

**PROGRAMA ESPECIAL DE TREINAMENTO  
EM  
BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO ANUAL XIV**

**SESu/MEC  
ESALQ / USP  
PIRACICABA  
DEZEMBRO/1999**

**RELATÓRIO ANUAL DE ATIVIDADES  
PET-BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**(01 / Janeiro a 31 / Dezembro de 1999)**

**Tutor:** Flavio Cesar Almeida Tavares

**Bolsistas:**

Adriano Reis Lucheta  
Ana Paula Matoso Teixeira  
André de Sousa e Silva  
Carolina Bueno de Abreu  
Daniel Macedo Abbud  
Eric Franchi Leonardo  
Éverton Yoshiaki Hiraoka  
Fábio Henrique Bicudo da Silva  
Juliana Abreu Giacomeli  
Rodrigo Mendes  
Simeire Aparecida Manarin  
Zayame Vegette Pinto

**Colaboradores:**

Carmo Augusto Lara Poloni  
Max Francisco Fernandes

## ÍNDICE

1. Identificação do Grupo	03
2. Informações sobre os bolsistas	04
2.1. Desempenho no curso de graduação	04
2.2. Desempenho nas atividades do PET	06
2.3. Desligamentos/Inserções de novos bolsistas	06
2.4. Período de férias das atividades do PET	07
3. Atividades desenvolvidas pelo Grupo PET	07
3.1. Reuniões administrativas com o tutor	07
3.2. Seminários/Conferências/Palestras	12
3.3. Filmes científicos/Exposições	15
3.4. Participação em Congresso	15
3.5. Pesquisa	17
3.6. Cursos extra-curriculares	20
3.7. Visitas a Institutos, Centros de Pesquisa, Empresas, etc	20
3.8. Publicações em Boletim, Periódicos, Anais e Congressos, etc	22
3.9. Estudo de língua estrangeira	23
3.10. Leituras extra-curriculares	25
3.11. Outras Atividades	34
4. Avaliação	34
4.1. Apreciação qualitativa do Grupo	34
4.2. Acompanhamento interno dos Grupos PET-CAPES	35
4.3. Sugestões do Grupo para aprimorar a qualidade do desempenho do próprio Grupo e do PET, visando torná-lo mais eficazes e eficientes	35
5. Informações sobre os ex-bolsistas	36
6. Anexos	38

## **1. IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO PET**

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

**GRUPO:** PET - Biotecnologia Agrícola

**IMPLANTAÇÃO DO GRUPO :** Fevereiro de 1988

**TUTOR:** Prof. Dr. Flávio César Almeida Tavares

**RELATÓRIO :** XIV                    **PERÍODO:** De Janeiro a Dezembro/1999

### **RESUMO DAS ATIVIDADES REALIZADAS PELO GRUPO:**

a) Organização da V Reunião Pró - Aprendizagem Ativa, no Anfiteatro do Departamento de Genética, ESALQ/USP, no dia 29/05/1999.

b) Ciclo de Seminários Internos do Grupo PET – Biotecnologia Agrícola, na Sala de Seminários do Departamento de Genética, Outubro e Novembro de 1999 .

c) Participação no Encontro da Sociedade Brasileira de Genética - Regional de São Paulo, realizado na ESALQ/USP, no dia 12/06/99

d) Participação do II AMUN – Americas Model United Nations, na Universidade de Brasília, Unb, de 27/06 a 01/07/99

e) Participação na 51ª Reunião Anual da SBPC – Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de 7 a 11/07/99.

f) Realização do processo de seleção de novo bolsista, //1999.

g) Participação no 3º Simpósio da Cultura da Seringueira, no Anfiteatro do Departamento de Engenharia Rural, de 27/09 até 01/10/99.

h) Participação no 16º Encontro Sobre Temas de Genética e Melhoramento, no Anfiteatro do Departamento de Genética, ESALQ/USP, dias 13 e 14/10/99

i) Participação no XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, no Centro de Convenções da Bahia, Salvador, dias 24 a 28/10/99

j) Organização do VIII CAB – Curso de Atualização em Biotecnologia, no Anfiteatro do Departamento de Engenharia Rural, ESALQ/USP, dia 05/11/1999.

k) Organização do II INTERPETS, Juntamente Com os Grupos PET Zootecnia (USP) e Pedagogia (UNESP) – Reunião dos Grupos PET do Estado de São Paulo, na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos , FZEA/USP, entre os dias 15 e 17 de dezembro.

## ESTRUTURA FÍSICA

Três salas, sendo uma para reuniões e seminários, contendo mesa com 15 cadeiras, quadro negro, retroprojetor, ar condicionado, computador pentium e uma impressora, outra servindo como depósito de materiais e arquivo, e a terceira desativada temporariamente.

## 2. INFORMAÇÕES SOBRE OS BOLSISTAS

### 2.1. Desempenho no curso de Graduação

a) Quadro de Relação Nominal

Nome do Bolsista	Ingresso no PET		Semestre Atual da Graduação	Rendimento Escolar: Média Geral
	Mês / Ano	Semestre/ Graduação		
Adriano Reis Lucheta	Mar/99	5º	6º	7.23
Ana Paula Matoso Teixeira	Set/98	4º	6º	8,27
André de Sousa e Silva	Set/98	2º	4º	6,65
Carolina Bueno de Abreu	Out/97	4º	8º	6,68
Daniel Macedo Abbud	Mar/99	3º	4º	6.35
Eric Franchi Leonardo	Mar/99	3º	4º	6.59
Éverton Yoshiaki Hiraoka	Set/99	2º	2º	7.93

Fábio Henrique Bicudo da Silva	Nov/97	2º	6º	6.96
Juliana Abreu Giacomeli	Set/98	4º	6º	6.96
Rodrigo Mendes	Set/98	2º	4º	7,73
Simeire Aparecida Manarin	Mai/99	3º	4º	6.27
Zayame Vegette Pinto	Mar/99	5º	6º	7.70

a.1) Desempenho Acadêmico na Graduação

**Médias dos alunos**

Nome do Bolsista	Médias		
	1º 1999	2º 1999	Geral
Adriano Reis Lucheta	7.33	6.88	7.23
Ana Paula Matoso Teixeira	8.36	7.89	8,27
André de Souza e Silva	6.47	7.34	6,65
Carolina Bueno de Abreu	6.59	7.73	6,68
Daniel Macedo Abbud	6.27	5.71	6.35
Eric Franchi Leonardo	6.52	7.11	6.59
Éverton Yoshiaki Hiraoka	8.45	7.99	7.93
Fábio Henrique Bicudo da Silva	7.13	6.57	6.96
Juliana Abreu Giacomeli	6.64	6.29	6.96
Rodrigo Mendes	8.02	7.81	7,73
Simeire Aparecida Manarin	6.9	5.93	6.27
Zayame Vegette Pinto	7.73	7.08	7.70

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

Não houve declínio significativo do rendimento dos bolsistas.

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

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

<b>Nome do Bolsista</b>	<b>% de participação/produção</b>
Adriano Reis Lucheta	96
Ana Paula Matoso Teixeira	96
André de Souza e Silva	97
Carolina Bueno de Abreu	96
Daniel Macedo Abbud	97
Eric Franchi Leonardo	97
Éverton Yoshiaki Hiraoka	97
Fábio Henrique Bicudo da Silva	97
Juliana Abreu Giacomeli	97
Rodrigo Mendes	96
Simeire Aparecida Manarin	96
Zayame Vegette Pinto	97

### 2.3. Desligamentos e inserções de novos bolsistas

Houve desligamento e seleção de novos bolsistas neste período, como ilustra o quadro abaixo.

a) Nomes dos bolsistas desligados e seus respectivos substitutos.

<b>Bolsistas Desligados</b>	<b>Bolsistas Substitutos</b>
Paula Salgado	Éverton Yoshiaki Hiraoka
Max Francisco Fernandes	Simeire Aparecida Manarin

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

O desligamento da aluna Paula Salgado deveu-se a motivos pessoais e do aluno Max Francisco Fernandes, à conclusão do curso. As substituições foram feitas por alunos que vêm acompanhando o programa, selecionados pelo grupo a tempo. Assim, os mesmos já se encontravam integrados ao grupo, conhecendo as atividades e inclusive, participando ativamente de toda a programação. Por esta razão, não se esperam prejuízos para o rendimento acadêmico e a dinâmica do grupo, pois se tratam de alunos capacitados a dar continuidade às atividades como os seus antecessores.

#### **2.4. Período de férias das atividades do PET**

Início: 24 de Dezembro de 1999

Término: 24 de Janeiro de 2000

### **3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS PELO GRUPO PET**

#### **3.1. Reuniões Administrativas**

- 05/02/99 Pauta: Organização do Relatório Final e Organização para SBPC.  
Participantes: Max, Carolina, Fábio, Juliana, Ana, Adriano, Carmo, Daniel, Paula.  
Duração: 2h.
- 05/03/99 Pauta: Relatório e programação para o ano de 1999.  
Participantes: Max, Rodrigo, Juliana, Eric, Paula, Carolina, Zayame, Fábio, Ana, Daniel.  
Duração: 2h.
- 16/03/99 Pauta: Organização da V RPAA e organização da ida à palestra Valorização do Ensino de Graduação.  
Participantes: Rodrigo, Max, Eric, Juliana, Carolina, Daniel, Fábio, Adriano, Carmo, Zayame, Ana.  
Duração: 1h 30'



- 05/04/99 Pauta: Reorganização das Comissões, Estabelecer o Plantão dos Alunos do Grupo, Contatos com Pró-Reitoria e convites do Grupos Pet para a V RPAA.  
Participantes: Fábio, Zayame, Juliana, Simeire, Carolina, Rodrigo, Adriano, Eric, Daniel, Ana, Carmo.  
Duração:2h.
- 19/04/99 Pauta: Organização da Estrutura da V RPAA.  
Participantes: Zayame, Simeire, André, Carmo, Juliana, Carolina, Paula, Fábio, Ana, Adriano, Daniel, Rodrigo, Max.  
Duração:2h.
- 22/04/99 Pauta: Envio de cartas e convites para palestrantes da VRPAA.  
Participantes: Adriano, Daniel, Fábio, Simeire, Ana, Zayame, Carolina, Rodrigo, Éverton, Carmo, Paula.  
Duração:3h.
- 03/05/99 Pauta: Contatos para divulgação da VRPAA, Preparação para ida à VRPAA.  
Participantes: Ana, Simeire, Daniel, Eric, Zayame, Juliana, Fábio, Carolina, Max, Rodrigo, André, Adriano, Paula, éverton.  
Duração:1:30h.
- 17/05/99 Pauta: Marcar Reunião com Vice-Diretor .  
Participantes: Zayame, Fábio, Simeire, André, Juliana, Max, éverton, Ana, Adriano, Daniel, Paula, Carmo, Carolina, Eric, Éverton.  
Duração:2h.
- 31/05/99 Pauta: Divisão do Grupo em comissões para próximos eventos e reunião com o secretário municipal de agricultura e abastecimento  
Participantes: Max, Carolina, Fábio, Ana, Juliana, Adriano, Carmo, Zayame, Simeire, André, Paula, Éverton, Rodrigo, Daniel, Eric.  
Duração:2h.

- 14/06/99 Pauta: Palestra com Irving Joseph Berger sobre Biotecnologia.  
Participantes: Max, Juliana, Éverton, Daniel, Fábio, Carmo, Eric, Rodrigo, Zayame, Adriano, Ana, Paula, Simeire, André, Maurício\* e Elaine\* (\* ex-bolsistas).  
Duração:2h.
- 05/07/99 Pauta: Organização da Viagem para a 51ª Reunião Anual da SBPC.  
Participantes: Carolina, Max, Fábio, Ana, Juliana, Adriano, Zayame, Simeire, Daniel, Rodrigo, Eric, André, Carmo.  
Duração:2h.
- 02/08/99 Pauta: Programação do II Interpets.  
Participantes: Rodrigo, André, Max, Carolina, Adriano, Eric, Simeire, Everton, Daniel, Juliana, Fábio, Ana, Zayame.  
Duração:2h.
- 17/08/99 Pauta: Escolha de Palestrantes e temas para o VIII CAB (Curso de atualização em biotecnologia)  
Participantes: Rodrigo, Adriano, André, Simeire, Carolina, Fábio, Zayame, Ana, Eric, Éverton, Max, Juliana.  
Duração: 2h.
- 31/08/99 Pauta: Estudo de proposta para participação em trabalho de extensão em Escolas de segundo Grau.  
Participantes: Rodrigo, Éverton, André, Fábio, Adriano, Max, Carolina, Zayame, Carmo, Simeire, Ana, Eric, Daniel.  
Duração: 2 h.
- 18/09/99 Pauta: Reunião com Pet pedagogia para organização do II Interpets.  
Participantes: Todos os integrantes dos dois grupos.  
Duração: 3h.

- 30/09/99 Pauta: Confirmação de palestrantes para o II Interpets e divulgação do VIII CAB.  
Participantes: Ana, Carolina, Zayame, Fábio, Daniel, Adriano, Juliana, Max, Eric, Carmo, Rodrigo, Éverton, André.  
Duração: 2h.
- 05/10/99 Pauta: Organização de seminários do Grupo.  
Participantes: Eric, Adriano, Carmo, Fábio, Simeire, André, Rodrigo, Juliana, Zayame, Éverton, Daniel, Ana.  
Duração: 2h
- 21/10/99 Pauta: Organização Final Do VIII CAB.  
Participantes: Éverton, Simeire, Juliana, Daniel, Rodrigo, André, Adriano, Fábio, Zayame, Eric, Max.  
Duração: 2h
- 04/11/99 Pauta: Preparação de últimos detalhes para o VIII CAB.  
Participantes: Daniel, Eric, Ana, Zayame, André, Rodrigo, Fábio, Juliana, Carmo, Max.  
Duração: 1 hora e 30'
- 11/11/99 Pauta: Organização para o Relatório Final e estudo de possibilidade de Viagem para curso no CENARGEN (Centro Nacional De Recursos Genéticos)  
Participantes: Zayame, Fábio, Adriano, Rodrigo, Carmo, Simeire, Éverton, Juliana, André, Max, Eric, Daniel.  
Duração: 2h
- 23/11/99 Pauta: Organização Final do II Interpets, Reunião com Secretário de Agricultura e abastecimento e Elaboração do Calendário para 2000.  
Participantes: Carmo, Max, Fábio, Eric, Daniel, Juliana, Everton, Simeire, Carolina, Zayame, André, Adriano, Ana.  
Duração: 2h

- 23/11/98 Pauta: Esclarecimentos sobre o funcionamento do grupo e processo de seleção para os novos ingressantes do grupo  
Participantes: Fábio, Max, Carolina, Elaine, Gildemberg, Leandra, Maurício, Ana Paula, André, Rodrigo, Juliana, Paula  
Duração: 2h
- 02/12/99 Pauta: Preparação para o II INTERPETS.  
Participantes: Todos presentes  
Duração: 1 hora 30'
- 20/12/99 Pauta: Relatório final e programação 2000.  
Participantes: Fábio, Carmo, Adriano, Eric, Simeire, Daniel, Ana.  
Duração: 2h

### **3.2. Seminários/Conferências/Palestras**

a) Apresentados pelos bolsistas

#### **SEMINÁRIO DE ESTÁGIO**

- 31/08/99 Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Produção de Anticorpos Monoclonais contra IRS-3  
(Substrato Receptor de Insulina)  
Apresentado por: Max Francisco Fernandes  
Participantes: Todos os bolsistas
- 31/08/99 Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Otimização do uso do reagente Trizol LS na extração do RNA Total de Tecidos Adiposo de Bovinos  
Apresentado por: Carmo Augusto Lara Poloni  
Participantes: Todos os bolsistas
- 14/09/99 Evento: Seminário Interno dos Bolsistas

Tema: Anticorpos Monoclonais na Agricultura  
Apresentado por: Fábio Henrique Bicudo da Silva  
Participantes: Todos os bolsistas

14/09/99                   Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Sistema de Sangria de Safra na Cultura da Seringueira  
(*Hevea Brasiliensis*)  
Apresentado por: Daniel Macedo Abbud  
Participantes: Todos os bolsistas

21/09/99                   Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*  
Apresentado por: Eric Franchi Leonardo  
Participantes: Todos os bolsistas

21/09/99                   Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Tratamento Térmico da Maniva de Mandioca (*Manihot  
esculenta* Crantz) Visando o Controle da Bacteriose  
(*Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* (Berthet & Bondar) Dye)  
Apresentado por: Adriano Reis Lucheta  
Participantes: Todos os bolsistas

05/10/99                   Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Viroses de abobrinha de moita: PRSV e CMV.  
Apresentado por: Zayame Vegette Pinto  
Participantes: Todos os bolsistas

05/10/99                   Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Microrganismos Endofíticos  
Apresentado por: André de Sousa e Silva  
Participantes: Todos os bolsistas

- 05/10/99           Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Melhoramento Genético da cultura da Soja  
Apresentado por: Éverton Yoshiaki Hiraoka  
Participantes: Todos os bolsistas
- 19/10/99           Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Produção de Xilases e Celulases de *Aspergillus niger* IZ-09 em fermentação submersa usando diversas fontes de Nitrogênio  
Apresentado por: Carolina Bueno de Abreu  
Participantes: Todos os bolsistas
- 19/10/99           Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Variabilidade genética e identificação de isolados de *Phoma* e *Phomopsis* e Estudo de Sua Patogenicidade a Sementes de Angico Branco e Ipê- Amarelo  
Apresentado por: Ana Paula Matoso Teixeira  
Participantes: Todos os bolsistas
- 19/10/99           Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema: Estudo do cruzamento de duas linhagens de *Trichoderma pseudokoningii* através de caracterização em meios seletivos  
Apresentado por: Rodrigo Mendes  
Participantes: Todos os bolsistas
- 26/10/99           Evento: Seminário Interno dos Bolsistas  
Tema :Eletroforese de proteínas em *Fischerella* CENA-19  
Apresentado por: Simeire Aparecida Manarin  
Participantes: Todos os bolsistas
- 26/10/99           Evento: Seminário Interno dos Bolsistas

Tema: Detecção de Fitoplasmas em Diferentes Espécies vegetais.

Apresentado por: Juliana Abreu Giacomeli

Participantes: Todos os bolsistas

### **b) Assistidos pelos bolsistas**

07/04/99            Tema: Transformação de Material Genético Plastidial  
 Palestrantes: Eng. Agro. Irving Joseph Berger  
 Participantes: Todos os Bolsistas

### **3.3. Filmes Científicos/Exposições**

19/10/99            Tema: Os Benefícios da biotecnologia na Agricultura.  
                           Plantas Genéticamente modificadas.  
 Revista Biotecnologia & Ciência  
 Assistido por: Todos os Bolsistas

### **3.4. Participação em Congressos**

23/03/99            Evento: "What's up with your pronunciation"  
                           Local: Hotel Antonio's - Piracicaba - SP  
                           Participantes: Carolina Bueno de Abreu

27/06 - 01/07/99    Evento: II Americas Model United Nations - II AMUN  
                           Local: UnB - Brasília - DF  
                           Participantes: Eric Franchi Leonardo, Max Francisco  
                           Fernandes, Carmo Augusto Lara Poloni, Daniel Macedo  
                           Abbud, Fábio Henrique Bicudo Silva

12 - 16/07/99        Evento: 51ª Reunião da SBPC  
                           Local: Porto Alegre - RS

Participantes: Todos os bolsistas

12 - 16/07/99

Evento: IV Encontro Nacional de Grupos PET 1999  
ENAPET

Local: Porto Alegre - RS

Participantes: Todos os bolsistas

27-29/07/99

Evento: II Semana da cana-de-açúcar de Piracicaba

Local: ESALQ - USP

Participantes: Carolina Bueno de Abreu

03/09/99

Evento: Feira Internacional da Produção Intensiva de  
Proteína Animal e Processamento - VIV América Latina  
99

local: Expo Center Norte - São Paulo SP

Participantes: Adriano Reis Lucheta

15/09/99

Evento: Debate: O Estágio como atividade  
profissionalizante de extensão universitária.

Local: ESALQ-USP

Participantes: Éverton Yoshiaki Hiraoka, Zayame Vegette  
Pinto, Rodrigo Mendes, Adriano Reis Lucheta e André  
de Sousa e Silva

13-14/10/99

Evento: 16° Encontro Sobre Temas de Genética e  
Melhoramento: "Ciência e política da Biotecnologia".

Local: ESALQ-USP

Participantes: Zayame Vegette Pinto, Adriano Reis  
Lucheta , Eric Franchi Leonardo e Éverton Yoshiaki  
Hiraoka

27/09 - 01/10/99

Evento: Simpósio da Cultura da Seringueira

Local: ESALQ - USP



Participantes: Carolina Bueno de Abreu e Daniel Macedo Abbud

- 24 - 28/10/99      Evento: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia  
 Local: Salvador - BA  
 Participantes: Fábio Henrique Bicudo da Silva
- 09 e 10/11/99      Evento: 7º Simpósio de Iniciação Científica da USP -  
 SICUSP  
 Local: ESALQ/USP  
 Participantes: Max Francisco Fernandes, Fábio Henrique Bicudo da Silva, Daniel Macedo Abbud, Adriano Reis Lucheta.

### 3.5. Pesquisa

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

TÍTULO: O efeito inibitório do crescimento de *Pichia anomala* IZ-234 sobre *Saccharomyces cerevisiae* Y-904

OBJETIVO: Avaliar o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de outra levedura, no caso, *Pichia anomala*.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jorge Horii

LOCAL: Laboratório de Tecnologia Sucroalcooleira - ESALQ/USP

BOLSISTA: Carolina Bueno de Abreu

INÍCIO: Agosto/ 1999

FASE DA PESQUISA: Concluída

TÍTULO: Caracterização de linhagens de *Xanthomonas albilineans*, pelos métodos Isoenzimas, SDS-PAGE e RAPD.

OBJETIVO: Comparar diferentes linhagens de *Xanthomonas*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

LOCAL: Laboratório de Genética de Leveduras - Departamento de Genética - ESALQ/USP

BOLSISTA: Fábio Henrique Bicudo da Silva

INÍCIO: janeiro/1999

FASE DA PESQUISA: Concluída

TÍTULO: Caracterização de linhagens de *Trichoderma pseudokoningii* em meios seletivos

OBJETIVO: Analisar o comportamento sexual do gênero

ORIENTADOR: Dra. Aline Pizzirani-Kleiner

LOCAL: Laboratório de Microorganismos - Departamento de Genética - ESALQ/USP

BOLSISTA: Rodrigo Mendes

INÍCIO: Maio/1999

FASE DA PESQUISA: Caracterização dos segregantes nos meios seletivos

TÍTULO: Caracterização e Identificação de Isolados de *Phoma* e *Phomopsis* e Estudo de sua Patogenicidade a Sementes de Angico Branco e Ipê- Amarelo.

OBJETIVO: Avaliar a Atual Classificação Taxonômica Destes Gêneros de Fungos Fitopatogênicos

ORIENTADOR: Luís Eduardo Aranha Camargo

LOCAL: Laboratório de Genética Molecular - Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola - ESALQ/USP

BOLSISTA: Ana Paula Matoso Teixeira

INÍCIO: Julho/1998

FASE DA PESQUISA: Final

TÍTULO: Estudo da interferência de potyvirus na transmissão do vírus do mosaico do pepino (CMV) por *Myzus persicae* em cucurbitáceas

OBJETIVO: Estudar a interferência de potyvirus na transmissão do vírus do mosaico do pepino (CMV) por *Myzus persicae* em cucurbitáceas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende

LOCAL: Laboratório de Virologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP.

BOLSISTA: Zayame Vegette Pinto

INÍCIO: 1999

FASE DA PESQUISA: início

TÍTULO: Eletroforese de proteínas em *Fischerella* CENA-19

OBJETIVO: Identificar genes responsáveis pela produção de fischerelinas, para estudos futuros sobre a produção de algicidas/herbicidas.

ORIENTADOR: Augusto Etchegaray

LOCAL: Centro de Energia Nuclear na Agricultura

BOLSISTA: Simeire Aparecida Manarin

INÍCIO: Agosto de 1999

FASE DA PESQUISA: Início

TÍTULO: Isolamento do gene responsável pela síntese de als em *Bidens pilosa*

OBJETIVO: Estudo de resistência a Herbicidas em plantas de *Bidens pilosa*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Helaine Carrer

LOCAL: CEBTEC/ESALQ

BOLSISTA: Adriano Reis Lucheta

INÍCIO: 02/08/99

FASE DA PESQUISA: Construção biblioteca c-DNA

TÍTULO: Projeto Genoma *Xylella fastidiosa*

OBJETIVO: Obtenção do código genético da bactéria e possível intervenção nos seus mecanismos de infecção.

ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Helaine Carrer

LOCAL: CEBTEC - ESALQ/USP

BOLSISTA: Eric Franchi Leonardo

INÍCIO: 15/03/99

FASE DA PESQUISA: Seqüenciamento completo do genoma da bactéria

TÍTULO: Detecção de Fitoplasmas em Diferentes Espécies Vegetais

OBJETIVO: Identificação das plantas afetadas por fitoplasmas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ivan Paulo Bedendo

LOCAL: Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola -  
ESALQ/USP

BOLSISTA: Juliana Abreu Giacomeli

INÍCIO: 09/98

FASE DA PESQUISA: Início

TÍTULO: Melhoramento Genético de Soja

OBJETIVO: Obtenção de linhagens melhoradas quanto ao teor de óleo, resistência a pragas e a doenças

ORIENTADOR: Prof. Dr. Natal Antônio Vello

LOCAL: Laboratório de Melhoramento de Soja - Departamento de Genética -  
ESALQ/USP

BOLSISTA: Éverton Yoshiaki Hiraoka

INÍCIO: 04/08/99

FASE DA PESQUISA: Início

### 3.6. Cursos extra-curriculares

25 - 28/10/99      Título: Tipagem Molecular de Microrganismos  
Local: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia - Salvador/BA  
Carga Horária: 16 horas  
Participantes: Fábio Henrique Bicudo da Silva

18/09/99            Título: Curso de Introdução ao BONSAI  
Local: ESALQ-USP  
Participantes: Carolina Bueno de Abreu

### 3.7. Visitas a Institutos, Centros de Pesquisa, Empresas. etc.

27-29/07/99        Visita: II Feira da cana-de-açúcar  
Objetivos: Conhecer as novas tecnologias aplicadas à cultura da cana-de-açúcar e ao seus produtos tecnológicos.  
Local: ESALQ-USP

Participantes: Carolina Bueno de Abreu, Juliana Abreu Giacomel, Zayame Vegette pinto e Fábio Henrique Bicudo da Silva.

- 21-24/09/99      Visita : FENASUCRO  
Objetivos: Conhecer as novas tecnologias aplicadas as usinas de cana-de-açúcar  
Local: Sertãozinho - SP  
Participantes: Carolina Bueno de Abreu, Adriano Reis Lucheta
- 01/05/1999      Visita: AGRISHOW  
Objetivos: Conhecer as novas tecnologias aplicadas na agricultura  
Local: Ribeirão Preto - SP  
Participantes: Todos
- 23-24/10/1999      Visita: Usina de Urindiúva  
Objetivos: Identificar os principais problemas da produção agrícola de cana-de-açúcar  
Local: Urindiúva - SP  
Participantes: Carolina Bueno de Abreu
- 01/09/99      Visita: Campo da Vila Belmiro - Santos  
Objetivos: Conhecer o método de irrigação realizado no campo de futebol do Santos Futebol Clube  
Local: Santos/SP  
Participantes: Carolina Bueno de Abreu
- 06/07/99      Visita à feira Analítica 1999

Objetivos: Conhecer as novas tecnologias e os lançamentos de produtos e equipamentos para laboratórios em geral.

Local: São Paulo, ExpoNorte

Participantes: Zayame Vegette pinto, Max Francisco Fernandes, André de Sousa e Silva, Carmo Augusto Lara Poloni e Éverton Yoshiaki Hiraoka.

### 3.8. Publicações em Boletins, Periódicos, Anais e Congressos

DUARTE, K.M.R.; GIAMPAN, J.S.; ANDRINO, F.G.; **SILVA, F.H.B.**; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.; REZENDE, J.A.M.. Caracterização de Estirpes forte e fraca do Vírus do Mosaico da Abobrinha (PRSV-W) Através de anticorpos monoclonais. 7º SICUSP, Piracicaba, 9 a 10 de novembro de 1999. **CD-ROOM - Resumos**, n. 1.26.

DUARTE, K.M.R.; PASCHOAL; ANDRINO, F.G.; **SILVA, F.H.B.**; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Testes em campo para diagnóstico de ToMV (Vírus do Mosaico do Tomateiro) através de ELISA usando anticorpos monoclonais. 7º SICUSP, Piracicaba, 9 a 10 de novembro de 1999. **CD-ROOM - Resumos**, n. 1.25.

PASCHOAL, J.A.R.; DUARTE, K.M.R.; **SILVA, F.H.B.**; GOMES, L.H.; MEIRELLES, C.F.; TAVARES, F.C.A. Produção de anticorpos policlonais contra progesterona utilizando coelhos e galinhas poedeiras. 7º SICUSP, Piracicaba, 9 a 10 de novembro de 1999. **CD-ROOM - Resumos**, n. 3.44.

**SILVA, F.H.B.**; PASCHOAL, J.A.R.; DUARTE, K.M.R.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Caracterização de linhagens de Xanthomonas albilineans, bactéria causadora de escaldadura da cana-de-açúcar, por SDS-PAGE e isoenzimas 7º SICUSP, Piracicaba, 9 a 10 de novembro de 1999. **CD-ROOM - Resumos**, n.1.27.

GARUTTI, F.G.; **SILVA, F.H.B.**; PASCHOAL, J.A.R.; DUARTE, K.M.R.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A. Caracterização de linhagens de Xanthomonas albilineans, bactéria causadora de escaldadura da cana-de-açúcar, por RAPD. 7º SICUSP, Piracicaba, 9 a 10 de novembro de 1999. **CD-ROOM - Resumos**, n.1.28.

DUARTE, K.M.R.; GIAMPAN, J.S.; GOMES, L.H.; ANDRINO, F.G.; **SILVA, F.H.B.**; TAVARES, F.C.A. REZENDE, J.A.M. Diferenciação de estirpes forte e fraca do

Vírus do Mosaico da Abobrinha (PRSV-W) através de anticorpos monoclonais. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador/BA, 24 a 28 de outubro, 1999. **Resumos**, p.397, VR-004.

**SILVA, F.H.B.; PASCHOAL, J.A.R.; DUARTE, K.M.R.; GOMES, L.H.; TAVARES, F.C.A.** Diferenciação de linhagens de *Xanthomonas albilineans*, bactéria causadora de escaldadura da cana-de-açúcar, por SDS-PAGE e RAPD. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador/BA, 24 a 28 de outubro, 1999. **Resumos**, p.174, MB-007.

**DUARTE, K.M.R.; GOMES, L.H.; ANDRINO, F.G.; SILVA, F.H.B.; PASCHOAL, J.A.R.; TAVARES, F.C.A.** Produção de anticorpos monoclonais contra a *Xanthomonas albilineans*, bactéria causadora de escaldadura da cana-de-açúcar. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador/BA, 24 a 28 de outubro, 1999. **Resumos**, p.176, MB-015.

**DUARTE, K.M.R.; GOMES, L.H.; LEAL Jr., G. A.; SILVA, F.H.B.; PASCHOAL, J.A.R.; ANDRINO, F.G.; GIACOMELLI, A.M.B.; TAVARES, F.C.A.** Produção de Anticorpos Monoclonais Aplicados à Agropecuária. II Simpósio de Recursos Genéticos para América Latina e Caribe, Brasília/DF, 21 a 26 de novembro, 1999. **CD-ROOM - Resumos**, n. 010.

### **3.9. Estudo de língua estrangeira**

Nome: Carolina Bueno de Abreu

Curso: Inglês – American Way

Fase: Avançado

Carga Horária: 2 horas por semana

Nome: Rodrigo Mendes

Curso: Inglês - BlueWave

Fase: Básico

Carga Horária: 2h semanais

Nome: Simeire Aparecida Manarin

Curso: Inglês (particular)

Fase: Básico

**Carga Horária: 1,5h semanais**

**Nome: Ana Paula Matoso Teixeira**

**Curso: Inglês - FISK**

**Fase: Básica**

**Carga Horária:**

**Nome: Fábio Henrique Bicudo da Silva**

**Curso: Francês (Particular)**

**Fase: Intermediário**

**Carga Horária: 2h semanais**

**Nome: Zayame Vegette Pinto**

**Curso: Inglês - New Company**

**Fase: Básico**

**Carga Horária: 1,5H semanais**

**Nome: Daniel Macedo Abbud**

**Curso: Inglês - Skill**

**Fase: Intermediário**

**Carga Horária: 3h semanais**

**Nome: Eric Franchi Leonardo**

**Curso: Inglês - CNA**

**Fase: Intermediário**

**Carga Horária: 2,5H semanais**

**Nome: Adriano Reis Lucheta**

**Curso: Inglês - New Company**

**Fase: Início de conversação**

**Carga Horária: 1,5h semanais**

**Nome: Andre de Sousa e Silva**

**Curso: Inglês - Yázigi**

**Fase: Básico**



Carga Horária: 5h semanais

Nome: Éverton Yoshiaki Hiraoka

Curso: Inglês - FISK

Fase: Avançado

Carga Horária: 3h semanais

### **3.10. Leituras extra-curriculares**

#### **a) Grupo de bolsistas:**

Foram lidos e discutidos pelos bolsistas inúmeros textos de revistas como *Veja*, *Exame*, *Isto É*, *Ciência Hoje*, *Biotecnologia: Ciência e Tecnologia*. Também foram analisados artigos de jornais do estado: *Folha de São Paulo*, *O Estado de São Paulo* entre outros.

#### **b) Individualmente:**

**Bolsista: Carolina Bueno de Abreu**

**BARBOSA, N. R. G. Fermentação etanólica a partir de hidrolisado ácido da cana-de-açúcar, obtido em estágio único, rico em xilose, pela levedura *Pichis stipilis* CBS 5773. (dissertação - tese) Rio Claro. 1995.**

**DENNIS, C. & BUHAGIAR, R. W. M. Yeasts Spoilage of fresh and processed fruits and vegetables. In: Biology and activities of yeasts. Ed. SKINNER, F. A., PASSMORE, S. M. & DAVENPORT, R. R. Society for applied bacteriology. Academic Press. 1980.**

**DO CARMO-SOUSA, L. Distribution of yeasts in nature. In: The yeasts. Ed. ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. Vol I. Academic press. London. 1969. p. 79-105.**

**GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Revista STAB. Vol.10. n. 5. p. 31-34. 1992**

- INGRAM, M. **Yeasts in food spoilage**. In: *The Chemistry and Biology of yeasts*. Ed. COOK, A. H. New York: Academic Press. 1958.
- LACHANCE, M-A. **Yeasts selection in nature**. In: *Yeast strain selection*. Ed. PANCHAL, C. J. s/d.
- LACHANCE, M.A. & BOIVIN, M.F. **Antibiosis in a yeast community**. Sixth International Symposium on Yeasts. Montpellier, France. 1984.
- MUNDT, J. O. **Fungi in the spoilage of vegetables**. In: *Food and beverage Mycology*. Ed. BEUCHAT, L.R. Westport, Connecticut; AVI. 1978.
- PANCHAL, C.J. & TAVARES, F.C.A. **Yeast strain selection for fuel ethanol production**. In: *Yeast strain selection*. Ed. PANCHAL, C. J. s/d.
- PELCZAR JR., M. J., CHAN, E. C. S. & KING, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. Vol. 1. 2a. Ed. Brasil: Makron Books. 1996. 524p.
- PHATFF, H. J. & MILLER, M. W. **A specific microflora associated with the fig. Wasp. *Blastophaga psenes* Linnaeus, J.** In: *Pathology*. Vol. 3. p. 233-243. 1961.
- SILVA, M.H. **Controle de inversão no caldo de cana**. *Sugar y azucar*, 41. 1974.
- STARMER, W. T., GANTER, P.F., ADERBEEN, V, LACHANCE, M-A & PHAFF, H. J. **The ecological role of killer yeasts in natural community of yeasts**. *Can. J. Microbiology*, 33:783-796 . 1987.
- TAVARES, F.C.A. **Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes**. *Revista STAB*. Vol 10. n. 5. 1992. p. 45-49.
- TUITE, M. F. & OLIVER, S. G. ***Saccharomyces***. *Biotechnology handbooks* n. 4. 1a. ed. New York: Plenum press, 1991. 327p.

WALKER, H. M. & AYRES, J. C. **Yeasts as spoilage organisms**. In: The Yeasts. Vol. 3. Ed. WOODRUFF, J. G. & LUCH, B. S. Westport, Connecticut: AVI. 1970.

**Bolsista: Max Francisco Fernandes**

AKIBA, F. Isolamento, inoculação e sobrevivência de *Xanthomonas albilineans* e avaliação de resistência à escaldadura das folhas em cana-de-açúcar. ESALQ/USP, Piracicaba. 95p. (Tese de Mestrado) 1978.

ALVAREZ *et al.* Identification of Xanthomonads and Group of Strains *Xanthomonas campestris pv. campestris* with Monoclonal Antibodies. *Phytopathology*, v. 75, p. 722-728, 1985.

ALVAREZ, A.M. *et al.* Analysis of *Xanthomonas campestris pv. citri* e *X. c. citrumelo* with Monoclonal Antibodies. *Phytopathology*, v. 81, p. 857-865, 1991.

ALVAREZ, A. M.; SHENCK, S. e BENEDICT, A.A.. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strains with monoclonal antibody reaction patterns and DNA fingerprints. *Plant Pathology*, v. 45, p. 358 - 366, 1996.

BENEDICT, A. A. *et al.* Pathovar-Specific Monoclonal Antibodies for *Xanthomonas campestris pv. oryzae* and for *Xanthomonas campestris pv. oryzicola*. *Phytopathology*, v. 79, p. 322-328, 1989.

**Bolsista: Fábio Henrique Bicudo da Silva**

ARNOLD, S.H.; PRICE, R.J.; BROWN, W.D. Histamine formation by bacteria isolated from skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*. **Bull. Jn. Soc. Sci. Fis**, v. 46, p. 991-995, 1980.

DUARTE, K.M.R. Produção de anticorpos monoclonais contra o vírus do mosaico do tomateiro (ToMV). Mestrado-ESALQ/USP). 89p. 1995.

- FRANK, H.A.; BARANOWSKI, J.D.; CHONGIRIWATANA, M.; BRUST, P.A.; PREMARATNE, R.J. Identification and decarboxylase activities of bacteria isolated from decomposed mahimahi (*Coyphaena hippurus*) after incubation at 0 and 3°C. **J. Food Microbiol**, v.2, p.331-340,1985.
- KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. **Nature**, v.256, p.495-7, 1975.
- KOVÁCS, A.; SARKADI, L.S.; GANZLER, K.. Determination of Biogenic amines by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 836, p. 305-313, 1999.
- LÜTEN, J.B.; BOUQUET, W.; SEUREN, L.A.J.; BURGRAAF, M.M.; RIEKWELBOOY, G.; RITCHIE, A.; LECLERCQ, M.; GUINET, R. Biogenic amines in fishery products: standardization methods with E.C. In: HUSS, H.H **Quality assurance in the fish industry**, Copenhagen: Elsevier Science Publ., 1992.
- RAWLES, d.d., and FLICK, G.J. (1996). Biogenic Amines in Fish and Shellfish. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 39, p. 329-365, 1996.
- SERRAR, D.; BREBANT, R.; BRUNEAU, S.; DENOYEL, G.A.. The development of a monoclonal antibody-based ELISA for the determination of histamine in food: application to fishery products and comparison with the HPLC assay. **Food Chemistry**, v. 54, p. 85-91, 1995.
- TAYLOR, S.L., SPECKHARD, M.W.. Isolation of histamine-producing bacteria from frozen tuna. **Mar. Fish**, v. 45, p. 35-39, 1983
- WENDAKOON, C.N., and SAKAGUUCHI, M. Effects of spices on growth and biogenic amine formation by bacteria in fish muscle. In: H.H.HUSS, M.JAKOBSEN, and J. LISTON, Eds. **Quality Assurance in the Fish Industry**, Amsterdam: Elsevier, 1999. v. 30, p. 305-313.
- YOSHINAGA, D.H. & FRANK, H.A. Histamine-producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonis pelamis*). **Appl. Environ. Microbiol**, v. 44, p. 447-452, 1982.

PELCZAR JR., M. J., CHAN, E. C. S. & KING, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. Vol. 2. 2a. Ed. Brasil: Makron Books. 1996. 524p.

STEIB, R. J. **Control of the ratoon stunting diseases of sugar cane in Louisiana with hot-air during the past three seasons**. Sug. Bull., N. Orleans, vol.36, n.22 p. 303-306, 1959.

TOKESHI, H. Doenças da Cana-de-Açúcar. In: HIROSHI, K. et alii. **Manual de Fitopatologia vol. 2**. 3.ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995-1973. cap.19, p. 211 - 213.

**Bolsista: Eric Franchi Leonardo**

Alberts; Bruce. **Biologia Molecular da Célula**. Editora Artes Medicas Sul

**Manual de Fitopatologia** / editado por Armando bergamin Filho, Hiroshi Kimati, Lilian Amorim – 3ª edição. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

Azevedo, João Lúcio de. **Genética de microrganismos**. Goiânia, Editora da UFG, 1998. 490 p.

Júnior, César da S.; Sasson, Sezar. **Biologia**. Vol. 3 – 2ª edição. São Paulo, Editora Saraiva, 1996. 400 p.

De Robertis, E. D. P.; De Robertis, E. M. F. Junior. – 2ª edição. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan S. A., 1993. 310 p.

**Bolsista: Zayame Vegette Pinto**

AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia, Editora da UFG, 1998. 490 p.

COSTA, G. L. Vetores de vírus de plantas. **RAPP**. 6: 103-171p, 1998.

FIGUEIRA, F. A. R. Guia da pequena horta. **A B C da Olericultura**. 4: 142p, 1987.

FIGUEIRA, F. A. R. **Manual de olericultura: Cultura e Comercialização de hortaliças**. 2 ed. revisada e ampliada. ed. Ceres, 1981.

LECOQ, H., PITRAT, M. Specificity of the Helper- Component - Mediated Aphid transmission of Three Potyviruses Infecting muskmelon **Phytopathology**. p: 890-893, 1985.

LOTZ, I. M. P. Reação de *Cucurbita pepo* e *C. moschata* a infecção mista do vírus do mosaico do mamoeiro-estirpe melancia com o vírus do mosaico da melancia-2 ou com o vírus do mosaico amarelo da abobrinha. **Dissertação**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP p. 1-4, 1995.

MOUSSALLEN, A. A Olericultura no trópico úmido: hortaliças na Amazônia.1: 164 - 165p, 1985.

MOWAT, W. P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal Virology. Meth.** 15: 233-247, 1987.

NAULT, L. R. Arthropod Transmission of Plant Viruses: A New Synthesis. **Entomological Society of America**. p: 521-541, 1997

PAVAN, M.A. Vírus do mosaico da melancia: purificação, viabilidade e distribuição nas principais regiões produtoras de pepino e abobrinha de Minas Gerais. **Dissertação**. Univesidade federal de Viçosa. Viçosa, 1985.

REZENDE, J. A. M. Premunização de duas espécies e um híbrido de *Cucurbita* para o controle do mosaico causado pelo vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia. **Dissertação**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1996.

SANTOS, C. D. G. Infecção mista pelos vírus do mosaico da melancia e do mosaico do pepino em *Cucurbita pepo* "Caserta". **Dissertação**. Universidade de Viçosa, 1990.

SMITH, K. M. Insect Virology. **Academic press**. New York, 1967. p 195-214.

SMITH, K.M. **Viruses**. Cambridge University Press. New York, 1963 p. 74-76.

VAN DEN HEUVEL, J. F. J. M., BOERMA, T. M., PETERS, D. Transmission of Potato Leafroll virus from plants and artificial diets by *Myzus persicae*. **Phytopathology**. v. 81, n. 2, p: 150-154, 1991.

WANG, R. Y., POWELL, G., HARDIE, J., PIRONE, T. P. Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. **Journal of General Virology**. P 1519-1524, 1998.

YUKI, V.A. Epidemiologia e controle do mosaico (VMM-ME) em abobrinha-de-moita. **Dissertação**. Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz". Piracicaba, 1990.

**Bolsista: Rodrigo Mendes**

Bergamin, A Filho, Hiroshi, K., Amorin, L. **Manual de Fitopatologia**  
3ª edição. São Paulo. Editora Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

Azevedo, João Lúcio de. **Genética de microrganismos**. Goiânia,  
Editora da UFG, 1998. 490 p.

Suzuki, D. T., Griffiths, A, J. F., Miller, J. H., Lewontin, R. C.,  
**Introdução à Genética**. 4ª edição. Editora Guanabara Koogan.

**Bolsista: Ana Paula Matoso Teixeira**

Chitarra, G.S.. Deterioração de sementes e técnicas moleculares na identificação de microorganismos. 1994.

Foster, L.M.; Kojak. K.R.; Loftus, M.G.; Stevens, J.J.; Ross, K.J..1993. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. *Mycology Research* 97 (7):769-781.

Glienke,C.. Variabilidade genética do fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD. ESALQ/USP. 1995.

Halloin, J.M.. Postha vest infection of cotton-seed by *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. *Phitopathology*.65: 1229-1232.

**Bolsista: Éverton Yoshiaki Hiraoka**

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. B.. Genética na Agropecuária

GRATTAPAGLIA & FERREIRA. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares na Agricultura.

MOLIN & BALASTREIRE. Agricultura de Precisão. ESALQ/USP. 1997

LEHNINGER, A. L.. Bioquímica Vol. I. 2º Ed. 1976. Editora Edgar Blücher Ltda.

LEHNINGER, A. L.. Bioquímica Vol. II 2º Ed. Editora Edgar Blücher Ltda

### **3.11. Outras Atividades**

#### 3.13.1.Organização de eventos:



Tema: Profissional de Qualidade

05/11/99 VIII CAB - Curso de atualização em Biotecnologia  
Tema: O progresso da Biotecnologia no Brasil

15 - 17/12/99 II INTERPETS  
Tema: Educação Para o Próximo Milênio

## **4. AVALIAÇÃO**

### **4.1. Apreciação qualitativa do grupo sobre:**

a) atividades realizadas no período:

Aproveitando o impacto gerado pela repercussão do assunto "O Progresso da Biotecnologia no Brasil", o grupo promoveu o VIII Curso de Atualização em Biotecnologia - CAB, contando com a participação de alunos de Graduação da ESALQ, e de outras instituições do Estado, pré-vestibulandos, além de professores e alunos de Cursos de Pós-Graduação.

Na V Reunião Pró- Aprendizagem Ativa realizada no Departamento de Engenharia Rural, no anfiteatro do "Maracanã", ESALQ/USP, estiveram presentes 400 alunos de graduação e pós-graduação da ESALQ/USP e diversas instituições do Estado de São Paulo, paralelamente a este evento foi realizado uma exposição das atividades de grupos PET do Estado de São Paulo.

Os Processos de Seleção para substituições de bolsistas realizados no primeiro e segundo semestres de 1999 existiram por motivo de desistência de bolsistas. Isso se deu em decorrência de problemas pessoais de um dos bolsista e por opção de outra bolsa de outro bolsista, este ainda continua como colaborador.

Foram selecionados, no primeiro semestre um bolsista para preenchimento imediato devido a desistência de um bolsista. No segundo semestre, foi selecionado um bolsista, para o preenchimento de uma vaga, sendo esta por desistência.

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

A programação para o respectivo período foi devidamente cumprida, se destacando a realização do VIII CAB como a melhor atividade do semestre, além do Ciclo de Seminários Interno de Nivelamento para os bolsistas selecionados.

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

A mudança de objetivos do programa PET não se faz necessária. Desta maneira, continuaremos a seguir a mesma linha de trabalho desenvolvida até o presente momento, pois julgamos ser esta linha de pensamento extremamente válida,

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

#### **Do ponto de vista do grupo:**

##### **- Entre si:**

O Grupo não foi coeso durante o ano de 1999, o que prejudicou o andamento das atividades deste neste período. Isto ocorreu devido a razões pessoais e até o momento a situação não foi normalizada. Esperamos que no ano 2000 os integrantes do grupo definam suas prioridades e que o grupo volte a seu funcionamento normal.

##### **Com o tutor:**

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

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

Neste período o grupo ganhou maior prestígio entre a comunidade esalqueana, principalmente com o VIII CAB, que divulgou de maneira ampla o nome do Grupo e o do Programa. Os alunos estão tomando conhecimento e apresentando maior interesse pela área de Biotecnologia Agrícola e estamos adquirindo cada vez mais apoio dos professores e alunos, tanto de graduação quanto de pós-graduação, através da interação com o Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz" - CALQ

#### **4.2. Acompanhamento Interno dos Grupos PET/CAPES**

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

Resposta ao Instrumento em anexo

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

- 1- Integrar o bolsistas e orientadores de estágios individuais para podermos ter maior amplitude do conhecimento de atividades individuais;
- 2- Montar a grade de aulas dos integrantes do Grupo, a fim de ser possível encontrá-los a qualquer momento do dia e saber como está o andamento de suas tarefas;
- 3- No final de cada Reunião, faremos a pauta da reunião seguinte a fim de tornar nossas reuniões mais produtivas;
- 4- Aumentar a integração com outros PETs da cidade e da região, para tornar o intercâmbio de idéias um meio de aprimorarmos nosso desenvolvimento.
- 5- No Estudo dirigido, cada bolsista elaborará um resumo do assunto que será apresentado aos integrantes do grupo, mediante sorteio.

## 5. INFORMAÇÕES SOBRE OS EX-BOLSISTAS

### Formados em:

#### 1989

Fernando Cesar Boscariol - Gerente de Produção - Usina São João

Goran Kuhar Jezovsek – Gerente/divisão de Biotecnologia, MONSANTO.

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

Roberto Pedroso de Oliveira - EMBRAPA- Sete Lagoas

#### 1991

Silvana Gomes Regitano - Promotora de Vendas - MONSANTO

#### 1992

Haíssa Roberta Cardarelli -

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

#### 1993

Sandro Alves Lima - Contratado pela ICI

Juliana C. de Freitas - Doutorado Florida University - USA

#### 1994

Claudia M. Ianelli - Gerente, Champion/produção de mudas

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

Mario Cesar Sesso - Contratado pela BAGISA S.A. (Pesquisa e Desenvolvimento)

**1995**

Elisabeth Bilsnand - Doutorado Gotemburgo University - Suécia

Jefferson Willians de Gaspari - Mestre em Microbiologia Agrícola, ESALQ/USP

Juan Lucas Argueso Gomes de Almeida – Doutorado Cornell University

Paula Marques Meyer – Mestrado em Ciência Animal e Pastagens – ESALQ/USP.

**1997**

Fernando de Mesquita Sampaio – Aperfeiçoamento - França.

Irving Joseph Berger – Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas – ESALQ/USP.

Patrícia Pompermayer – Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas – ESALQ/USP.

**1998**

Elaine Cristina Castelhana - Mestrado em Ciência Animal e Pastagens - ESALQ/USP

Gildemberg Amorin Leal Junior - Mestrado Ciências - CENA/USP

Leandra Maria Scarpari - Mestrado em Microbiologia Agrícola - ESALQ/USP

Mauricio Pires Machado Barbosa - Mestrado em Fitopatologia - ESALQ/USP

## **6. ANEXOS**

1. Programação de atividades para o ano de 2000
2. Quadro de Acompanhamento Interno dos Grupos - PET / CAPES
3. Históricos escolares dos bolsistas
4. V Reunião Pró Aprendizagem Ativa - Programação
5. VIII Curso de Atualização em Biotecnologia - Programação
6. II InterPET's - Programação
7. Seminários apresentados pelos bolsistas

**GRUPO PET - BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**Prof. Dr. Flávio C. A. Tavares**

## Programação 2000

### Fevereiro

Organização e planejamento da semana de integração aos calouros  
Revisão bibliográfica sobre assuntos básicos  
Planejamento para participação em um curso de oratória  
Atividades de rotina

### Março

Participação na "Reunião da Pós Graduação"  
Agendar uma visita  
Planejamento da VI Reunião Pró Aprendizagem Ativa  
Atividades de rotina

### Abril

Organização da VI RPAA  
Contato com palestrantes e divulgação da RPAA  
Atividades de rotina

### Maiο

27 – VI RPAA  
Atividades de rotina

### Junho

Atividades de rotina  
Organização da viagem para Brasília (SBPC)

### Julho

9-14 – 52ª. Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência  
Ciclo de seminários dos bolsistas  
Atividades de rotina

### Agosto

Continuação do ciclo de seminários dos bolsistas  
Palestra com professor convidado  
Planejamento do IX Curso de Atualização em Biotecnologia  
Atividades de rotina

### Setembro

Reunião para a programação de 2001  
Contato com palestrantes e divulgação do IX CAB  
Curso de conhecimentos básicos  
Atividades de rotina

### Outubro

Semana "Luiz de Queiroz"

Organização do IX CAB  
Atividades de rotina

**Novembro**

8 – IX CAB  
Término do relatório de 2000  
Atividades de rotina

**Dezembro**

Ciclo de seminários dos bolsistas  
Atividades de rotina

23/12 – 15/01 – Férias



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"**  
**ESALQ/USP**

**PET AGRONOMIA - BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO**

**TRATAMENTO TÉRMICO DA MANIVA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta*  
Crantz) VISANDO O CONTROLE DA BACTERIOS (*Xanthomonas campestris* pv.  
*Manihotis* (Berthet & Bondar) Dye)**

**Adriano Reis Lucheta**

**Dezembro 1999**

## I) Nome

Adriano Reis Lucheta

## II) Orientador

Prof. Dr. Marcos Silveira Bernardes

## III) Departamento

Departamento de Produção Vegetal - ESALQ/USP

## IV) Período do Estágio

Meados de Junho 1999 até a presente data

## V) Título

Tratamento Térmico da Maniva de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) Visando o Controle da Bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* (Berthet & Bondar) Dye)

## VI) Resumo

TRATAMENTO TÉRMICO DA MANIVA DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) VISANDO O CONTROLE DA BACTERIOSE (*Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* (Berthet & Bondar) Dye): A.R.Lucheta<sup>1</sup>, A.M.Grassi, M.S.Bernardes (orientador): Departamento de Produção Vegetal-ESALQ/USP; L. Zimback: Instituto Agrônomo de Campinas-IAC/Unidade de Piracicaba

Testamos a termoterapia para o controle da Bacteriose (*Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* (Berthet & Bondar) Dye) no processo de propagação vegetativa da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). A Bacteriose ou murcha bacteriana é a moléstia mais grave da mandioca no Brasil e prejudica sensivelmente o rendimento da cultura. Essa bactéria é de hábito sistêmico, e desenvolve-se especialmente no xilema, interferindo na circulação da água, do que resulta a murcha. A termoterapia é utilizada na cana-de-açúcar para controle do "Raquitismo das Soqueiras", causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris. O número médio de brotos aos 80 DAP, de manivas submetidas a diferentes temperaturas em imersão em água por 30 minutos foi **16.75**, 35 ° C; **17.0**, 40 ° C; **12.5**, 45 ° C; **13.25**, 50 ° C; **0**, 55 ° C; **0**, 60 ° C; **0**, 65 ° C; **0**, 70 ° C. A curva de brotação permite estabelecer a faixa de temperaturas adequadas para a termoterapia. Os níveis de controle da Bacteriose serão estabelecidos no próximo ensaio.

<sup>1</sup>Bolsista PET/CAPES

## VII) Introdução

A planta da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é originária do continente americano, não se descartando a possibilidade de ser genuinamente brasileira, pois a maioria das espécies selvagens do gênero *Manihot* identificadas, foram localizadas em território nacional.

Afora os estudos botânicos, muitos historiadores, etnologistas e paleontologistas chamam a atenção para a hipótese da planta ser brasileira, fundamentando-a no conhecimento da cultura dos primitivos povos do continente americano, em especial dos indígenas, que cultivavam primitivamente a mandioca utilizando-se de suas raízes na alimentação, além de conhecerem uma técnica rudimentar da fabricação de farinha.

A mandioca, tem a maior parte de sua produção destinada a alimentação humana através do consumo de suas raízes na forma "in natura". Para grande número de países, especialmente os da África e alguns da América Latina ela é o alimento predominante na dieta diária. Além disso, é também empregada na nutrição animal sob as formas de raízes frescas ou de raspas e "pellets" que entram na composição de rações balanceadas. Pode ainda ser usada na forma de farelos, obtidos apenas de sua parte aérea ou, misto ( ramos + raízes). Na indústria, a mandioca encontra grandes possibilidades como matéria prima, onde um de seus mais importantes produtos é o amido empregado no setor de alimentação e preparo de adesivos.

Contudo a cultura da mandioca é atacada por uma doença conhecida como Bacteriose ou Murcha Bacteriana, o uso de variedades tolerantes é a medida de controle mais eficiente, visto que não existe ainda materiais totalmente resistente.

O presente trabalho tem por intenção a determinação de um método de controle da bacteriose através de tratamento térmico da maniva, material vegetativo utilizado na propagação da mandioca, e com isso viabilizar o plantio de variedades não resistentes que possuam boas características agrômicas. Também "limpar" manivas de variedades

tolerantes que sofreram forte ataque no campo, bem como diminuir a propagação da doença via material de plantio.

O tratamento térmico da maniva de mandioca terá como fundamento o tratamento térmico da cana-de-açúcar que é realizado com expressivos resultados no controle do "Raquitismo das Soqueiras", causado pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris.

### **Bacteriose** – (*Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* (Berthet & Bondar) Dye)

Bacteriose ou murcha bacteriana é a moléstia mais grave que ataca a lavoura da mandioca no Brasil. É causada pela bactéria *Xanthomonos campestris* pv. *manihotis*, de hábito sistêmico, e que se desenvolve especialmente no sistema vascular do xilema, interferindo na circulação da água. Dessa característica resulta a murcha como principal sintoma da moléstia.

Essa bactéria é bem específica da mandioca, de modo que se estabelece uma certa convivência entre patógeno e hospedeiro. Assim, a vantagem de um sobre o outro fica muito na dependência das condições ambientais, solo e clima, principalmente. Ora a favorecida é a planta, ora o patógeno, razão pela qual as perdas provocadas pela bacteriose são muito variáveis em função dos diferentes anos agrícolas.

Segundo Massola & Bedendo (, a bacteriose apresenta um complexo de sintomas que envolve manchas foliares, murcha, exudação de látex, necrose no sistema vascular e morte descendente. Sintomas primários, decorrentes do plantio de material vegetativo infectado, traduzem-se por murcha de folhas novas, seguida por morte das plantas. Sintomas secundários, provenientes das infecções secundárias no campo, iniciam-se com o aparecimento de pequenas lesões encharcadas e poligonais nas folhas. Posteriormente, estas lesões desenvolvem e tornam-se irregulares, podendo cobrir grandes extensões. Nessa fase, a bactéria transloca-se para o pecíolo e haste através do xilema, iniciando a infecção sistêmica da planta. Ocorre, então, exudação de látex nas hastes infectadas e morte descendente, com murcha e posterior secamento das folhas, as quais permanecem aderidas à haste por algum tempo. Cortes transversais ou longitudinais das hastes atacadas revelam necrose dos feixes vasculares, sintoma que pode ser observado tanto em plantas

provenientes de material propagativo doente como em plantas infectadas posteriormente. Em casos mais graves, as raízes são afetadas, exibindo descoloração dos feixes vasculares e apodrecimento.

Os sintomas da bacteriose são mais fáceis de serem observados durante os meses de novembro a março, quando a planta está em pleno desenvolvimento vegetativo.

O uso de ramas contaminadas, para o plantio, é o maior responsável pela transmissão da bacteriose. Plantas assim originadas são fontes de inóculo para as plantas sadias. As culturas formadas com manivas contaminadas pela bacteriose podem ter a produção de raízes diminuída em mais da metade e, se as condições climáticas forem extremamente favoráveis à moléstia, a perda de produção pode ser total. O trânsito livre de manivas infectadas no território nacional é quase sempre responsável pela introdução da doença em áreas isentas. Sementes verdadeiras também podem carregar o patógeno.

Sua disseminação dentro de um mesmo campo é feita principalmente por respingos de chuva, que promovem a liberação dos talos bacterianos presentes nas exudações e os transportam até plantas sadias. A ocorrência de granizo ou ataque de mandarová são condições ainda mais drásticas para sua disseminação, não se devendo, pois, utilizarem-se de ramas provenientes de tais culturas para futuros plantios.

A via normal de penetração da bactéria na planta é através dos estômatos ou por ferimentos da epiderme e é mais comum em tecidos jovens. Estudos indicam que é necessário um período de 12 horas com umidade relativa entre 90 e 100 % e temperatura de 22 a 26 °C para o estabelecimento da bactéria no hospedeiro. Os sintomas geralmente aparecem de 11 a 13 dias após a infecção.

A sobrevivência da bactéria no solo não é muito longa. Em geral, solos com pH entre 6.0 e 6.5 e com baixo teor de matéria orgânica são mais favoráveis a bacteriose, mas mesmo nesses solos a sobrevivência dificilmente ultrapassa 60 dias. Além do grau de resistência da variedade, a severidade da doença depende diretamente das condições de temperatura do ambiente. Massola & Bedendo observaram que a severidade é maior em áreas onde as temperaturas médias mínimas e máximas estão um pouco abaixo de 20°C e 30°C, respectivamente. Em áreas de temperaturas mais elevadas, a bacteriose não causa danos significativos, mesmo em condições de alta precipitação.

Não há tratamento curativo para a bacteriose; portanto, o controle dessa moléstia tem de ser preventivo. Os seguintes cuidados são recomendados: utilizar variedades tolerantes; selecionar material de plantio de alta sanidade; fazer rotação de culturas, eliminando-se os restos culturais de mandioca; corrigir o solo e adubar a cultura; eliminar da cultura plantas que apresentem sintomas severos da moléstia; evitar trânsito de ferramentas, máquinas e outros utensílios usados em áreas muito contaminadas.

#### Tratamento Térmico Para Formação de viveiros de cana -de-açúcar

A termoterapia para controle de doenças, foi desenvolvida principalmente para controlar o "Raquitismo das Soqueiras", que é uma das mais importantes doenças em quase todas as regiões onde se cultiva a cana-de-açúcar.

A doença foi descrita pela primeira vez na Austrália, em 1944, e em 1989 já havia sido relatada em 61 países, seu agente etiológico é uma bactéria, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* Davis, Gillaspie, Vidaver & Harris. Esta bactéria é baciliforme, aeróbia, imóvel e gram-positiva.

Em anos de seca, quando o desenvolvimento da planta é prejudicado, pode-se observar sintomas externos caracterizados por crescimento irregular, raquitismo, afinamento e encurtamento dos colmos. Em mesma situação, plantas sadias apresentam crescimento bem maior, seus colmos são sempre de maior diâmetro e altura que os das plantas doentes. Os sintomas podem desaparecer quando não houver déficit hídrico.

Os sintomas internos podem ser observados em variedades mais suscetíveis, observando na parte mais velha de colmos maduros, na altura do anel de cera abaixo do nó, vasos com a cor alterada variando de alaranjado-claro a vermelho-escuro. A ausência de sintomas internos não, indica a sanidade do material, pois muitas variedades suscetíveis somente exibem sintomas em condições muito favoráveis.

A falta de sintomas externos, exceto a redução do tamanho das plantas infectadas, principalmente nas soqueiras, o que também pode ser causado por fatores culturais ou climáticos, e a presença de sintomas externos não específicos da doença, faz com que esta doença seja encarada com a devida importância. A redução média na produtividade devida à esta doença está entre 10 a 15%, dependendo das variedades envolvidas.

O controle da doença pelo uso de variedades resistentes é até o momento inviável pelo desconhecimento de variedades resistentes do gênero *Saccharum*. A prática do "rouguing", adotada com êxito no controle de algumas doenças da cana-de-açúcar, não pode ser utilizado para o raquitismo devido a falta de sintomas externos da doença. A termoterapia, ou seja, a inativação do agente etiológico pela ação do calor, parece ser a única maneira viável de se controlar a doença.

Os processos de termoterapia empregados atualmente são três: água quente, ar quente e vapor. No Brasil, praticamente, só é empregado o de água quente em toletes ou gemas.

O método tradicional de termoterapia consiste no tratamento de colmos inteiros, toletes ou gemas isoladas. Gemas isoladas ou toletes (que devem conter cerca de 3 a 5 gemas) devem ser tratados a uma temperatura de 50,5°C por 2 horas em água quente, 52°C por 30 minutos em água quente ou 54°C por 8 horas em vapor aerado.

É aconselhável a utilização do período de setembro a março para a realização do tratamento, pois este período proporciona condições ótimas para brotação das estruturas tratadas, podendo ser este período mais ou menos elástico de acordo com a temperatura média ambiental, sendo que esta não deve ser inferior a 25°C.

O banho térmico é realizado em uma unidade de tratamento térmico que é acionada por corrente elétrica trifásica de 220v.

A água do banho previamente aquecida a 50,5°C, recebendo as cestas com as gemas ou toletes, resfria-se, caindo sua temperatura de 1 a 3°C. A operação de tratamento inicia realmente quando a temperatura atingir novamente os 50,5°C, marcando a partir deste momento as duas horas em que as gemas ou toletes ficarão em tratamento.

Após as duas horas de tratamento as gemas ou toletes são retirados do banho, deixadas esfriar à temperatura ambiente durante 15 a 20 minutos.

No caso de tratamento de toletes, deve-se observar fatores que possibilitem o escape do controle, que podem ser:

1. A grande variação do diâmetro dos colmos dentro de uma mesma variedade. Antoine (1968), estudando a transmissão do calor em colmos, verificou que o diâmetro dos mesmos é mais importante que o seu comprimento, concluindo que os colmos mais finos

recebem mais rapidamente em seu interior o calor suficiente para inativar o agente etiológico.

2. De acordo com Hughes (1955), os colmos de cana-de-açúcar são pobres condutores de calor, supondo-se que grande parte desta característica pode ser atribuída a natureza da cana-de-açúcar de tipo de fibra que são variáveis de acordo com a variedade envolvida.
3. Segundo Staib (1959), variedades de hábito ereto de crescimento, quando tem seus colmos colocados nos cestos de tratamento térmico, formam uma massa compacta que dificulta a circulação da água entre os mesmos, comprometendo o tratamento adequado dos colmos localizados na parte mais central do cesto.
4. A dificuldade do controle perfeito da temperatura em tanques com grande volume de água.

### **VIII) Objetivo**

O presente trabalho tem por intenção a adaptação da termoterapia na cultura da mandioca determinando a curva de brotação da maniva de mandioca submetida a um tratamento térmico, e com isso viabilizar o plantio de variedades não resistentes que possuam boas características agrônomicas. Também “limpar” manivas de variedades tolerantes que sofreram forte ataque no campo de produção de ramas, bem como diminuir a propagação da doença via material de plantio.

### **IX) Material, Métodos e Desenvolvimento**

Para a possibilidade do experimento serão necessários os seguintes materiais:

1. Hastes principais e ramas primárias, medindo cerca de 20 cm da variedade IAC 576-70;
2. Aparelho de banho térmico marca Cooperçucar utilizado no tratamento no toletes de toletes de cana-de-açúcar;
3. Canteiros em “casa-de-vegetação”.



O experimento foi realizado com tratamento térmico das manivas a temperaturas entre 35° C e 70° C com variações de 5° C, durante 30 minutos cada tratamento, totalizando 8 tratamentos com 4 repetições cada um. Nesta primeira etapa foi determinada a curva de brotação das manivas de mandioca em relação a temperatura de tratamento. Para a obtenção da curva de brotação não foi necessário o uso de manivas doentes.

Após a determinação da curva de brotação será selecionada a maior temperatura com índice de brotação satisfatório para a segunda etapa do experimento.

Na segunda etapa do experimento serão utilizadas manivas contaminadas com *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, tratadas por volta da temperatura selecionada, procedendo-se com a contagem de bactérias antes e depois do tratamento térmico.

A partir da comparação dos níveis de bactéria antes e depois do tratamento térmico será determinada a eficiência do mesmo.

## X) Resultado

Repetições : 1, 2, 3, 4.

HP- Haste principal

N.º canteiro na casa de vegetação

RP- Ramo Primário

Temperatura do tratamento

Tratamento 1	1	2	3	4	
N.º canteiro	27	17	20	2	Total
HP 35	10	9	13	5	9,25
RP 35	10	6	7	7	7,5

Tratamento 5	1	2	3	4	
N.º canteiro	11	24	23	16	Total
HP 55	0	0	0	0	0
RP 55	0	0	0	0	0

Tratamento 2	1	2	3	4	
N.º canteiro	29	1	8	13	Total
HP 40	12	5	12	13	10,5
RP 40	11	3	5	7	6,5

Tratamento 6	1	2	3	4	
N.º canteiro	14	30	19	10	Total
HP 60	0	0	0	0	0
RP 60	0	0	0	0	0

Tratamento 3	1	2	3	4	
N.º canteiro	7	9	3	28	Total
HP 45	7	6	8	10	7,75
RP 45	7	0	6	6	4,75

Tratamento 7	1	2	3	4	
N.º canteiro	25	22	4	31	Total
HP 65	0	0	0	0	0
RP 65	0	0	0	0	0

Tratamento 4	1	2	3	4	
N.º canteiro	21	26	5	12	Total
HP 50	14	12	7	13	11,5
RP 50	0	2	0	5	1,75

Tratamento 8	1	2	3	4	
N.º canteiro	15	18	32	6	Total
HP 70	0	0	0	0	0
RP 70	0	0	0	0	0

	HP	RP	TOT
35	9,25	7,5	16.75
40	10,5	6,5	17.0
45	7,75	4,75	12.5
50	11,5	1,75	13.25
55	0	0	0
60	0	0	0
65	0	0	0
70	0	0	0

## XI) Conclusão

Até a presente data obtivemos a conclusão da primeira etapa do trabalho, foi observado a ausência de brotação à temperaturas acima de 55 graus Celsius para tratamento realizado durante 30 minutos. Foi observado que as maiores taxas de brotação ocorreram no intervalo entre 35,0-45,0 graus Celsius e provavelmente a temperatura a ser utilizada na segunda etapa do projeto será escolhida dentro deste intervalo visto que a temperatura ótima para o desenvolvimento da bactéria situa-se entre 20,0-30,0 graus Celsius.

## XII) Bibliografia

- ANTOINE, R.; RICAUD, C.; SCIEFFER, M.C. **Cane diseases**. Rep. Maurít. Sug. Ind. Res. p.47-59, 1968.
- CENTER FOR OVERSEAS PEST RESEARCH - **Pest Control in Tropical Root Grops - Pans Manual nº4**. London, 1978.
- CENTRO DE TECNOLOGIA COOPERSUCAR - **I Seminário de Tecnologia Agronômica**.

**CENTRO DE TECNOLOGIA COOPERSUCAR - III Seminário de Tecnologia Agronômica.**

**COCK, J.H. CASSAVA: New Potential for a Neglected Crop.** Colorado: Westview, 1985. p.191.

**CONCEIÇÃO, A. J. da. A Mandioca. 3.ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1987.**

**HUGHES, C.G.; STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting diseases of sugar cane. Technical Communications Bureau of Sugar Experiment Stations Brisbane Queensland p. 32, 1955.**

**MASSOLA Jr., N.S. & BEDENDO, I.P. Doenças da Mandioca. In: HIROSHI, K. et alii. Manual de Fitopatologia vol. 2 . 3.ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995-1973. cap.48, p. 501-503.**

**MONTALDO, A. et alii. La Yuca o Mandioca. Instituto Internacional de Ciencia Agrícolas, San José, Costa Rica, 1979.**

**STEIB, R. J. Control of the ratoon stunting diseases of sugar cane in Louisiana with hot-air during the past three seasons. Sug. Bull., N. Orleans, vol.36, n.22 p. 303-306, 1959.**

**TOKESHI, H. Doenças da Cana-de-Açúcar. In: HIROSHI, K. et alii. Manual de Fitopatologia vol. 2 . 3.ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995-1973. cap.19, p. 211 - 213.**

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

**PET AGRONOMIA – BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE PESQUISA**

**“Identificação e Caracterização e Estudo de Patogenicidade de Isolados  
Fúngicos de *Phoma* spp. e *Phomopsis* spp”**

Ana Paula Matoso Teixeira

1999

**I) Nome**

Ana Paula Matoso Teixeira

**II) Orientador**

Luís Eduardo Aranha Camargo

**III) Departamento**

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola

**IV) Período do Estágio**

A partir de Julho/1998

**V) Título**

Identificação, caracterização e identificação de isolados fúngicos de *Phoma* spp. e *Phomopsis* spp.

**VI) Resumo**

As associações de patógenos (fungos) – hospedeiros (sementes) causam danos às plantas através da interferência em diferentes mecanismos biológicos. Desta forma, a patologia de sementes cresce em importância, não só para os programas de fitomelhoramento, na efetivação da seleção precoce de cultivares resistentes (Hewth,1979; Tokeshi,1980; Champion,1983), como no entendimento da relação patógeno/hospedeiro, com vista à preservação da qualidade das sementes.

Na área florestal pouco se estudou sobre a disseminação de patógenos via semente. No entanto, alguns trabalhos têm evidenciado a frequente contaminação fúngica, especialmente em espécies nativas (Ferreira,1989).

## VII) Introdução

As associações de patógenos (fungos) – hospedeiros (sementes) causam danos às plantas através da interferência em diferentes mecanismos biológicos. Desta forma, a patologia de sementes cresce em importância, não só para os programas de fitomelhoramento, na efetivação da seleção precoce de cultivares resistentes (Hewth,1979; Tokeshi,1980; Champion,1983), como no entendimento da relação patógeno/hospedeiro, com vista à preservação da qualidade das sementes.

A interferência dos patógenos associados às sementes podem provocar redução da população de plantas e desenvolvimento de epidemias (Menten, 1991).

Dentre outros danos, que podem facilmente ser causados por estes organismos, podemos citar: aborto, enrugamento e redução do tamanho das sementes, perdas do poder germinativo, podridões, mortes de pré-emergência, manchas necróticas, tombamento e deformações.

Na área florestal pouco se estudou sobre a disseminação de patógenos via semente. No entanto, alguns trabalhos têm evidenciado a frequente contaminação fúngica, especialmente em espécies nativas (Ferreira,1989).

Dentre os fungos isolados a partir de espécies florestais se encontram os gêneros *Phoma* e *Phomopsis* (Carneiro,1986, 1990; Fosco Mucci et al., 1986; Homechin et al., 1986; Martins, citado por Sales, 1992; Urben et al., 1982). No entanto. Poucos pesquisadores estudaram a patogenicidade destes fungos, não tendo, nenhum deles, determinado as espécies dos isolados.

Fator que em grande parte determinou esta situação foi o fato de estes gêneros de fungo serem de difícil classificação, sendo problemática a determinação de patogenicidade de cada isolado, ora tidos como saprófitas, ora como patógenos de sementes.

Maiores avanços nos programas de classificação e melhoramento de sementes, são conseguidos com a identificação e caracterização das variedades morfológicas, anatômicas e bioquímicas associadas à resistência das sementes que podem constituir marcadores durante o programa de melhoramento.

Segundo Chirlei Glienke (1995), várias técnicas têm sido empregadas para análise de variabilidade em microorganismos. As clássicas utilizam a caracterização de fenótipos, a partir de características morfológicas ou bioquímicas, principalmente por auxotrofia, restringindo a possibilidade de se conduzir estudos populacionais e, muitas vezes, de sistemática.

Assim, fungos dos gêneros *Phoma* e *Phomopsis* são caracterizados a partir de sua morfometria (tamanho e formato de seus picnídios e esporos). Assim, fungos do gênero *Phomopsis* apresentam esporos dos tipos beta e/ou alfa que são diferenciados pelo tamanho e pela forma (conídios beta são maiores e fusiformes enquanto conídios alfa são ovalados) e fungos do gênero *Phoma* apenas produzem conídios alfa.

Problemas porém ocorrem de acordo com o substrato utilizado para o crescimento dos fungos. Assim fungos do gênero *Phomopsis*, que normalmente são cultivados em meio malte-ágar e aveia-ágar podem apresentar ou não formação de conídios beta de acordo com o meio.

Logo, é aconselhado que se faça revisão da antiga classificação destes fungos, para que não sejam classificados erroneamente *Phomopsis* como se fossem *Phoma*.

Métodos tradicionais de detecção de fungos em sementes, tais como “Blotter test” e a incubação em meio ágar, os quais se baseiam na observação direta da morfologia da cultura e no exame microscópico das estruturas reprodutivas após o período de incubação, não têm se mostrado sensíveis na detecção e identificação de fungos, quando se trata de subespécies, variedades e raças,

devido à semelhança da maioria das características morfológicas destes agentes, nesses níveis taxonômicos (Lima et al., 1982).

Já foram realizados estudos para a classificação destes fungos de acordo com sua morfometria em diferentes substratos e usando técnicas de isoenzimas, mas ultimamente têm-se usado mais comumente técnicas de RAPD, que são mais precisas sendo por isso mais confiáveis.

A utilização de PCR oferece várias vantagens em relação aos métodos tradicionais de detecção. Esta técnica possibilita avaliação específica, possuindo uma sensibilidade que permite detectar uma única molécula alvo, em um complexo de misturas, sem o uso de sondas radioativas, sendo também muito rápido e versátil (Henson e French, 1993; Foster et al, 1993).

O método RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), também chamado AP-PCR (Arbitrary – Primer PCR) é indicado por vários autores como uma técnica imprescindível em qualquer projeto de identificação genética de fungos (Foster et al., 1993; Henson e French, 1993; Williams e Kubelik, 1991).

## VIII) Objetivos

O presente trabalho tem como principal objetivo estudar a caracterização e a classificação de isolados de fungo dos gêneros *Phoma* e *Phomopsis*, já estudados e avaliados anteriormente morfologicamente e pela técnica de isoenzimas, tendo sido este antigo trabalho base para dissertação apresentada por Regina Corrêa na conclusão de seu Mestrado em fitossanidade pela Universidade Federal de Lavras.

Pelo fato de o primeiro trabalho não Ter tido resultados conclusivos com relação à classificação taxonômica destes fungos, já que a taxonomia



destes fungos foi contestada mas a técnica de isoenzimas não foi considerada segura o bastante, espera-se que sejam obtidos resultados definitivos agora com análise genética de cada isolado fúngico através da técnica de RAPD, podendo, talvez, ser feita uma reclassificação de alguns dos isolados, que passariam a pertencer ao gênero *Phomopsis* e não *Phoma herbarum*..

## **IX) Material, métodos e desenvolvimento**

O trabalho está sendo realizado com dezesseis isolados de fungos obtidos a partir de espécies florestais nativas como *Tabebuia serratifolia* – (ipê-amarelo), *Dalbergia nigra* (jacarandá-da-Bahia) e *Triplaris surinamenses* (tachi-branco), cedidos pelo departamento de fitossanidade da Universidade Federal de Lavras, já utilizados anteriormente em outros trabalhos de classificação e caracterização.

Também serão utilizados no trabalho mais quatro isolados de fungos dos mesmos gêneros cedidos pelo Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), para que se possa fazer uma classificação mais segura e eficiente de cada isolado, além de ainda ser utilizado um isolado de *Colletotrichum graminicola*, para que se possam ser analisadas as diferenças que surgem quando são comparados fungos de gêneros diferentes.

Os isolados serão cultivados em Erlenmeyer contendo 50ml de meio de cultura batata-dextrose (BD), previamente autoclavado, durante sete dias, à temperatura ambiente e sob luz natural.

Após este período serão feitas filtrações do conteúdo de cada Erlenmeyer em papel de filtro, com o auxílio de uma bomba de vácuo, primeiramente com água comum, até que a água comece a sair límpida, então serão feitas mais duas lavagens, com água bidestilada, do material que ficou

retido no papel, a fim de obter como resultado micélio puro e limpo de cada isolado fúngico.

As hifas serão conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , preservando assim suas condições ideais.

Será obtido das hifas o DNA através da técnica apresentada por Gratapaglia e Ferreira (1994), que será então submetido à amplificação, após ser quantificado em espectrofotômetro, através de reações de RAPD.

Os produtos das reações de amplificação serão resolvidos em géis de agarose por meio de eletroforese a 70-80V em tampão TBE. Para comparação de pesos moleculares, será incluído, em cada gel, um padrão de peso molecular apropriado e conhecido.

Os isolados que ainda não foram isolados morfologicamente, após cultivo em meios diferenciados, serão agora submetidos a este estudo para que os testes por técnicas moleculares possam ser complementados e para que, ao final do trabalho, os resultados sejam mais significativos.

Ainda serão feitos testes de patogenicidade em casa-de-vegetação, com ipê-amarelo e angico-branco, usando cada isolado com posterior análise de sintomas e de desenvolvimento das plantas.

## **X) Resultados**

Ainda não foram obtidos resultados conclusivos sobre o trabalho.

## **XI) Conclusão**

## **XII) Bibliografia consultada**

Chitarra, G.S.. Deterioração de sementes e técnicas moleculares na identificação de microorganismos. 1994.

Foster, L.M.; Kojak. K.R.; Loflus, M.G.; Stevens, J.J.; Ross, K.J..1993. The polymerase chain reaction and its aplication to filamentous fungi. **Mycology Research** 97 (7):769-781.

Glienke,C.. Variabilidade genética do fungo endófito *Guignardia citricarpa* *Kiely* detectada por RAPD. ESALQ/USP. 1995.

Halloin, J.M.. Postha vest infection of cotton-seed by *Rhizopus arrhizus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*. **Phitopathology**.65: 1229-1232.

Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”  
PET- Agronomia-Biotecnologia Agrícola

*Revisão Bibliográfica*

## **“Microrganismos Endofíticos”**

Bolsista: André de Sousa e Silva

## 1) Introdução

Microorganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando, de modo geral, suas partes aéreas como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. Portanto, eles se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São também distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem nas superfícies dos órgãos e tecidos vegetais. Evidentemente, essas distinções tem apenas finalidades didáticas, havendo sobreposição entre esses grupos de microrganismos. Assim, um endófito, que vive no interior de um planta de acordo com condições do ambiente e o próprio estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patógeno latente. De fato, há duas maneiras de se estudar um microrganismo endofítico, conforme o enfoque seja patológico ou ecológico. Na primeira, microrganismos são inoculados em plantas ou partes vegetais para verificar se eles produzem doença, muitas vezes sem a preocupação de preservar as condições naturais em que a planta vive, ou seja, favorecendo o microrganismo. O enfoque ecológico está muito mais relacionado com as interações planta-microrganismo em condições naturais como um ecossistema tendendo ao equilíbrio. Nessas condições, um microrganismo endofítico, do ponto de vista ecológico, pode ser considerado patogênico. Também um microrganismo epifítico pode eventualmente alojar-se no interior de um tecido vegetal e nesse caso ser erroneamente considerado como endofítico. Microrganismos endofíticos também podem ser encontrados não apenas nas aéreas vegetais mas inclusive em raízes, que são, aliás, uma das principais portas de entrada dos mesmos. A distinção, no caso, é feita apenas para não incluir as bactérias fixadoras de nitrogênio entre os endófitos, que vivem em simbiose com as plantas formando nódulos nas mesmas, e também os fungos micorrízicos. Eles são microrganismos endofíticos, mas constituem grupos muito mais estudados que os outros que habitam principalmente as partes aéreas das plantas. A respeito deles, as pesquisas ainda são poucas, comparadas com as existentes sobre micorrizas e bactérias, como por exemplo em *Rhizobium*.

## 2) Descoberta e crescente Importância

Microrganismos endófitos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1866) quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e os patógenos de plantas. Definidos como assintomáticos, não produzindo, portanto, efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, permaneceram praticamente esquecidos até o final dos anos 70, quando, por uma

série de motivos, começaram a chamar atenção. Nessa época verificou-se que antes de serem meros habitantes do interior de vegetais, possuíam propriedades de interesse, como por exemplo conferir proteção contra insetos-pragas, outros microrganismos patogênicos e inclusive contra herbívoros. Atualmente, sabe-se que endófitos podem produzir toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos produtos de potencial interesse biotecnológico, além de exercerem outras funções de importância para a sobrevivência do hospedeiro.

### **3) Instalação de um microrganismo endofítico no hospedeiro**

Em geral, microrganismos endofíticos adentram as plantas por aberturas naturais e feridas. Uma das portas de entrada mais utilizadas pelos endófitos são as raízes; a emergência de raízes secundárias laterais sempre é acompanhada por uma ferida, que serve de entrada para eles. O próprio crescimento das raízes, penetrando no solo, gera abrasões que facilitam a entrada dos germes. Outras portas de entradas são aberturas naturais, aberturas causadas por insetos e até por estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios. Eles podem também ser encontrados dentro de estruturas fúngicas. Esse é o caso por Paula *et al.* (1991), que identificou um fungo micorrízico, o *Glomus clarum*, contendo a bactéria endofítica *Acetobacter diazotrophicus* no seu interior. Especialmente em plantas perenes, podem ser causadas feridas como as que ocorrem, por exemplo, na época da colheita dos frutos. Elas constituem pontos de penetração dos endófitos. Também pode ocorrer entrada ativa de endófitos pela produção de enzimas ou estruturas que facilitam a penetração dos microrganismos. No caso de bactérias endofíticas, como as fixadoras de nitrogênio, penetram via raízes laterais emergentes ou pela região apical meristemática da raiz. Outras podem entrar via estomas. Há, em seguida, movimento de microrganismos dentro da planta, atingindo os diversos órgãos e tecidos. Alguns microrganismos endofíticos são transmitidos via semente. Em plantas com propagação vegetativa, eles passam de uma para outra através das estruturas utilizadas nessa propagação.

### **4) Ocorrência de microrganismos endofítico**

Provavelmente todas as plantas possuem microrganismos endofíticos. Uma mesma planta pode albergar vários deles, incluindo fungos e bactérias. Em geral, existem espécies bastantes frequentes em um determinado hospedeiro. São chamadas de espécies dominantes, em contraposição à outras mais raras, que são

secundárias. Existe um certo grau de especificidade endófito-hospedeiro. Assim, em *Citrus* são encontrados poucos fungos, quando comparamos com o número de espécies e gêneros encontrados em, por exemplo, *Stylosanthes* e *Musa*. A tabela a baixo dá idéia dos principais fungos encontrados em quatro espécies vegetais.

Tabela. Fungos endofíticos mais frequentemente isolados de quatro espécies de plantas no estado de São Paulo, Brasil (os números representam porcentagem de fragmentos analisados contendo o fungo).

TAXON	<i>Stylosanthes</i>	BANANEIRA	MILHO	TANGERINA
<i>Alternaria</i> sp	1,4	0,08	0,0	0,0
<i>Aspergillus</i> sp	0,0	0,08	1,0	0,0
<i>Fusarium</i> sp	0,0	0,6	6,3	0,0
<i>Penicillium</i> sp	0,0	0,0	1,0	0,0
<i>Rhizopus</i> sp	0,0	0,0	0,3	0,0
<i>Xylaria</i> spp	6,3	7,2	0,0	0,0
outros	8,3	3,7	3,0	11,8

## 5) Endófitos e Controle biológico de insetos

Vários casos de controle biológico natural de insetos por meio de microrganismos endofíticos têm sido relatados. Por exemplo, *Rhizoglyphus parkeri*, um fungo endofítico isolado de pinheiros, infecta também as galhas formadas na planta pelo inseto-praga da mesma, pertencente ao gênero *Contarinia*. Isso ocasiona mortalidade das larvas que habitam o interior das galhas, provavelmente devido à produção de uma toxina pelo fungo. Mesmo fungos entomopatogênicos bastante conhecidos e já largamente empregados no controle biológico de insetos-pragas da agricultura são encontrados como endófitos. Esse é o caso de *Beauveria bassiana*, encontrado como endófito no milho, protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos. Muitos outros casos são relatados.

Em certas gramíneas, a presença de fungos endofíticos reduz o ataque de insetos, como *Spodoptera frugiperda* e *S. eridana*. Nesse caso, é interessante o fato de *S. frugiperda* discriminar plantas infectadas por fungos endofíticos do gênero *Acremonium*. Não sendo atacadas por insetos, essas plantas tornam-se mais vigorosas e, conseqüentemente, resistem mais ao ataque de doenças e são selecionadas. Essa é uma maneira de seleção de determinados endófitos dentro das

plantas. Também em algumas plantas de clima temperado, como o olmeiro, coleópteros transmitem certas doenças, como a causada pelo fungo *Ceratocystis ulmi*. Na presença do fungo endofítico *Phomopsis oblonga*, as árvores são menos afetadas pela doença graças à proteção que o fungo endofítico proporciona, por diminuição do ataque dos insetos.

## 6) Endófitos como patógenos de plantas

Como mencionado na introdução, é difícil estabelecer um limite definido entre microrganismos endofíticos e patogênicos. Muitos endófitos são relacionados com patógenos, e pode ser, inclusive, levantada a hipótese de que todos os patógenos tenham sido derivado de endófitos e vice-versa. Muitos endófitos estão intimamente relacionados com patógenos, como no caso do fungo endofítico *R. parkeri*, isolado de crucíferas e relacionado com outros fungos desse gênero e patógenos do mesmo hospedeiro. Vários patógenos e plantas de clima temperado e tropical, estas últimas estudadas no Brasil, como *Stylosanthes*, bananeira e plantas cítricas, estão presentes em plantas aparentemente sábias. Foi detectada também uma modificação genética em *Colletotrichum magna*, que normalmente causa antracnose em cucurbitáceas, resultando em um endófito que não produz nenhum efeito patogênico no hospedeiro mas, ao contrário, o protege contra fungos fitopatogênicos como *Fusarium* e o próprio *C. magna*. Certos endófitos, que não causam sintomas em um determinado hospedeiro, podem ser patógenos para outros.

## 7) Conclusão

Os microrganismos endofíticos, embora já descritos no século XIX, começaram a ser efetivamente estudados somente no final dos anos 70, primeiro timidamente e com interesse mais acadêmico. Nos últimos anos, entretanto, eles adquiriram grande importância. Verificou-se que não se tratam de simples espectadores dentro de seus hospedeiros, como eram considerados até então. Eles passaram a ser vistos como atores em importantes processos, por exemplo, protegendo a planta contra seus inimigos. Mas ainda, foram identificados como realizadores de funções de alto interesse agrônomo, como fixação de nitrogênio atmosférico, produção de metabólitos úteis para a planta hospedeira, e outras, o que



os colocou no mesmo nível de microrganismos como os fungos micorrízicos e as bactérias simbiontes, que também nitrogênio atmosférico. Com a possibilidade de manipulação genética de microrganismos endofíticos e alta variabilidade que hoje sabemos que ocorre, programas de melhoramento genético devem produzir que levam a sua utilização mais racional.

Portanto, pode-se esperar, que pesquisas com os microrganismos endofíticos devam levar a novas e surpreendentes descobertas de interesse.

#### **8) Referência bibliográfica:**

- Ecologia microbiana; Itamar Soares de Melo e João Lucio Azevedo( Capítulo 4),.

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

**PET AGRONOMIA – BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE PESQUISA**

**“OTIMIZAÇÃO DO USO DO REAGENTE TRIZOL LS NA EXTRAÇÃO DO RNA  
TOTAL DE TÊCIDO ADIPOSEO DE BOVINOS”**

**Carmo Augusto Lara Poloni**

**26/11/1999**

**I- NOME:**

Carmo Augusto Lara Poloni

**II- ORIENTADOR:**

Prof. Dr. Dante Pazzanese Duarte Lanna

**III- DEPARTAMENTO:**

Departamento de Produção Animal, ESALQ-USP

**IV- PERÍODO DO PROJETO:**

04/11/98 - 01/07/99

**V- TÍTULO:**

“OTIMIZAÇÃO DO USO DO REAGENTE TRIZOL LS NA EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE TECIDO ADIPOSEO DE BOVINOS”

**VI- RESUMO:**

A extração de RNA total de tecido adiposo de bovinos foi realizada com o reagente químico TRIZOL LS para posterior quantificação deste ácido nucléico em espectrofotômetro.

Foram feitos seis tratamentos em quatro repetições, variando-se apenas a quantidade de tecido das amostras no intervalo entre 10 mg e 200 mg.

Foi determinada que a relação 50 mg de tecido para 750 µL de Trizol LS proporcionou as melhores condições para o isolamento de RNA de tecido adiposo subcutâneo de bovinos.

**VII- INTRODUÇÃO:**

A extração de RNA total de tecido adiposo de bovinos pode ser feita com o reagente químico TRIZOL LS, que tem a função de lisar as membranas celulares, separar e purificar o material genético (DNA E RNA). Neste trabalho visamos quantificar o RNA total (ribossômico, mensageiro e transportador) para podermos padronizar uma quantidade ideal de extração de RNA para utilização em outras técnicas laboratoriais como, RT-PCR, RFLP, RAPD, no estudo de biologia molecular.

## **VIII- OBJETIVOS:**

Encontrar uma quantidade padrão de tecido para extração de RNA, encontrando-se a razão entre a quantidade de RNA extraído da amostra pelo peso da amostra, fornecendo-nos a concentração de nanogramas de RNA extraídos por miligrama de tecido, determinando assim o peso ideal da amostra, considerando os seguintes parâmetros:

- concentração de RNA/mg de tecido.
- pureza do RNA.
- quantidade total de RNA total isolado.

## **IX- a .MATERIAIS:**

- Tecido adiposo subcutâneo bovino da região caudal.
- Trizol LS Gibco Life Technologies.
- Clorofórmio P.A.
- Água livre de RNAses.
- Etanol 75%.
- Isopropanol.

## **IX- a .MÉTODOS:**

- Remover o tecido a ser submetido à extração.
- Em tubos de 1,5mL acrescentar 0,75 mL de Trizol LS + 0,25 mL de água livre de RNAses.
- Homogenizar no Vortex por 45 segundos em 3 ciclos de 15 segundos cada.
- Incubar por 5 minutos à 25 graus Celsius.
- Acrescentar 0,20 mL de clorofórmio.
- Agitar vigorosamente com as mãos por 15 segundos.
- Incubar por 15 minutos à 25 graus Celsius.
- Centrifugar a 12.000 XG por 15 minutos à 4 graus Celsius.
- Remover a fase aquosa superior e translúcida e transferi-la para um novo tubo Eppendorf de 1,5 mL.
- Adicionar 0,50 mL de isopropanol.
- Homogenizar no Vortex por 15 segundos.
- Incubar por 15 minutos à 25 graus Celsius.
- Centrifugar a 12.000 XG por 10 minutos à 4 graus Celsius.
- Descartar o sobrenadante.
- Lavar com 1,0 mL de etanol 75 %.
- Homogenizar no Vortex por 30 segundos em 2 ciclos de 15 segundos cada.
- Centrifugar a 7.500 XG por 5 minutos à 4 graus Celsius.
- Secar brevemente o RNA ao fluxo.
- Dissolver o "pellet" em água livre de RNAses (30 µL).
- Fazer as leituras em espectrofotômetro a 260 e 280 nanômetros.

## **X- RESULTADOS:**

Os resultados finais seguem abaixo:

-10 mg	-----	2.944,06 nanogramas de RNA
-30 mg	-----	2.948,88 nanogramas de RNA
-50 mg	-----	4.022,68 nanogramas de RNA
-100 mg	-----	3.148,74 nanogramas de RNA
-150 mg	-----	4.193,49 nanogramas de RNA
-200 mg	-----	4.506,81 nanogramas de RNA

## **XI -CONCLUSÕES:**

Foi determinada que a relação 50 mg de tecido para 750 µL de Trizol LS proporcionou as melhores condições para o isolamento de RNA de tecido adiposo subcutâneo de bovinos. Tal determinação considerou os seguintes parâmetros:

-concentração de RNA/mg de tecido	-----	80,45 ng RNA/ mg de tecido.
-pureza do RNA	-----	2,03.
-quantidade total de RNA total isolado	-----	4,022 µg.

## **XII- BIBLIOGRAFIA CITADA:**

“Trizol” Gibco Life Technologies, Bula.

## **XIII- ANEXO:**

### **PUBLICAÇÃO RESULTANTE:**

“OTIMIZAÇÃO DO USO DO REAGENTE TRIZOL LS NA EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DE TECIDO ADIPOSEO DE BOVINOS” 51º Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Porto Alegre-RS, julho de 1.999.

# **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**

**ESALQ / USP**

**PET BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO EM  
AGROINDÚSTRIA, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO I**

**“O efeito inibitório do crescimento de *Pichia anomala* IZ-  
234 sobre *Saccharomyces cerevisiae* Y-904”**

**Aluna: Carolina Bueno de Abreu**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Horii**

**Piracicaba, 7 de Dezembro de 1999**

**“O EFEITO INIBITÓRIO DO CRESCIMENTO DE *PICHIA ANOMALA* IZ-234  
SOBRE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y-904”**      1

<b><u>I)</u></b>	<b><u>NOME</u></b> .....	<b>3</b>
<b><u>II)</u></b>	<b><u>ORIENTADOR</u></b> .....	<b>3</b>
<b><u>III)</u></b>	<b><u>DEPARTAMENTO</u></b> .....	<b>3</b>
<b><u>IV)</u></b>	<b><u>PERÍODO DO ESTÁGIO</u></b> .....	<b>3</b>
<b><u>V)</u></b>	<b><u>TÍTULO</u></b> .....	<b>3</b>
<b><u>VI)</u></b>	<b><u>RESUMO</u></b> .....	<b>3</b>
<b><u>VII)</u></b>	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	<b>4</b>
<b><u>VIII)</u></b>	<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>IX)</u></b>	<b><u>MATERIAL, MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>X)</u></b>	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>XI)</u></b>	<b><u>CONCLUSÃO</u></b> .....	<b>6</b>
<b><u>XII)</u></b>	<b><u>BIBLIOGRAFIA CITADA E CONSULTADA</u></b> .....	<b>6</b>

## **I) NOME**

Carolina Bueno de Abreu

## **II) ORIENTADOR**

Prof. Dr. Jorge Horii

## **III) DEPARTAMENTO**

Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP

## **IV) PERÍODO DO ESTÁGIO**

08/1999 a 12/1999

## **V) TÍTULO**

O efeito inibitório do crescimento de *Pichia anomala* IZ-234 sobre *Saccharomyces cerevisiae* Y-904.

## **VI) RESUMO**

Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito antagônico entre dois gêneros de leveduras, a saber, *Pichia anomala* Linhagem IZ-234, e *Saccharomyces cerevisiae* Y-904.

Foi testado o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 em presença de células de *Pichia anomala* IZ-234 em meio líquido. Ambas as leveduras foram inoculadas em 50 mL de meio YPD (líquido) sendo posteriormente incubadas a 30° C e 100rpm por 48 horas. Foi então inoculado 2 mL de cada cultura para outro recipiente contendo 200mL do mesmo meio. O recipiente contendo as duas leveduras foi então incubado em banho maria a 30° C e 100rpm, e a cada 30 minutos foi feita leitura espectrofométrica para avaliação de crescimento. Foram utilizadas curvas de crescimentos para a



comparação. As curvas de crescimento foram obtidas a partir de uma curva padrão.

Os resultados mostraram que o comportamento do crescimento das leveduras apresenta dificuldades de crescimento em conjunto, indicando a existência de antagonismo entre elas.

## VII) INTRODUÇÃO

A produção de álcool por fermentação é baseada em processos não estéreis e sempre com recuperação de células por centrifugação e recirculação de células. É um processo aberto a contaminação de todos os tipos, desde os microrganismos advindos da contaminação da matéria-prima até os trazidos pela água e o ar. Os compartimentos de produção e seus ambientes são os seletores dos microrganismos participantes.

A contaminação é normal na indústria alcooleira, porque não se trabalha em condições assépticas, mas mesmo assim as fermentações são produtivas e eficientes. Isso acontece porque os pés-de-cuba produzidos são de alta densidade e supera numericamente os contaminantes. O problema acontece quando aparecem leveduras de certas espécies que ocorrem em proporções elevadas chegando a sobrenumerar o fermento original, ocasionando redução da produtividade e dos rendimentos, assim como problemas operacionais. (Tavares, 1992).

Segundo citação de Tavares, 1992 e também segundo Neder, 1991, as leveduras mais identificadas em processos de produção alcoólica são: *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, e *Schizosaccharomyces*.

O caldo de cana se constitui num ótimo substrato para crescimento de microrganismos, devido teor de nutrientes orgânicos e inorgânicos que apresenta, devido também à alta atividade de água, ao pH e a temperatura favorável. (Gallo, 1992)

Fatores como variações nas formas de colheita, terrenos com muitas variações, diferentes variedades de cana, condições climáticas oscilantes, pragas e doenças, tipo de transporte e armazenamento e o estado da matéria-prima contribuem significativamente para o número de microrganismos na cana-de-açúcar. (Silva, citado por Gallo, 1992)

As contaminações por microrganismos são prejudiciais ao processamento da indústria alcooleira, pois causam diminuição do rendimento e produção. No trabalho de Barbosa, 1995, foi concluído que culturas mistas de *Pichia stipitis* e *Saccharomyces uvarum* inibiram o crescimento celular, retardaram o metabolismo de açúcares e abaixaram o nível de etanol e o rendimento fermentativo.

A obtenção do álcool se dá através de um processo fermentativo realizado industrialmente por *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo Dennis & Buhagiar, 1980, *S. cerevisiae* têm sido utilizada há muito tempo para produção industrial de etanol e para produção de álcool, usando como substrato, uma ampla gama de vegetais ricos em açúcares e extratos de frutas.

*Saccharomyces cerevisiae* é a principal levedura escolhida para a produção de fermentação etanólica. Porém a eficiência da fermentação pode ser prejudicada por inibição da fermentação devido à contaminação por bactérias ou outras leveduras. (Panchal & Tavares, s/d).

*Pichia anomala* é uma espécie encontrada como contaminante dos processos de fermentação alcoólica. Essa levedura foi isolada de solos de manguezais próximos ao litoral, associada a videiras, e jardins.

Quando existe a presença de microrganismos de diversas espécies num mesmo ambiente, ocorrerá competição entre eles, e em geral uma espécie prevalecerá sobre as outras. Walker & Ayres (citado por Dennis & Buhagiar, 1980) citam que a fermentação de alimentos é comumente o resultado das atividades combinadas de leveduras, fungos e bactérias; dependendo do ambiente, um desses grupos vai provavelmente prevalecer sobre os outros. A espécie que prevalecer, pode não ser a espécie desejada para a fermentação, e aí, ela ocasionará perdas ou até mesmo, deterioração do produto.

Em fermentações vegetais, há uma competição entre os organismos fermentativos desejáveis como bactérias lácticas e as leveduras. A temperatura influi nessa interação, em temperaturas maiores há um favorecimento às leveduras. (Mundt, citado por Dennis & Buhagiar, 1980)

Do Carmo-Sousa, em 1969 (citado por Lachance, s/d), citou que a competição por nutrientes é provavelmente o fator mais importante na ecologia de leveduras.

Segundo Ingram (citado por Dennis & Buhagiar, 1980) os fatores mais importantes para na determinação da habilidade de leveduras competirem com fungos e bactérias em alimentos são o número e tipos de leveduras contaminantes, nutrientes disponíveis, pH, potencial Redox, temperatura durante o processamento e armazenamento, Umidade relativa e Atividade de água do alimento.

Segundo Lachance & Boivin (citado por Lachance, s/d), a presença de uma espécie particular de levedura é suficiente para exclusão de muitas outras espécies, devido à produção de metabólitos de ação antibiótica.

Algumas leveduras produzem substâncias que são especificamente letais para outras leveduras. Esse fenômeno é chamado “Killer”. Esse fenômeno foi identificado entre *Pichia kluyveri*, uma espécie de levedura conhecida por produzir uma forte toxina killer, e *Cryptococcus cereanus*, uma outra espécie conhecida por ser sensível a essa toxina. Essas duas leveduras têm o mesmo cactus como habitat, mas onde *P. kluyveri* está abundante, *Cr. cereanus* tende a ser bem menos freqüente. (STAMER, et al. Citado por Lachance, s/d).

O presente trabalho procurou demonstrar o efeito antagônico que existe entre as leveduras *P.anomala* e *S. cerevisiae*. O efeito antagônico seria um fator importante no rendimento da fermentação alcoólica, porque as leveduras não conseguiriam se desenvolver normalmente se esse efeito estivesse presente, diminuindo assim a produção de álcool.

## VIII) OBJETIVOS

Demonstrar antagonismo entre as duas leveduras.

## IX) MATERIAL, MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO

### 9.1. Microrganismos:

Foram utilizadas leveduras do gênero *Saccharomyces* e do gênero *Pichia*. As linhagens utilizadas foram: *Saccharomyces cerevisiae* Y-904, e *Pichia anomala* IZ-234 (antiga *Hansenula anomala*), procedentes da micoteca

do Instituto Zimotécnico – Prof. *Jayme Rocha de Almeida*, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Todos os ensaios foram conduzidos nos laboratórios do Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ.

## **9.2. Conservação dos microrganismos:**

Tanto *S. cerevisiae* Y-904 como *P. anomala*. IZ-234 foram semeadas em tubos de ensaio com meio inclinado contendo (YPD-A completo) e incubados em estufa a 30° C, durante 48 horas e depois, conservados em refrigerador.

## **9.3. Obtenção da curva de crescimento para ambas as leveduras:**

Foi preparado meio de cultura YPD, contendo 1% de extrato de levedura, 1% de peptona e 2% de glicose. O mesmo foi distribuído em frascos erlenmeyer de 150mL com 50mL do meio. Após a esterilização em autoclave por 15 minutos, 1atm, 121° C, um frasco foi inoculado com *S. cerevisiae* e outro com *P. anomala*. Os frascos foram levados ao agitador mecânico com temperatura constante de 30° C por 48 horas e 100 rpm em movimentos circulares.

Foram retirados 2 mL de inóculo de cada frasco, reinoculando outros dois frascos, contendo 100 mL do mesmo meio. Assim que cada erlenmeyer foi inoculado com uma levedura, foram feitas leituras dos inóculos homogeneizados com agitação, no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 610nm, utilizando o próprio meio de cultura como branco.

Os frascos voltaram ao agitador com movimento circular na mesma temperatura e a cada 30 minutos foram retirados os frascos é realizada uma leitura para cada frasco. As leituras foram realizadas por 9 horas.

A partir dos valores de % de transmitância foram obtidos os valores de Log de transmitância, que foram colocados numa reta de regressão para Taxa de crescimento em g/L.

#### **9.4. Obtenção da curva de calibração para a determinação da concentração de leveduras por turbidimetria**

##### **9.4.1. Princípio do método:**

Através de uma série de diluições de uma suspensão padrão de leveduras, de concentração conhecida, é possível estabelecer uma curva de calibração, que relacione a concentração de células com valores de transmitância.

Como a concentração de células é expressa em termos de concentração de matéria Seca, parte-se de uma suspensão padrão de leveduras, realizando-se uma série de diluições, de forma a produzir novas suspensões cujos valores de suas concentrações estejam compreendidos em uma faixa previamente determinada.

A determinação de faixas de concentração na qual o método aplica-se é feita segundo dois critérios:

1. Deve existir uma correlação linear entre a concentração e o logaritmo da transmitância.
2. Os valores de transmitância obtidos devem estar situados na região de maior sensibilidade na escala do espectrofotômetro utilizado.

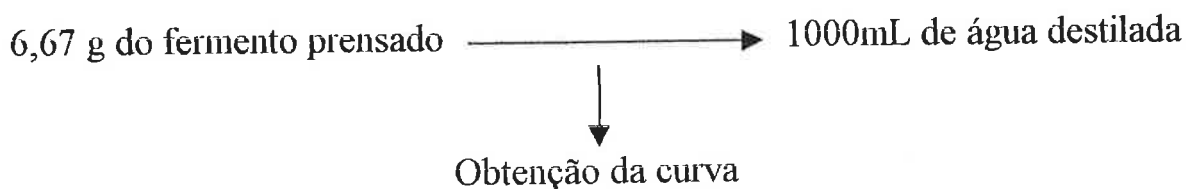
##### **9.4.2. Solução de uso:**

Suspensão padrão de leveduras

### 9.4.3. Obtenção da curva de calibração:

A suspensão padrão de leveduras deverá apresentar as condições mais idênticas possíveis às que estarão submetidas às células por ocasião das medidas.

A partir da concentração da suspensão padrão a 2 g/L, realizar as diluições com conjuntos de pipetas e balões volumétricos adequados, segundo a Tabela 1.



**Tabela 1 - Obtenção da curva de calibração**

Suspensão número	Concentração da diluição (g/L)	Fator de diluição	Modo de preparo (mL susp. Padrão)
1	0,1	20,00	25 até 500
2	0,2	10,00	25 até 250
3	0,3	6,67	15 até 100
4	0,4	5,00	20 até 100
5	0,5	4,00	50 até 200
6	0,6	3,33	15 até 50
7	0,8	2,50	20 até 50
8	1,0	2,00	25 até 50
9	1,2	1,67	15 até 25

### 9.4.4. Procedimento

Transferir, com auxílio de pipetas volumétricas os volumes da suspensão padrão de leveduras indicados na tabela 1, para os balões volumétricos também indicados na tabela 1;

Homogeneizar cada suspensão padrão e transferi-la para uma cubeta do espectrofotômetro;

Realizar, pelo menos, duas leituras do valor da transmitância para cada concentração. O espectrofotômetro é ajustado antes de cada leitura (T=100%), usando como branco a água destilada.

Determinar a transmitância em  $\lambda = 610 \text{ nm}$

#### **9.4.5. Construção do gráfico:**

Construir um gráfico com os valores de Concentração X Densidade Óptica em papel milimetrado, ou um gráfico com os valores de Concentração X Log T em papel mono-Log. O uso de papel mono-Log permite que os valores de T sejam alocados diretamente.

#### **9.4.6. Expressão dos resultados:**

Os valores de transmitância são convertidos em concentração de matéria seca através da equação obtida pela curva padrão, que é uma expressão do tipo:

$$X(T) = A - B \cdot \text{LOGT}$$

#### **9.4.7. Curva Obtida:**

Os resultados obtidos conforme procedimento acima foram os mostrados na tabela abaixo. A curva obtida também é descrita a seguir. A leitura de



Transmitância foi feita em 3 repetições. A Tabela 2 mostra a média obtida entre as repetições.

**Tabela 2 - Resultados obtidos para construção da curva**

Suspensão número	Concentração da diluição (g/L)	Transmitância	Log T
1	0,1	88,66	1,947
2	0,2	78,90	1,897
3	0,3	69,60	1,842
4	0,4	61,70	1,790
5	0,5	54,26	1,734
6	0,6	48,33	1,684
7	0,8	38,96	1,590
8	1,0	31,86	1,503
9	1,2	25,96	1,414

A equação de regressão foi obtida através da construção do gráfico e cálculo de regressão linear. Está apresentada abaixo:

$$X(T) = -2,0314.X + 4,0456 ,$$

Com R= 0,99905.

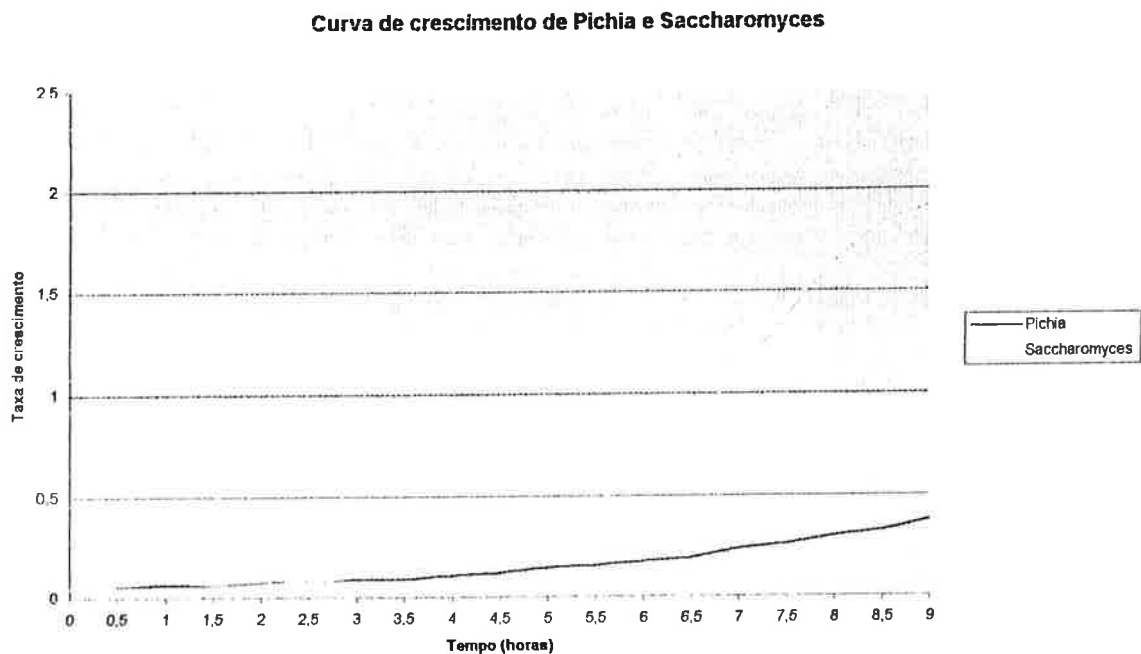
A partir dessa equação foi calculada a concentração de células das leveduras em g/L.

## **X) RESULTADOS**

A curva de crescimento de *P. anomala* e de *S. cerevisiae* foram determinadas obtendo-se o gráfico 1.

Como mostra o gráfico 1, *P. anomala* possui um crescimento mais lento que *S. cerevisiae*

Quando as duas leveduras entram em contato ocorre uma inibição do crescimento (Gráfico 2), mas não se dá para saber quem é inibida, pois o que acontece na realidade é um baixo crescimento generalizado, das duas leveduras, o que mostra um antagonismo entre elas. O gráfico 3 mostra como a taxa de crescimento das duas leveduras juntas é baixa.



**Gráfico 1- Crescimento de *P. anomala* e *S. cerevisiae* separadamente**

Crescimento das leveduras juntas e separadas

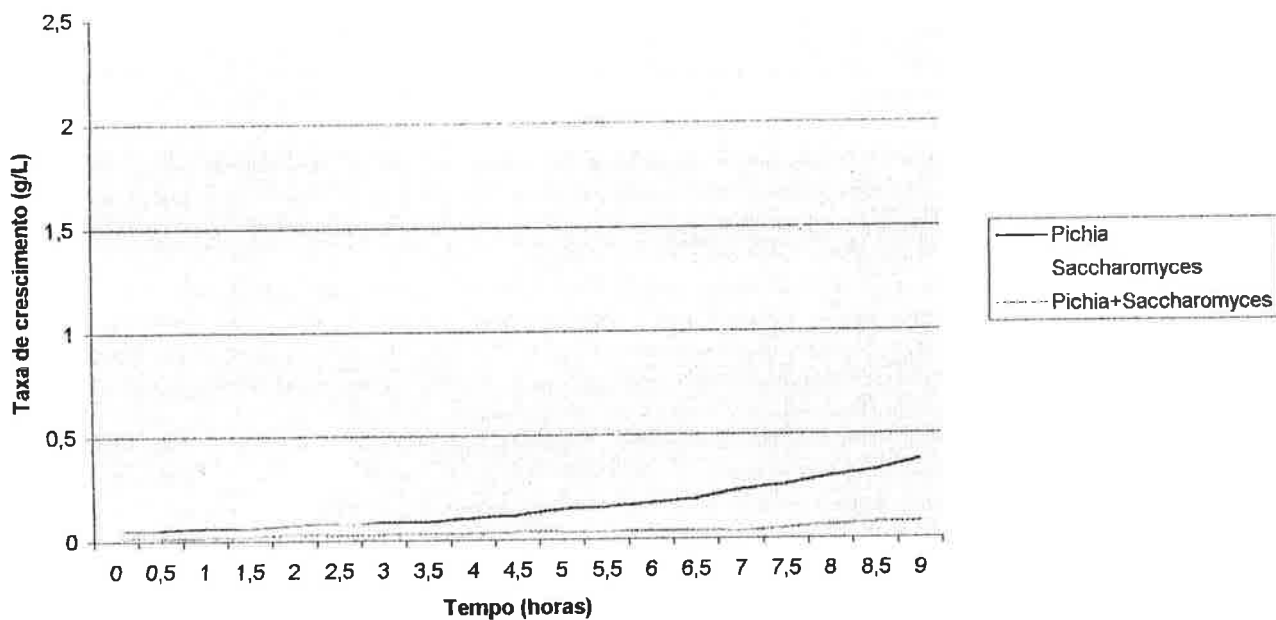


Gráfico 2 - Crescimento de *P. anomala* e *S. cerevisiae* juntas e separadas

Crescimento de *P. anomala* junto com *S. cerevisiae*

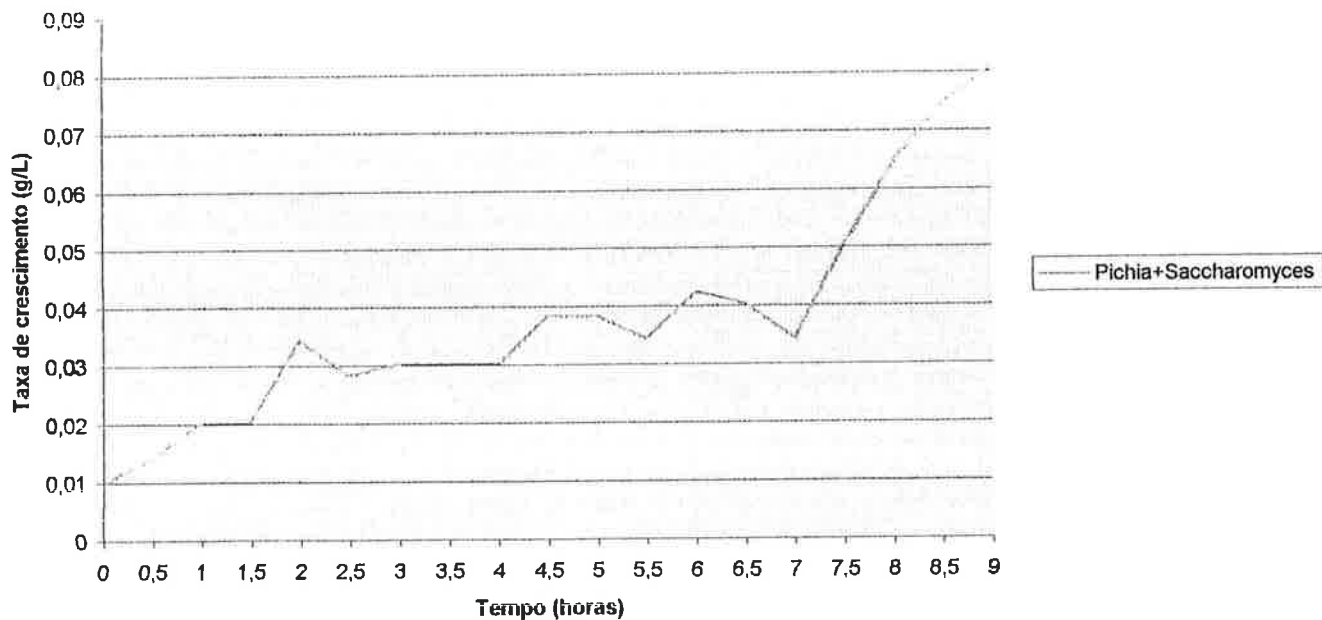


Gráfico 3 - Crescimento de *P. anomala* e *S. cerevisiae* juntas

## **XI) CONCLUSÃO**

Conclui-se então que existe um efeito antagônico entre *Saccharomyces cerevisiae* Y-904 e *Pichia anomala* IZ-234.

## **XII) BIBLIOGRAFIA CITADA E CONSULTADA**

**BARBOSA, N. R. G. Fermentação etanólica a partir de hidrolisado ácido da cana-de-açúcar, obtido em estágio único, rico em xilose, pela levedura *Pichis stipilis* CBS 5773. (dissertação - tese) Rio Claro. 1995.**

**DENNIS, C. & BUHAGIAR, R. W. M. Yeasts Spoilage of fresh and processed fruits and vegetables. In: Biology and activities of yeasts. Ed. SKINNER, F. A., PASSMORE, S. M. & DAVENPORT, R. R. Society for applied bacteriology. Academic Press. 1980.**

**DO CARMO-SOUSA, L. Distribution of yeasts in nature. In: The yeasts. Ed. ROSE, A. H. & HARRISON, J. S. Vol I. Academic press. London. 1969. p. 79-105.**

**GALLO, C. R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Revista STAB. Vol.10. n. 5. p. 31-34. 1992**

**INGRAM, M. Yeasts in food spoilage. In: The Chemistry and Biology of yeasts. Ed. COOK, A. H. New York: Academic Press. 1958.**

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. ***Pichia Hansen***. In: The yeasts: a taxonomic study. Ed. LODDER, J. 2a. Ed. London: North Holland Publishing company. 1971. Cap. 4. p. 455-550.

LACHANCE, M-A. **Yeasts selection in nature**. In: Yeast strain selection. Ed. PANCHAL, C. J. s/d.

LACHANCE, M.A. & BOIVIN, M.F. **Antibiosis in a yeast community**. Sixth International Symposium on Yeasts. Montpellier, France. 1984.

MUNDT, J. O. **Fungi in the spoilage of vegetables**. In: Food and beverage Mycology. Ed. BEUCHAT, L.R. Westport, Connecticut; AVI. 1978.

NEDER, R. N. **Microbiologia e deterioração de açúcar e seus produtos**. In: Microbiologia de alimentos I. Departamento de ciência e tecnologia Agroindustrial. Curso de pós-graduação. ESALQ/USP. P. 135-7. 1992

PANCHAL, C.J. & TAVARES, F.C.A. **Yeast strain selection for fuel ethanol production**. In: Yeast strain selection. Ed. PANCHAL, C. J. s/d.

PELCZAR JR., M. J., CHAN, E. C. S. & KING, N. R. **Microbiologia: Conceitos e aplicações**. Vol. 1. 2a. Ed. Brasil: Makron Books. 1996. 524p.

PHATFF, H. J. & MILLER, M. W. **A specific microflora associated with the fig. Wasp. *Blastophaga psenes* Linnaeus, J.** In: Pathology. Vol. 3. p. 233-243. 1961.

SILVA, M.H. **Controle de inversão no caldo de cana.** Sugar y azucar, 41. 1974.

STARMER, W. T., GANTER, P.F., ADERBEEN, V, LACHANCE, M-A & PHAFF, H. J. **The ecological role of killer yeasts in natural community of yeasts.** Can. J. Microbiology, 33:783-796 . 1987.

TAVARES, F.C.A. **Processo de controle seletivo de leveduras contaminantes.** Revista STAB. Vol 10. n. 5. 1992. p. 45-49.

TUITE, M. F. & OLIVER, S. G. ***Saccharomyces*.** Biotechnology handbooks n. 4. 1a. ed. New York: Plenum press, 1991. 327p.

VAN DER WALT, J. P. ***Saccharomyces* Meyen emend. Reess.** In: The yeasts: a taxonomic study. Ed. LODDER, J. 2a. Ed. London: North Holland Publishing company. 1971. Cap. 4. p. 555-718.

WALKER, H. M. & AYRES, J. C. **Yeasts as spoilage organisms.** In: The Yeasts. Vol. 3. Ed. WOODRUFF, J. G. & LUCH, B. S. Westport, Connecticut: AVI. 1970.

WICKERMAM, L. J. *Pichia* H. Et P. Sydow. In: The yeasts: a taxonomic study. Ed. LODDER, J. 2a. Ed. London: North Holland Publishing company. 1971. Cap. 4. p. 226-315

**I) Nome**

Daniel Macedo Abbud

**II) Orientador**

Prof. Dr. Marcos Silveira Bernardes

**III) Departamento**

Departamento de Produção Vegetal

**IV) Período do Estágio**

Dezembro de 1998 à agosto de 1999

**V) Título**

Sistema de Sangria de Safra na Cultura da Seringueira (*Hevea Brasilienses*)

**VI) Resumo**

Sabe-se que na fase produtiva a cultura da seringueira demanda uma grande quantidade de mão de obra especializada, chegando a somar cerca de 60% do custo total de produção. Para que um empreendimento heveícola resulte em um alto rendimento econômico é indispensável que haja uma redução no contingente de mão de obra. A aplicação de estimulante tem sido a alternativa adotado para a redução da frequência da sangria; experimentos tem demonstrado que sistemas de baixa frequência com o uso de ethephon (ETHREL) tem possibilitado boas produções com economia nos gastos de mão-de-obra. Além disso aumentam o período de sangria e a vida útil da planta. Um período de descanso anual não implica em perda de produção. Foi mostrado que dois meses de descanso durante o período de desfolhamento e enfolhamento, ou em outro período, tal como durante a época de chuvas intensas, quando a sangria é normalmente interrompida, tiveram um efeito positivo a longo prazo, na produção e no estado geral das plantas. O presente



experimento pretende identificar a melhor combinação entre as diferentes doses de estimulação (ET 3,3% 1ml, ET 5% 2ml, ET 7,5% 2ml e ET 10% 2ml) e os diferentes períodos de sangria (10 meses e 6 meses) nos clones RRIM 600 e GT1. A análise dos resultados demonstrou que a estimulação de ethephon a 7,5% gerou uma maior produtividade comparada aos outros tratamentos, tanto de mesmo período de sangria (6 meses) quanto ao período de sangria utilizado comercialmente (10 meses).

## **VII) Introdução**

A importância da seringueira para o homem determinou sua expansão geográfica e atualmente a heveicultura compreende latitudes de 22° N na China a 25° S no Brasil, onde a periodicidade e a amplitude dos fatores térmicos e hídricos alteram o comportamento fenológico dessa planta, e exigem, como premissa básica, o desenvolvimento e adaptação de novas tecnologias de produção (ORTOLANI, 1985). Sabe-se que na fase produtiva a cultura da seringueira demanda uma grande quantidade de mão de obra especializada, chegando a somar cerca de 60% do custo total de produção (BERNARDES, 1990). Segundo MAIA & MAIA(1986), para que um empreendimento heveícola resulte em um alto rendimento econômico é indispensável que haja uma redução no contingente de mão de obra.

A estimulação é um tratamento que consiste em aplicar nas árvores de seringueira, para um sistema de sangria definido, uma substância que promova um aumento na produção de látex (BERNARDES, 1990). Isso ocorre porque essa substância promove efeitos favoráveis nos fatores limitantes para a produtividade da seringueira: aumenta a duração do fluxo de látex após a sangria devido a redução no processo de desestabilização e coagulação do látex e também no cessamento do fluxo e modifica os mecanismos envolvidos na capacidade de regeneração do látex entre duas

sangrias consecutivas (CASTRO *et al*, 1990).

A combinação de um tipo de estimulação com um sistema de sangria (comprimento ou tipo do corte e frequência de sangria) é denominado de “sistema de exploração” (BERNARDES, 1990).

Segundo Hashim (1983), citado por VIRGENS FILHO & CASTRO(1986), a aplicação de estimulante tem sido a alternativa adotado para a redução da frequência da sangria; experimentos tem demonstrado que sistemas de baixa frequência com o uso de ethephon (ETHREL) tem possibilitado boas produções com economia nos gastos de mão-de-obra. Além disso aumentam o período de sangria e a vida útil da planta.

O período de desfolha em *Hevea* depende da época de seca e torna-se fator limitante à produção principalmente onde as estações são bem definidas. O efeito depressivo do desfolhamento e refolhamento na produção é amplamente conhecido e aceito. A retomada da produção ocorre apenas várias semanas após o rebrotamento. A explicação é que durante o refolhamento, seguido logo após pelo florescimento, as árvores usam prioritariamente suas reservas minerais e orgânicas para a reconstituição de suas folhas e para o crescimento dos frutos aos custos da produção de látex (d’AUZAC & JACOB & CHRESTIN, 1989).

Segundo BERNARDES (1990), um período de descanso anual não implica em perda de produção. TONNELIER e GENER (1979) mostraram que dois meses de descanso durante o período de desfolhamento e enfolhamento, ou em outro período, tal como durante a época de chuvas intensas, quando a sangria é normalmente interrompida, tiveram um efeito positivo a longo prazo, na produção e no estado geral das plantas. Sivakumaram e Pakianathan (1983a), citados por BERNARDES (1990), obtiveram melhores produções e melhor crescimento em perímetro de tronco,

no cultivar RRIM600, sangrado em painel BO-1, para sistemas de sangria com descanso anual associados com estimulação.

### **VIII) Objetivos**

Com o objetivo de dar continuidade aos trabalhos realizados pelo Departamento de Agricultura no que diz respeito a pesquisa sobre o cultivo da seringueira, o presente projeto se constitui em uma nova etapa da pesquisa de diferentes sistemas de sangria nos clones RRIM 600 e GT1. Em experimento de sistemas de estimulação para sangria realizado no ano agrícola de 98/99, no mesmo local serão avaliados dois períodos de sangria (10 meses e 6 meses) com mesma frequência (d/7), sendo que o período de 10 meses será o tratamento testemunha T com estimulação padrão utilizada no Campus da ESALQ (ET 3,3% 1ml) e a sangria de período de 6 meses será submetida a diferentes concentrações e doses de estimulantes: ET 5% 2ml, ET 7,5% 2ml, ET 10% 2ml, respectivamente, tratamentos B, C e D, e um único modo de aplicação do estimulante (sobre o canal da sangria, sem a retirada do cernambi combinada com a aplicação sobre o painel, ou casca em regeneração recém sangrada; denominado Pa/La).

O presente experimento pretende identificar a melhor combinação entre as diferentes doses de estimulação (ET 3,3% 1ml, ET 5% 2ml, ET 7,5% 2ml e ET 10% 2ml) e os diferentes períodos de sangria (10 meses e 6 meses).

### **IX) Material e Métodos**

#### *Localização da área:*

O seringal onde será instalado o experimento é formado por árvores de 13 anos de idade pertencentes aos cultivares RRIM 600 e GT1 e está localizado no Campo Experimental do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, município de Piracicaba.

### *Caracterização da área:*

O clima da região caracteriza-se por :

Temperatura média do ar: 21,1°C

Temperatura média máxima do ar: 27,8°C

Temperatura média mínima do ar: 14,3°C

Precipitação: 1.257 mm/ano

Umidade relativa do ar: 74%

Insolação média: 6,6 horas/dia

Radiação solar: 436 cal/cm.d

Solo: Terra Roxa Estruturada

### *Materiais utilizados:*

Balança analítica : para pesagem de látex e borracha para análises de sólidos totais e de produção, respectivamente.

Estufa com circulação de ar: secagem da borracha.

Paquímetro

Fita métrica

Plaquinhas de identificação

ETHREL

Pincéis

Copos plásticos

Vidraria de Laboratório: placas de Petri, proveta, etc.

### *Metodologia*

O experimento será conduzido no período compreendido entre dezembro de 1998 e agosto de 1999 em árvores dos cultivares RRIM 600 e

GT1.

Se iniciará a sangria no tratamento T imediatamente e pesagem da produção uma vez por mês.

Iniciar as sangrias nos tratamentos B, C e D no início de Fevereiro de 1999, e na primeira semana de sangria, sangrar a cada dois dias (d/2) e logo em seguida fazer a primeira estimulação. Pesagem da produção uma vez por mês.

As sangrias serão realizadas no período da manhã pelos sangradores da ESALQ, e a estimulação será feita através do pincelamento de ETHREL, na dosagem de 1 ml de solução por planta para o tratamento testemunho (T), e 2ml de solução por planta para os demais tratamentos (B, C, D), em casca sem raspar, na canaleta e na porção de casca equivalente ao consumo mensal.

O delineamento experimental utilizado foi um fatorial inteiramente casualizado, sendo que cada tratamento será representado por 10 árvores e cada árvore representará uma repetição.

*Parâmetros a serem analisados:*

1. Produção: o látex será coagulado mediante a adição de solução de ácido acético a 1% na tigela. O coágulo formado será colocado em arames, sendo que ao final de cada mês, os coágulos serão pesados. Para determinar o grau de umidade, será retirada uma amostra, a qual será seca até peso constante em estufa a 70°C. A produção será expressa de três maneiras: gramas de borracha seca/tratamento/sangria, quilogramas de borracha seca/tratamento/ano e quilogramas de borracha seca/árvore/ano. As fórmulas utilizadas para as conversões são:

Gramas de borracha seca/sangria(g.b.s.) = peso da b.s. no período/no. de

sangrias

Quilograma de b.s./árvore/ano = (g.b.s./sangria/árvore x no.sangrias ano) / 1000

Porcentagem de peso seco = (peso amostra seca/peso amostra úmida) x 100

2.Crescimento relativo do perímetro: o perímetro será avaliado a 1,30 m do solo no começo e final do experimento(set/ago). A fórmula utilizada será:

C.R.P = (Perímetro final – Perímetro inicial/ Perímetro inicial) x100

3.Crescimento relativo da espessura de casca: a espessura de casca será avaliada do lado contrário ao painel no começo e final do experimento. A fórmula utilizada será:

C.R.E.C.= (Espessura final – Espessura inicial/Espessura inicial) x 100

4.Percentagem de comprimento de corte seco: a percentagem ed comprimento de corte seco (PCS) será determinada ao final de cada período de sangria, em todas as plantas de cada experimento. No momento da sangria serão observadas as partes do corte das quais não exudam látex. As extremidades destas partes serão imediatamente marcadas com giz, na casca abaixo do corte. Em seguida será medido o comprimento total do corte (CTC) e a soma dos comprimentos das partes secas (SPS). A percentagem era então calculada de acordo com a fórmula:

$$PCS = SPS/CTC . 100 (\%)$$

5.Relações entre produção e crescimento: segundo metodologia proposta por BERNARDES (1995), para avaliar os efeitos da produção de borracha e dos sistemas de exploração, sobre o crescimento das árvores, durante a fase de exploração precoce, serão avaliados alguns índices. Através destes será calculada a proporção de borracha produzida pela perda de crescimento (borracha/perda de crescimento). Esse procedimento permite uma

estimativa mais precisa da proporção da perda de crescimento que pode ser explicada pela produção de borracha.

A análise estatística dos dados será feita ao final do experimento.

O experimento apresenta os quatro seguintes tratamentos:

T - S/2 d/7 5d/7 10m/y ET3,3% Pa/La 1ml

B - S/2 d/7 5d/7 6m/y ET5% Pa/La 2ml

C - S/2 d/7 5d/7 6m/y ET7,5% Pa/La 2ml

D - S/2 d/7 5d/7 6m/y ET10% Pa/La 2ml

S/2 - Sangria em meia espiral

d/7 5d/7 - sangria 7 e , considerando a semana com 5 dias úteis.

ET 3,3%, ET 5,0%, ET7,5%, e ET10,0% - Concentração dos estimulantes

10m/y - 10 estimulações /ano

6m/y - 6 estimulações/ano

1ml e 2ml - volume da solução de estimulante a ser aplicado.

## **X) Resultados**

Os resultados dos clones RRIM 600 e GT1 estão representados na tabelas e gráficos em anexo.

## **XI) Conclusão**

Foi demonstrado que o sistema de sangria de safra na cultura de seringueira é viável tanto nos clones GT1 quanto RRIM 600, embora o clone RRIM 600 tenha apresentado uma maior produtividade no tratamento 3. O experimento também mostrou que diferentes clones responde diferentemente a estimulação, portanto se faz necessário o estudo individual de cada clone em sistema de sangria de safra.

## **XII) Bibliografia consultada**

**BERNARDES, M.S. Sangria de Seringueira.** Piracicaba, ESALQ/USP, 1990. 206p.

**BERNARDES, M.S. Sistemas de exploração precoce de seringueira cultivar RRIM 600 no Planalto Ocidental do Estado de São Paulo.** Piracicaba, 1995. 182p. Tese (Doutoramento) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

**CASTRO, P. R. C.; BERNARDES, M.S.; VIRGENS FILHO, A .C.,** **Uso de estimulantes na exploração de seringais,** IN: Simpósio da Cultura da Seringueira, 2, Piracicaba, SP 1987. Anais Piracicaba:USP /ESALQ Depto de Agricultura, 1990. 384p. ilus.

**MAIA, F. Z. & MAIA, M. A . Z.; Comparação econômica de cinco sistemas de sangria em quatro clones de seringueira.** IN: Encontro Nacional sobre Exploração e Organização de seringais de Cultivo, 1.; Brasília, SUDHEVEA, 1986. p 59 –65.

**ORTOLANI, A A ; PEDRO JUNIOR, M.J.; ALFONSI, R.R.; CAMARGO, M.B.P. e BRUNINI, O. Aptidão agroclimática para regionalização da heveicultura no Brasil.** IN: Seminário Nacional sobre Recomendação de Clones de seringueira, Brasília, DF 1982. ANAIS, Brasília, DF, EMBRAPA, 1983 p. 17 –28.

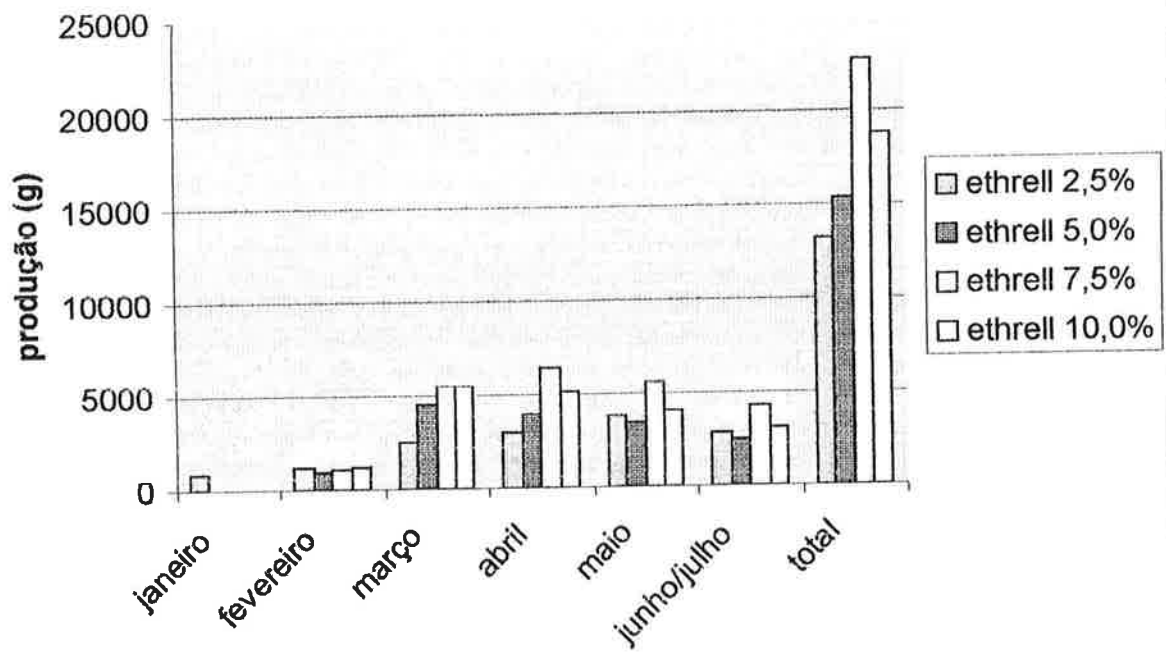
**VIRGENS FILHO, A .C. & CASTRO, P.R.C.; Sangria da seringueira( Hevea spp.).** IN: Simpósio sobre a cultura da Seringueira no

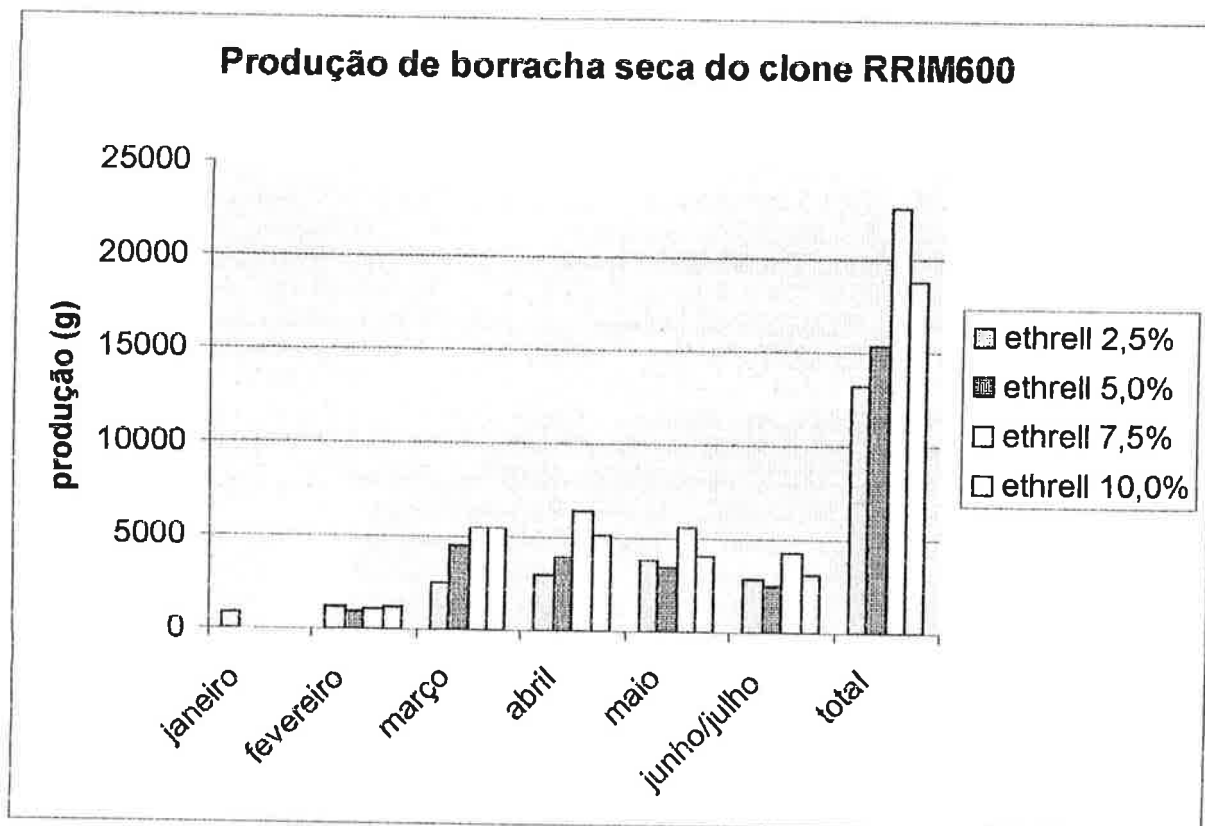


Estado de São Paulo, 1. Piracicaba, 1986. Anais. Campinas, Fundação Cargill, 1989 p. 271 –315.

d'AUZAC, J & JACOB, J. & CHRESTIN, H.; **Physiology of Rubber Tree Latex**. Boca Raton, Florida, CRC Press, Inc; 1989.

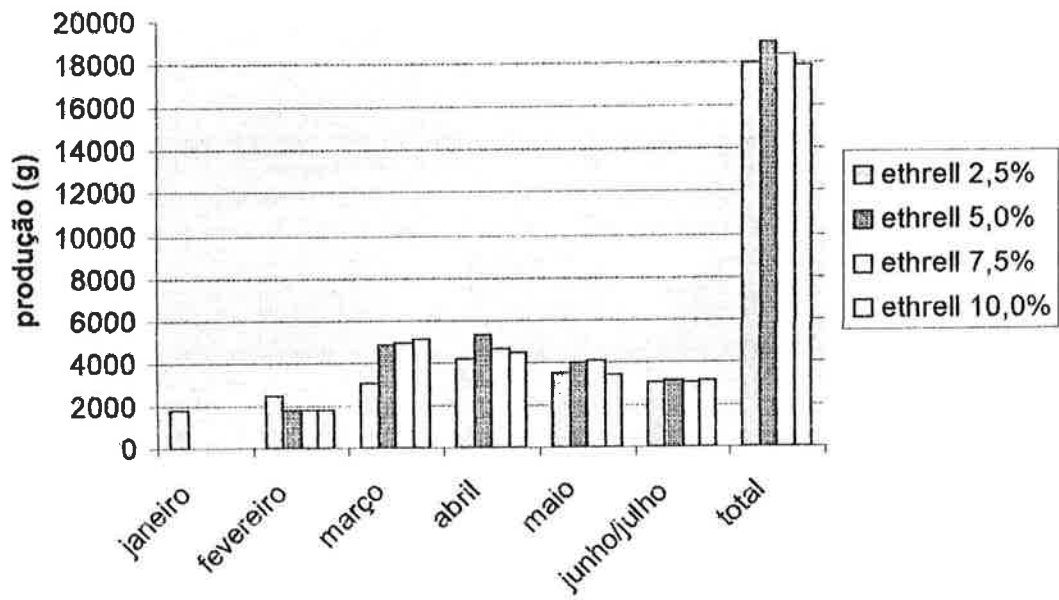
### Produção de borracha seca do clone RRIM600





CLONE	peso	peso	peso	peso	peso	
RRIM600	seco (g)	seco (g)	seco (g)	seco (g)	seco (g)	
tratamento	03/03/99	07/04/99	14/05/99	09/06/99	05/08/99	TOTAL
GB1	69,480805	197,17569	176,463805	139,834471	105,67253	688,627301
GB2	144,085243	476,753425	606,35617	390,690622	296,887728	1914,77319
GB3	141,320108	351,354393	464,923582	442,129795	333,178837	1732,90672
GB4	250,298975	559,217399	699,992146	536,864809	420,099882	2466,47321
GB5	110,75	399,350001	397,277392	484,866514	290,20861	1682,45252
GB6	226,28025	574,142485	728,294252	527,359744	374,724432	2430,80116
GB7	238,831796	559,774768	385,551244	252,488425	273,002017	1709,64825
GB8	178,613291	590,836995	759,445622	503,98486	396,722968	2429,60374
GB9	250,217647	592,792207	526,576793	378,398968	326,712488	2074,6981
GB10	174,004732	491,457333	541,775752	308,580932	301,180125	1816,99887
<b>TOTAL</b>	<b>1783,88285</b>	<b>4792,8547</b>	<b>5286,65676</b>	<b>3965,19914</b>	<b>3118,38962</b>	<b>18946,9831</b>
GC1	310,225473	723,792298	1097,68123	1079,40249	555,561958	3766,66344
GC2	133,286681	458,0325	617,612649	628,727171	375,905352	2213,56435
GC3	128,598018	351,480486	203,163282	195,93789	193,455919	1072,63559
GC4	256,133396	575,740179	572,991588	407,572611	326,632559	2139,07033
GC5	174,282193	551,700745	377,679314	234,144415	290,316652	1628,12332
GC6	85,2348706	335,260284	261,746869	238,958837	158,32124	1079,5221
GC7	157,214712	486,862711	392,565944	439,384132	384,302146	1860,32964
GC8	156,729999	401,450001	259,929721	229,411748	229,506278	1277,02775
GC9	253,448833	586,083124	398,289181	259,306583	240,567704	1737,69543
GC10	115,119275	458,186489	470,897418	334,06638	254,38533	1632,65489
<b>TOTAL</b>	<b>1770,27345</b>	<b>4928,58882</b>	<b>4652,55719</b>	<b>4046,91225</b>	<b>3008,95514</b>	<b>18407,2869</b>
GD1	283,774549	681,565618	668,338391	492,815823	465,729215	2592,2236
GD2	151,243037	509,1916	345,057077	308,456214	227,852803	1541,80073
GD3	191,333889	553,608986	372,916047	259,160058	238,747614	1615,76659
GD4	190,300001	567,929999	578,556123	374,557878	347,580835	2058,92484
GD5	121,167975	314,985308	264,045376	196,701865	219,179079	1116,0796
GD6	101,044085	322,701888	239,867276	146,986709	125,280747	935,880705
GD7	171,911565	500,619524	315,178515	253,904352	243,218507	1484,83246
GD8	176,360976	510,012877	667,10872	502,95,3779	542844944	2399,2813
GD9	226,190682	592,910501	613,190498	523,338997	403,356904	2358,98758
GD10	179,194936	579,821403	428,430398	351,039276	301,837949	1840,32396
<b>TOTAL</b>	<b>1792,52169</b>	<b>5133,3477</b>	<b>4492,68842</b>	<b>3409,91495</b>	<b>3115,6286</b>	<b>17944,1014</b>
T1G	452,783441	334,780815	515,897332	326,282713	322,185576	1951,92988
T2G	310,07	262,599999	429,806471	486,105155	353,226899	1841,80852
T3G	334,199525	223,154226	398,169123	425,884443	324,248091	1705,65541
T4G	497,494032	371,98668	535,59857	462,306739	374,944523	2242,33054
T5G	293,34555	229,954911	325,69164	245,616803	251,080603	1345,68951
T6G	618,263052	486,33894	506,259699	353,597291	309,490277	2273,94926
T7G	597,756691	358,871073	584,416819	483,935426	463,566747	2488,54675
T8G	227,932499	148,904418	232,616601	286,781631	173,6374	1069,87255
T9G	487,987895	319,155432	309,300565	235,23126	219,671983	1571,34714
T10G	427,897534	315,899019	289,519457	223,525013	225,624082	1482,4651
<b>TOTAL</b>	<b>4247,73022</b>	<b>3051,64551</b>	<b>4127,27628</b>	<b>3529,26647</b>	<b>3017,67618</b>	<b>17973,5947</b>

### Produção de borracha seca do clone GT1



CLONE	peso	peso	peso	peso	peso	
GT1	seco (g)	seco (g)	seco (g)	seco (g)	seco (g)	
tratamento	03/03/99	07/04/99	14/05/99	09/06/99	05/08/99	TOTAL
RB1	155,310021	586,670001	517,565555	443,955198	300,300182	2003,80096
RB2	83,7191665	378,289525	349,003	291,867908	232,556016	1335,43562
RB3	118,678316	605,12294	418,354035	389,368859	271,489445	1803,0136
RB4	36,7779395	226,217461	276,118515	269,897047	165,125217	974,13618
RB5	41,4757181	381,60883	448,578376	436,158483	334,637567	1642,45897
RB6	121,136881	546,205281	661,911442	460,491703	342,870563	2132,61587
RB7	160,062638	508,324144	449,039261	425,551217	354,094785	1897,07204
RB8	117,471883	842,33346	270,248298	176,803341	168,277875	1575,13486
RB9	23,9824337	138,230221	66,7636117	55,5014028	59,8720165	344,349686
RB10	51,7852399	351,256013	451,198142	495,777672	293,406116	1643,42318
<b>TOTAL</b>	<b>910,400238</b>	<b>4564,25788</b>	<b>3908,78023</b>	<b>3445,37283</b>	<b>2522,62978</b>	<b>15351,441</b>
RC1	115,956672	615,922833	1040,50495	1276,37468	827,702096	3876,46124
RC2	89,0846632	459,124214	341,708409	181,904302	230,184111	1302,0057
RC3	166,508071	733,446682	874,657012	853,904975	659,050925	3287,56766
RC4	84,2233953	440,74448	358,88852	215,961021	179,314959	1279,13238
RC5	58,7403204	356,863871	473,646224	328,707525	248,187659	1466,1456
RC6	79,4199996	435,979999	539,708547	693,126814	433,699144	2181,9345
RC7	101,585066	538,832683	703,824038	474,307081	318,655124	2137,20399
RC8	115,204333	660,786211	1091,08564	844,399539	620,017618	3331,49334
RC9	117,123762	690,66079	611,622129	519,187961	404,551456	2343,1461
RC10	85,8148818	492,140775	374,106888	259,204558	346,044727	1557,31183
<b>TOTAL</b>	<b>1013,66116</b>	<b>5424,50254</b>	<b>6409,75236</b>	<b>5647,07846</b>	<b>4267,40782</b>	<b>22762,4023</b>
RD1	61,9630976	340,081528	269,867066	152,890069	149,713793	974,515553
RD2	90,986955	549,418598	506,168577	364,995185	330,23246	1841,80177
RD3	155,922665	773,615725	823,93939	663,468215	438,121204	2855,0672
RD4	90,6694915	591,989955	581,988733	467,427361	278,91649	2010,99203
RD5	301,840421	881,55931	804,095603	578,000658	524,858479	3090,35447
RD6	72,1315488	325,51335	338,104363	281,603187	185,679893	1203,03234
RD7	75,2484629	480,71552	378,340808	426,484818	223,528886	1584,31849
RD8	28,7641145	259,909336	275,524657	331,473478	243,380491	1139,05208
RD9	223,484664	896,814261	866,041996	633,633233	470,19727	3090,17142
RD10	49,38	320,559998	251,551672	180,649491	215,500312	1017,64147
<b>TOTAL</b>	<b>1150,39142</b>	<b>5420,17758</b>	<b>5095,62286</b>	<b>4080,62569</b>	<b>3060,12928</b>	<b>18806,9468</b>
T1R	104,776907	120,347498	169,450089	256,385949	153,898644	804,859088
T2R	148,947207	115,025774	259,141488	465,106549	412,604939	1400,82596
T3R	256,029206	329,590407	338,690517	226,113983	208,495601	1358,91971
T4R	240,558668	319,060001	411,652684	421,919517	296,517001	1689,70787
T5R	149,521202	153,408278	237,502685	232,571516	130,301654	903,305335
T6R	145,093239	152,990888	158,547697	250,42094	335,428901	1042,48166
T7R	268,256215	329,068669	399,7544	779,218101	407,802257	2184,09964
T8R	195,322377	268,1384	315,575348	423,944337	312,37788	1515,35834
T9R	137,403525	136,486585	150,528148	269,893868	300,172221	994,484347
T10R	410,652588	531,789857	520,973631	439,969599	277,750454	2181,13613
<b>TOTAL</b>	<b>2056,56113</b>	<b>2455,90636</b>	<b>2961,81669</b>	<b>3765,54436</b>	<b>2835,34955</b>	<b>14075,1781</b>

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”  
ESALQ / USP

PET AGRONOMIA – BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE PESQUISA

*“Projeto Genoma  
Xylella fastidiosa”*

Eric Franchi Leonardo

29/11/1999

**I) Nome**

Eric Franchi Leonardo

**II) Orientador**

Prof.ª Dr.ª Helaine Carrer

**III) Departamento**

CEBTEC – Centro de Biotecnologia na Agricultura – ESALQ/USP

**IV) Período do Estágio**

03/1999 a 06/1999

**V) Título**

Projeto Genoma – *Xylella fastidiosa*

**VI) Resumo**

O Brasil hoje é um grande produtor de Citros, mas essa produção poderia ser maior, só não é, devido a existência de doenças e pragas. A principal doença que ataca Citros é a Clorose Variegada dos Citros (CVC), a praga do amarelinho, causa por uma bactéria denominada *Xylella fastidiosa*. O seqüenciamento completo do genoma desta bactéria surgiu com intuito de melhor compreender o funcionamento e estrutura do microorganismo causador da CVC. Está tecnologia é baseada em análise de DNA. Esse sequenciamento propiciará o estudo dos desconhecidos mecanismos do processo infeccioso da bactéria, tendo em vista buscar variabilidades genéticas e desenvolvimento de drogas para o tratamento eficaz e bloqueio para outras plantações. Assim pretende-se contribuir para o controle da doença, responsável por prejuízos anuais na faixa de US\$ 100 milhões por ano na citricultura paulista.

Este relatório refere-se ao período como aluno do projeto GENOMA-FAPESP, realizado pelo laboratório do CEBTEC/ESALQ/USP. A realização



de tais atividades pelo aluno vem ampliar sua visão quanto ao uso de técnicas na área de biotecnologia, além de contribuir para sua formação e iniciação na área de pesquisa científica.

## **VII) Introdução**

O presente relatório refere-se as atividades como aluno de iniciação científica do Projeto Genoma no período de março de 1999 à julho de 1999. O projeto é o primeiro envolvendo completo sequenciamento de um organismo, a ser desenvolvido no país. Será obtido o código genético da bactéria *Xylella fastidiosa*. Esta possui em torno de 2,7 milhões de pares de bases e cerca de duas mil “orfs-open reading frame” serão identificadas. Esta operação tem o intuito de determinar a posição e a combinação exatas dos nucleotídeos que formam o código genético. Após, a etapa relacionada a identificação de genes, onde a intenção será a função de cada proteína. Assim, de posse dessas informações, será possível identificar os mecanismos utilizados pela bactéria para infectar os Citros e possivelmente inferir neste processo.

### **Clorose Variegada do Citros (CVC)**

---

---

A Clorose Variegada dos Citros (CVC) ou Amarelinho foi identificada oficialmente no Brasil em 1987 em pomares do Triângulo Mineiro e do Norte e Noroeste do Estado de São Paulo. Embora essas sejam as regiões mais afetadas até hoje, ela já está presente em quase todas as áreas citrícolas do país.

A CVC é causada pela bactéria *Xylella fastidiosa* que, restrita ao xilema da planta, provoca o entupimento dos vasos. A produção do pomar afetado pela doença cai rapidamente, seus frutos vão ficando duros e amadurecem precocemente. A bactéria é transmitida e disseminada nos pomares por insetos

vetores. Como ainda não há uma forma específica de combate à *Xylella*, os citricultores devem implantar em seus pomares as estratégias de manejo com a doença.

Os primeiros sintomas são vistos nas folhas, passam posteriormente para os frutos e acabam afetando toda a planta. Quanto mais nova a planta, maior a chance de ser infectada.

O manejo da CVC exige cuidados e dedicação por parte do citricultor e está baseada em três fatores: utilização de mudas sadias; poda de ramos com sintomas iniciais em plantas com mais de 2 anos e erradicação de plantas abaixo dessa idade, e controle do vetor (cigarrinhas). Além dessas medidas, é importante manter os tratos culturais exigidos pelo pomar. Deve-se ressaltar que nenhuma das medidas de convivência poderá ter eficiência isoladamente.

#### Histórico da bactéria *Xylella fastidiosa*

---

---

O primeiro relato que se tem de uma doença causada por *Xylella fastidiosa* foi feito na década de 20, em plantas de alfafa, causando nanismo, porém, teve como "marco" inicial o ano de 1892, quando Newton B. Pierce, agente especial da Secretaria de Agricultura dos EUA e primeiro fitopatologista treinado na Califórnia, caracterizou a doença em videira, como sendo ainda de causa desconhecida, em uma publicação do Departamento de Agricultura dos EUA (Pierce, 1892). Desde então acreditava-se que todas as doenças causadas por *Xylella fastidiosa* tinham natureza viral, por colonizar sistematicamente o sistema vascular e ser transmitida por enxertia e insetos vetores (Purcell & Hopkins, 1996). Na década de 50, estudos demonstraram mais de 100 espécies hospedeiras do "vírus" da doença de Pierce, quando então se utilizavam plantas de alfafa e videira como plantas indicadoras

(Purcell & Hopkins, 1996); até que em 1973 dois trabalhos descreveram a associação da doença a organismos do tipo *Rickettsia* (Hopkins & Mollenhaver, 1973; Goheen et al., 1973) mais tarde apropriadamente referidos como Bactérias Limitadas ao Xilema (XLB) (Chen, *et al.*, 1992). Embora o Dr. Newton B. Pierce tenha rejeitado as explicações mais aceitas da época da causa da doença em videira, nunca soube qual era o agente causal e, ironicamente, sua especialidade era na área de bacteriologia de plantas. Somente em 1987, Wells *et al.* cria o gênero *Xylella* incluindo somente uma espécie, *Xylella fastidiosa*, como sendo uma bactéria relacionada a gênero *Xanthomonas* spp. sua estirpe tipo é um isolado obtido de videira com doença de Pierce (Holt, 1994).

### **VIII) Objetivos**

O objetivo do Projeto Genoma-FAPESP consiste na realização do seqüenciamento genético da bactéria *Xylella fastidiosa*, causadora da Clorose Variegada dos Citros (CVC). Através da obtenção de seu código genético, haverá a identificação de genes da bactéria que poderão estar diretamente relacionados a instalação da doença, que atualmente ameaça seriamente a citricultura paulista. A intenção é conhecer o genoma da bactéria para possivelmente interferir no mecanismo de patogenicidade e conseqüentemente controlá-lo.

### **IX) Material, métodos e desenvolvimento**

Durante o projeto foram realizadas diversas atividades envolvendo desde práticos comuns vinculados ao uso diário de um laboratório, bem como a utilização de protocolos específicos para a realização de extração de plasmídeos, sua purificação e seqüenciamento em seqüenciador automático ABI - 377 - Perkin-Elmer.

## Minipreparação de plasmídeos

---

- A. Inoculação de colônias transformantes em meio LB-ampicilina 100 µg/L (vide item 3.5).
- B. Colônias isoladas são inoculadas em 2 mL de meio LB-ampicilina 100 µg/L e deixadas a 37°C por 10-16 h a 200rpm.
- C. Vortexar a cultura.
- D. Colocar 500 µL em glicerol (estoque).
- E. Colocar o restante em eppendorf (1,7mL).
- F. Centrifugar 5 minutos / 4°C / 14.400 rpm.
- G. Descartar o sobrenadante (remover o máximo possível)
- H. Adicionar 100 µL da solução 1 (vide 3.5).
- I. Ressuspender com a pipeta.
- J. Adicionar 200 µL da solução 2 (vide 3.5), misturar simultaneamente por inversão (5x).
- K. Deixar 10 min no gelo.
- L. Adicionar 150 µL da solução 3 (vide 3.5), misturar simultaneamente por inversão (5x).
- M. Deixar 10 min no gelo.
- N. Centrifugar 20 minutos / 4°C / 15.000 rpm. ( Deixar a “asinha” do eppendorf virada para o lado de fora).
- O. Passar o sobrenadante para o outro eppendorf descartando o precipitado
- P. Adicionar 1,5 µL de RNase e misturar lentamente.
- Q. Aquecer a 37°C por 20 minutos.
- R. Adicionar 1mL de etanol 100%.
- S. Centrifugar por 20 minutos / 4°C / 15.000 rpm.

- T. Descartar o sobrenadante e lavar com 500  $\mu$ L de etanol 75%.
- U. Centrifugar por 5 minutos / 4°C / 15.000 rpm
- V. Descartar sobrenadante e secar a 37°C.
- W. Ressuspender em 30  $\mu$ L de água deionizada (Milli-Q estéril).

### PCR (reaction chain polimerase)

---

- A. 3,5  $\mu$ L de água deionizada (Milli-Q estéril).
- B. 3,0  $\mu$ L de tampão de sequenciamento (vide 3.5).
- C. 1,0  $\mu$ L de “BigDye TM Terminator RR Mix”.
- D. 1,5  $\mu$ L de DNA (200-300 ng).
- E. 1,0  $\mu$ L de primer (“Reverse” ou “Forward”).
- F. Vortexar a mistura.

### Programa do PCR (reaction chain polimerase)

---

#### Programa 6

25 ciclos

.....96°C    3 minutos

.....step # 1    96°C    10 minutos

                  step # 1    50°C    5 minutos

                  step # 1    60°C    4 minutos

.....4°C    “hold forever”

## Purificação do PCR (reaction chain polmerase)

---

---

- A. Adicionar 60  $\mu$ L de Isopropanol 75% no tubo de PCR.
- B. Ressuspender e passar o volume total (64  $\mu$ L) para eppendorfs de 1,7 mL.
- C. Deixar à temperatura ambiente por 20 minutos para precipitar o DNA.
- D. Centrifugar por 20 minutos / 4°C / 15.000 rpm.
- E. Retirar todo Isopropanol com pipeta.
- F. Adicionar 125  $\mu$ L de Etanol 75%.
- G. Centrifugar por 20 minutos / 4°C / 14.500 rpm.
- H. Retirar todo Etanol com a pipeta e secar à 37°C por 1 hora.
- I. Adicionar 4  $\mu$ L de Lodding Buffer com formamida (vide 3.5).
- J. Short Spin à 13.000 rpm e colocar na geladeira.

## Soluções Utilizadas

---

---

Meios usados:

**2Y + T** g/L (16 g de Bacto-triptona, 10 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl);

**LB** g/L (10 g de bacto-triptona, 5g de extrato de levedura, 10 de NaCl)

Soluções:

A. Para 100 mL da solução 1:

Tris-HCl 1,0 M ----- 2,5 mL

EDTA 0,5 M ----- 2,0 mL

Glicose ----- 0,90 g

B. Para 100 mL da solução 2:

NaOH 0,2 N

SDS 1%

C. Para 100 mL da solução 3:

Kac 5 M ----- 60 mL

Hac glacial ----- 11,5 mL

Água deionizada (Milli-Q) ----- 28,5 mL

D. Tampão de sequenciamento:

200 mM . TRIS + HCl pH 9,0

5 mM . MgCl<sub>2</sub>

E. "Loading buffer"

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

F. RNase

Dissolver 10 mg de RNase em 0,01 M de acetato de sódio (pH 5,2) \. Aquecer a 100°C por 15 minutos. Deixar esfriar vagarosamente até atingir a temperatura ambiente. Ajustar o pH adicionando 0,1 volume de 1 M Tris-HCl (pH 7,4). Dispensar em alíquotas e armazenar a -20°C.

## **X) Resultados**

Durante o período do projeto o grupo de trabalho do laboratório CEBTEC/ESALQ/USP realizou o sequenciamento de 4 cosmídeos, sendo que três deles foram obtidos com a colaboração do grupo LB-UNICAMP. Todos

os cosmídeos estão na categoria “close-to-finish of” e o sequenciamento com “primers” específicos já foram iniciados.

## **XI) Conclusão**

A realização de tais atividades pelo aluno vem ampliar sua visão quanto ao uso de técnicas na área de biotecnologia, como a biologia molecular, assimilando importantes conhecimentos para sua formação além de contribuir para sua iniciação na área de pesquisa científica.

## **XII) Bibliografia consultada (caso haja)**

Alberts; Bruce. **Biologia Molecular da Célula**. Editora Artes Medicas Sul

**Manual de Fitopatologia** / editado por Armando bergamin Filho, Hiroshi Kimati, Lilian

Amorim – 3ª edição. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1995. 919 p.

Azevedo, João Lúcio de. **Genética de microrganismos**. Goiânia, Editora da UFG, 1998.

490 p.

Júnior, César da S.; Sasson, Sezar. **Biologia**. Vol. 3 – 2ª edição. São Paulo, Editora Saraiva,

1996. 400 p.

De Robertis, E. D. P.; De Robertis, E. M. F. Junior. – 2ª edição. Rio de Janeiro, Editora

Guanabara Koogan S. A., 1993. 310 p.



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

**PET AGRONOMIA – BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE PESQUISA**

**“MELHORAMENTO GENÉTICO DE SOJA”**

**Éverton Yoshiaki Hiraoka**

**Dezembro de 1999**

**I) Nome**

Éverton Yoshiaki Hiraoka

**II) Orientador**

Natal Antônio Vello

### **III) Departamento**

Departamento de Genética

### **IV) Período do Estágio**

Início em 03 de agosto de 1999

### **V) Título**

Melhoramento Genético da Soja

### **VI) Resumo**

O programa tem como objetivo o desenvolvimento de genótipos de soja com alta produtividade de óleo e com resistências genéticas ao nematóide de cisto e ao cancro da haste. A fase atual compreende a conclusão do primeiro e início do segundo ciclo de seleção recorrente.

### **VII) Introdução**

O óleo de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) representa mais de 30% do óleo vegetal produzido no mundo. Além do consumo interno significativo, o Brasil, juntamente com os Estados Unidos, Argentina e União Européia, atendem cerca de 90% do volume mundial de óleo de soja (EMBRAPA, 1997).

No mercado internacional de grãos, a soja brasileira tem sido muito valorizada, principalmente devido apresentar um acréscimo de cerca de 1,25% no teor de óleo, comparativamente à soja produzida em regiões temperadas (Hill et al. 1996). Para atender às demandas interna e externa por óleo de soja, há necessidade de se manter e, se possível, aumentar a produtividade de óleo.

A síntese de óleo ocorre, pelo menos parcialmente, nos cloroplastos das células da semente. Todavia, seu controle genético é feito pelo genoma nuclear materno. Portanto, o teor de óleo de uma semente avaliado em uma dada geração de endogamia, é consequência da ação gênica na geração

anterior, isto é, o teor de óleo é controlado por genes da planta mãe da semente. Herança semelhante a esta também ocorre para o caráter produtividade de grãos. O teor de óleo da semente de soja, apresenta variação ambiental entre plantas de mesmo genótipo, entre vagens de uma mesma planta e entre sementes de uma mesma vagem.

Cerca de 900 progênies  $F_{6:3}$  de 40 cruzamentos biparentais de soja foram avaliadas por Laínez-Mejía (1996) em diferentes locais da região de Piracicaba.

Em relação à herdabilidade, o teor de óleo alcançou os valores mais altos ( $h^2=45\%$ ); a produtividade de grãos apresentou os valores mais baixos ( $h^2=26\%$ ).

### **VIII) Objetivos**

O programa de melhoramento genético em andamento no Departamento de Genética da ESALQ/USP procura a obtenção de genótipos com alta produtividade de óleo e com caracteres agronômicos relevantes para o cultivo da soja, incluindo-se resistência genética ao nematóide de cisto (*Heterodera glycines* Ichinohe) e ao cancro-da-haste (*Diaporthe phaseolorum* f.sp.*meridionalis*).

### **IX) Material, métodos e desenvolvimento**

Após dois anos de experimentações, conduzidas em três locais, foram selecionados 40 parentais para produtividade de óleo, caracteres agronômicos e diversidade genética.

Os parentais foram cruzados em cadeia circulante, obtendo-se na primeira recombinação 40 cruzamentos biparentais em  $F_{1[2]}$ . Na segunda recombinação, estas plantas, com parentais distintos, foram cruzadas novamente em cadeia, produzindo plantas  $F_{1[4]}$ . Uma terceira recombinação

entre plantas  $F_{1[4]}$  com parentais distintos, originou 44 cruzamentos óctuplos em  $F_{1[8]}$ .

A seguir, foram desenvolvidos três gerações de endogamia pelo método SHDT (Single Hill Descent Thinned; Vello 1992) até a obtenção de plantas  $F_{4[8]}$  dos 44 cruzamentos óctuplos.

As populações sintetizadas foram avaliadas em vários anos agrícolas e localidades do município de Piracicaba.

Em conjunto com a EMBRAPA, 409 progênies escolhidas foram testadas para reação a doenças, sendo selecionadas 11 linhagens com resistência ao NCS e 4 linhagens possuem resistência ao cancro-da-haste da soja.

A seguir, um dialeto parcial 5 X 8 foi constituído, reunindo cinco parentais resistentes a NCS e oito parentais com alto teor ou produtividade de óleo. Cruzamentos entre os dois grupos originou 40 cruzamentos biparentais, que foram avançados até  $F_2$  por SHDT e avaliados em três épocas de semeadura para caracteres agronômicos e teor de óleo.

O teor de óleo foi quantificado em espectrômetro de ressonância nuclear magnética (NMR), com base no peso secoda matéria seca. A produtividade de óleo (PO) foi estimada pela relação:

$$PO = \% OL \times PG : 100$$

na qual, PG é a produtividade de grãos.

A análise da capacidade de combinação obedeceu ao modelo de Griffing adaptado por Geraldi & Miranda-Filho (1998) para dialeto parcial.

## **X) Resultados**

O desempenho dos cruzamentos óctuplos pode ser visualizado na tabela 1:

Tabela 1- Distribuição observada para PO (produtividade de óleo) de progênies  $F_{5:3|8|}$  selecionadas para caracteres agronômicos na geração anterior. Número (NC) e porcentagem (%C) de cruzamentos óctuplos [8]. Porcentagem média de seleção entre progênies dentro de cruzamentos (P%). Número total de progênies mantidas (NTP) e número médio de progênies mantidas por cruzamento (NPC).

<b>PO Kg/ha</b>	<b>NC</b>	<b>%C</b>	<b>P%<sup>D</sup></b>	<b>NTP</b>	<b>NPC<sup>C</sup></b>
345 a 424	5	11	35	66	13
425 a 464	3	7	41	52	17
465 a 504	5	11	47	110	22
505 a 544	11	25	25	177	9
545 a 584	11	25	25	99	19
585 a 624	5	11	41	94	19
625 a 664	2	5	48	49	24
665 a 707	2	5	28	24	12

Vale lembrar que como a média das testemunhas de alto óleo é de 423 kg/ha, existem 24 progênies com PO na classe de 665 a 707 kg/ha, produzindo no mínimo 57% a mais do que as testemunhas. Serão portanto, objetos dos próximos estudos.

## **XI) Conclusão**

No primeiro ciclo de seleção recorrente, os cruzamentos óctuplos forma eficientes em originar alta frequência (38%) de progênies superiores em PO. A superioridade das progênies em PO foi mais dependente da PG do que da % OL. No início do segundo ciclo, três parentais destacaram-se com valores superiores de capacidade geral de combinação ( $g_i$ ) para PO: USP 1-19, USP 8-

13 e USP 93-5884. Oito cruzamentos foram selecionados ( $p = 20\%$ ) com altos valores de PO, em função principalmente da superioridade dos parentais em termos de g. O cruzamento Hartwig x USP 93-5884 destacou-se com excepcional capacidade específica de combinação para PO maior precocidade.

## **XII) Bibliografia consultada**

HAMAWAKI, O. T. Potencial de progênies selecionadas em cruzamentos óctuplos de soja com ênfase na produtividade de óleo. Piracicaba, 1998. 128 p. Tese (Doutorado) - ESALQ/USP.

VELLO, N. A.; HIROMOTO, D. M.; YORINORI, J. T.; FERREIRA, B. M.; BOOTAN, A. J.; KIIHL, R. A. S. USP01 A USP11: novas linhagens de soja resistentes ao nematóide de cisto, cancro da haste e mancha olho-de-rã. Revista Brasileira de Genética, v.17, p. 362, 1994. Supplement, 40º Congresso Nacional de Genética.

**Anexos** (caso haja, mas em folha separada)

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

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE PESQUISA**  
**Caracterização de linhagens**  
**de *Xanthomonas albilineans***

Fábio Henrique Bicudo da Silva

Piracicaba, novembro de 1999.



Nome

Fábio Henrique Bicudo da Silva

Orientador

Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

Co-orientadores

Dra. Keila Maria Roncato Duarte

Dr. Luiz Humberto Gomes

Departamento

Departamento de Genética/Laboratório de Genética de Leveduras

Período do Estágio

De agosto de 1997 até o momento.

Título

Caracterização de diferentes linhagens de *Xanthomonas albilineans*, bactéria causadora da escaudadura da cana-de-açúcar, por Isoenzimas, SDS-PAGE e RAPD.

Resumo

A bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson da família *Pseudomonadaceae* é agente causal da escaudadura da cana-de-açúcar e é encontrada em mais de 57 países, onde a cana-de-açúcar é cultivada comercialmente. Comparou-se 12 (doze) linhagens de *Xanthomonas spp.*, sendo 1 (uma) *X. albilineans* isolada de planta doente, 1 (uma) *X. albilineans* cedida pela COPERSUCAR, 1 (uma) *Pseudomonas*, 1 (uma) *Erwinia* e 8 (oito) linhagens de *Xanthomonas* de origens diversas.

Para o método de ISOENZIMAS, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e ressuscendidas em 1,5 mL de PBS. Adicionou-se 50µL de PMSF e congelou-se. As amostras foram colocadas em gel de acrilamida, segundo DAVIS e coradas com  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase. Para o SDS PAGE, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, ressuscendidas em 1,5 mL de água destilada e posteriormente fervidas por 5 min. em Tampão de Amostra. Um gel de 16cm x 1mm de espessura foi feito de acordo com Laemmli (1970) e corado com prata. Para a diferenciação pelo método de RAPD, o DNA das linhagens foi extraído e as ampliações foram feitas em volume de 25µL contendo 20mM de Tris-HCL, pH 8.4, 50 mM de KCL, 3.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µL de cada um dos 4 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 de 3 minutos a 72°C. Após o término da amplificação os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% e corado com Brometo de etídio.

Os resultados obtidos pelos métodos SDS-PAGE e RAPD permitem distinguir as linhagens de *Xanthomonas* mesmo havendo alto grau de parentesco, mostrado através do dendograma de similaridade genética (NTSYS v.1,7), porém pelo método de isoenzimas tal distinção não foi possível.

## Introdução

A bactéria *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dawson da família *Pseudomonadaceae* é agente causal da escaldadura da cana-de-açúcar e é encontrada em mais de 57 países, onde a cana-de-açúcar é cultivada comercialmente (ROTT et al, 1995). Os principais sintomas da doença são as folhas queimadas e os colmos atrofiados, o que confunde o diagnóstico com o do “raquitismo da soqueira”, causado pela bactéria *Clavibacter michiganensis*. Este fato torna os diagnósticos ineficientes e os danos em variedades susceptíveis podem chegar à 100 %. A propagação da *X. albilineans* pode ser por sementes contaminadas, ferramentas de cultivo da cultura, rats, etc. Em casas de vegetação a propagação pode ser feita via irrigação (Klett & Rott, 1994)..

Diferentes metodologias de caracterização podem ser aplicadas para esta bactéria, no entanto todas elas apresentam suas limitações e vantagens. No presente trabalho buscou-se efetuar uma comparação entre métodos laboratoriais, fenotípicos e genéticos, de considerável rapidez, utilizando-se linhagens de *Xanthomonas* e outras espécies aparentadas.

Comparou-se 12 (doze) linhagens de *Xanthomonas spp.*, sendo 1 (uma) *X. albilineans* isolada de planta doente, 1 (uma) *X. albilineans* cedida pela COPERSUCAR, 1 (uma) *Pseudomonas*, 1 (uma) *Erwinia* e 8 (oito) linhagens de *Xanthomonas* de origens diversas.

Os métodos comparados foram: ISOENZIMAS segundo DAVIS, SDS-PAGE segundo Laemmli (1970) e RAPD.

## Objetivo

O objetivo do trabalho foi comparar diferentes metodologias de caracterização de microorganismos de alto grau de parentesco.

## Metodologia

Para o método de ISOENZIMAS, as amostras foram obtidas segundo descrito por in Gomes et al. (2000), maceradas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 1,5 mL de PBS.

Adicionou-se 50µL de PMSF e congelou-se. As amostras foram colocadas em gel de acrilamida, segundo DAVIS e coradas com  $\alpha$  e  $\beta$ -esterase.

Para o SDS PAGE, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, ressuspendidas em 1,5 mL de água destilada e posteriormente fervidas por 5 min. em Tampão de Amostra. Um gel de acrilamida 10% de 16cm x 1mm de espessura foi feito de acordo com Laemmli (1970). Um marcador de peso molecular (Pharmacia, LMW 17-0446-01) foi usado. O gel foi corado com prata como descrito por Gomes et al. (2000). Os geis foram fotografados e analisados pelo programa KODAK Photo Imaging System e a relação entre as bandas foi determinada por UPGMA usando-se “single mating coefficient” de SDS-PAGE datas (Rohel, 1992).

Para a diferenciação pelo método de RAPD, o DNA das linhagens foi extraído e as ampliações foram feitas em volume de 25µL contendo 20mM de Tris-HCL, pH 8.4, 50 mM de KCL, 3.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µL de cada um dos 4 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 de 3 minutos a 72°C. Após o término da amplificação os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% e corado com Brometo de etídio.

## Resultados

Os resultados foram publicados nos seguintes:

Silva, F.H.B.; Paschoal, J.A.R.; Duarte, K.M.R.; Gomes, L.H.; Tavares, F.C.A. Caracterização de linhagens de *Xanthomonas albilineans*, bactéria causadora de escaldadura da cana-de-açúcar, por SDS-PAGE e isoenzimas 7<sup>o</sup> SICUSP, Piracicaba, 9 a 10 de novembro de 1999. **CD-ROOM - Resumo**, n.1.27.

Silva, F.H.B.; Paschoal, J.A.R.; Duarte, K.M.R.; Gomes, L.H.; Tavares, F.C.A. Diferenciação de linhagens de *Xanthomonas albilineans*, bactéria causadora da escaldadura da cana-de-açúcar, por SDS PAGE e RAPD. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador, 24 a 28 de outubro de 1999. **Resumo**, MB-007, p.174.

## Conclusão

Conclui-se com os resultados obtidos, que os métodos SDS-PAGE e RAPD permitem distinguir as linhagens de *Xanthomonas* mesmo havendo alto grau de parentesco,

mostrado através do dendograma de similaridade genética (NTSYS v.1,7), sendo eficientes na caracterização destes microorganismos.

O método de isoenzimas não permitiu a distinção dos microorganismos, mesmo quando de gêneros diferentes, sendo portanto uma metodologia ineficiente para a caracterização deste microorganismos.

#### Bibliografia

- GOMES, L.H.; DUARTE, K.M.R.; ARGUESO, J.L.; ECHEVERRIGARAY, S.; TAVARES, F.C.A. Methods for yeast characterization from industrial products. **Food Microbiology**, v. p. 2000.
- KLETT, P., ROTT, P.. Inoculum sources for the spread of leaf scald disease of sugarcane caused by *Xanthomonas albilineans* in Guadeloupe. **Journal of Phytopathology**, v. 142, p. 283 - 91, 1994.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.224, p. 680-5, 1970.
- ROTT, P.; SOUPA, D.; BRUNET, Y.; FELDMANN, P.; LETOURMY, P.. Leaf scald (*Xanthomonas albilineans*) incidence and its effect on yield in seven sugarcane cultivars in Guadeloupe. **Plant Pathology**, v. 44, p. 1075 - 84, 1995.

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

**PET AGRONOMIA – BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE PESQUISA**

**“DETECÇÃO DE FITOPLASMAS EM DIFERENTES ESPÉCIES  
VEGETAIS”**

**Juliana Abreu Giacomeli**

**1999**

**I) Nome**

Juliana Abreu Giacomeli

**II) Orientador**

Ivan P. Bedendo

**III) Departamento**

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola

**IV) Período do Estágio**

A partir de Setembro/1998

**V) Título**

Deteccção de Fitoplasmas em diferentes espécies vegetais.

**VI) Resumo**

É feita uma atualização sobre as diferentes espécies vegetais que são atacadas por organismos do tipo fitoplasma, transmitidos por cigarrinhas e alguns psílídeos.

**VII) Introdução**

Micoplasmas são microorganismos causadores de doenças de plantas do tipo PPLO (=pleuropneumonia - "like organisms") em bovinos e caprinos.

Micoplasma em planta, foi descoberto em 1967, por um grupo de pesquisadores japoneses da Universidade de Tóquio. Eles obtiveram evidências de que certas doenças de plantas, conhecidas por amarelos, até então consideradas de etiologia viral, eram causadas por microorganismos semelhantes aos micoplasmas encontrados em animais, denominados MLOs.

Após anos de estudo, esses microorganismos, presentes no floema de plantas, passaram a ser chamados de fitoplasmas (1994). São organismos

unicelulares, procariotos e não possuem parede celular, apresentando assim, um alto grau de pleomorfismo.

As doenças atribuídas aos fitoplasmas são caracterizadas por uma série de anormalidades relacionadas com o crescimento e desenvolvimento da planta, sugerindo a ocorrência de profundos distúrbios no balanço hormonal, atingindo uma enorme gama de espécies de hospedeiros naturais e insetos vetores.

A observação cuidadosa dos sintomas continuará sendo uma etapa preliminar importante para detecção e identificação de fitoplasmas, porém a existência de hospedeiros que não exibem sintomas, a presença de infecção provocada por mais de um fitoplasma em único hospedeiro e a ocorrência de insetos vetores ainda desconhecidos, enfatizam a necessidade de métodos sensíveis, rápidos e seguros que permitam a detecção de fitoplasmas.

A detecção em plantas visa evidenciar a natureza do possível agente etiológico associado a um determinado quadro sintomatológico exibido pela planta doente.

Vários métodos e testes têm sido empregados na tentativa de se detectar a presença de fitoplasmas em plantas. Entre eles, podem ser citados a coloração DAPI, secções ultrafinas em microscopia eletrônica, a serologia, as técnicas moleculares utilizando DNA, os métodos biológicos de transmissão por enxertia e por insetos vetores e o uso de antibióticos visando a remissão da doença.

O uso recente de PCR (Reação em cadeia por Polimerase) para detecção de fitoplasma, combina as vantagens da serologia com a alta sensibilidade do PCR baseado no DNA.

A identificação permite diferenciar ou reunir em grupos os fitoplasmas com características divergentes ou comuns, envolvendo o uso de metodologias

mais complexas e sensíveis como a serologia e as técnicas de homologia de DNA (PCR; RFLP).

Os sintomas mais comumente associados aos fitoplasmas manifestam-se na forma de clorose, redução do tamanho das folhas, superbrotamento ou proliferação de brotações (vassoura-de-bruxa), deformação de órgãos florais, como gigantismo do cálice e redução do tamanho das flores, esterilidade de flores, enfezamento da planta, necrose do floema e declínio generalizado.

Dois sintomas em particular estão associados aos fitoplasmas: a virescência (desenvolvimento de cloroplastos nas pétalas resultando em flores verdes) e a filodia (transformação de órgãos florais em estruturas foliares), resultante de distúrbios hormonais causados pelos fitoplasmas.

Até o momento não foi possível cultivar fitoplasmas em meio de cultura, implicando na impossibilidade de conduzir testes de patogenicidade para provar que estes microorganismos são agentes causais de doenças. Mesmo assim, são constantemente detectados em plantas sadias (da mesma espécie das doentes).

Fitoplasmas têm sido resistentes a sulfa, penicilina e acetato de tálio. Por outro lado, fitoplasmas são sensíveis a numerosas substâncias relativamente inócuas a outros microorganismos como água destilada, solução fisiológica, íons metálicos, detergentes, água oxigenada (provavelmente por causa da ausência da catalase), etc.

Alguns compostos arseniacaisorgânicos têm propriedades terapêuticas. Um estudo extensivo dos efeitos dos diferentes antibióticos sobre os fitoplasmas, mostraram que a tetraciclina foi a mais eficiente em inibir o crescimento das colônias de fitoplasmas.



## **VIII) Objetivos**

A associação de corpúsculos do tipo fitoplasma, tanto em material vegetal como no inseto vetor com doenças do tipo amarelo, determinada pela microscopia eletrônica e a sensibilidade do agente causal, a tetraciclina, têm sido verificada literalmente em todo o mundo.

A aceitação do fitoplasma como agente etiológico de numerosas doenças de plantas, até então tidas como virais, deverão alterar certos conceitos estabelecidos em virologia vegetal.

O presente trabalho visa a identificação do maior número possível de plantas atacadas por este patógeno.

## **IX) Material, métodos e desenvolvimento**

O trabalho está sendo realizado com dezessete amostras de extratos de DNA de plantas supostamente infectadas por fitoplasmas, entre elas, Pimenta, Hortelã, Vinca, Orquídea e Ingá.

No trabalho esta sendo utilizado como padrão positivo, uma amostra de milho sabidamente infectada por fitoplasma, e como controle, de que não houve contaminação, água mQ.

Para se obter as amostras que posteriormente serão analisadas em técnica de PCR, faz-se a extração de DNA do fitoplasma, utilizando o tampão de extração 2XCTAB, na quantidade de 800 $\mu$ L para cada extração, juntando-o à 50-200mg de tecido fresco da planta macerado com Nitrogênio líquido. Os tubos de extração são então incubados 65°C por no mínimo 30 minutos.

Em capela de exaustão, adicionar 600 $\mu$ L de CIA 24:1, solvente orgânico, agitando até formar uma emulsão homogênea. Então os tubos são

centrifugados em microcentrífuga a velocidade máxima por 5 minutos. Quando retirar os tubos da microcentrífuga, deve-se fazê-lo cuidadosamente para não perturbar a interface entre as duas fases formadas. Pipeta-se a fase superior (aquosa) para um novo tubo e adiciona-se 10% do volume de uma solução 10% CTAB, 1,4M NaCl, Misturando bem até homogeneizar a solução, e repetir a extração com 600µL CIA e retirar novamente a fase aquosa superior para um novo tubo.

Adiciona-se 2/3 do volume da solução aquosa de isopropanol gelado (-20°C). Colocar a mistura no gelo por dez minutos e centrifugar a velocidade máxima por 8 minutos. Gentilmente descarta-se o sobrenadante sem perder o pelete. Este é lavado duas vezes em 1mL de etanol 70% por 5 minutos cada vez. O pelete é seco ao ar sobre toalha de papel e então ressuspenso em 100µL de água mQ.

Terminada a extração do DNA de fitoplasmas são feitas diluições 1:5; 1:10; 1:20; 1:50; 1:100 e 1:200 para a realização da técnica do PCR.

Para se fazer o PCR utiliza-se água mQ, Buffer 10X, dNTP, Primer (mR1 e mF2 quando for PCR simples, e F2N e R2, quando for PCR Nested) e Amplitaq mais a amostra que se quer analisar.

O material é posto no termociclador por aproximadamente 5 horas, onde ocorrerá 35 ciclos e em cada ciclo ocorre a denaturação, o anelamento e amplificação de um determinado fragmento de DNA.

Quando o material sai do termociclador pode-se fazer a eletroforese do material em gel de agarose 1%, com padrões positivos de material de milho.

## **X) Resultados**

Ainda não foram obtidos todos os resultados, mas já sabe-se que os materiais de Pimenta das cidades de Jaboticabal, de Monte Alegre do Sul e de Piracicaba, e o material de Vinca de Santa Catarina estão infectados.

## **XI) Conclusão**

## **XII) Bibliografia consultada**

Davis, R. E. & Bedendo, I. P. 1997. Identificação Molecular do Fitoplasma Associado ao Enfezamento Vermelho do Milho. Fitopatologia. ESALQ - USP. Piracicaba. 12p.

Davis, R. E. 1995. Fitoplasmas: Fitopatógenos Procarióticos sem Parede Celular Habitantes do Floema e Transmitidos por Artrópodes. Fitopatologia. RAPP - Volume 3. 27p.

Kitajima, E.W. & Costa, A.S. 1970. Micoplasma: Possível Agente Etiológico de Certas Moléstias de Plantas. Virologia. Instituto Agronômico de Campinas, São Paulo. Ciência e Cultura. Volume 22 nº.4. 13p.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**  
**PET AGRONOMIA – BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO E PESQUISA**

“Estudo do cruzamento de duas linhagens de *Trichoderma pseudokoningii* através de caracterização nos meios seletivos”

Aluno: Rodrigo Mendes  
Orientador: Profa. Dra. Aline Pizzirani-Kleiner

Dezembro de 1999.

## **I – NOME**

Rodrigo Mendes

## **II – ORIENTADOR**

Profa. Dra. Aline Pizzirani-Kleiner

## **III – DEPARTAMENTO**

Depto. de Genética

## **IV – PERÍODO**

Início: 19 de abril de 1999

Estágio em andamento

## **V – TÍTULO**

Estudo do cruzamento de duas linhagens de *Trichoderma pseudokoningii* através de caracterização em meios seletivos.

## VI – RESUMO

Fez-se o cruzamento de duas linhagens do fungo *Trichoderma pseudokoningii*, linhagem 1 (*white*) com marcas auxotróficas, leusina e lisina e linhagem 2 (*green*) com marcas ácido nicotínico e metionina.

## VII – INTRODUÇÃO

Existe um grande interesse econômico no aproveitamento de resíduos celulósicos através da transformação em carboidratos e de carboidratos em açúcares simples fermentescíveis, visando a obtenção de combustíveis líquidos, materiais alimentares e produtos químicos, além de outras aplicações.

A transformação química da celulose para açúcares fermentescíveis pode ser realizada através de duas vias, através de hidrólise enzimática ou através de hidrólise ácida utilizando ácido acético, essa última tem uma barreira econômica devido a utilização de ácido acético em grande quantidade, portanto se tem a necessidade de utilizar a via de hidrólise por enzimas celulásicas, então procura-se um gênero que produza enzimas para celulose e em grande quantidade, e é o que se tem observado no gênero *Trichoderma*, essa espécie foi isolada na região amazônica do Brasil.

## VIII – OBJETIVO

Estudar o fungo *Trichoderma pseudokoningii* através do cruzamento de duas de suas linhagens, afim de esclarecer os ciclos de reprodução verificando seu comportamento no cruzamento analisando seus segregantes obtidos por recombinação, crossing-over mitótico, anastomose de hifas ou fusão de protoplastos.

## IX – MATERIAIS , MÉTODOS E DESENVOLVIMENTO

Composição dos meios de cultura utilizados.

MM - meio mínimo (PONTECORVO et al,1953)

NaNO <sub>3</sub>	6,0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5g
KCl	0,5g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,5g
FeSO <sub>4</sub>	0,01g
ZnSO <sub>4</sub>	0,01g
Glicose	10,0g
Ágar	15,0g
H <sub>2</sub> O	1000mL
pH	6,8 (NaOH 1N)

MC – meio completo (PONTECORVO et al, 1953)

MM

Peptona

Extrato de levedura

Caseína hidrolisada

Solução de vitaminas

Ágar

pH 6,8 (NaOH 1N)

Porções iguais de esporos de cada colônia das duas linhagens são colocadas com uma pinça num tubo de ensaio contendo MM mais 4% MC, para a obtenção do heterocário que é cultivado em MM por 7 dias a 28°C, os esporos parentais e recombinantes são colocados numa solução de *tween* e contados na câmara de Neubauer, a partir do número conhecido de esporos por mL dilui-se em concentrações conhecidas para se obter um número de colônias entre 20 e 30 nas placas do meio de cultura.

As diferentes concentrações são plaqueadas em MC mais 0,1% de desoxicolato de sódio, que atua como redutor de colônia. As concentrações plaqueadas foram:

$1,8 \cdot 10^3$  conídios /mL

$1,8 \cdot 10^2$  conídios/mL

$3,6 \cdot 10^2$  conídios/mL

numa quantidade de 100µL por placa.

As colônias obtidas são inoculadas em placas mestras de 26 pontos, essas colônias são inoculadas em meios seletivos, os meios analisados são:

Meio completo

Meio mínimo

Meio mínimo + leu + lys + met + nic

Meio mínimo + leu + lys + met

Meio mínimo + leu + lys + nic

Meio mínimo + leu + met + nic

Meio mínimo + lys + met + nic



## **X – RESULTADOS**

O trabalho está na fase de inoculação das colônias obtidas para os segregantes serem analisados nos meios seletivos, portanto logo serão obtidos os primeiros resultados.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"  
ESALQ / USP**

**PET AGRONOMIA – BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA**

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE PESQUISA**

***"Título"*  
ACOMPANHAMENTO DO TRABALHO SOBRE "ELETROFORESE  
DE PROTEÍNAS EM "FISCHERELLA CENA-19"**

**Nome**

**Simeire Aparecida Manarin**

**05/12/1999**

**I)Nome**

Simeire Aparecida Manarin

**II) Orientador:**

Augusto Etchegaray

**III)Departamento:**

Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)

**IV)Período do Estágio**

Início em agosto de 1999

**V)Título**

“Eletroforese de proteínas em *Fischerella sp*”

## **VI) Introdução**

Células de cianobactérias foram isoladas de sedimentos de rios da Amazônia em áreas normalmente alagadas durante as cheias. Elas foram purificadas e uma linhagem identificadas como *Fischerella* CENA-19. Foi escolhida para se estudar a produção de algicidas naturais baseando-se nas propriedades da *Fischerella muscicola* que produz compostos inibidores de fotossíntese, portanto com propriedades algicidas e/ou herbicidas, projeto de estudo Dr. Augusto EtcheGARAY CENA-USP.

Está-se estudando a produção de compostos conhecidos como fischerelinas (algicidas naturais) e sua biossíntese. Para estudar a biossíntese, estamos procurando uma enzima de peso molecular em torno de 140kDa através de eletroforese de proteínas e Western-Blot, utilizando-se anticorpos específicos para sintetases de peptídeos e demais enzimas relacionadas.

## **VIII) Objetivos**

O trabalho tem como objetivo identificar genes envolvidos na biossíntese de fischerelinas para estudos futuros de biotecnologia da produção algicidas/herbicidas naturais.

## **IX) Material, métodos e desenvolvimento**

Para se obter as células de *Fischerella* sp, fez-se uma cultura de 15l. Desta retirou-se 40ml aos 7, 10, 14, 17 e 21 dias. Centrifugou-se o material. Liofilizou-se o precipitado e obteve-se:

Extratos	Peso seco
1) 7 dias	5.2 mg
2) 10 dias	5.6 mg
1) 14 dias	12.8 mg
2) 17 dias	16.1 mg
3) 21 dias	20.4 mg

As células foram moídas em eppendorfs com bastão de vidro. Colocou-se TpA contendo DNase I (razão 10x - 10µl/ mg). As células foram sonicadas e o sobrenadante tratado com sulfato de amônio saturado, fracionando proteínas até 45% de saturação. Dissolve novamente o precipitado de proteínas.

#### GEL

##### Gel de Corrida (6ml) 5%

	ml
AA/ Bis (30%/ 0.8%)	1.00
H <sub>2</sub> O	2.25
1 M Tris / HCl, pH 8.8	2.66
TEMED ( catalisador)	0.006 – 10 µl
SDS ( 10%)	0.060
APS (10%)	0.025

##### Gel de empilhamento (3.5ml) 4%

	ml
Bis (30 %/ 0.8 %)	0.47
0.5 M Tris/ HCl, pH 6.8	0.88
H <sub>2</sub> O	1.92
TEMED	5 µl
SDS (10%)	35 µl
APS (1%)	200µl

## **X) Resultados**

Obteve-se uma proteína de peso molecular próximo ao esperado, porém, ainda faltam estudos sobre esta proteína.

## **XI) Conclusão**

Dos resultados obtidos, ainda não se obteve conclusão.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"  
ESALQ / USP

PET AGRONOMIA – BIOTECNOLOGIA AGRÍCOLA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE PESQUISA

Estudo da interferência de Potyvirus na transmissão do vírus do mosaico do pepino (CMV) por *Myzus persicae* em cucurbitáceas

Zayame Vegette Pinto

1999

## **I) Nome**

Zayame Vegette Pinto

## **II) Orientador**

Prof. Dr. Jorge A. M. Rezende

## **III) Departamento**

Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola

## **IV) Período do Estágio**

1999

## **V) Título**

Estudo da interferência de Potyvirus na transmissão do vírus do mosaico do pepino (CMV) por *Myzus persicae* em cucurbitáceas

## **VI) Resumo**

A abobrinha de moita cultivar Caserta (*Cucurbita pepo* L.) pertence à família *Cucurbitacea*, a qual tem elevado valor econômico e social na horticultura e alimentação mundial, pois é tida como fonte de empregos devido a alta demanda de mão-de-obra do cultivo até a comercialização. Além disso, é fonte de pró-vitamina A e carboidratos (amido). No Brasil, são empregadas na alimentação humana e animal, e são muito utilizadas na indústria de doces.

As Cucurbitáceas em geral estão sujeitas a doenças causadas por vírus, sendo oito relatados no Brasil até 1995, destacando-se o "*Papaya ringspot virus - type W*" (PRVS-W) e o "*Cucumber mosaic virus*" (CMV). Estes vírus em abobrinha italiana tem como principal agente de transmissão os afídeos, sendo muito eficiente a espécie *Myzus persicae*.

No presente trabalho procurou-se investigar se durante a transmissão por pulgão, um vírus pode interferir na transmissão do outro. Para isto foram



feitos experimento com três repetições de cada tratamento, os quais foram compostos por diferentes combinações de inoculações por afídeo com um potyvívus (PRSV) e um cucumovírus (CMV) em abobrinha de moita 'Caserta'.

## VII) Introdução

A família Cucurbitaceae é constituída de cerca de 80 gêneros e mais de 800 espécies. Dentre essas, várias são de grande valor econômico e social na horticultura alimentar mundial. No Brasil, as espécies com maior expressão econômica pertencem aos gêneros *Cucurbita* (abóbora, abobrinha e moranga), *Cucumis* (pepino, melão e maxixe), *Citrullus* (melancia), *Sechium* (chuchu) e *Lagenaria* (cabaça caxi). Segundo LOPES (1991), o cultivo das cucurbitáceas, além do valor econômico e alimentar, também tem grande importância social, na geração de empregos diretos e indiretos, pois demanda um grande número de mão de obra desde o cultivo até a comercialização.

As cucurbitáceas em geral estão sujeitas a várias doenças causadas por vírus, que podem reduzir substancialmente a sua produtividade. Mais de 20 vírus diferentes já foram encontrados na natureza infectando plantas dessa família ( LOVISOLO, 1980). Desses, oito foram encontrados no Brasil até 1995; o vírus do mosaico da abóbora ("*Squash mosaic virus*"- SqMV) (CHAGAS, 1970); o vírus do mosaico do pepino ("*Cucumber mosaic virus*"- CMV) (COSTA *et al.*,1972); o vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia ("*Papaya ringspot virus - type W*") (ALBURQUERQUE *et al.*,1972) ; o vírus da clorose letal da abobrinha ("*Zucchini lethal chlorosis virus*") (KITAJIMA & COSTA, 1972; POZZER *et al.*,1994; REZENDE *et al.*, 1995); o vírus da necrose da abóbora ( provável Necrovirus) ( LIN *et al.*, 1983); o vírus do mosaico da melancia 2 ("*Watermelon mosaic virus*"- WMV-

2) ( SÁ & KITAJIMA, 1991), um possível Rhabdovirus ( KITAJIMA *et al.*, 1991) e o vírus do mosaico amarelo da abobrinha ("*Zucchini yellow mosaic virus*" - ZYMV) (VEGA *et al.*, 1992. 1995).

Estudos recentes sobre a incidência de vírus infectando cucurbitáceas no Estado de São Paulo indicam que os mais freqüentemente encontrados foram o PRSV-W e o ZYMV, com incidências médias de 48,3% e 24,5%, respectivamente, de um total de 614 amostras analisadas. ZLCV, CMV e WMV-2 foram detectados em 7,7; 5,9 e 4,4% das amostras, respectivamente (YUKI *et al.*, 1999). Na região do Sub-médio do São Francisco, envolvendo os Estados da Bahia e Pernambuco, constatou-se que os vírus mais freqüentes em melão e melancia foram o WMV-2 e o PRSV-W, com incidência de 68,7 e 31,2%, respectivamente (CRUZ *et al.*, 1999)

Entre os vírus encontrados infectando cucurbitáceas em São Paulo, três Potyvirus ( PRSV-W, ZYMV e WMV-2) e um Cucumovirus (CMV) são transmitidos por diversas espécies de afideos de maneira não persistente. Entre os Potyvirus, os que ocorrem com maior freqüência são o PRSV-W e o ZYMV, que são vírus restritos a cucurbitáceas. O CMV, apesar de ser transmitido da mesma maneira e possuir um círculo de hospedeiras com mais de 800 espécies vegetais foi um dos que apresentou menor incidência em cucurbitáceas no Estado de São Paulo. Vários podem ser os fatores que contribuem para essas diferenças, entre eles a interação entre os vírus nos processos de aquisição e/ou de transmissão pelos afideos vetores, o que será motivo de investigação neste trabalho.

### **VIII) Objetivo**

Estudar a possível interferência do PRSV-W na transmissão do CMV pelo afideo *Myzus persicae* em plantas de abobrinha de moita.

## **IX) Material, métodos e desenvolvimento**

Local da execução: Os testes foram conduzidos na casa de vegetação e laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba (ESALQ/USP).

Planta teste: Foram utilizadas plantas de abobrinha de moita (*Cucurbita pepo* L. cv Caserta). As sementes foram feitas a intervalos de 15 a 20 dias em vasos de alumínio, de 16 cm de altura por 14,5 cm de diâmetro de boca, cheios de terra misturada com composto de matéria orgânica, contendo três sementes por vaso. As plantas foram semanalmente adubadas com uma pequena quantidade de sulfato de amônia por vaso.

Isolado de Vírus: Neste estudo foram utilizados isolados do complexo normal de Potyvirus ( PRSV-W) e de um Cucumovirus (CMV). Todos foram mantidos separadamente em abobrinha de moita em casa de vegetação.

Inoculação mecânica: Os inóculos do PRSV e do CMV foram obtidos a partir de plantas infectadas pelos vírus, macerando-as em almofariz de porcelana, em presença de tampão fosfato de potássio 0,02M, pH 7,0, acrescido de sulfito de sódio até atingir a mesma molaridade.

As inoculações foram feitas geralmente nas folhas cotiledonares, previamente polvilhadas com carborundo malha 320, que funciona como abrasivo, friccionando-se aquelas com o indicador umedecido na solução de inóculo. Em seguida as folhas serão lavadas com água para retirar o excesso

de abrasivo e inóculo existentes.

Vetor: Como vetor foi utilizado *Myzus persicae*. A colônia inicial foi obtida no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC- Campinas) e foi mantida em plantas de mostarda e/ou nabiça . As plantas foram mantidas em gaiola à prova de insetos, em condição de casa de vegetação.

Transmissão com afídeos vetores : Os afídeo foram removido das folhas de nabiça e/ou mostarda utilizando um pincel fino e macio, passando levemente sobre os afídeos . Estes, após coletados, foram mantidos em jejum numa caixa plástica por um período de aproximadamente 30 minutos. A seguir os afídeos s foram colocados sobre plantas de abobrinha de moita “Caserta”, infectadas com isolados dos vírus a serem estudados. O período de aquisição foi de aproximadamente 20 minutos. Em seguida, os afídeos foram transferidos para plantas testes de abobrinha de moita “Caserta” em estágio cotiledonar em número de 5 afídeos por planta.

Uma hora depois foi feita a pulverização com um aficida, para matar os afídeos ainda presentes e as plantas foram mantidas casa de vegetação para posteriores avaliações.

Testes de interferência: Para avaliar o efeito do Potyvirus na transmissão do CMV foram comparados os seguintes tratamentos:

- (1) plantas inoculadas com afídeos que adquiriram somente o CMV;
- (2) plantas inoculadas com afídeos que adquiriram somente o PRSV-W;
- (3) plantas inoculadas com afídeos que adquiriram o PRSV-W seguido pelo CMV;
- (4) plantas inoculadas com afídeos que adquiriram o CMV seguido

pelo PRSV-W.

As plantas foram mantidas em casa de vegetação para avaliações com base nos sintomas. Em seguida foram feitas avaliações para identificação do(s) vírus presente(s) nas plantas por PTA-ELISA.

PTA- ELISA: A confirmação da infecção foi feita pelo teste de ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay"), do tipo PTA ("Plate Trapped antigen") conforme MOWAT & DAWSON (1987), com as seguintes modificações: a) o conjugado com fosfatase alcalina foi "goat anti-rabbit IgG"(Sigma A-8025); b) o antissoro e o conjugado foram diluídos em Tris-HCl (0,20M; 0,15M NaCl), pH 7,2 e c) o tempo de incubação em cada etapa foi de uma hora. Para esse teste foram utilizados antissoros contra o PRSV-W e o CMV do laboratório de Virologia Vegetal do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Campus de Piracicaba (ESALQ/USP).

## **X) Resultados**

O trabalho teve como dificuldade constante a manutenção da colônia de pulgão, devido a perda da mesma por ação de parasitas (microhimenoptero) Devido a esse fato, somente foi possível a realização de um experimento, cujos resultados estão na tabela 1. Observa-se que nas inoculações com afídeos que só adquiriram o CMV, a eficiência de transmissão foi boa, da ordem de 67%; o mesmo ocorreu com o PRSV-W, a qual foi de 89%.

Nas plantas inoculadas com afídeos que adquiriram o PRSV-W seguido pelo CMV, ocorreu um aumento na percentagem de transmissão do CMV , 78% e não houve transmissão de PRSV-W. Já nas plantas inoculadas com

afídeos que adquiriram o CMV seguido pelo PRSV-W ocorreu uma queda na transmissão de ambos, sendo as percentagens de transmissão, respectivamente, 22% e 33%.

Nas duas inoculações sucessiva ( tratamento (3) e (4) ), o número de infecções mistas, ou seja, planta que adquiriram o PRSV-W e o CMV, foi baixa e idêntica, 11%.

Os dados obtidos não permitem especular sobre o(s) fator(s) que pode (m) estar afetando a transmissão desses vírus quando adquiridos pelo mesmo afídeo. Estudos adicionais estão em andamento.

Tabela 1: Transmissão do PRSV-W e do CMV por *Myzus persicae* em plantas de 'Caserta'.

Trat. *	Inoc./Inf.**			% Transmissão		
	PRSV-W	CMV	PRSV+CMV	PRSV-W	CMV	PRSV+CMV
1	9/0	9/6	9/0	0	67	0
2	9/8	9/0	9/0	89	0	0
3	9/0	9/7	9/1	0	78	11
4	9/3	9/2	9/1	33	22	11

\* Os tratamentos são: (1) plantas inoculadas com afídeos que adquiriram somente o CMV; (2) plantas inoculadas com afídeos que adquiriram somente o PRSV-W; (3) plantas inoculadas com afídeos que adquiriram o PRSV-W seguido pelo CMV; (4) plantas inoculadas com afídeos que adquiriram o CMV seguido pelo PRSV-W.

\*\* Número de plantas inoculadas/ número de plantas infectadas. Confirmação da infecção por PTA-ELISA.

## **XII) Bibliografia consultada**

- BEDENDO, T. P. Vírus. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia** . vol. I, 1995.
- COSTA, C. L. Vetores de vírus de plantas. **RAPP**. 6: 103-171p, 1998.
- FIGUEIRA, F. A. R. Cultura e Comercialização de hortaliças. **Manual de Olericultura**. 2 ed. revisada e ampliada. ed. Ceres, 1981.
- FIGUEIRA, F. A. R. Guia da pequena horta. **A B C da Olericultura**. 4: 142p, 1987.
- LECOQ, H., PITRAT, M. Specificity of the Helper- Component - Mediated Aphid transmission of Three Potyviruses Infecting muskmelon **Phytopathology**. 890-893p, 1985.
- LOTZ, I. M. P. Reação de *Cucurbita pepo* e *C.moschata* a infecção mista do vírus do mosaico do mamoeiro-estirpe melancia com o vírus do mosaico da melancia-2 ou com o vírus do mosaico amarelo da abobrinha. **Dissertação (Mestrado)**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" -USP. 1-4p, 1995.
- MOUSSALLEN, A. A Olericultura no trópico úmido: hortaliças na

Amazônia. 1: 164 -165p, 1985.

MOWAT, W. P.; DAWSON, S. Detection of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. **Journal Virology. Meth.** 15: 233-247, 1987.

NAULT, L. R. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. **Entomological Society of America.** 521-541p, 1997

PAVAN, M.A. Vírus do mosaico da melancia: purificação, viabilidade e distribuição nas principais regiões produtoras de pepino e abobrinha de Minas Gerais. **Dissertação (Doutorado).** Univesidade federal de Viçosa. Viçosa, 1985.

REZENDE, J. A. M. Premunização de duas espécies e um híbrido de Cucurbita para o controle do mosaico causado pelo vírus do mosaico do mamoeiro - estirpe melancia. **Dissertação (Doutorado).** Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-USP, 1996.

SANTOS, C. D. G. Infecção mista pelos vírus do mosaico da melancia e do mosaico do pepino em *Cucurbita pepo* "Caserta". **Dissertação (Mestrado).** Universidade de Viçosa, 1990.

SMITH, K. M. Insect virology. **Academic press. New York,** 195-214p, 1967.

SMITH, K.M. Viruses. **Cambridge University Press.** New York, 74-76p,



1963.

WANG, R. Y., POWELL, G., HARDIE, J., PIRONE, T. P. Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses. **Journal of General Virology**. 1519-1524p, 1998.

YUKI, V.A. Epidemiologia e controle do mosaico (VMM-ME) em abobrinha-de-moita. **Dissertação (Doutorado)**. Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz"-USP. Piracicaba, 1990.