação e portanto não foram feitos testes de número de ciclos e de variação no tempo e na temperatura de anelamento de “primers”, oligonucleotídeos iniciadores da amplificação do DNA.

Tabela 1: Concentração dos reagentes na reação de amplificação

Reagente	[] estoque	Volume (μ l)	Total/reação	[] na reação
Tampão da enzima	10x	2.5		1x
dNTP mix	1.25 mM	2.0		100 μ M
Primer (10 mer)	5 ng/ μ l	6.0	30 ng	
Taq DNA polimerase	5 U/ μ l	0.3	1.5 U	
MgCl ₂	7.5 mM	7.5		2.25 mM
DNA genômico	10 ng/ μ l	4.0	40 ng	
Água MilliQ	-	2.7	-	-

Segunda etapa: Extração e quantificação do DNA das tétrades. (01/03 a 15/03)

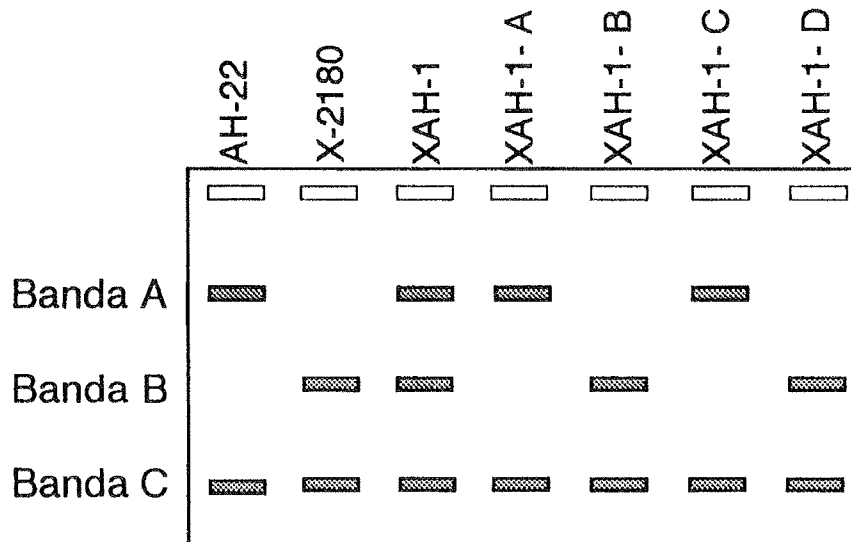
Foram selecionadas quatro tétrades das quais se extraiu o DNA seguindo-se o seguinte procedimento:

As linhagens foram crescidas em 50 ml de YEPD por 15 horas a 30 °C sob agitação constante. Após o crescimento, o volume total foi transferido para tubos de 100 ml e centrifugado a 4000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa celular úmida transferida para um almofariz de 150 ml onde foi adicionado N₂ líquido e a massa celular congelada foi macerada com ajuda de um pistilo.

Em seguida, foram adicionados ao almofariz 3 ml de Tris-HCl 0,1M pH 8.0 . 1200 µl foram transferidos para 2 tubos de microcentrifuga de 1,7 ml (600 µl em cada) e adicionou-se 75 µl de solução de SDS 10% e 60 µl de 2-Mercaptoetanol, sendo os tubos agitados lentamente até que a solução atingisse o ponto de viscosidade que caracteriza a lise das estruturas membranosas. Adicionou-se então o mesmo volume de clorofane (fenol - clorofórmio - álcool iso-amílico na proporção 25:24:1 v/v) aos tubos para extração de proteínas, sendo agitados lentamente por inversão durante 10 minutos e centrifugados a 12000 g por 10 minutos. Em seguida a fase aquosa da mistura foi transferida para outro tubo com a ajuda de uma micropipeta e o restante descartado. Este passo foi repetido por 3 vezes sendo que na última vez, o clorofane foi substituído por clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v), para retirada do fenol restante nas amostras.

Aos tubos contendo o material desproteínizado, foram acrescidos de 5% do seu volume com solução de Acetato de Sódio 3M e o dobro de seu volume com etanol 96°GL gelado. Em seguida o precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) para a retirada do excesso de sais e aguardou-se a evaporação completa do etanol. Os ácidos nucleicos foram ressuspensos em 1 ml de TE e tratados com 20 µl de solução de RNase (10 mg/ml) e deixado em banho maria a 37 °C por 1 hora. Procedeu-se a uma nova extração protéica com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1

aos produtos de sua meiose completa na proporção 2:2, como é mostrado no esquema abaixo.



Esquema 2: O esquema exemplifica uma eletroforese dos fragmentos gerados pela amplificação, representando o comportamento esperado neste caso para a segregação de bandas polimórficas (A e B). Apenas um parental possui a marca, o híbrido a herda. Antes da meiose o híbrido duplica o material genético e envia uma cromátide para cada um dos quatro produtos meióticos. Portanto duas células possuem a marca e as outras duas não. A banda C é monomórfica, o híbrido a herda de ambos os parentais e a meiose não apresenta segregação.

Portanto, para identificar quais os “primers” capazes de revelar polimorfismo entre os segregantes foram comparados sempre os dois parentais. O “primer” que mostrasse polimorfismo entre AH-22 e X-2180 passaria à próxima etapa, reações de amplificação com o DNA dos segregantes.

Foram testados todos os 74 “primers” disponíveis sendo que 6 deles revelaram polimorfismo de uma banda cada um. Antes de iniciar as provas desses “primers” com os segregantes foi feita uma verificação da autenticidade do polimorfismo encontrado. A técnica de RAPD pode sofrer influência de

v/v) e a uma nova precipitação e lavagem com etanol. O precipitado final foi ressuspenso em 200 µl de TE.

A quantificação da concentração de DNA em cada amostra foi feita por espectrofotometria em aparelho GENE-QUANT Pharmacia. Foi considerada ideal a razão 1.9 entre absorvância a 260 nm e 280 nm. As amostras cuja razão foi maior que 2.0 ou menor que 1.7 foram também quantificadas em eletroforese em gel de agarose de acordo com o critério utilizado por LEHMANN et al (1992), buscando-se a estimativa mais precisa possível.

O protocolo de extração permitiu a obtenção de DNA de boa integridade em géis de eletroforese e com quantidades em torno de 80 µg por extração (aproximadamente 250 µg por grama de células em peso fresco).

Terceira etapa: Identificação do Polimorfismo. (15/03 a 15/05)

Estabelecidos todos os parâmetros passou-se à etapa de identificação do polimorfismo, teste de “primers”. Foram adquiridos para a execução do programa três kits de “primers” (kits B, J e L) de fabricação de Operon Technologies e também foi utilizada uma parte do kit F cedido pelo laboratório central de cultura de tecidos, Departamento de Genética. Cada um dos kits possui 20 oligonucleotídeos de 10 bases (simplex fita) especialmente concebidos para produzir produtos de amplificação polimórficos. Além dos kits foi encomendada a síntese de quatro primers utilizados com sucesso na identificação molecular de leveduras do gênero *Candida*, LEHMANN et al (1992). No total, estiveram disponíveis para a execução do trabalho 74 “primers”.

A estratégia utilizada para a identificação do polimorfismo foi baseada no tipo de herança apresentada pelos marcadores moleculares RAPD. Esses marcadores são codominantes e no esquema hierárquico estudado espera-se o seguinte comportamento. Quando um parental possui a marca o híbrido a herda e a transmite

contaminação de amostra ou de variações nas condições de amplificação que resultam no aparecimento de bandas que não tem repetitibilidade. Para diminuir as chances de dúvida cada um dos seis “primers” previamente selecionados foi retestado, desta vez contra duas concentrações de DNA de cada parental. Após este novo teste apenas três “primers” confirmaram ser polimórficos, a saber OPJ-12, OPJ-17 e OPL-18, exibindo as bandas em ambas concentrações, 20 e 40 ng de DNA genômico por reação.

Tabela 2: Relação dos “primers” selecionados.

Código	Sequência 5' - 3'	P.M.	Banda polimórfica
OPJ - 12	GTCCCGTGGT	3026	900 bp em X 2180
OPJ - 17	ACGCCAGTTC	2979	1600 bp em X 2180
OPL - 18	ACCACCCACC	2893	1500 bp em AH 22

Os outros três primers não tiveram esse comportamento desejado comprovando que o polimorfismo não era verdadeiro mas sim um erro na amplificação. As figuras 1 e 2 (apêndice) mostram a confirmação do polimorfismo em cinco primers e a segregação da marca em uma tétrade respectivamente.

Quarta etapa: Análise da segregação dos marcadores. (15/05 a 01/06)

Para a análise da segregação das marcas encontradas foram selecionadas quatro tétrades completas do híbrido XAH-1. As 16 linhagens foram usadas para confirmação da segregação 2:2 esperada nesse tipo de estudo. As reações de amplificação foram realizadas com os dois parentais, o híbrido e os 16 segregantes escolhidos visando a visualização da segregação. As figuras 3, 4 e 5 são fotografias (apêndice) dos géis de eletroforese dos fragmentos obtidos nos ensaios de segregação.

Quinta etapa: Correlação entre os dados moleculares e quantitativos. (01/06 a 20/06)

Esta etapa do programa de residência não foi possível de ser realizada uma vez a quantidade de dados fornecidos pela análise molecular das linhagens foi insuficiente para qualquer análise significativa. O objetivo final do programa não pode ser alcançado pela falta de dados sobre os quais seriam feitas as análises. Durante esta etapa buscou-se então a interpretação dos fatores técnicos que levaram à não obtenção desses dados.

Resultados e Discussão:

Os três primers selecionados foram usados para a avaliação do polimorfismo entre as linhagens.

O “primer” OPJ-12 gerou, no teste de seleção, uma banda de aproximadamente 900 bp apenas no parental X-2180. Entretanto, o outro parental, AH-22, também apresentou a banda e a segregação foi irregular, fora da proporção esperada 2:2. O segundo “primer”, OPL-18, gerou uma banda de 1500 bp nos testes iniciais. Porém neste ensaio ambos os parentais e o híbrido não apresentaram a banda, mas ainda assim marca aparece entre alguns dos segregantes. Esse comportamento é inexplicável geneticamente. Um descendente não pode herdar um caráter que nenhum dos dois parentais possui. O comportamento observado nestes dois primeiros casos aponta uma mesma possível explicação. As bandas geradas por OPJ-12 e OPL-18 sempre apresentam uma variação na intensidade com que aparecem no gel de eletroforese, e sempre mais tênues que a maioria. Podem se tratar de regiões com baixa especificidade de anelamento que a cada diferente reação amplificam-se mais ou menos, chegando mesmo a não aparecer. É um tipo de banda que um pesquisador que dispõe de bastante polimorfismo, o que não foi o nosso caso, normalmente não considera no cômputo geral dos resultados. Pode então ter havido um erro, induzido por variações inerentes à técnica, ao se selecionar estes dois “primers” como polimórficos.

O “primer” OPJ-17 gerou uma banda de 1600 bp em X-2180. A marca confirmou estar presente em X-2180 e no híbrido e ausente em AH-22. Porém, novamente a segregação foi irregular. Das quatro tétrades testadas, duas mostraram segregação 2:2 conforme o esperado (XAH-1-4 e XAH-1-13), a terceira (XAH-1-11) segregou 1:3 enquanto que a quarta (XAH-1-30) segregou na proporção 3:1. Neste caso a compreensão do resultado não admite a hipótese levantada para explicar o caso anterior uma vez que as bandas são claramente identificadas e sempre aparecem com a mesma intensidade. Apesar do grande cuidado com que o trabalho foi conduzido, etapa por etapa, a explicação para o resultado pode estar em um erro na manipulação das amostras desde o armazenamento na coleção de culturas do laboratório até o momento da reação, passando pelo crescimento, extração do DNA e armazenamento da amostra. Pode ter ocorrido desde uma simples troca de etiquetas até a contaminação das amostras de DNA com DNA de outra linhagem. A dificuldade de se quantificar com precisão o DNA também pode ter influenciado o aparecimento das bandas entre os segregantes, este é um ponto importante sobretudo se lembrarmos que o trabalho envolve diferentes níveis de ploidia. Todas estas variáveis reunidas, aliadas ao fato do número de bandas polimórficas ser reduzido, dificultam uma interpretação segura do que possa ter acontecido. Se houvessem mais bandas polimórficas e o mesmo tipo de comportamento fosse verificado poderia ser formulado um diagnóstico bastante mais seguro. Dispondo apenas da banda de 1600 bp gerada por OPJ-17 não existe outro dado com o qual fazer uma comparação, a interpretação não possui um apoio.

Como resultado indireto, foram estabelecidas as condições ideais de reação para o emprego da técnica de RAPD em *Saccharomyces cerevisiae*. Os parâmetros estabelecidos já foram inclusive utilizados em outros trabalhos do Laboratório de genética de leveduras da ESALQ/USP com bons resultados, GOMES et al (1995).

Os resultados alcançados no programa de residência foram enviados à comissão organizadora do 41º Congresso Nacional de Genética e aprovados para apresentação em forma de painel com o título de Uso de RAPD para caracterização

de híbridos e segregantes de meioses completas de *Saccharomyces cerevisiae* (ARGUESO et al., 1995).

Conclusões:

Os dados obtidos de análise com diferentes marcadores moleculares revelaram haver uma semelhança entre os parentais. Este fato foi difícil de se antecipar tendo em vista a grande diferença fenotípica existente entre eles quanto ao caráter quantitativo estudado, produção de etanol. Apesar do número elevado de oligonucleotídeos “primers” empregados poucos obtiveram polimorfismo. Dentre os 74 “primers” utilizados apenas 3 apresentaram polimorfismo, sendo que o único que confirmou ser útil em todas as etapas foi OPJ-17. Além disto o número de bandas foi pequeno. Cada “primer” gerou em torno de 15 bandas, acumulando um total de 1110 bandas para três polimorfismos, sendo insuficientes para a análise conclusiva dos dados. Esse número de bandas não permite a correlação com um caráter quantitativo como é a produção de etanol pela levedura.

Apesar do número de “primers” já testados supõe-se que com um maior número de “primers” possa aparecer um maior número de bandas polimórficas. Entretanto é mais lógica a conclusão de que a técnica utilizada não foi adequada ao tipo de estudo realizado, o que não significa dizer que a técnica não seja aplicável ao estudo com leveduras, mas que devido ao material biológico empregado ou quanto ao caráter estudado a técnica não foi capaz de obter número de dados suficientes.

Os resultados obtidos permitem sugerir o emprego de outras metodologias de análise molecular. Como exemplo, TAVARES et al. (1992) mostrou ser possível obter resultados no mesmo material biológico através do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição, “RFLP’s” (Restriction Fragment Length Polimorfism). Este outro sistema deverá ser aplicado, a curto prazo, às mesmas linhagens com perspectivas de sucesso, já existindo inclusive sondas de DNA selecionadas para o estudo. O fato dos parentais serem muito próximos do ponto de vista molecular deve ser considerado como uma vantagem, pois assim a probabilidade do polimorfismo

entre eles estar relacionado ao caráter é maior do que em indivíduos mais distantes. O material biológico empregado é adequado a este tipo estudo pois permite a associação de três metodologias de análise genética: Quantitativa, de tétrades e molecular.

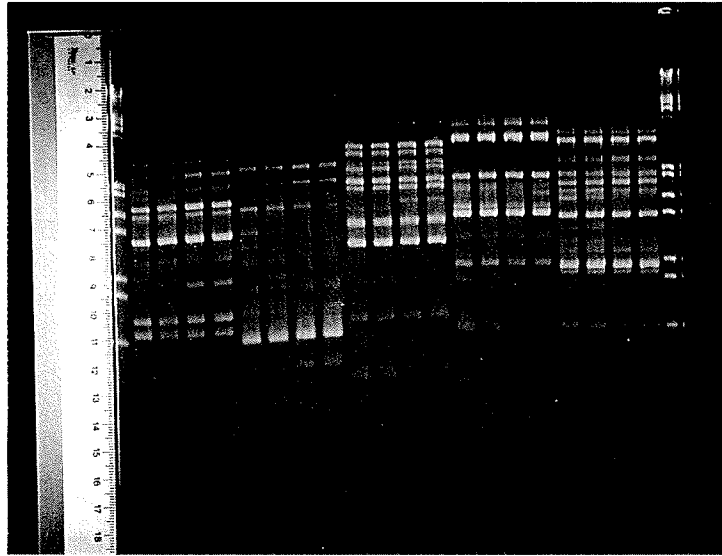


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose mostrando o ensaio para confirmação do polimorfismo fornecido pelos primers. Cada grupo de quatro canaletas representa um "primer", da direita para a esquerda OPJ-12, OPJ-16, OPJ-17, OPL-17 e OPL-18. Em cada grupo, temos a primeira canaletas AH-22 (20 ng), a segunda AH-22 (40 ng), a terceira X-2180 (20 ng) e a quarta X-2180 (40 ng). Só foram selecionados os primers com polimorfismo em ambas as concentrações, grupos 1, 3 e 5.

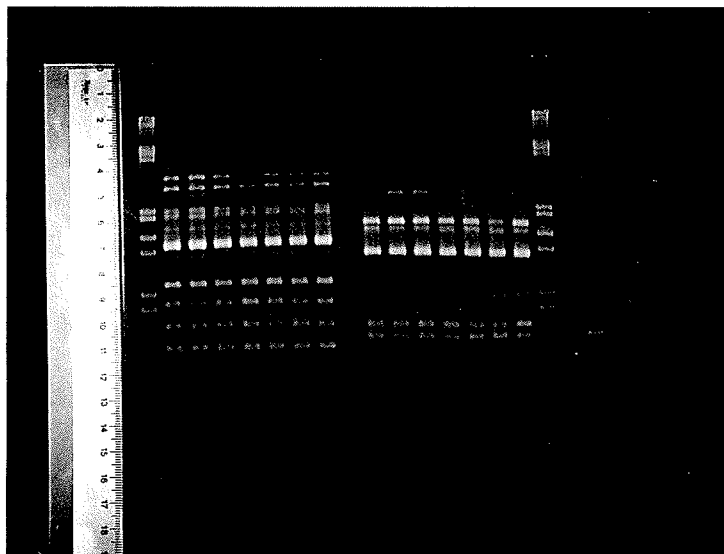


Figura 2: Gel de eletroforese mostrando o comportamento na segregação de um primer monomórfico OPL-13 (canaletas 2 até 8), e de um primer polimórfico OPJ-12 (canaletas 10 até 16). Cada grupo tem a linhagens na seguinte disposição: AH-22, X-2180, XAH-1, XAH-1-4A, XAH-1-4B, XAH-1-4C e XAH-1-4D.

As Figuras 3, 4 e 5 representam ensaios onde se buscou a segregação das bandas polimórficas. Os geis estão organizados na seguinte disposição, da esquerda para a direita: λ Eco RI/Hind III, AH-22, X-2180, XAH-1, XAH-1-4A, XAH-1-4B, XAH-1-4C, XAH-1-4D, XAH-1-11A, XAH-1-B, XAH-1-11C, XAH-1-11D, XAH-1-13A, XAH-1-13C, XAH-1-13D, XAH-1-30A, XAH-1-30B, XAH-1-30C e XAH-1-30D.

Figura 3: "Primer" OPJ 12.

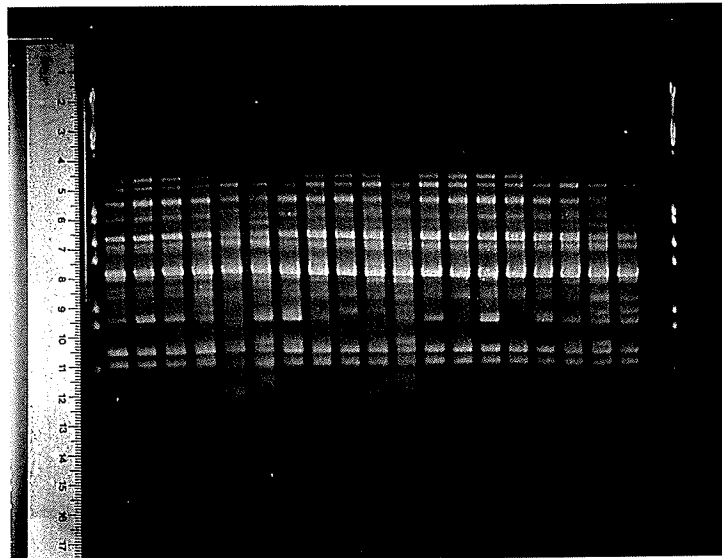


Figura 4: "Primer" OPL-18.

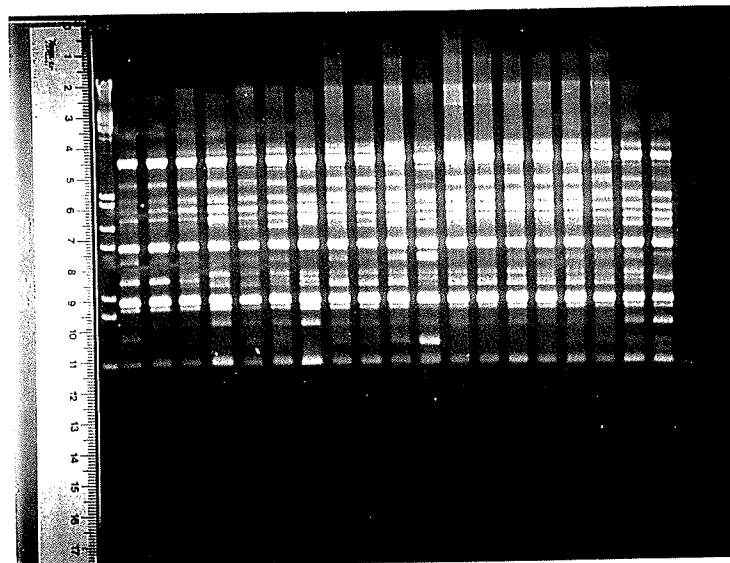


Figura 5: "Primer" OPJ-17.

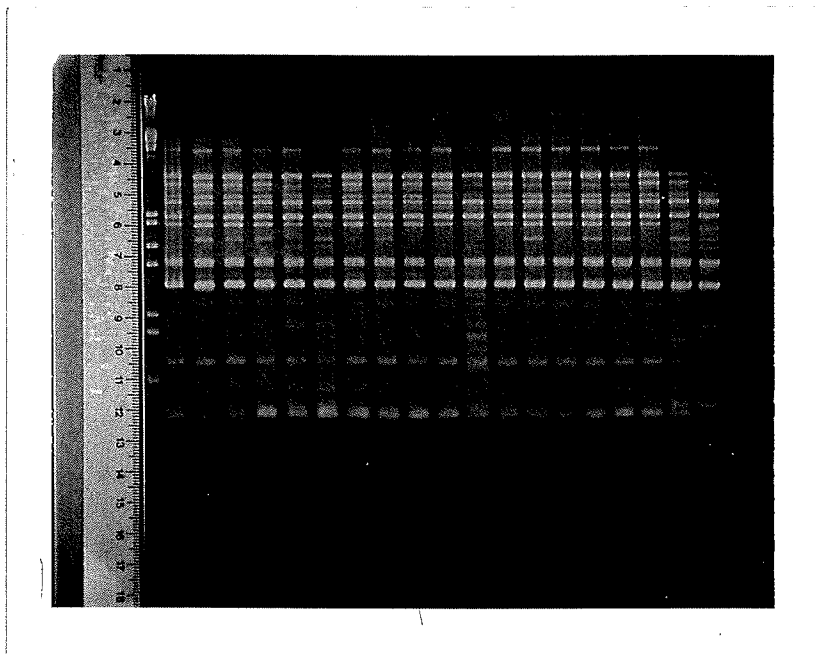


Tabela 3: Produção média de etanol % (v/v), KIDO (1990), entre as linhagens e presença (+) e ausência (-) da banda polimorfica no teste de segregação.

Linhagem	etanol (v/v)	OPJ-12 ₉₀₀	OPL-18 ₁₅₀₀	OPJ-17 ₁₆₀₀
AH-22	6.20	+	-	-
X-2180	7.99	+	-	+
XAH-1	7.57	+	-	+
XAH-1-4A	6.98	+	-	+
XAH-1-4B	6.25	-	+	-
XAH-1-4C	7.57	+	+	+
XAH-1-4D	7.17	+	-	-
XAH-1-11A	7.09	+	-	+
XAH-1-11B	6.69	-	+	-
XAH-1-11C	7.09	-	-	-
XAH-1-11D	3.67	+	+	-
XAH-1-13A	7.32	+	-	-
XAH-1-13B	7.52	-	-	+
XAH-1-13C	6.23	+	-	-
XAH-1-13D	6.86	-	-	+
XAH-1-30A	7.15	+	+	+
XAH-1-30B	7.52	+	+	-
XAH-1-30C	5.74	+	+	+
XAH-1-30D	6.86	+	+	+

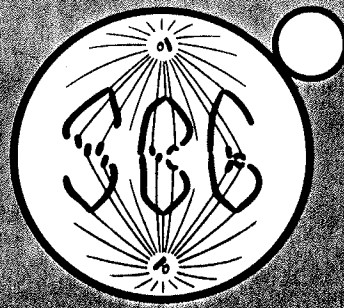
Revista Brasileira de
GENÉTICA

BRAZILIAN JOURNAL OF GENETICS

VOL. 18 - Nº 3 - SUPPLEMENT

SEPTEMBER, 1995

Programa e Resumos



41º CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA
6 à 9 de setembro de 1995
CAXAMBU - MG - BRASIL

SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA

RAPD PARA IDENTIFICAÇÃO LEVEDURAS INDUSTRIAIS

Gomes, L. H.; Argueso, J. L. ; Duarte, K. M. R.; Tavares, F. C. A.
Departamento de Genética, ESALQ / USP, Caixa Postal 83,
Piracicaba, SP.

A identificação molecular de leveduras por RAPD mostrou grande eficiência comparada com outras técnicas. As cinco principais linhagens utilizadas pela indústria alcooleira foram identificadas e os padrões de bandas foram distintos, mesmo havendo alto grau de parentesco. As amplificações foram feitas em volume de 25 μ l contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM de KCl, 3.75 mM $MgCl_2$, 100 μ M 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. Os resultados permitem distinguir a linhagem de levedura padrão dentre outras que eventualmente possam, por exemplo, contaminar a fermentação.

Apoio financeiro - CAPES-PADCT

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES RAPD NA ANÁLISE DE SEGREGANTES MITÓTICOS E IDENTIFICAÇÃO DE MATERIAL GENÉTICO VIRAL EM *Penicillium chrysogenum*. Rosemeire BUENO¹; Maria Helena Pelegrineli FUNGARO²; João Lúcio AZEVEDO¹; Aline PIZZIRANI-KLEINER¹. 1. Depto. de Genética, ESALQ/USP, Piracicaba, S.P. 2. Depto. Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

Marcadores de RAPD foram utilizados para analisar segregantes mitóticos via fusão de protoplastos entre duas linhagens de *Penicillium chrysogenum* de origens diferentes (IFO 4626 e IZ 1671), a fim de ampliar os conhecimentos sobre o fenômeno da parassexualidade nessa espécie. A reação de amplificação foi feita em um volume de 25 µl, contendo 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM Mg CL₂, 200 µM dNTP's, 0,4 µM de primer, 30 ng de DNA e 1,5 unidades de Taq polimerase. As reações foram submetidas a 40 ciclos de amplificação após desnaturação inicial a 92°C de 4 minutos. Cada ciclo consistiu de 1 minuto a 92°C, 1 minuto e 30 segundos a 37°C e 2 minutos a 72°C. Os ciclos foram seguidos de uma extensão final de 3 minutos a 72°C. Um "screening" de 20 primers foi realizado para detectar polimorfismos entre as linhagens parentais, sendo que um destes não deu origem a produto de amplificação. Dentre 19 primers responsivos, até o momento, quatro foram utilizados para a análise das linhagens parentais, do diplóide e dos segregantes mitóticos. Todos os quatro primers selecionados apresentaram de 11 a 18 bandas, embora somente um ou dois polimorfismos entre as linhagens parentais tenham sido detectados. O diplóide apresentou bandas extras para os primers testados, enquanto que os segregantes apresentaram-se semelhantes a um dos pais. Foi verificado em eletroforese em gel de agarose, que uma das linhagens apresenta 3 bandas de RNA viral, sendo as mesmas observadas também no diplóide e em segregantes mitóticos.

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.

205
205 REUNIÃO ANUAL
DE GENÉTICA DE
MICROORGANISMOS

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA
"LUIZ DE QUEIROZ"
(ESALQ/USP)

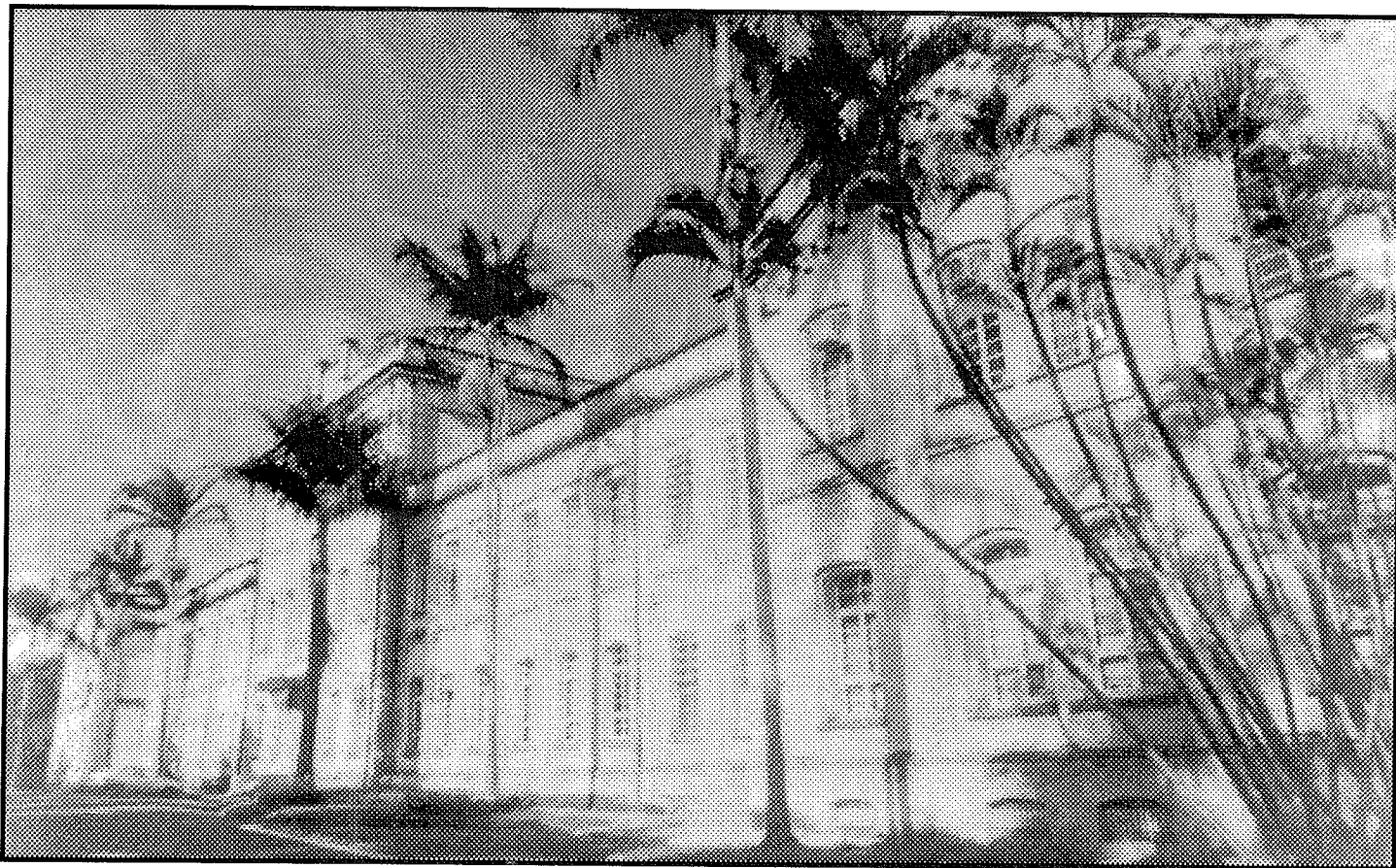
VOLUME 20

PIRACICABA, SP
1995

Relatório de Viagem

**Grupo de Estudos “Luiz de Queiroz”
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Universidade de São Paulo**

**Piracicaba
1995**



Aos nossos pais

ÍNDICE

Roteiro de viagem.....	1
Introdução.....	2
Relatório das visitas:	
- Espanha.....	3
- França.....	3
- Suíça.....	5
- Itália.....	7
- Alemanha.....	8
- Países Baixos.....	11
Conclusão.....	15
Agradecimentos.....	16
Quem é Quem?.....	18

ROTEIRO DE VIAGEM EUROPA (JUNHO-AGOSTO/1995)

GRUPO DE ESTUDOS “LUIZ DE QUEIROZ” (GELQ)

06 - Chegada à Madri

ESPANHA

30/06 - Danone (Barcelona)

FRANÇA

03/07 - Pioneer (Toulouse)

04/07 - INRA / ENSAT (Toulouse)

SUIÇA

06/07 - Ciba-Geigy (Basel)

07/07 - Sandoz (Basel)

ITÁLIA

10/07 - Asgrow Itália (Milão)

14/07 - FAO (Roma)

ALEMANHA

21/07 - Universidade de Hohenheim (Stuttgart)

24/07 - Universidade Técnica de Berlim
(Berlim)

27/07 - Bayer (Leverkusen)

28/07 - Bayer (Leverkusen)

HOLANDA

31/07 - Universidade de Wageningen
(Wageningen)

01/08 - Bloemem Veiling (Naaldwijk)

01/08 - Bruisma Seeds (Naaldwijk)

02/08 - Porto de Rotterdam (Rotterdam)

FRANÇA

12/08 - Saída do aeroporto de Paris.

INTRODUÇÃO

Já faz parte das tradições da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” a viagem técnica realizada pelas turmas de acadêmicos de último ano. A turma ingressante em 1991, dando continuidade a esta tradição, iniciou em 1994 as reuniões que dariam origem ao Grupo de Estudos “Luiz de Queiroz”. Inicialmente a idéia foi tomando forma e em pouco tempo vários colegas aderiram ao projeto, até que o Grupo foi definitivamente consolidado, no mês de abril, com a participação de 16 estudantes.

Uma vez consolidado, a etapa seguinte foi a oficialização do GELQ perante à Congregação da ESALQ, o que facilitaria posteriormente os apoios solicitados.

A seguir, o GELQ procurou estabelecer um organograma que definisse as tarefas de seus membros, assim como seus objetivos, orçamento e prazo de execução do projeto. Ao mesmo tempo, foram discutidas quais as áreas de interesse dos integrantes para uma orientação do roteiro de visitas a ser seguido. Foi então convidado o Prof. Dr. Antonio Roque Dechen para ser o professor acompanhante do Grupo, representando o corpo docente da ESALQ durante nossos compromissos no exterior.

Os trabalhos iniciais permitiram a confecção de um projeto apresentando nossos objetivos e cada um dos membros do Grupo. A partir de julho, tiveram início as entrevistas com diferentes setores da iniciativa privada, principalmente com aquelas relacionadas com o setor agrícola. Em cada entrevista, os membros do GELQ expunham nosso projeto e enfatizavam a necessidade de um apoio concreto para a sua viabilidade, além de destacar o retorno que uma empresa teria participando deste tipo de iniciativa.

Após alguns meses de trabalho intenso, o GELQ começou a receber várias respostas positivas de apoio. O apoio veio de empresas privadas e universidades da Europa, entusiasmadas em recebermos, deixando o Grupo cada vez mais confiante no sucesso do empreendimento. A ajuda foi obtida de diferentes maneiras, de acordo com as possibilidades de cada empresa. Algumas ofereceram suas mercadorias; outras, apoio financeiro e, algumas empresas com sede no exterior, nos ofereceram hospedagem, transporte e alimentação durante as visitas às matrizes.

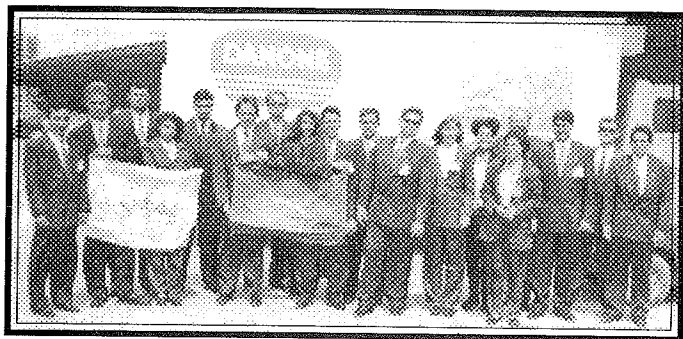
As reuniões eram realizadas semanalmente para se avaliar o trabalho em andamento e traçar uma programação para os dias seguintes. Assim foram sendo atingidas nossas metas, superando os obstáculos que nos encorajaram a seguir adiante.

Finalmente, em 23 de junho de 1995, o Grupo, constituído de 16 estudantes de Engenharia Agrônômica, juntamente com um professor acompanhante, embarcou para a Europa. Concretizava-se nosso objetivo, ao mesmo tempo em que nos era passada a responsabilidade de representar a imagem do estudante brasileiro e da ESALQ no exterior.

ESPAÑA

DANONE

A primeira visita realizada pelo Grupo de Estudos "Luiz de Queiroz" foi à fábrica da Danone na cidade de Barcelona sendo recebido pelos Srs. José Antônio Zaldua e Leonardo Valtez. A visita foi dividida em duas partes: apresentação de uma palestra a respeito da história e organização do Grupo Danone e uma visita à linha de produção da fábrica.



O Grupo na fábrica de Barcelona.

A Danone foi fundada em Barcelona, em 1919 e, atualmente está representada em 30 países. Tem uma participação de 54,1% no mercado europeu, seguida da Yoplait (11,9%) e da Nestlé (10%). O processo de comercialização é inteiramente feito em caminhões frigoríficos. São vendidas mais de 8.000.000 de unidades diárias, em mais de 75.000 pontos de venda. São gastos cerca de 300 milhões de litros de leite por ano.



A Danone mantém e aprimora cultivos microbianos com um acervo de mais de 200 cepas de *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Os produtos passam por um rigoroso controle de qualidade, sendo estudados os efeitos do processo de produção e armazenagem dos produtos. São gastos 1.000.000 de litros de água por dia. O leite é recepcionado, desnatado, pasteurizado e homogeneizado.

FRANÇA

PIONEER

Pela manhã, visitamos a propriedade do Sr. Ramondenc, que foi acompanhada pelo agrônomo Jean Collombier.

A área da propriedade era de 100 ha, dos quais 20 ha destinados a silagem de milho, 25 ha para pasto, 30 ha para feno, 10 ha de cereais (cevada e trigo) e 15 ha para set-aside.



Propriedade do Sr. Ramondenc.

Nesta propriedade a empresa demonstrou alguns dos híbridos utilizados para a produção de silagem de milho. Estes híbridos se denominam "Natalia" e "Cecilia" que correspondem aos números 9422 e 9524, respectivamente. O rendimento alcançado é de 18 ton de MS/ha para silagem com o uso de irrigação, e sem irrigação, 12 ton de MS/ha. Esta alta produtividade é alcançada devido às boas condições do solo, também pelos níveis altos de adubação orgânica e mineral e pela boa qualidade da semente. Tudo isto sendo monitorado pelo técnicos de campo que a empresa fornece



Milho híbrido cultivado na fazenda do Sr. Ramondenc.

vacas lactantes e animais em crescimento para a substituição das mesmas. O rebanho apresentava índices muito elevados, como 1 ano de intervalo entre partos, 300 dias de lactação e uma produção média anual de 8000 kg de leite por lactação. Cada propriedade na CEE tem uma cota de produção, sendo na propriedade visitada, cota de 650 mil litros/ano, pagos pela sua qualidade e composição. Outra regulamentação determina que cada propriedade deve manter 15% de sua área total fora de produção, regime conhecido como set-aside. O governo paga ao proprietário o equivalente à renda que seria obtida pelo uso desta área. Tal medida tem como objetivo a redução dos excedentes de produção gerados na Comunidade Econômica Européia.

Na sequência do programa, foi feita uma visita a um dos laboratórios de pesquisa da empresa. No laboratório são feitas as seguintes determinações para o controle de qualidade: exame de características físicas, germinação e vigor, pureza genética e teste sanitário.

Ainda na visita, foi ministrada uma palestra pelo Sr. Lafargre Gerald que é um dos responsáveis pelo marketing da empresa. A empresa, no ano de 1991, apresentava-se em primeiro lugar no setor de produção de sementes,

Atualmente, a empresa possui mais de 350 distribuidores e 3000 depósitos somente na França. A equipe é composta por 185 funcionários na fábrica, 68 agrônomos e 5 grandes cooperativas com 27800 sócios.

INRA (Instituto Nacional de Pesquisa Agrônômica)

Atualmente, o INRA direciona suas pesquisas principalmente às seguintes áreas: Genética e Biotecnologia, Tecnologia de Alimentos, Produção Animal e Economia.

No setor de Genética e Biotecnologia, as pesquisas estão voltadas para o melhoramento de plantas, hipersensibilidade de plantas, genética molecular e análise de genomas.



GELQ na visita ao INRA.

e a identificação dos métodos de controle para a melhor qualidade dos produtos agroindustriais.

ENSAT (Escola Superior de Agronomia de Toulouse)

O Grupo conheceu a estação experimental de bovinocultura leiteira da ENSAT localizada próxima à cidade de Toulouse.

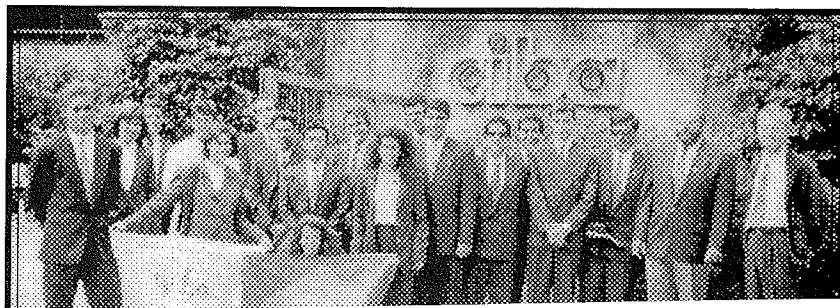


Confinamento na estação experimental da ENSAT.

A estação apresenta índices de produtividade elevados e alta tecnologia de produção. As vacas são identificadas por sensores presos ao pescoço. A cada ordenha um computador registra a produção de cada animal e oferece no momento da alimentação, as quantidades corretas de ração para que haja um equilíbrio nutricional.

Outro equipamento empregado na estação permite a detecção do cio através de outro sensor preso à canela que mede o número de passos dados pelo animal.

Quando esse número aumenta, o computador acusa o cio e procede-se à inseminação



O setor de tecnologia de Alimentos se preocupa com a higiene e segurança alimentar

SUIÇA

CIBA-GEIGY

Em 1970, as indústrias químicas Ciba e Geigy associaram-se, dando origem à empresa Ciba-Geigy Ltda. Atualmente, a empresa trabalha nos setores químico, farmacêutico, agrícola e industrial. No setor agrícola ela opera nas áreas de fitossanidade, saúde animal e sementes, sendo que fitossanidade inclui controle de plantas daninhas, pragas e doenças.

A Ciba-Geigy conta com 85.000 pessoas trabalhando no mundo, sendo 20.000 na Suíça e 12.000 na sede da empresa em Basel e Stein, na região da Basiléia.

Para o desenvolvimento de um novo produto, são necessários de 6 a 8 anos, sendo o investimento da ordem de 100 a 200 milhões de dólares. Durante o desenvolvimento de uma nova molécula para uso agrícola, são testadas suas funções de controle de plantas daninhas, pragas e doenças com a finalidade de observar onde ela se mostra mais eficaz. No desenvolvimento do novo produto, são realizados pesquisa e síntese do produto, experimentos e pesquisa de campo a nível mundial, desenvolvimento biológico, ecológico, toxicológico, econômico e de marketing, registro do produto e finalmente sua oferta no mercado. Para a aprovação de um novo produto, são testadas aproximadamente 20.000 moléculas.

A empresa durante o desenvolvimento do produto realiza muitos estudos relacionados com o comportamento e destino dos produtos

fitossanitários no meio ambiente, sendo este setor de fundamental importância dentro da empresa. Para isso, são utilizados

anual é de 1,2 bilhões de dólares, dos quais 8% são direcionados à pesquisa e desenvolvimento.

pesquisas com o meio ambiente, avaliando-se o comportamento dos produtos no solo e água.

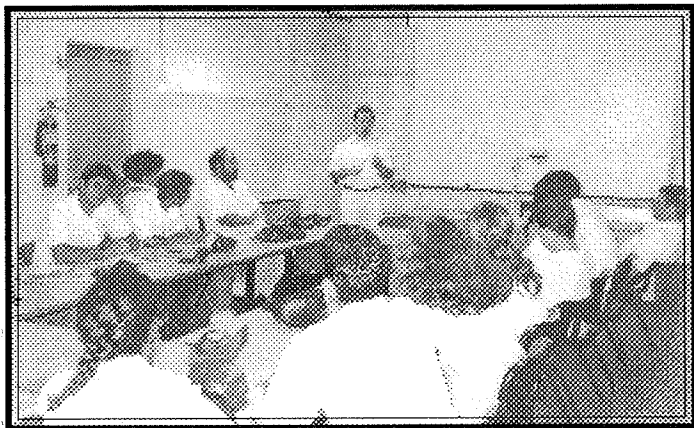
Uma área de grande enfoque na empresa é a relacionada com pesquisa pré-clínica, através do uso da Ressonância Magnética, que tem por objetivo testar os medicamentos nos organismos, antes de introduzir um novo medicamento numa clínica ou mercado. Doenças e transplantes são induzidos em animais para se testar tais medicamentos e sua eficácia.

Durante a visita à Sandoz, o grupo foi recebido pelos responsáveis: Sr. e Sra. Carlo Capone, Sr. Max A. Widmer, Sra. Veronique Altermatt, Dr. Markus Wisson e Dr. Nicolau Beckmann.

ITÁLIA

ASGROW SEMENTES

A Asgrow é uma empresa de origem norte-americana e recentemente, passou ao controle das Empresas Las Modernas do México. Trabalha na área de sementes, principalmente milho, soja, girassol, alfafa, ervilha, tomate e melancia. É líder de mercado no setor de legumes e segunda em cereais.



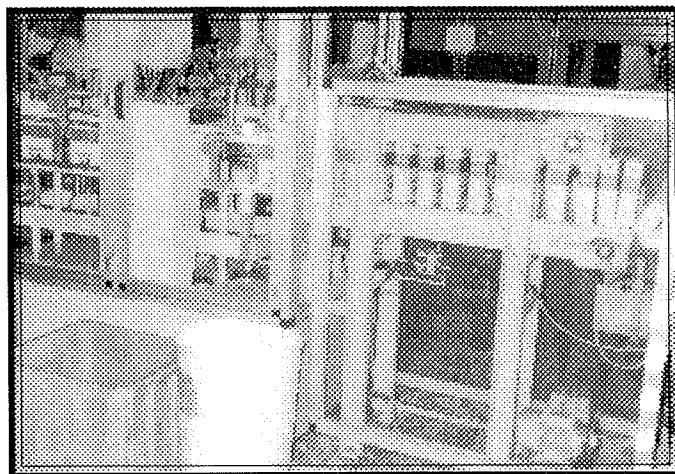
Sr. Giorgio Ahghinetti em palestra ao GELQ.

Em seguida, o grupo foi recebido pelo Sr. Giorgio Ahghinetti, gerente de produção, que apresentou as etapas do processamento das sementes de milho e legumes.

A primeira fase do processamento do milho

isso as sementes são classificadas em 16 tipos, de acordo com o tamanho, comprimento e forma. Antes porém, é preciso reduzir o teor inicial de água da semente de 33% para 14-15%.

Após a secagem e separação, as sementes de milho passam por uma limpeza, são tratadas, ensacadas e por fim classificadas, de acordo com os padrões internacionais de classificação de sementes.



Embalagem das sementes ASGROW.

A Asgrow possui campos de produção em vários países e realiza contratos com terceiros de acordo com suas necessidades, principalmente para tomate, melancia e brócoli.

As sementes de legumes são armazenadas em local climatizado.

As sementes de alface apresentam problemas de germinação devido à ausência de luz e temperaturas abaixo de 24°C. Para isto, a Asgrow desenvolveu um tratamento a base de resinas e choque térmico. Outro tipo de processamento dado às sementes hortícolas é a peletização.

Da colheita ao empacotamento, que é totalmente automatizado, são feitas aproximadamente 40 análises laboratoriais, num intervalo de 30 a 40 dias, e armazenando as sementes por período de até um ano. O controle de qualidade final é realizado nos laboratórios da própria companhia e regulado de acordo com as exigências do ISTA.

Após a apresentação da planta industrial

do produto no solo.

Os estudos de ecotoxicologia são realizados para se observar os efeitos do produto químico sobre microrganismos, algas e plantas, invertebrados e peixes.

Uma nova área de estudo dentro da empresa refere-se ao controle biológico e resistência das plantas às doenças. Para o controle biológico são utilizados principalmente bactérias e fungos, que são isolados e multiplicados em laboratório. Os estudos são realizados em casa de vegetação e campo e então, prossegue-se a formulação adequada, patente, registro e marketing.

Em resistência das plantas através da imunização, a pesquisa é feita para avaliar o comportamento das mesmas em relação aos patógenos. A imunização é realizada através da estimulação de mecanismos de defesa da própria planta, por uma pré-inoculação com o microorganismo em estudo ou por tratamento com um produto químico.

Durante a visita à empresa, o grupo foi recebido pelos responsáveis: Dr. Thomas Egli, Dr. Juan Gonzalez-Valero, Dr. Hans Rufli, Dr. R. Grade, Sr. Paul Stöcklin, Sr. Markus Julmy, Dr. Michael Oostendorp, Dr. Hans-Joachim Kempf e Sr. Axel Lhken.

SANDOZ

A empresa foi fundada em 1886, tendo como principal atividade a produção de corantes.

Em 1917, criou-se o setor farmacêutico, e em 1939, o agroquímico. Atualmente, a Sandoz concentra-se na "Ciência da Vida" - indústria farmacêutica e nutrição.

Em todo o mundo, aproximadamente 60.000 pessoas trabalham na Sandoz.

Em 1994, suas vendas atingiram US\$ 14 bilhões, sendo a contribuição vinda das áreas farmacêutica (45%), nutrição (18%), químico (14%), agrícola (9%), materiais para construção civil (8%) e sementes (6%). O mercado consumidor de seus produtos está concentrado na Europa (40%) e USA e Canadá (34%).

Durante a visita, conheceu-se a indústria de produção de fármacos, onde são produzidas 60 substâncias ativas em 180 diferentes formas.

Os setores de estudo da empresa referem-se à formulação e identificação dos ingredientes ativos, resíduos químicos, metabolismos das plantas e animais e efeitos no ambiente.

Desenvolvem-se métodos analíticos para a identificação e quantificação do ingrediente ativo nos produtos formulados, tudo para um rigoroso controle de qualidade.

Testes são realizados com plantas e solo com a finalidade de avaliar o comportamento dos resíduos químicos nos mesmos. São realizados também estudos de metabolismo de plantas e animais (ruminantes e peixes), para se observar o comportamento dos resíduos químicos nos tecidos e leite.

Grande importância é direcionada à



o Sr. Giancarlo Campi, gerente geral da ASGIW na Itália, e o Engenheiro Agrônomo Sr. Piero

consiste em homogeneizar as sementes, para facilitar o agricultor na operação do plantio e, para

Sismondo, supervisor de produção e mercado, fizeram um histórico da Asgrow Itália e de sua posição atual. A empresa se instalou na Itália após a 2ª Guerra Mundial, graças aos incentivos proporcionados na época pelo plano Marshall. Iniciou suas atividades com sementes hortícolas, e posteriormente oferecendo sementes para grandes culturas como milho, sorgo, girassol e recentemente, introduzindo a cultura da soja no sul da Europa. Atualmente, possui representantes, fábricas e "joint-ventures" em quase toda a Europa.

FAO (Food and Agriculture Organization)

A palestra de introdução da visita foi realizada pelo Dr. Roberto Castelo Branco, onde foi discutido "A Organização das Nações Unidas pela Alimentação e Agricultura" (FAO). Criada em 1945, possui 169 países membros e seu conselho é composto por 49 destes, que se reúnem a cada 2 anos, e elege o diretor geral da FAO, que atualmente é um senegalês, Dr. Jacques Dief.

A FAO oferece assistências técnicas e cooperação com os governos. Possui mais de 2500 projetos mundialmente e mais de 2000 profissionais.

São metas da FAO elevar níveis nutricionais e de vida, e a produtividade agrícola, melhorando a situação da população rural, o que representa um grande desafio para o próximo milênio.

A FAO atua para o desenvolvimento agrícola e rural, oferecendo uma base essencial



para melhorar a nutrição, segurança alimentar e nível de vida.

A entidade acredita ser a agricultura um dos fundamentos de soberania nacional, contribuindo na alimentação da população do país e representando uma fonte decisiva de divisas.

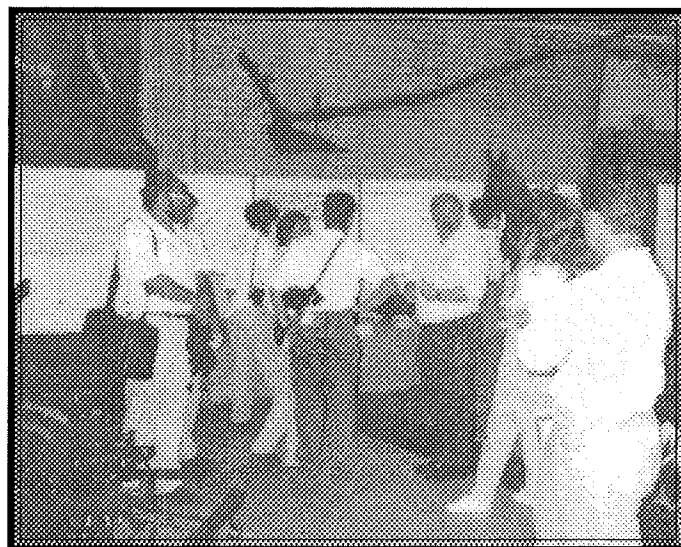
A FAO é regida pela conferência dos estados membros, que examina as atividades realizadas, aprova um programa de trabalho e o orçamento para o biênio seguinte. A contribuição de cada país é calculada em função do seu PIB.

Após a apresentação inicial, o grupo assistiu alguns seminários apresentados por pesquisadores da organização: Dr. Peter Griffee, Dr. Eric Kuenemam, Dr. Sebastião Barbosa e Dr. José de Souza Silva.

ALEMANHA

UNIVERSIDADE DE HOHENHEIM

A visita ao Departamento de Produção Vegetal nos Trópicos e Sub-trópicos da Universidade de Hohenheim contou com a apresentação de três palestras e uma visita ao Campus.



Museu da Agricultura da Universidade em Stuttgart.

A primeira palestra foi proferida pelo Dr. Jürgen Greiling, chefe do Departamento. Ele apresentou um histórico da universidade e do departamento. Hohenheim foi criada em 1818

que reúnem um total de 37 institutos. Os cursos oferecidos aos mais de 6000 estudantes são: Ciências Naturais aplicadas e gerais, Biologia, Ciências Agrárias I (Produção Vegetal e Ecologia), Ciências Agrárias II (Economia Agrícola, Técnica Agrária e Produção Vegetal) e Ciências Sociais e Econômicas. O departamento foi criado em 1980 juntamente com outras áreas ligadas à pesquisa nos trópicos.

O Dr. Thomas Hilger apresentou as atuais prioridades de pesquisa desenvolvidas pelo departamento em três áreas. Em Agronomia, desenvolvimento de sistemas de produção vegetal sustentáveis, proteção e manejo sustentável de recursos naturais, estudos de fisiologia de cultivos tropicais, recursos naturais renováveis e seleção de plantas nativas com valor agro-industrial. Em Ecologia Agrícola, estudos de agroecossistemas, estudos da dinâmica de pragas e ervas daninhas e seu controle, em sistemas agrícolas do pequeno produtor, e estudos da dinâmica de plantas parasitas e seu controle, incluindo controle biológico. Em pastagens e cultivo de forrageiras, recursos genéticos com valor forrageiro, recuperação de pastagens degradadas pela consorciação com leguminosas.

No período da tarde, o Dr. Thomas Gaiser apresentou o projeto WAVES (Disponibilidade de água e vulnerabilidade de ecossistemas e sociologia no Piauí / Ceará), em fase de implantação no nordeste do Brasil, com o objetivo principal de avaliação e prognose, tanto do fenômeno da migração como da situação agropecuária de regiões sob o risco de secas.

Finalizando a visita, o Sr. Bernhard Klocke acompanhou o Grupo numa visita ao Museu de Agricultura da universidade e a um passeio pelo Campus incluindo o jardim exótico, a biblioteca e o edifício central.



Estação ecológica próxima a Berlim.

poluição de solos, erosão hídrica e processos de formação de solos urbanos. A visita teve seqüência na estação ecológica da universidade, onde se encontra o projeto de monitoramento ambiental automatizado. O equipamento consiste de tensiômetros eletrônicos, sondas TDR (Time Domain Reflectometry) e de cápsulas para retirada de solução do solo. Cada uma dessas unidades está ligada a um registrador central que acumula os dados e permite assim, uma análise a longo prazo dos efeitos da poluição do solo através da chuva ácida.

BAYER LEVERKUSEN E CENTRO AGROQUÍMICO BAYER MONHEIM

A visita de dois dias à Bayer teve início no centro de produção de Leverkusen, onde estão concentradas várias unidades. O complexo iniciou suas atividades em 1912, ocupa uma área de 340 ha e possui 600 edifícios onde trabalham 32000 dos 56000 empregados da companhia. Nesse complexo está localizado o Baycomm



GELQ após visita à FAO - Roma.



Confraternização com os amigos da BAYER - Colônia.

(centro de comunicação Bayer), onde o grupo foi recebido pela Sra. Monika Pasbt-Schumacker. Nas diversas salas do Baycomm é apresentada a importância dos produtos Bayer no cotidiano.

Em seguida, o Grupo visitou as instalações do centro agroquímico de Monheim, situado a 15 km de Leverkusen, ocupando uma área de 55 ha. Este é o maior centro de pesquisa fitossanitária do mundo, que foi concluído em 1994 após nove anos de construção. No centro trabalham 1800 pessoas. Seu ponto central é o "Tropicarium", que abriga uma das maiores coleções de plantas tropicais de interesse econômico. Ao seu redor, se agrupam os diversos institutos de pesquisa, assim como o edifício da administração. O ponto inicial foi o "tropicarium", apresentado pela Sra. Krewer. Este edifício possui luz, umidade e temperatura adequadas ao crescimento de uma grande variedade de espécies tropicais. No auditório do edifício foi exibido um filme sobre a importância da pesquisa agroquímica para a produção de alimentos.

No instituto de entomologia, o Dr. Elbert mostrou as instalações onde é feito o screening

novas substâncias, totalizando 40000 testes a cada ano. Também foram apresentados os produtos em desenvolvimento, visando um menor dano ao meio ambiente e aos inimigos naturais das pragas. Produtos como fungos entomopatogênicos e inseticidas aplicados em pequenas gotas com feromônios estarão no mercado em poucos anos. Em seguida, foram visitadas instalações de pesquisa de efeitos dos agroquímicos sobre o meio ambiente. No instituto de metabolismo o Dr. Gram apresentou os ensaios de toxicologia dos produtos Bayer, desenvolvidos em animais (peixes e aves), plantas e microrganismos. Esta é uma das etapas anterior à liberação do produto para comercialização. Finalizando a visita, o Grupo conheceu os lisímetros instalados em Monheim para estudo da dinâmica dos produtos no solo. As colunas de solo são retiradas do local de origem, sem a alteração da estrutura. Tem área de 1 m quadrado e profundidade de 1,2 m, representando uma amostra muito significativa do perfil. As substâncias são marcadas radioativamente e aplicadas sobre a cultura instalada no cubo de solo. A água que infiltra pelo lisímetro é coletada e analisada quanto à

ESTAÇÃO EXPERIMENTAL BAYER HÖFCHEN

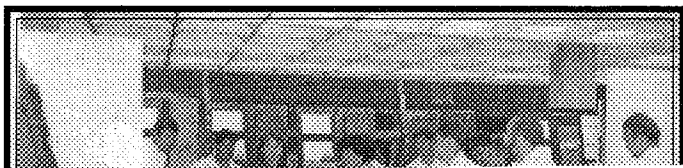
A Fazenda Höfchen foi adquirida em 1940 pela Bayer, com o objetivo de estabelecer uma estação experimental para trabalhos de pesquisa fitossanitária. Está situada no distrito rural de Burscheid, entre Leverkusen e Wuppertal. Possui 35 funcionários, sendo 10 pesquisadores e 25 de pessoal de apoio. Atualmente, a estação ocupa uma área de 110 hectares. Dos 100 ha cultivados, 75 ha são ocupados por culturas anuais, 16 ha com frutíferas e 9 ha com pastagens. A estação ainda possui uma área de 10 ha de reflorestamento. A estação de Höfchen foi apresentada pelo seu diretor, Dr. Hans Karl Kirfel. Na primeira etapa, foi apresentada a infraestrutura disponível na estação, sala de armazenamento de agroquímicos, sala de pesagem e equipamentos para o tratamento de sementes, bem como máquinas e implementos utilizados nas operações de semeadura de precisão, pulverização e colheita.

Na segunda etapa, foram apresentados os ensaios de defensivos agrícolas em culturas anuais, principalmente trigo. Em seguida, os ensaios com frutíferas, principalmente maçã, reunindo uma coleção de variedades de toda a Alemanha e também de outros países. No laboratório foi feita uma demonstração da avaliação do nível de infestação de patógenos (ferrugem e oídio) em trigo, visando a aplicação do manejo integrado de doenças.

PAISES BAIXOS

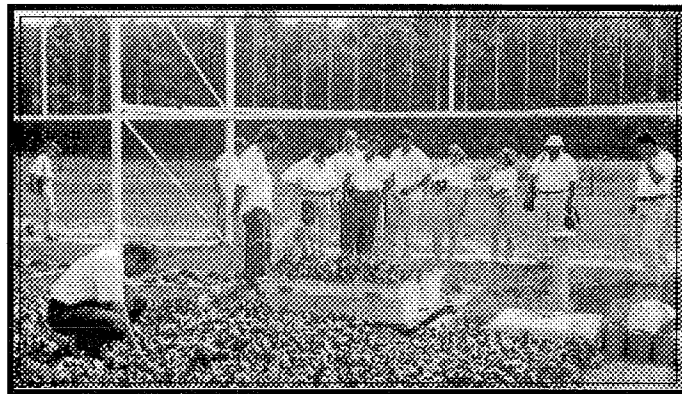
UNIVERSIDADE DE WAGENINGEN

A Universidade de Wageningen, situada na cidade de Wageningen a aproximadamente



100 km de Amsterdam, é uma das maiores universidades da Holanda, com 119 anos de existência. Possui por volta de 6500 alunos de graduação distribuídos em diferentes cursos de diversas áreas.

As visitas foram orientadas pelo professor Marcos Bernardes, do Departamento de Agricultura da ESALQ-USP, que está



Departamento de Produção Vegetal - Wageningen.

desenvolvendo seu curso de doutoramento nesta universidade.

A primeira visita foi realizada no ISRIC - The International Soil Reference and Information Centre.

O ISRIC é um centro de documentação, pesquisa e treinamento sobre solos do mundo, com ênfase em países em via de desenvolvimento.

O Dr. Hans Van Baren, diretor do ISRIC, fez uma introdução sobre as principais atividades desenvolvidas e os objetivos do centro, citando: os principais problemas dos solos europeus, como acidificação, poluição e degradação, a coleta de solos africanos para pesquisa, identificação e treinamento de pessoal para o desenvolvimento agrícola destas áreas; a coleta de amostras de solos de países de todo o mundo, para estudo detalhado e exposição na coleção de solos do Centro.

O ISRIC recebe colaboração de diversas

coleção é composta por 850 perfis de solos, amostrados em mais de 60 países.

Logo após, o professor Marcos Bernardes mostrou ao grupo as demais instalações e departamentos pertencentes à Universidade.

No período da tarde, visitamos o Departamento de Teoria da Produção, acompanhado pela pesquisadora Anne Marie Van Dan. Foram apresentados os campos contendo diferentes ensaios. O primeiro experimento era desenvolvido em estufas, onde se analisava o comportamento de plantas sob diversas condições do solo. Existiam parcelas de 1,25 x 1,25 x 2,00 m de profundidade, onde se controlavam a água no solo, aeração, infiltração e percolação para avaliar a interferência no crescimento de raízes. Todo o sistema é muito complexo e altamente informatizado, dispondo de um equipamento de TV com microcâmeras dispersas no solo, onde se pode analisar o crescimento das raízes. O sistema de fertirrigação é automático, com tensiômetros eletrônicos, medidores de condutividade elétrica e outros.

O outro experimento tinha como objetivo observar o comportamento da planta em meio saturado de CO₂. As parcelas eram completamente isoladas por plásticos, não havendo interferência do meio ambiente.

Posteriormente, o Sr. Rudy Rabbeuge em sua explanação comentou a situação sócio-econômica da Holanda no aspecto agrícola. A Holanda é o segundo país exportador de produtos agropecuários do mundo. Chega a exportar 60 bilhões de dólares por ano apenas em flores.

Além disso, o Sr. Rabbeuge abordou um programa educacional constituído por cursos básicos, cursos avançados e treinamento individual. No programa de pesquisa, ele deu destaque aos seguintes parâmetros: solo e clima, crescimento e desenvolvimento de culturas, pragas, doenças e plantas daninhas, e sistema de produção agrícola.

Integrando estes tópicos foram

situações.

Por fim, foi feita uma demonstração do software de simulação de produção no computador, utilizando estes modelos, aos alunos do GELQ.

BLOEMEN VEILING

Nesta oportunidade, o Grupo visitou o maior leilão de flores do mundo. Situado numa área de 45 ha, com cerca de 1400 funcionários. O leilão de flores comercializa mais de 10.000 flores/dia, de mais de 3000 espécies e gerando um faturamento de aproximadamente 5 milhões de florins/dia (3 milhões de dólares/dia).

O leilão funciona em um sistema cooperativista integrando mais de 4.000 produtores, sendo 5 a 6% do faturamento repassado para a cooperativa.

Cerca de 80% das flores comercializadas são exportadas, principalmente para a França e Alemanha. O restante fica no mercado interno.

As flores chegam um dia antes e recebem um tratamento químico, que tem como função conservar as flores garantindo a qualidade. Perde-se muito pouco, aproximadamente 1%. As flores ficam armazenadas a 2 graus no período noturno, para serem comercializadas na manhã seguinte durante o leilão.

As flores são levadas em lotes a leilão, onde os compradores as observam acompanhados dos catálogos contendo todas as informações sobre o produto. Existem oito recintos de leilão.



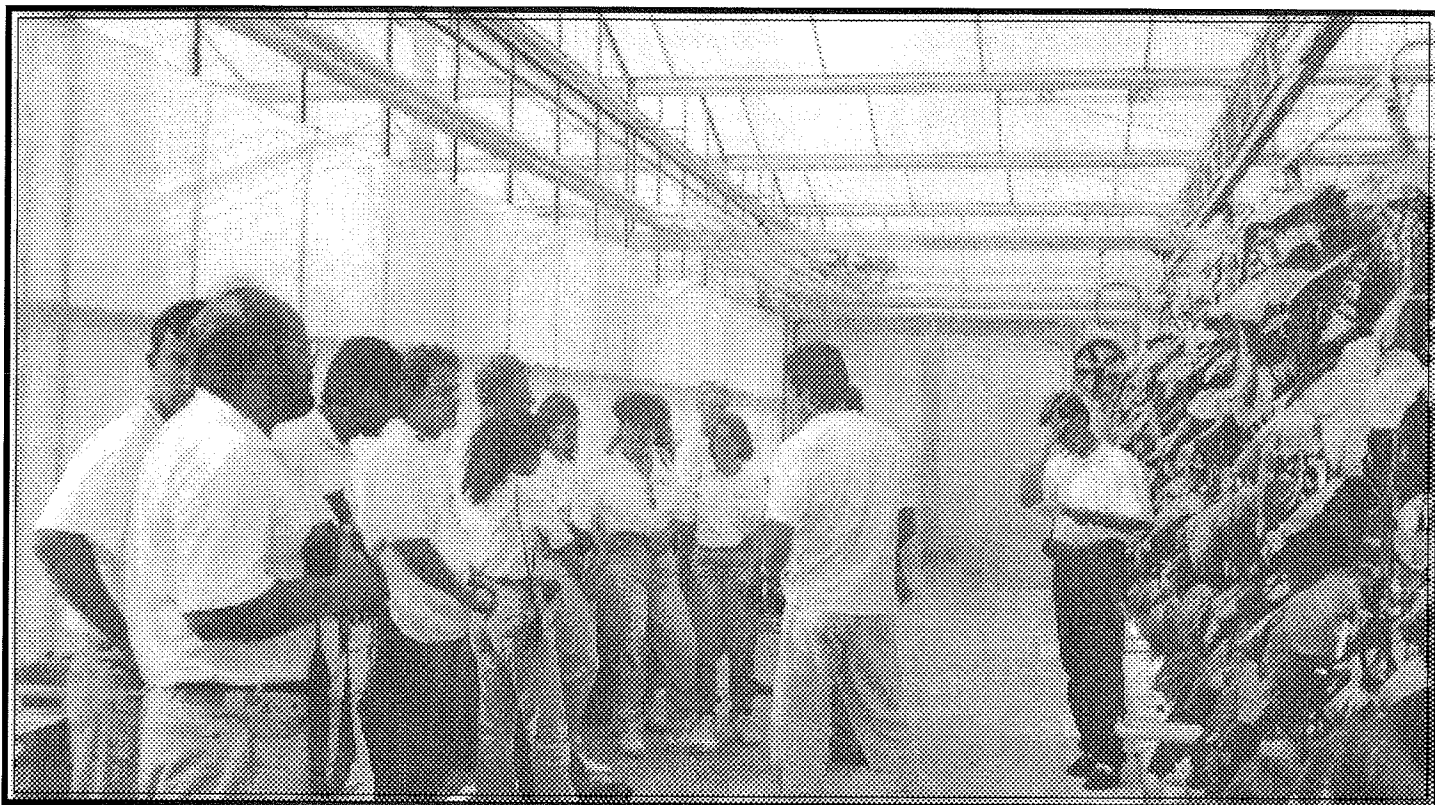
As flores não negociadas vão a um mercado anexo e são comercializadas a preços mais altos.

BRUINSMA SEEDS

A visita foi orientada pelo Sr. Henk Van Kooten, que recebeu o Grupo, representando a empresa. A Bruinsma é ligada ao grupo Asgrow

acondicionamento é feito em embalagens seguras e descontaminadas em uma sala climatizada.

O Grupo foi convidado a conhecer três produtores que utilizam os produtos da empresa. O primeiro, produtor de tomate, usa hidroponia, e obtém um rendimento de 60 kg/m² e possui uma



Estufa de produção de sementes de pepino.

e desenvolve, produz e comercializa principalmente sementes de hortaliças como: tomate, pepino, pimentão, melão e outras.

O maior mercado explorado pela empresa é o europeu, no entanto, possui unidades dispersas pelo mundo. No vídeo apresentado, o Grupo conheceu as instalações da empresa e a metodologia de obtenção de híbridos através de melhoramento genético daquelas espécies.

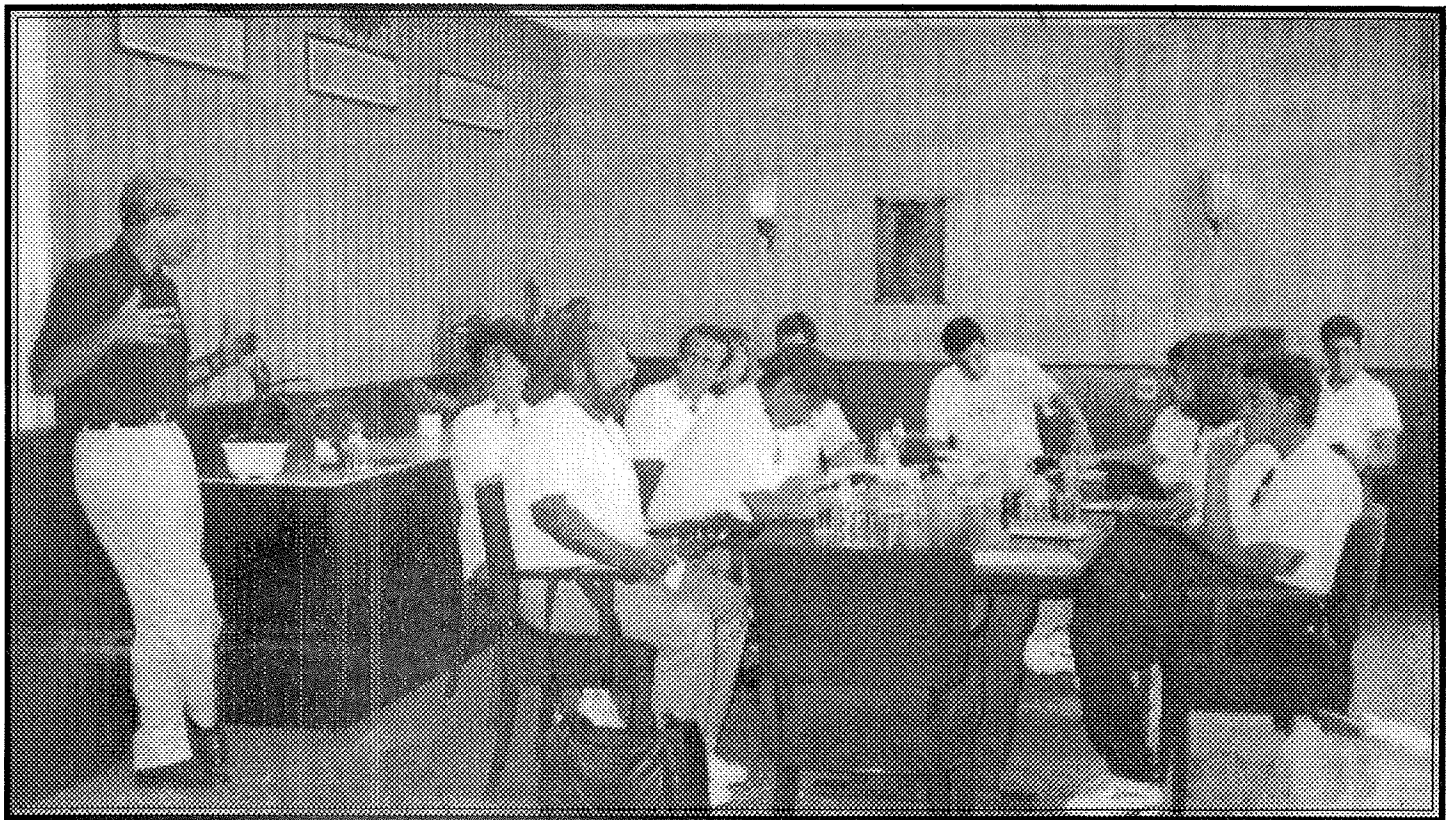
Foram mostradas ao Grupo as estufas de produção de sementes de pepino, pimentão e tomate. O sistema é sofisticado e muito informatizado. O controle de polinização é rigoroso e bastante confiável. São feitas diversas

área de 12.000 m². O segundo, de pimentão, numa área aproximada de 9.000 m², sendo 90 a 95% da produção voltada para a exportação. E por fim, um produtor de crisântemo e girassol. Os três produziam em estufas com 100% de controle biológico.

VELLEMAN & TAS

Nesta visita conhecemos o porto de Rotterdam, acompanhado do Sr. Ton Feelders, representante da Velleman & Tas. Essa empresa é uma importadora de frutas frescas, oriundas de vários países produtores do mundo. Possui armazéns frigoríficos com capacidade de 100.000 m³, situados numa posição privilegiada

ser utilizados em várias culturas e em diferentes desenvolvidos modelos matemáticos que podem



Após o leilão, o Grupo tira dúvidas sobre seu funcionamento.

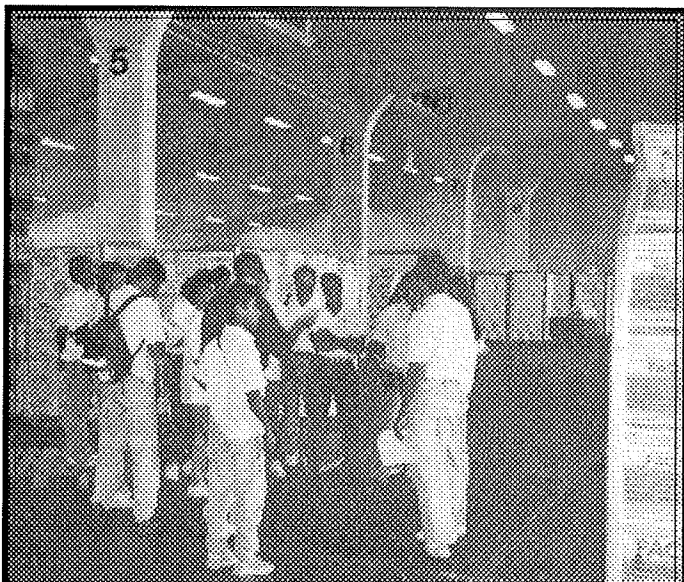
do leilão, os compradores observem a qualidade, cor e sabor dos frutos que irão adquirir.

As principais frutas comercializadas no leilão são laranja, tangerina, kiwi, melancia, uva, abacaxi, pêsego, pera e outras. Os principais fornecedores destas frutas são: Brasil, Argentina, Nova Zelândia, Chile, Itália, França e outros.

Os frutos que chegam ao porto são armazenados em grandes galpões frigoríficos a temperaturas baixas, aguardando a sua distribuição aos consumidores de todo o mundo.

O porto é o maior do mundo e tem importância vital para toda a Europa. Está localizado a aproximadamente 25 km da foz do rio Reno, no Oceano Atlântico. Existe um projeto para a ampliação do porto até o ano 2005, aumentando assim sua capacidade.

O leilão é realizado na própria empresa e acontece diariamente num auditório frequentado por compradores holandeses e de outros países. O preço do produto leiloado tende a ser justo, obedecendo a lei da oferta e demanda. Os compradores são atacadistas e fazem a distribuição dos produtos atingindo cerca de 200 milhões de consumidores.



CONCLUSÃO

O aprimoramento intelectual e técnico sempre foi o principal objetivo do Grupo de Estudos "Luiz de Queiroz". De fato, nossas aspirações foram satisfeitas pelas visitas que realizamos, pelos países e culturas que conhecemos e pelas pessoas que tivemos oportunidade de contactar. Contudo, devemos mencionar a experiência de desenvolvimento humano por que cada um de nós passou durante a viagem de estudos. O convívio intensivo com os colegas de Grupo fez crescer em nós o sentido de respeito mútuo, camaradagem, compromisso e amizade que fizeram com que ao final de 52 dias nosso projeto fosse concluído.

No entanto, ao desembarcar no Brasil, nos é apresentado um novo desafio. Após conhecer novas tecnologias, programas de pesquisa de vanguarda, estruturas empresariais de porte mundial e podendo absorver uma visão internacional do setor agropecuário, nosso novo compromisso é compartilhar essa rica experiência com nossos colegas. Estamos deixando neste momento as salas de aula da ESALQ com uma grande oportunidade para contribuir para o progresso da Engenharia Agrônômica e da agropecuária brasileira, aplicando aqui os novos conhecimentos e também sabendo evitar os erros cometidos em outros países.

AGRADECIMENTOS

A viagem do Grupo de Estudos "Luiz de Queiroz" só foi possível devido à confiança depositada em cada um de seus membros e no projeto, por aqueles que se juntaram a nós para alcançarmos uma meta. Por esta razão, fazemos público nosso agradecimento às pessoas e instituições participantes do projeto.

- ADAG - Serviços de Publicidade Ltda
 - AJINOMOTO INTERAMERICANA Ind. e Com. Ltda
 - ASGROW DO BRASIL SEMENTES Ltda
 - BAYER DO BRASIL
 - BRASKALB
 - CALDEMA Equipamentos Industriais Ltda
 - CARGILL AGRÍCOLA S/A
 - CIBA
 - DAAD - Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico
 - DANONE
 - DMB Máquinas e Implementos Agrícolas Ltda
 - FCB/SIBONEY PUBLICIDADE LTDA
 - FMC DO BRASIL Ind. e Comércio Ltda
 - IPIRANGA SERRANA Fertilizantes
 - J.F. PAVIMENTAÇÃO SÃO PAULO Ltda
 - MARCHESAN Implementos e Máquinas Agrícolas TATU S/A
 - MASCHIETTO Implementos Agrícolas Ltda
 - MEFSA - Mecânica e Fundação Santo Antônio Ltda
 - PIONEER
 - RÁDIO AMERICA S/A
 - ROHM & HAAS BRASIL Ltda
 - SAKURA NAKAYA ALIMENTOS Ltda
 - SUCOCÍTRICO CUTRALE
 - ZENECA AGRÍCOLA
-
- Dr. Flavio Fava de Moraes - Reitor da Universidade de São Paulo
 - Dr. João Lúcio de Azevedo - Diretor ESALQ - 1990-1994
 - Dr. Evaristo Marzabal Neves - Diretor ESALQ - 1995
 - Dr. Justo Moreti Filho - Diretor Presidente da FEALQ
 - À Srta Rosane Aparecida Grisoto - FEALQ
 - Sessão de Alunos de Graduação - ESALQ
 - Membros de Grupos anteriores - GELQ 1991; GEEULQ 1993; GEULQ 1994.
 - FAX CENTER Comércio de Suprimentos e Serviços em Informática Ltda
 - Curso Pós-Graduação Microbiologia Agrícola - ESALQ/USP

Agradecimentos especiais ao Prof. Dr. Antonio Roque Dechen e à sua esposa Sonia Carmela Falci Dechen pela amizade e apoio constante.

O Grupo agradece ainda a todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a realização deste projeto.

AGRADECIMENTOS AOS QUE NOS RECEBERAM NA EUROPA

DANONE:

Sr. Jose Antonio Zaldua
Sr. Leonardo Valtez

PIONEER:

Sr. Gérard Faure
Sr. Jean Collombier
Sr. Lafargre Gerald
Sr. Ramondenc

INRA:

Dr. Jean-Claude Flanant

ENSAT:

Dr. Kaemmerer
Dr. Raymond Moncoulon

CIBA:

Sr. Axel Lohken
Dr. Hans Ruffli
Dr. Hans-Joachim Kempf
Dr. Juan Gonzalez-Valero
Sr. Markus Julmy
Dr. Michael Oostendorp
Sr. Paul Stöcklin
Dr. R. Grade
Dr. Thomas Egli

SANDOZ:

Sr. e Sra. Carlo Capone
Dr. Markus Wisson
Sr. Max A. Widmer
Dr. Nicolau Beckmann
Sra. Veronique Altermatt

ASGROW:

Sr. Giancarlo Campi

Sr. Giorgio Ahghinetti
Sr. Piero Sismondo

FAO:

Dr. Eric Kuenemam
Dr. José de Souza Silva
Dr. Peter Griffee
Dr. Roberto Castelo Branco
Dr. Sebastião Barbosa

UNIVERSIDADE de HOHENHEIN:

Sr. Bernhard Klocke
Dr. Jürgen Greiling
Dr. Thomas Gaiser
Dr. Thomas Hilger

UNIVERSIDADE TÉCNICA de BERLIM:

Dr. Christian Roth

BAYER:

Dr. Elbert
Dr. Gram
Dr. Hanskarl Kirfel
Sra. Krewer.
Sra. Monika Pasbt-Schumacker

UNIVERSIDADE de WAGENINGEN:

Dra. Anne Marie Van Dan
Sra. Cristine Nuggler
Dr. Hans Van Baren
Sr. Marcos Bernardes
Dr. Rudy Rabbeuge

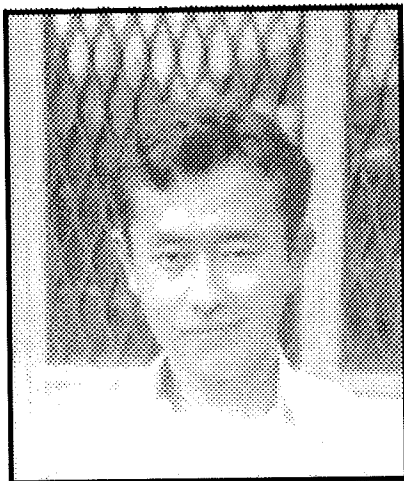
BRUINSMA SEEDS:

Sr. Henk Van Kooten

VELLEMAN & TAS:

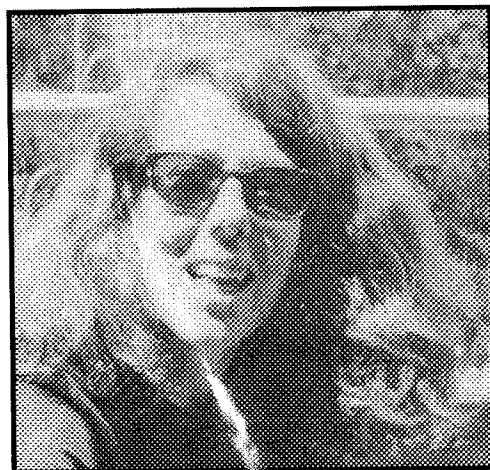
Sr. Ton Feelders

Quem é Quem?



DAYSÚ
Cícero Mineo Mizote
Rua Marechal Deodoro, 1317 - Zona 7
Maringá - PR cep: 87030-020
fone: (044) 2245021
25/06/73

GIBSITA
Eliana Salgado Marconi
Av: Duque de Caxias, 291 - Bairro Jardim Europa
Piracicaba - SP cep: 13416-270
fone: (0194) 22-5343
19/01/69



PERERЕК
Fernanda Januzzi Mendes
Av: Holanda, 122
Piracicaba - SP cep: 13416-260
fone: (0194) 33-1392
27/06/73

CETIM
Jansen Joyce Jacon
Rua Prudente de Moraes, 155 Bairro Centro
Limeira - SP cep: 13480-738
fone: (0194) 41-6720
05/07/73



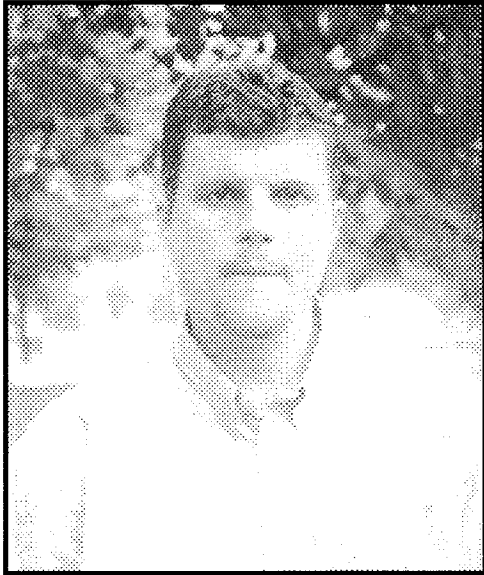
VOÇOROK

João Maurício Bueno Vendramini
Av: Gastão Vidigal, 232
Araraquara - SP cep: 14800-000
fone: (0162) 36-5709
24/12/72



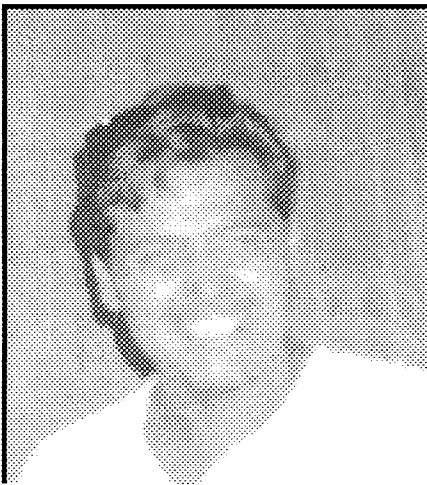
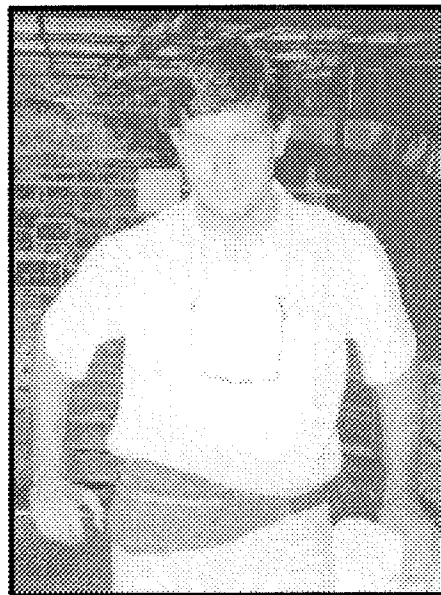
VARZINO

José Roberto Aprillanti Júnior
Rua Professora Ruth Fonseca, 111
Bairro Jardim Brasil
Jundiaí - SP cep: 13200-000
fone: (011) 436-5947
11/10/72



BARRABÁS

Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida
Rua Barão de Itambé, 54 apto 401 - Botafogo
Rio de Janeiro - RJ cep: 22231-000
fone: (021) 551-1935
13/08/72



XICRETINHO

Luiz Pereira Barreto Vinholis Filho
Rua Rui Barbosa, 367 apto 14 - Bairro Centro
Ribeirão Preto - SP cep: 14010-100
fone: (016) 6347745
29/08/73





BIBI

Paulo Tosi

Rua Ana Ramos de Carvalho, 805 - Bairro Nova Jaboticabal

Jaboticabal - SP cep: 14870-000

fone: (0163) 22-1661

25/01/72



SADÃ

Rafael Roque

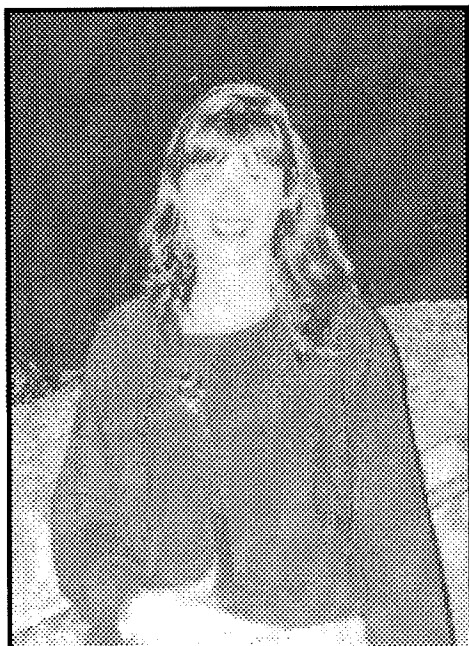
Rua Dr. Antônio Frederico Ozanan, 269

Bairro Parque Real

Limeira - SP cep: 13480-688

fone: (0194) 51-5321

23/01/73



PENUGEN

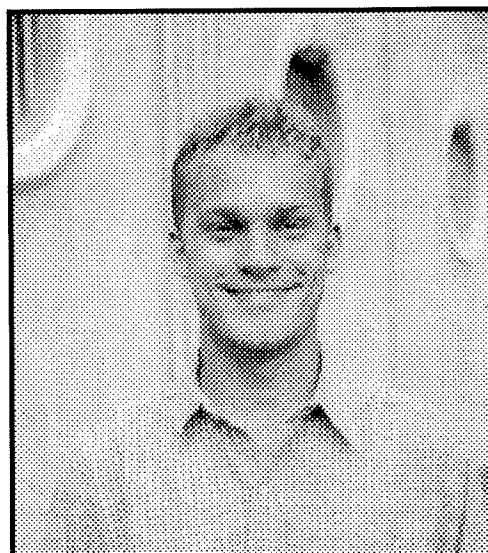
Renata Waldemarin Maschietto

Av: Expedicionário Diogo Garcia Martins, 1148

Penápolis - SP cep: 16300-000

fone: (018) 652-0187/ 652-1303

04/06/71



HUSSEN

Rodrigo Peixoto dos Santos

Rua João Carlos Batista Levy, 261

Bairro São Cristovão

Limeira - SP cep: 13480-574

fone: (0194) 41-7493



BURGA

Marcela de Mello Brandão

Alameda Sarutaria, 186 apto 41 Bairro Jardins

São Paulo - SP cep: 01403-010

fone: (011) 887-1989

19/09/72



TROÇO

Marcelo Cruvinel Petto

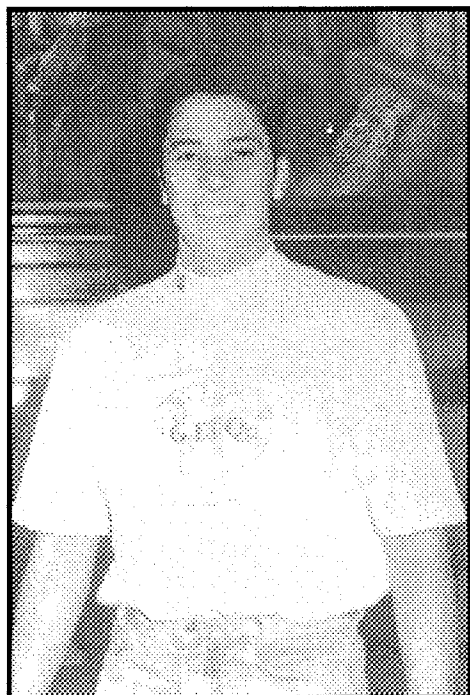
Av: Pres. H. de Alencar Castelo Branco, 286

Bairro Jardim Mercedes

Limeira - SP cep: 13480-230

fone: (0194) 41-4282/ 410861

21/01/73



JUK

Nicolau Celestino dos Passos Júnior

Rua Guilherme Bebiano Martins, 238 - Saúde

São Paulo - SP cep: 04295-010

fone: (011) 946-0436

23/05/73



LIGERO

Paulo Augusto Zanin

Av: Bento de Abreu, 548 - Bairro Fonte Luminosa

Araraquara - SP cep: 14802-396



28/05/73



ANTONIO ROQUE DECHEN

Professor acompanhante
Dep. Química ESALQ/USP

Rua Bom Jesus, 1875
Piracicaba - SP cep: 13417-000
fone: (0194) 33-5736
05/04



SONIA CARMELA FALCI DECHEN

Rua Bom Jesus, 1875
Piracicaba - SP cep: 13417-000
fone: (0194) 33-5736
05/06



*Arte &
Linha*

Rua Rio Grande do Norte, 379
Fone: (0194) 26-5388
Vila Prudente (Piracicamirim)
CEP 13420-500 - Piracicaba-SP